

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA

Katedra analytické chemie

Chirální separace biologicky významných látek pomocí
vysokoučinných separačních metod za využití makrocyclických
antibiotik

Disertační práce

Mgr. Marie Honetschlägerová-Vadinská

Praha 2009

Tato disertační práce byla vypracována na Katedře analytické chemie Přírodovědecké fakulty Univerzity Karlovy v Praze v letech 2005 – 2009.

Prohlášení

Prohlašuji, že všechny výsledky použité a publikované v této disertační práci jsou získány vlastní experimentální činností, pod vedením školitelek doc. RNDr. Zuzany Bosákové, CSc. a doc. RNDr. Evy Tesařové, CSc., a veškerá použitá literatura je citována a uvedena v seznamu literatury.

Dále prohlašuji, že tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání stejného nebo jiného akademického titulu.

V Praze dne 6. července 2009

podpis:

Poděkování

Chtěla bych touto cestou poděkovat svým školitelkám doc. RNDr. Zuzaně Bosákové, CSc. a doc. RNDr. Evě Tesařové, CSc. za odborné vedení při řešení této disertační práce, za jejich cenné rady a připomínky. Dále děkuji všem členům z katedry analytické chemie a fyzikální chemie za jejich ochotu a vstřícnost kdykoli bylo třeba a za vytvoření příjemných pracovních podmínek po celou dobu mého působení na tomto pracovišti.

Tato disertační práce byla finančně podporována Ministerstvem školství, mládeže a tělovýchovy - projektem Centrum 1M06011 a dlouhodobým záměrem MSM 0021620857.

Klíčová slova: vysokoučinná kapalinová chromatografie, kapilární kapalinová chromatografie, chirální separace, β -blokátory, profeny, deriváty chlorofenoxipropanové kyseliny, aminokyseliny s rozvětveným řetězcem, teikoplanin, teikoplanin aglykon

OBSAH

1 Úvod	1
2 Cíl	3
3 Teoretická část	4
3.1 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie	4
3.1.1 Miniaturizace ve vysokoúčinné kapalinové chromatografii	4
3.2 Chiralita	5
3.3 Princip chirální separace	6
3.4 Chirální stacionární fáze	7
3.4.1 Proteinové chirální stacionární fáze	8
3.4.2 Polysacharidové chirální stacionární fáze	9
3.4.3 Pirklovy chirální stacionární fáze.....	10
3.4.4 Cyklodextrinové chirální stacionární fáze.....	10
3.4.5 Chirální stacionární fáze na bázi makrocyclických antibiotik	12
3.4.5.1 Teikoplanin	14
3.4.5.2 Teikoplanin aglykon.....	16
3.4.5.3 Methylovaný teikoplanin aglykon.....	17
3.4.5.4 CSP s různým stupněm pokrytí teikoplaninem.....	18
3.5 Analyzované látky	19
3.5.1 Profeny	20
3.5.2 β -blokátory	23
3.5.3 Chlorofenoxipropanové kyseliny	26
3.5.4 Aminokyseliny s rozvětveným řetězcem	27
4 Experimentální část	29
4.1 Použité přístroje	29
4.2 Příprava pufrů a mobilních fází	30
4.3 Obecné podmínky měření	30
5 Publikované práce	31
5.1 Komentář k publikovaným pracím	31
5.2 Enantioseparace profenů metodou vysokoúčinné kapalinové chromatografie na CSP na bázi teikoplanin aglykonu	32
5.3 Enantioseparace profenů metodou kapilární kapalinové chromatografie	36

5.3.1	Evaluace chirálních kapilárních kolon na bázi teikoplanin aglykonu.....	38
5.3.2	Srovnání chromatografického chování profenů v kapilární kapalinové chromatografii a vysokoučinné kapalinové chromatografii	41
5.4	Porovnání enantioselektivní HPLC separace strukturně odlišných látek na stacionárních fázích s rozdílným pokrytím teikoplaninem	45
5.4.1	Charakterizace obecných vlastností chirálních stacionárních fází (Waltersův test)	45
5.4.2	Aminoalkoholy	47
5.4.3	Chlorofenoxypropanové kyseliny	51
5.4.4	Aminokyseliny s rozvětveným řetězcem	54
6	Závěr.....	59
7	Seznam použitých zkratk.....	61
8	Použitá literatura	63
9.	Publikace.....	67
9.1	Marie Vadinská, Zuzana Bosáková, Eva Tesařová; Study of Enantioseparation Behaviour of Profen NSAIDs on Teicoplanin Aglycone-Based Chiral Stationary Phase by HPLC; 3th International Student Conference „Modern Analytical Chemistry“, Praha, ISBN 80-86238-96-2, 2007, 17-27.....	67
9.2	Marie Vadinská, Zuzana Bosáková, Eva Tesařová, Pavel Coufal, Josef Planeta; LC with a Teicoplanin Aglycone Chiral Sorbent for the Separation of the Enantiomers of Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs; An Evaluation of the Chiral Capillary Columns; Chromatographia 2008, 67, 33-40.....	78
9.3	Marie Honetschlägerová-Vadinská, Simona Srkalová, Zuzana Bosáková, Pavel Coufal, Eva Tesařová; Comparison of Enantioselective HPLC Separation of Structurally Diverse Compounds on Chiral Stationary Phases with Different Teicoplanin Coverage and Distinct Linkage Chemistry; J. Sep. Sci. 2009, 32, 1704-1711.	86

1 Úvod

S chirální diskriminací se setkáváme ve všech biologických systémech, protože živý organismus představuje komplexní soustavu chirálních komponent. Enantiomery mohou mít vlivem rozdílných enantioselektivních interakcí s receptory odlišné účinky. Může se jednat o rozdílnou chuť či vůni, odlišné terapeutické nebo naopak toxické účinky léčiv, rozdílné působení jednotlivých enantiomerů pesticidů aj.¹ Odlišné chování enantiomerů je nejpřísněji sledováno u léčiv. V současné době je sice ještě mnoho léků vyráběno a předepisováno ve formě racemátu, kde pouze jedna forma má požadované terapeutické účinky, zatímco druhá může být označena za izomerní balast, v horším případě může mít nežádoucí vedlejší účinky nebo může být přímo toxická. Nový trend vývoje farmak však směřuje k postupné náhradě racemátu pouze účinným enantiomerem, tzv. „chiral switching“.

V souvislosti s vývojem selektivně působících biologicky aktivních látek je nutné vypracovávat rychlé, selektivní a citlivé enantioseparační metody, ať již pro účely mezioperační kontroly při jejich syntéze, hodnocení komerčních forem preparátů nebo pro potřeby klinických či ekotoxikologických studií.

K separaci stereoizomerů se využívají chromatografické a elektromigrační metody, nejčastěji vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC) a plynová chromatografie (GC). Všeobecně sílí poptávka po vývoji nových metodik pro separaci chirálních látek se promítla i do oblasti miniaturizovaných separačních technik, především do kapilární elektroforézy (CE), micelární elektrokinetické chromatografie (MEKC), kapilární elektrochromatografie (CEC) a sporadicky do kapilární kapalinové chromatografie (cLC). Využití cLC je orientováno převážně na achirální separace. Tento fakt souvisí se skutečností, že zatímco výběr komerčně dostupných kapilárních kolon, naplněných achirálním sorbentem, je dnes prakticky stejně široký jako v případě klasických kolon pro HPLC, chirální kapilární kolony nejsou komerčně dostupné a jsou omezeny pouze na kolony laboratorně připravené.

Dominantní postavení v oblasti chirálních separací (jak vývoje, tak aplikací) zaujímá HPLC, ve které se chirální prostředí potřebné k separaci enantiomerů vytváří za použití chirálních stacionárních fází (CSP)². Hledání vhodné CSP, respektive vhodného chirálního selektoru (CS), schopného zajistit dostatečně stereoselektivní interakce s analyty, je často velmi obtížné vzhledem k tomu, že i strukturně velmi podobné látky mohou vykazovat značně odlišné stereoselektivní chování. Hlavní

směr ve vývoji nových nebo modifikovaných CS resp. CSP je zaměřen na dosažení jejich dostatečné univerzálnosti, umožňující separovat široký okruh i značně strukturně rozdílných látek. K takovým chirálním selektorům patří bezesporu i makrocyclická antibiotika (MA).

2 C1

Náplní této disertační práce bylo sledování retenčního a enantioseparačního chování vybraných biologicky aktivních látek metodami vysokoúčinné kapalinové chromatografie a kapilární kapalinové chromatografie (cLC) s chirálními stacionárními fázemi na bázi makrocyclických antibiotik. Konkrétně se jednalo o studium čtyř skupin strukturně odlišných chirálních analytů (β -blokátory, profeny – nesteroidní antirevmatika, deriváty chlorofenoxypropanové kyseliny (CPPA) a aminokyseliny s rozvětveným řetězcem) v separačních systémech, kde jako chirální selektory (CS) vázané na silikagelovém nosiči sloužily teikoplanin (T) a teikoplanin aglykon (TAG). Pozornost byla soustředěna jednak na vliv modifikace struktury chirálního selektoru (teikoplanin vs. teikoplanin aglykon) na retenci a enantioseparaci vybraných analytů a jednak na vliv pokrytí silikagelového nosiče chirálním selektorem. Dále byla porovnána separace enantiomerů v HPLC s komerčně dostupnými kolonami a v cLC, kde je třeba kapilární kolony připravit. Chirální kapilární kolony byly otestovány a evaluovány.

3 Teoretická část

3.1 Vysokoučinná kapalinová chromatografie

Vysokoučinná kapalinová chromatografie je účinná, citlivá a robustní separační technika. Předností HPLC oproti plynové chromatografii je možnost individuálně ovlivňovat separaci jak změnou stacionární fáze, tak změnou mobilní fáze, která není pouze nosičem analytu, ale sama se podílí na interakcích se stacionární fází a ovlivňuje tak separaci analytů³. Rozdělovací HPLC dovoluje pracovat ve dvou rozdílných systémech - normálním⁴ a reverzním⁵. Při separaci v normálním systému je polarita stacionární fáze vyšší než polarita fáze mobilní, zatímco v reverzním systému je tomu naopak. Již řadu let má HPLC také významné postavení mezi metodami používanými pro dělení enantiomerů.

3.1.1 Miniaturizace ve vysokoučinné kapalinové chromatografii

Vysokoučinné separační techniky se pod neustálým tlakem analytické praxe velmi rychle vyvíjejí. Kromě zdokonalování teorie a instrumentace klasických separačních metod (HPLC, GC) a jejich propojení zejména s hmotnostní spektrometrií (MS), se v instrumentaci postupně přechází na práci v mikro- až nanoměřítku. Mnohé z těchto technik byly přeneseny i do planární čipové podoby. Podle vnitřního průměru kolon se rozlišuje mikrokapalinová chromatografie (mikro-HPLC), kde se používají kolony s vnitřním průměrem 1,0 - 2,1 mm, kapilární kapalinová chromatografie s kolonami o vnitřním průměru 100 - 1000 μm a nanokapalinová chromatografie (nano-LC), jejíž kolony mají vnitřní průměr 25 - 100 μm ⁶.

Miniaturizace přináší oproti konvenční kapalinové chromatografii mnoho výhod, jako je úspora rozpouštědel, která musí být v HPLC vysoce čistá, a tudíž jsou velmi drahá. Nízká spotřeba rozpouštědel vede ke snížení množství odpadů, a díky tomu je metoda cLC šetrnější k životnímu prostředí. Kolony o malém průměru umožňují dosažení vyšší citlivosti detekce, neboť dávkované vzorky jsou malé a jsou zředěny menším objemem mobilní fáze^{7,8}. Celkově menší množství jak mobilní, tak stacionární fáze dovolují širší výběr separačních podmínek. Malý vnitřní průměr kolony a nižší průtoková rychlost mobilní fáze umožňují přímé spojení kapalinového chromatografu s hmotnostním spektrometrem⁹. Další velkou předností je možnost

volit kolonu dostatečně dlouhou, a tím dosáhnout potřebného počtu teoretických pater¹⁰.

Současně jsou však kladeny vyšší požadavky na konstrukci a především minimalizaci mimokolonových mrtvých objemů celého systému, což vede k určitým technickým problémům. Komplikace jsou spojeny především s přípravou kapilárních kolon, jejich efektivním napojením na dávkovací ventil a výstupem kolony na detekční celu, s dávkováním malých objemů a se zajištěním nízkého, avšak stabilního toku mobilní fáze.

Při aplikaci miniaturizovaných LC systémů pro chirální separace na CSP je omezujícím faktorem nedostupnost komerčních kapilárních kolon. Proto se práce zabývající se separací enantiomerů za použití chirálních kapilárních kolon vyskytují v literatuře sporadicky. Byla publikována evaluace laboratorně plněných chirálních kapilárních kolon na bázi derivátů amylosy a celulosy a srovnání jejich použití v cLC a CEC^{11,12}.

3.2 Chiralita

Za chirální sloučeniny jsou považovány molekuly, které nejsou ztotožnitelné se svým zrcadlovým obrazem - nemají střed, osu ani rovinu souměrnosti. Nejjednodušším případem asymetrie a z toho plynoucí chiralitě molekuly je ten, kdy jsou na jednom atomu uhlíku vázány čtyři různé substituenty. Ty je možno prostorově uspořádat dvojím způsobem. Získají se dvě molekuly - enantiomery, které nelze žádnou vnitřní rotací ztotožnit. *R* a *S* konfigurace vychází z prostorového uspořádání molekuly. Uhlíkový atom, nesoucí čtyři různé substituenty, se označuje jako chirální centrum. Kromě uhlíku může být centrem chiralitě atom síry, fosforu, dusíku, aj. Jedná se o prvky ze IV. - VI. skupiny periodického systému. Předpokladem je neplanární struktura se čtyřmi příp. třemi ligandy, kdy pak volný elektronový pár tvoří čtvrtý ligand¹³.

U aminokyselin, peptidů a sacharidů se k rozlišení absolutní konfigurace na chirálním uhlíkovém atomu používá označení *D* a *L* (Fischerova projekce)¹⁴. Aminokyseliny se v organismech vyskytují převážně v *L*-formě. Možným vysvětlením může být jejich vyšší stabilita než jakou vykazuje *D*-forma. Naopak pro sacharidy vyskytující se v živém organismu, např. jako součást glykoproteinů nebo nukleových kyselin, je typická *D*-forma. Původním významem předpon *L*- a *D*- mělo

být kromě souvislosti s prostorovou strukturou i vystižení toho, že každá forma takové chirální látky se chová při vystavení lineárně polarizovanému světlu rozdílně, tj. stáčí jeho rovinu na jednu nebo opačnou stranu¹⁵.

Ekvimolární směs obou enantiomerů se nazývá racemát. Je pro něj typické, že nejví optickou aktivitu. Mezi enantiomery může docházet k interkonverzi, kdy se jeden enantiomer přeměňuje v druhý a naopak. Energie potřebná pro tuto změnu se nazývá racemizační bariéra.

Enantiomery vykazují v achirálním prostředí (rozpuštědlo, stacionární fáze v HPLC, nepolarizované světlo) stejné chemické a fyzikální vlastnosti. V chirálním prostředí se však chovají odlišně a jsou vzájemně rozlišitelné¹⁶.

3.3 Princip chirální separace

Podle způsobu provedení lze chirální separace dělit na přímé a nepřímé. Nepřímé separace probíhají v systému achirálním, ale dělení předchází derivatizace homochirálním činidlem. Vznikají tak diastereoizomery, které jsou následně separovány na nechirální stacionární fázi. Zásadním požadavkem pro úspěch nepřímé separace je chirální čistota derivatizačního činidla. Reakce mezi ním a analytem musí proběhnout zcela, bez následných racemizací nebo epimerací. Důležitá je pro tvorbu stabilních diastereoizomerů vzájemná blízkost chirálních center analytu a chirálního selektoru. Přes některé nevýhody se nepřímá chirální separace používá¹⁷, zejména při analýze biologických tekutin¹⁸.

Přímé separace probíhají v enantioselektivním systému, kdy se využívá tvorby přechodných diastereoizomerních komplexů mezi chirálním selektorem a chirálním solutem. Tento postup nevyžaduje předchozí derivatizaci vzorku. V případě kapalinové chromatografie bývá selektorem chirální stacionární fáze (přesněji chirální selektor je vázán na nosič a vytváří CSP) nebo může být chirální selektor součástí mobilní fáze. Oba tyto způsoby provedení mají své výhody i nevýhody. Výhodami přídavku chirálního selektoru do mobilní fáze je jejich široký výběr, snadná výměna CS, aniž by bylo nutné vyměnit chromatografickou kolonu a použití levnější achirální stacionární fáze. V praxi je však přídavek CS do mobilní fáze méně častý, neboť má řadu omezení – např. omezenou rozpustnost či menší stabilitu chirálního selektoru v mobilní fázi. Chirální selektor může také absorbovat, a tím snižovat citlivost detekce^{19,20}.

Principem chirální separace v HPLC za použití chirální stacionární fáze je rozdílná interakce enantiomerů s chirálním selektorem vázaným ve formě CSP. Jeden enantiomer je kolonou zadržován více, díky vyšší hodnotě konstanty stability přechodného diastereoizomerního komplexu. Schéma interakce je popsáno třibodovým modelem. Molekula solutu interaguje s chirálním selektorem třemi interakcemi, přičemž alespoň jedna interakce musí mít stereoselektivní charakter²¹. V závislosti na použité mobilní fázi a chirálním selektoru resp. CSP se na interakcích mohou podílet π - π interakce, vodíkové vazby, hydrofobní, dipólové a stérické interakce nebo inkluze do kavity chirálního selektoru^{22,23}.

3.4 Chirální stacionární fáze

V současné době je pro HPLC techniku komerčně dostupná široká škála chirálních stacionárních fází, které jsou používány pro enantioseparaci různých typů látek. Některé CSP vykazují enantioselektivitu k širokému okruhu strukturně rozdílných analytů a vykazují tak značnou univerzálnost, jiné jsou určeny pro konkrétní aplikační účely tzv. „šité na míru“. Ty obvykle umožňují enantioseparaci pouze jednoho chirálního analytu nebo značně omezené skupiny podobných analytů, zato s vysokou hodnotou chirálního rozlišení, dovolující i aplikaci preparativního módu.

V chirálních stacionárních fázích je chirální selektor buď kovalentně navázán na nosič (nejčastěji silikagel), nebo je silikagel pokrytý chirálním selektorem (jde pouze o fyzikální interakci). Volné hydroxylové skupiny na povrchu silikagelu mohou mít různý charakter (vicinální, geminální aj.), mohou se lišit kyselostí, a tak mohou poskytovat odlišné vazebné možnosti pro interakci s CS. Pro uplatnění v chromatografii hrají velice významnou roli tři fyzikální vlastnosti silikagelu: velikost částic, pórů a specifický povrch. Účinnost kolony je tím vyšší, čím menší je velikost částic silikagelu. Póry silikagelu se pohybují v rozsahu 60 – 150 Å i více. Větší porozita nosiče stacionární fáze vede ke zkrácení doby analýzy. Kulovité částice silikagelu používané při výrobě CSP mají velikost v rozsahu 3 – 5 μm a velikost pórů mezi 100 - 200 Å²⁴. Důležitou roli hraje také délka řetězce, tzv. spaceru, který zprostředkovává vazbu chirálního selektoru k silikagelu. Jeho délka může ovlivnit stérickou dostupnost chirálního selektoru pro analyt a rozdílné odstínění silanolových skupin.

Chirální stacionární fáze lze dělit podle řady kritérií, např. podle struktury, původu, převládajícího interakčního mechanismu aj. V této práci je vybráno a stručně charakterizováno pět skupin v současné době nepoužívanějších chirálních selektorů, respektive chirálních stacionárních fází.

3.4.1 Proteinové chirální stacionární fáze

CSP na bázi proteinů se dají rozdělit na: 1) CSP na bázi albuminu (lidského sérového nebo hovězího sérového), 2) CSP na bázi glykoproteinů (α_1 -kyselý glykoprotein, ovomukoid a ovoglykoprotein, avidin nebo riboflavin vázící protein), 3) CSP na bázi enzymů (např. trypsin, chymotrypsin, cellulasa, lysozomy nebo pepsin). Společným znakem proteinových selektorů je jejich vysoce selektivní trojrozměrná struktura schopná stereoselektivně interagovat s mnoha chirálními molekulami. Během separačního procesu se na těchto chirálních stacionárních fázích mohou v rámci interakčního mechanismu uplatňovat vodíkové vazby, hydrofobní a elektrostatické interakce. Výhodou je také amfoterní charakter aminokyselin, díky němuž lze stereoselektivně rozdělit kyselé, neutrální i zásadité typy analytů^{25,26}. Nevýhodou proteinových CSP je jejich nižší životnost daná základními vlastnostmi bílkovin, které je možné poškodit vyššími teplotami, vyšším obsahem organického modifikátoru v mobilní fázi, nevhodnou hodnotou pH nebo vysokými koncentracemi solí v použitém pufru. Ze základních vlastností proteinů vychází i princip přípravy CSP. Chirální selektor je k povrchu silikagelu vázán přes hydroxylovou skupinu silikagelu. Před navázáním na silikagel musí být volná aminoskupina proteinu chráněna před hydrolyzou. Jednou možností je blokace aminoskupiny pomocí *t*-butyloxykarbonyl azidu. V následujícím kroku je provedena modifikace silikagelu 3-aminopropyldimethylethoxysilanem a peptid je spojen s aminovou skupinou navázanou na povrchu silikagelu pomocí dicyklohexyldiimidu jako spojovacího činidla. Nakonec se blokována aminoskupina odblokuje pomocí kyseliny chlorovodíkové. CSP na bázi proteinů jsou velmi vhodné pro enantioseparace aminokyselin²⁷, sulfoxidů²⁸ a řady strukturně odlišných léčiv: benzodiazepinů²⁹, warfarinu, derivátů 2-arylpropanové kyseliny³⁰ nebo β -blokátorů³¹.

3.4.2 Polysacharidové chirální stacionární fáze

Polysacharidové chirální stacionární fáze patří mezi univerzální CSP; s jejich využitím lze rozdělit až 80 % všech chirálních látek. Jsou založeny na bázi celulosy a amylosy, vykazující levotočivou helikální strukturu. Nativní polysacharidy poskytují pouze nízkou separační účinnost, ale tři hydroxylové skupiny přítomné v D-glukosových jednotkách jsou vhodné pro derivatizaci. Z celé řady zkoušených derivátů celulosy a amylosy se nejvíce osvědčily jejich estery (triacetáty, tribenzoáty a trisfenylkarbamáty)³². Pro účinnou separaci je významná interakce mezi enantiomerem a karbonylovými skupinami esterů, resp. karbamátovými skupinami. Určující interakce pro vznik přechodného diastereomerního komplexu jsou tedy vodíkové vazby. Modifikace substituentů může měnit polaritu vazeb, tím sílu interakcí a tudíž i enantioselektivitu. Při použití reverzního separačního módu se mohou kromě polárních interakcí projevit i π - π interakce mezi fenylovými zbytky CSP a aromatickými skupinami separovaných enantiomerů³³.

Podobně jako v případě proteinových CSP, existují dvě možné varianty, jak může být chirální selektor navázán na silikagelový nosič: 1) silikagel je pokryt chirálním selektorem (tzv. coated CSP) nebo 2) chirální selektor je kovalentně vázán na silikagel (tzv. immobilized CSP)³⁴. Použití CSP z první skupiny (coated) bývá omezeno jejich stabilitou v použitých rozpouštědlech. Běžně užívaná rozpouštědla jako chloroform, tetrahydrofuran, aceton, octan ethylnatý aj. nemohou být použita jako součásti mobilní fáze nebo pouze v nízkých koncentracích, aby nedošlo k rozpuštění chirálního selektoru. V případě vázaných polysacharidových CSP je jejich příprava vedena přes předem připravené estery celulosy nebo amylosy a jejich deriváty (3,5-dimethylkarbamáty, 3,5-dichlorokarbamáty, 3,5-difluorokarbamáty nebo 3,4,5-trimethylkarbamáty). Silikagelové částice jsou modifikovány 3-aminopropyltriethoxysilanem. Polysacharidové deriváty jsou potom rozpuštěny v tetrahydrofuranu a následně navázány na aminopropylsilikagel. Oproti pokrytým polysacharidovým CSP dovolují verze s kovalentně vázanými polysacharidy pracovat s mnohem širší škálou polarit rozpuštědel. Tyto kolony vykazují i vyšší selektivitu³⁵. Jsou vhodné pro enantioseparace např. aminokyselin, řady důležitých léčiv (diazepinů, β -blokátorů, barbiturátů, warfarinu a ketaminu)³⁴, binaftylů³⁶, sulfamidů nebo tyroidních hormonů (tyroxin, trijodtyronin)³⁷.

3.4.3 Pirklovy chirální stacionární fáze

Pirklovy CSP byly prvními komerčně dostupnými CSP zavedenými do praxe Pirklem již v 80. letech minulého století^{38,39}. Tyto CSP byly založeny na přítomnosti π -donorových nebo π -akceptorových skupin v molekule chirálního selektoru. První použitý chirální selektor byl (*R*)-*N*-(3,5-dinitrobenzoyl)-fenylglycin. Pirklovy stacionární fáze se vyznačují nízkou molekulovou hmotností chirálního selektoru, omezeným počtem chirálních center, ale obecně snazší přípravou než jiné CSP. Jeden z prvních způsobů navázání tohoto chirálního selektoru na povrch silikagelu byl realizován pomocí fenylglycinu. Ten zreagoval s benzoyl chloridem na benzoyl derivát, který potom dále reagoval s 3-aminopropylovou skupinou, která byla navázána na silikagel pomocí jedné nebo více silanolových vazeb. Další možnou metodou přípravy je použití isokyanátu. Je známo mnoho dostupných činidel, vhodných pro navázání aminopropylové, hydroxypropylové nebo isokyanátpropylové skupiny. Pro úspěšnou enantioseparaci je nutná přítomnost komplementární (π -donor nebo π -akceptorové) skupiny v molekule analytu, což v řadě případů vedlo k nutnosti jeho derivatizace. V současné době jsou k dispozici CSP na bázi chirálních selektorů, obsahujících jak π -donorovou, tak π -akceptorovou skupinu a vykazující tak podstatně větší univerzálnost. Určujícími interakcemi pro vznik přechodného diastereomerního komplexu jsou interakce, zahrnující vodíkové vazby, π - π interakce, dipólové interakce, van der Waalsovy interakce či stérické interakce. Pirklovy CSP se přednostně uplatňují v normálním separačním módu. Byla na nich separována řada skupin látek, např. primární, sekundární i terciární aminy⁴⁰, derivatizované aminokyseliny, alkoholy, aldehydy, hydantoiny, β -laktamy nebo binaftyly⁴¹.

3.4.4 Cyklodextrinové chirální stacionární fáze

Mezi všeobecně nejznámější, univerzální chirální selektory patří cyklodextriny (CD) a jejich deriváty. Jsou to cyklické oligomery tvořené různým počtem α -D-glukopyranosových jednotek, spojených v polohách C1 a C4. Vznikají štěpením škrobu enzymem cyklodextrintransferasou. Z praktického hlediska mají význam pouze tři cyklodextriny, a to α -CD, β -CD a γ -CD, které se navzájem liší počtem glukopyranosových jednotek (kruhy obsahují šest, sedm a osm jednotek)

a tím i velikostí vnitřní kavity. Nejširší použití mají β -CD (rozměr kavity je vhodný pro „fit“ velké řady farmaceuticky významných látek). Cyklodextrin má tvar kónického prstence s otevřeným koncem na obou stranách. Vnitřní část je nepolární, vnější je polární díky přítomnosti tří hydroxylových skupin (C2, C3 a C6) na obou okrajích prstence. Tyto skupiny (přednostně v poloze 2 a 3) jsou vhodné pro derivatizaci a v současné době existuje řada derivátů zejména β -CD^{42,43}. Derivatizace zavádí do molekuly nativního cyklodextrinu funkční skupiny schopné dalších interakcí, v některých případech i chirální centra, která mohou poskytovat další stereoselektivní interakce a tak rozšiřují okruh možných separovatelných látek. Cyklodextriny mohou být vázány na silikagel různým způsobem, nejvyužívanější cesty napojení jsou přes: 3-glycidoxypropyltrimethoxysilan, 3-glycidoxypropyldimethylchlorosilan a 3-glycidoxypropyltriethoxysilan. Teoreticky může vazba vzniknout pomocí kterékoli primární nebo sekundární hydroxylové skupiny cyklodextrinu, ale běžnější je navázání přes primární skupinu, která je méně stericky bráněna. Předností cyklodextrinových CSP je jejich multimodálnost, tj. možnost pracovat ve třech odlišných separačních módech - v reverzním (RP), normálním (NP) a polárně-organickém (PO) separačním módu. V reverzním módu, realizovaném mobilní fází organický modifikátor (nejčastěji acetonitril nebo methanol)/voda nebo vodný pufr, dochází k inkluzi hydrofobní (nepolární) části molekuly do nitra kavity a polární část molekuly může interagovat s hydrofilním okrajem cyklodextrinu⁴⁴. V normálním a polárně-organickém módu se inkluze neuplatňuje. Mobilní fáze v normálním módu (hexan, heptan modifikovaný přídavkem alkoholu) dovoluje vznik vodíkové vazby, π - π interakcí a dipól-dipól interakcí. Polárně-organický mód je realizován mobilní fází tvořenou převážně acetonitrilem s přídavkem methanolu a k modifikaci selektivity separačního systému slouží velmi malé přídavky octové kyseliny (HAc) a triethylaminu (TEA). Významná je tvorba polárních interakcí a vodíkových vazeb. Cyklodextriny poskytují široké aplikační možnosti pro separace např. flavonových glykosidů⁴⁵, chirálních alkoholů, chirálních kyselin (aminokyseliny, chloromethoxypropanové kyseliny, hydroxykumariny, benzodiazepiny, pyridiny), bází (binaftaleny) nebo heterocyklických sloučenin (chlortalidon, oxazolidiny, hydantoin nebo promethazin)⁴⁶.

3.4.5 Chirální stacionární fáze na bázi makrocyclických antibiotik

Makrocyclická antibiotika (MA) představují významnou skupinu chirálních selektorů použitelnou pro separaci širokého okruhu analytů. Od svého zavedení do praxe v 90. letech minulého století⁴⁷ se díky své stereoselektivní interakční schopnosti k velkému počtu chirálních látek zařadily mezi jedny z nejpoužívanějších chirálních selektorů. Významnou část MA tvoří glykopeptidy. Tyto přírodní látky jsou produkovány různými mikroorganismy. K chirálním separacím jsou nejčastěji používány: vankomycin (V), teikoplanin (T), teikoplanin aglykon (TAG), ristocetin A (R A), případně avoparcin, vzácněji thiostrepton, fradiomycin, kanamycin a streptomycin⁴⁸. MA obsahují mnoho funkčních skupin a chirálních center, umožňujících celou řadu interakcí a zvyšujících tak možnou strukturální variabilitu separovaných látek. Zvláště účinná se jeví pro separaci enantiomerů, které obsahují ionizovatelnou skupinu na nebo v těsné blízkosti chirálního centra analytu⁴⁹. Některé fyzikálně-chemické vlastnosti nejpoužívanějších glykopeptidových CS jsou uvedeny v tabulce 1.

Tab. 1: Vybrané fyzikálně-chemické vlastnosti glykopeptidů.

Vlastnosti	Avoparcin	Teikoplanin	Teikoplanin aglykon	Vankomycin	Ristocetin A
Molekulová hmotnost	1908	1877	1197	1449	2066
Počet chirálních center	32	23	8	18	38
Počet cukerných složek	5	3	0	2	6
Počet inkluzních kavít	3	4	4	3	4
Počet hydroxylových skupin	16	14	7	9	21
Počet primárních aminů	2	1	1	1	2
Počet sekundárních aminů	1	0	0	1	0
Počet amidových skupin	6	8	6	7	6
Počet karboxylových skupin	1	2	1	1	0
Produkovány	<i>Streptomyces candidus</i>	<i>Actinoplanes teichomyceticus</i>	chemická modifikace	<i>Streptomyces orientalis</i>	<i>Nocardia lurida</i>

Tabulka dle ref.²³

Kostru molekuly tvoří substituovaný peptid doplněný o cukernou složku. Díky této struktuře spojují MA řadu výhod proteinových i polysacharidových CSP, avšak bez jejich aplikačních omezení. CSP na bázi glykopeptidů patří do skupiny nejmodernějších multimodálních CSP, tzn., že mohou být bez omezení používány ve třech rozdílných separačních módech. V reverzním separačním módu, který je nejčastěji realizován mobilní fází organické rozpouštědlo (acetonitril, methanol, ethanol, tetrahydrofuran)/voda nebo vodný roztok pufrů, se uplatňuje v omezené míře inkluze (ve srovnání s CD CSP), hydrofobní a elektrostatické interakce. Retence se obvykle snižuje s rostoucím obsahem organického modifikátoru v mobilní fázi. Nový polárně-organický, dnes častěji nazývaný jako polárně-iontový (PI) separační mód byl odvozen od polárně-organického módu zavedeného pro cyklodextrinové CSP. Tento separační mód je vhodný pro analyty obsahující alespoň dvě ionizovatelné funkční skupiny, nacházející se v blízkosti chirálního centra. Základem mobilní fáze je methanol případně ve směsi s acetonitrilem a s přísadkou velmi malého množství kyseliny (nejčastěji HAc) a báze (nejčastěji TEA). Retence a enantioseparace analytů je ovlivňována nejen koncentrací obou aditiv, ale i jejich vzájemným poměrem. V tomto separačním módu převažují elektrostatické interakce a vodíková vazba^{50,51}. Základ mobilní fáze v normálním separačním módu tvoří hexan, modifikovaný přísadkou alkoholů např. propan-2-olu nebo ethanolu. Bez omezení mohou být použita i halogenovaná rozpouštědla nebo rozpouštědla typu dimethylformamid, dioxan aj., jejichž aplikace v případě proteinových CSP je vyloučena a v případě polysacharidových CSP značně omezena. V tomto separačním módu jsou preferovány vodíkové vazby, dipól-dipól a π - π interakce. Někdy je možno dosáhnout dobré enantioseparace jak v reverzním, tak v normálním módu⁵². Možnost reverzibilně přecházet z jednoho separačního módu do druhého je výhodná i při optimalizaci metody, kdy může být klíčovým problémem rozpustnost analyzovaného vzorku. Z aplikačního hlediska je důležitá i komplementarita glykopeptidových CSP daná strukturní podobností jednotlivých glykopeptidových chirálních selektorů. Pokud na CSP s jedním typem glykopeptidu dojde pouze k částečné enantioseparaci, může záměna navázaného glykopeptidového CS vést k podstatnému zlepšení enantioseparace.

Snaha po rozšíření aplikačních možností vedla v případě glykopeptidových CS k testování analogů některých glykopeptidů nebo k modifikaci již osvědčených chirálních selektorů (odstranění určitých funkčních skupin nebo jejich

derivatizace)^{53,54}. Některé z těchto derivátů byly úspěšně zavedeny i do praxe (teikoplanin aglykon, methylovaný teikoplanin aglykon, vankomycin aglykon). Vedle modifikací chemické struktury se snaha po zvýšení enantioselektivity promítla i do přípravy stacionárních fází, které se vyznačují vyšším stupněm pokrytí nosiče chirálním selektorem a tím i zvýšeným počtem interakčních míst.

Molekuly chirálního selektoru jsou vázány na silikagelový nosič kovalentními vazbami takovým způsobem, aby bylo dosaženo dostatečné stability chirální stacionární fáze během celého chromatografického procesu. Spacery mohou být organosilany, které bývají zakončeny karboxylovou, aminovou, isokyanátovou nebo epoxyskupinou. Příkladem může být 2-karbomethoxyethyltrichlorosilan, 3-aminopropyltrimethoxysilan, 3-glycidoxypropyltrimethoxysilan nebo 3-isokyanátpropyltriethoxysilan. Vazebným místem peptidů může být ether, thioether, amin, amid, karbamát nebo močovina.

Do praxe byla zavedena CSP s vyšším pokrytím silikagelového nosiče vankomycinem, komerčně dostupná pod názvem Chirobiotic V2⁵⁵. Ze srovnání separačního chování na obou CSP s různým pokrytím vankomycinem (Chirobiotic V a V2) bylo zřejmé, že vyšší pokrytí nemá v řadě případů výrazný vliv na retenci, ale vzhledem k většímu množství stereoselektivních interakčních možností nabízených chirálním selektorem, resp. vzhledem k omezení nežádoucích nestereoselektivních interakcí se silikagelovým nosičem, se poněkud zvýší hodnoty chirálního rozlišení a zlepší se symetrie píků⁵⁶. Nověji se na trhu objevila i CSP na bázi teikoplaninu s vyšším pokrytím (Chirobiotic T2)⁵⁵. Ta je charakterizována kromě vyššího pokrytí silikagelu CS navíc jinou chemií vazby teikoplaninu na silikagel.

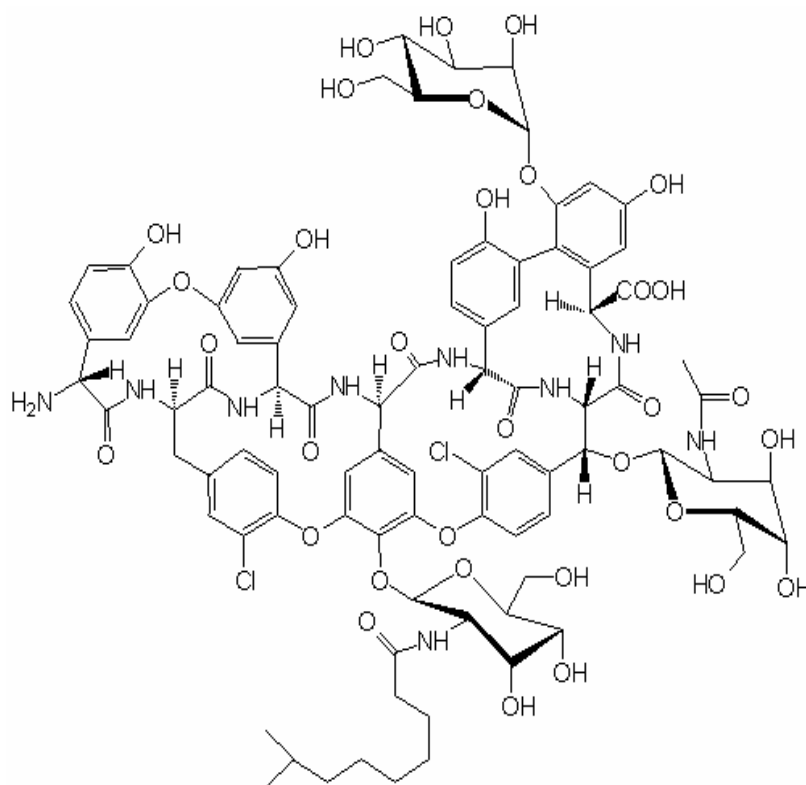
3.4.5.1 Teikoplanin

Teikoplanin (obr. 1) je amfoterní glykopeptid produkovaný bakterií *Actinoplanes teichomyceticus*. V lékařské praxi je využíván při těžkých systémových infekcích, neboť je účinný jak proti aerobním, tak proti anaerobním grampozitivním bakteriím. Stejně jako ostatní glykopeptidová antibiotika zabraňuje svou vazbou na karboxylový konec D-Ala-D-Ala zesíťování peptidoglykanu, a tím inhibuje syntézu buněčné stěny bakterií⁵⁷. Struktura teikoplaninu obsahuje tzv. aglykonový koš, který je tvořen čtyřmi makrocykly. Molekulu tvoří hexapeptidový řetězec, na který je

navázáno sedm benzenových jader, pět z nich je vzájemně propojeno třemi etherovými skupinami. Na dvou aromatických cyklech je navázán atom chloru a na šesti jsou vázány hydroxylové skupiny. Aglykon také obsahuje samostatnou karboxylovou skupinu a primární amin, čímž molekula získává amfoterní charakter. Na aglykonový koš jsou dále navázány tři cukerné zbytky, tvořené dvěma D-glukosaminy a D-mannosou. Z hlediska chirálního rozlišení jsou cukerné jednotky také velmi důležité. Do procesu chirálního rozpoznávání mohou zasáhnout třemi různými cestami: 1) sterickým bráněním - cukerné jednotky obsadí místo přístupu jiných molekul k vazebnému místu; 2) blokováním možných interakčních míst na aglykonu - dva cukry jsou spojené přes fenol hydroxylovou skupinou a třetí cukr je spojen přes alkohol; 3) nabízenými kompetitivními místy - všechny tři cukry jsou chirální a obsahují hydroxylovou, etherovou a aminovou funkční skupinu⁵⁸. Ve struktuře teikoplaninu je dále na jeden D-glukosamin vázán acylový řetězec; přítomnost tohoto hydrofobního řetězce významně přispívá ke snížené rozpustnosti molekuly teikoplaninu ve vodě a k jejím agregačním schopnostem⁵⁹. V přírodě se teikoplaninové glykopeptidy liší právě tímto uhlíkovým řetězcem⁶⁰. Teikoplaninová CSP je tvořena směsí pěti izomerů (T-A₂₋₁ až T-A₂₋₅), které se liší větvením a délkou acylového řetězce (C₁₀ - C₁₁). Nejznámější a nejhojněji produkováný je teikoplanin A₂₋₂. Strukturálně velmi podobný teikoplaninu je komplex glykopeptidů A-40,926, produkováný *Actinomadura* spp. kmene ATCC 39726. CSP na bázi tohoto glykopeptidu není komerčně dostupná, byla však laboratorně připravena a její enantioselektivní vlastnosti byly porovnány s komerčně dostupnou teikoplaninovou CSP⁶¹. Jednotlivé CSP, mírně se lišící svojí strukturou, vykazovaly rozdílné retenční i enantioselektivní chování a bylo prokázáno, že vykazují komplementární enantioseparaci.

Strukturální uspořádání teikoplaninu je vhodné pro separaci řady analytů, např. aminokyselin, hydroxykyselin, fenolů, malých peptidů nebo neutrálních aromatických sloučenin⁶¹. Velmi důležitou roli při interakci hraje afinita karboxylové skupiny analytu a aminoskupina teikoplaninu. Velkou předností je jeho komplementární stereoselektivita s vankomycinem nebo ristocetinem A. To v praxi znamená, že pokud nedošlo k enantioseparaci na chirální stacionární fázi s navázaným teikoplaninem, popř. došlo jen k částečnému rozlišení, lze předpokládat, že ke zlepšení enantioseparace nebo k úplnému rozdělení analytu až na

základní linii dojde na CSP s navázaným vankomycinem nebo ristocetinem A. Samozřejmě tento fakt platí i naopak.



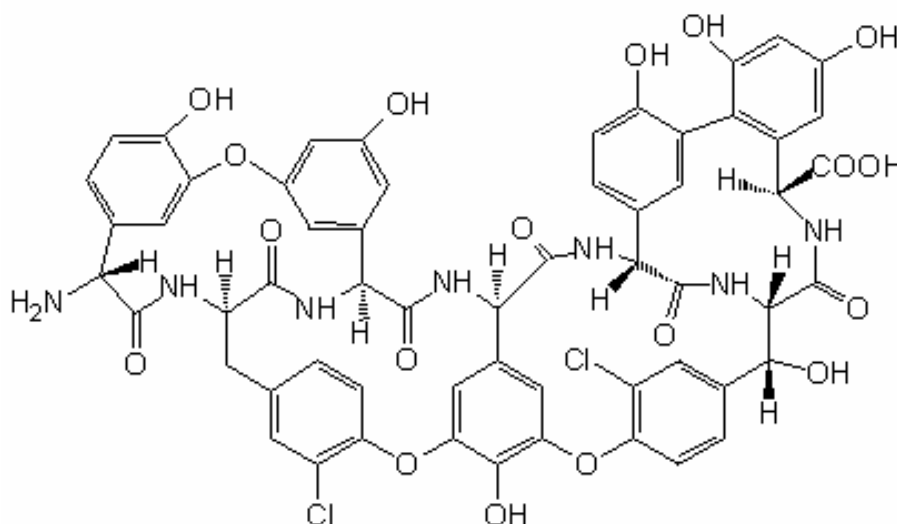
Obr. 1: Struktura teikoplaninu

3.4.5.2 Teikoplanin aglykon

Teikoplanin aglykon (obr. 2) na rozdíl od teikoplaninu neobsahuje cukerné zbytky α -D-manosu, β -D-N-acetyl-glukosamin a β -D-N-acyl-glukosamin. Odstranění tří cukerných zbytků a hydrofobního alkylového řetězce dává větší prostor některým látkám ke snadnější interakci s takto modifikovaným chirálním selektorem, a tím k lepší enantioseparaci. Ačkoli cukerné jednotky teikoplaninu snižují retenci mnoha enantiomerů aminokyselin, mohou v některých případech přispívat ke zlepšení rozlišení, např. sekundárních aminokyselin⁶⁰. Významným faktorem je komplementarita teikoplanin aglykonu s teikoplaninem. Bylo zjištěno, že retenční faktory sloučenin se střední polaritou byly za stejných separačních podmínek

relativně podobné na obou výše uvedených stacionárních fázích, zatímco pro polární látky (např. aminokyseliny) byly získány vyšší retenční faktory na aglykonovém selektoru⁵⁸. Také je prokázáno, že účinnost separace je poněkud nižší na TAGu než na teikoplaninu pro stejné analyty za stejných separačních podmínek. Jedním z důvodů může být pomalý přenos hmoty mezi mobilní a stacionární fázi.

Při separacích na této chirální stacionární fázi se v závislosti na použitém separačním módu uplatňují elektrostatické interakce, π - π interakce, vodíkové vazby, částečně i inkluze nebo stérická repulze. Separace je vysoce selektivní pro analýzy aminokyselin, *N*-blokovaných aminokyselin, peptidů, neutrálních molekul, diazepinů, hydantoinů, oxazolidinoidů a sulfoxidů⁶².



Obr. 2: Struktura teikoplanin aglykonu

3.4.5.3 Methylovaný teikoplanin aglykon

Další modifikovanou formou TAGu je methylovaný teikoplanin aglykon (Me-TAG). Jeho struktura byla navržena především pro enantioseparace hydrofobnějších aminokyselin. Srovnání CSP na bázi teikoplaninu (teikoplanin, teikoplanin aglykon a methylovaný teikoplanin aglykon) bylo studováno v reverzním a polárně-iontovém separačním módu⁶³. V reverzním módu hrají významnou roli hydrofobní interakce. V polárně-iontovém módu se na chirálním rozlišení velkou měrou podílejí vodíková vazba a elektrostatické a stérické interakce. Bylo zjištěno, že methylace hydroxylových skupin ve struktuře TAGu snížila možnost vodíkových

interakcí. Přesto vykazoval methylovaný TAG v některých případech lepší rozlišení analytů, když sterické repulze hrály podstatnou roli při chirálním rozlišení analytů s objemnou hydrofobní skupinou.

CSP na bázi teikoplaninu (T, TAG a Me-TAG) byly také porovnány mezi sebou pomocí modelu LFER (linear free energy relationship). Takový postup se řadí mezi modely, které jsou založené na lineární korelaci mezi změnami volné energie fyzikálně-chemických procesů⁶⁴. Metoda LFER byla vyvinuta pro charakterizaci různých separačních systémů a k predikci separačních možností analytů v daném separačním systému. Metodou LFER lze získat koeficienty charakterizující hydrofobní interakce, polární interakce, možnost tvorby dipólů a acido-bazické vlastnosti systému. Největší příspěvek k retenci analytů na těchto CSP představuje hydrofobicita, která převažuje v mobilních fázích s vysokým obsahem vodné složky a klesá v následujícím pořadí: Me-TAG>TAG>T. Logicky to vyplývá ze struktury Me-TAGu, kdy vyšší hydrofobicitu způsobí methylace karboxylových a fenylových skupin TAGu. Nejnižší hydrofobicitu vykazoval T díky hydrofilní povaze cukerných zbytků ve své struktuře. Převahu nebo naopak potlačení některých typů interakcí je možno docílit díky změně poměru složek mobilní fáze⁶⁵. Zatímco hydrofobní interakce dominují v mobilních fázích s vysokým obsahem pufru, s rostoucím podílem organického modifikátoru (methanolu) v mobilní fázi začínají převažovat polární interakce. Také vodíkové interakce mohou přispět k chirálnímu rozlišení látek.

3.4.5.4 CSP s různým stupněm pokrytí teikoplaninem

Jak bylo již uvedeno dříve, snaha o zvýšení počtu interakčních míst a tím i enantioselektivity a kapacity CSP vedla k přípravě a posléze i k zavedení do praxe teikoplaninové CSP, vyznačující se vyšším stupněm pokrytí silikagelového nosiče teikoplaninovým selektorem (Chirobiotic T2). Na rozdíl od vankomycinových CSP, lišících se navzájem pouze stupněm pokrytí silikagelového nosiče vankomycinovým CS (Chirobiotic V vs. V2), se v případě teikoplaninových CSP (Chirobiotic T vs. T2) jedná nejen o různý stupeň pokrytí silikagelu teikoplaninem, ale i o různou délku spojovacího řetězce mezi chirálním ligandem a silikagelem a o rozdílnou pórovitost vlastního silikagelového nosiče. Velikost pórů u kolony Chirobiotic T je 120 Å, zatímco u kolony Chirobiotic T2 je 200 Å. Větší pórovitost zajišťuje vyšší hodnoty

specifického povrchu silikagelového nosiče a přibližně dvojnásobně dlouhý spacer zlepšuje sterickou dostupnost vazby chirálního ligandu na silikagel⁶⁶. V porovnání s kolonou Chirobiotic T byly na koloně Chirobiotic T2 získány vyšší retenční faktory, selektivita i rozlišení enantiomerů některých aromatických β -aminokyselin za jinak stejných podmínek separace v polárně-iontovém módu⁶⁷.

CSP na bázi makrocyclických antibiotik představují v současnosti jedny z nejpoužívanějších komerčně dostupných chirálních stacionárních fází. Jejich předností je kromě možnosti enantioseparace strukturně značně odlišných analytů i možnost modifikace struktury makrocyclických antibiotik a schopnost pracovat v různých separačních módech. Odstranění nebo naopak derivatizace funkčních skupin MA nebo různé pokrytí silikagelového nosiče těmito CS dovoluje rozšíření jejich aplikačních možností v rámci analytické praxe. Pestrá nabídka komerčně dostupných glykopeptidových CSP spolu s jejich multimodálním charakterem zajišťují jejich vysokou univerzálnost.

3.5 Analyzované látky

Pro studium enantioselektivních schopností glykopeptidových CSP založených na bázi teikoplaninu, teikoplanin aglykonu a CSP s vyšším pokrytím teikoplaninem byly vybrány čtyři skupiny strukturně odlišných látek. Ve všech případech se jednalo o chirální látky, hrající důležitou roli v biologických procesech. Byly to dvě skupiny velmi známých a ve velké míře používaných farmak (profeny a β -blokátory), selektivní herbicidy a aminokyseliny, používané jako potravinové doplňky zejména u sportovců.

Při interakci biologicky aktivních chirálních látek s cílovými strukturami (receptory) v organismu se uplatňuje účinněji ten enantiomer, jehož prostorové uspořádání a vazebné možnosti lépe odpovídají aktivnímu místu receptoru. Druhý stereoizomer může být biologicky méně účinný, neúčinný nebo může vykazovat zcela jiný (v případě léčiv i nežádoucí či toxický) účinek. Farmakokinetika jednotlivých enantiomerů může vykazovat významné odlišnosti jak v jejich biologické dostupnosti, vazbě na plazmatické proteiny, v rychlosti metabolických přeměn, ale i v eliminaci z organismu. Proto je třeba při terapeutickém používání racemátu brát zřetel na farmakokinetické parametry každého enantiomeru. Současné trendy směřují k tzv. „chiral switching“, tj. k záměně racemátu za chirálně čistou,

účinnou složku. Přípravu chirálně čistých léčiv, pesticidů aj. v průmyslovém měřítku umožňují nově vyvíjené postupy (asymetrická chirální syntéza, preparativní chirální chromatografie nebo z ekonomického hlediska výhodné biokatalytické metody s použitím enzymů). Spolu s výrobou je nutné zajistit i možnosti kontroly čistoty takto produkovaných látek. Zde se nabízí velký prostor pro vývoj nových metod v analytickém až preparativním měřítku, přispívajících k usnadnění sledování nežádoucích chirálních nečistot v průmyslovém měřítku a možností jejich odstranění.

Pro větší přehlednost je rešerše metod analýzy studovaných látek omezena pouze na kapalinové chromatografické techniky.

3.5.1 Profeny

Profeny (deriváty 2-arylpropanové kyseliny, nesteroidní protizánětlivá léčiva) patří k nejčastěji užívaným léčivým přípravkům. Jedná se o skupinu látek, které mají kromě protizánětlivého účinku i analgetický, antipyretický a některé z nich i antiagregační účinek. Jejich protizánětlivé působení nemá vedlejší nežádoucí účinky hormonální povahy pozorované při antiflogistické terapii kortikosteroidy (odtud název nesteroidní). Většina těchto léčiv má středně silný analgetický účinek, ale na rozdíl od analgetik opiátového typu nejsou návyková a neovlivňují dechové centrum.

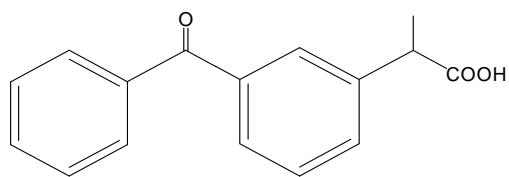
Mechanismem účinku profenů je neselektivní inhibice cyklooxygenasy (COX) s následným omezením biosyntézy prostaglandinů, hrající roli v genezi zánětů i jako modulátorů imunitní odpovědi. Tato inhibice má za následek např. snížení citlivosti receptorů na bolestivé podněty, snížení zvýšené teploty, regulaci zvýšené tvorby leukocytů atd.⁶⁸ Cyklooxygenasa se v organismu vyskytuje ve dvou izoformách; COX-1 hraje významnou úlohu za fyziologických podmínek, zatímco COX-2 je aktivována až při samotném rozvoji zánětu. Profeny patří do skupiny neselektivních inhibitorů, to znamená, že tlumí obě formy tohoto enzymu. Z tohoto faktu vyplývá i výskyt mnoha nežádoucích účinků. Základním problémem krátkodobé, ale především dlouhodobé aplikace profenů je jejich toxický efekt na gastrointestinální trakt, a to hlavně na žaludeční sliznici vedoucí k tzv. indukované gastropatii. Druhou zásadní oblast nežádoucích účinků reprezentuje jejich nefrotoxický efekt.

Tyto přípravky jsou komerčně dostupné ve formě racemátu, ale farmakologická účinnost profenů bývá přisuzována výhradně *S*-izomerům.

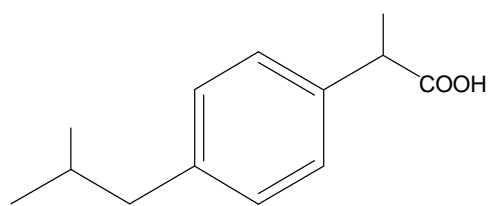
Předpokládá se, že *R*-izoformy mohou být akumulovány jako rezidua v tukových tkáních^{69,70}.

Nejznámějším zástupcem profenů je ibuprofen, který se používá perorálně proti bolesti, zánětům a na snižování horečky nebo ve formě masti při degenerativním onemocnění pohybového aparátu. Podobné vlastnosti jako ibuprofen má i indoprofen. Využití ketoprofenu a fenoprofenu je především při jejich lokální aplikaci při revmatoidní artritidě ve formě mastí či gelů. Flurbiprofen má své protizánětlivé uplatnění zejména v očním lékařství, dále při bolestech a otocích v krku, které provázejí zánětlivá onemocnění horních cest dýchacích bakteriálního nebo virového původu. Karprofen je hojně využíván ve veterinárním lékařství. Také suprofen je převážně aplikován ve veterinárním lékařství, ale jeho použitelnost v praxi je značně omezena kvůli prokázané nefrotoxicitě.

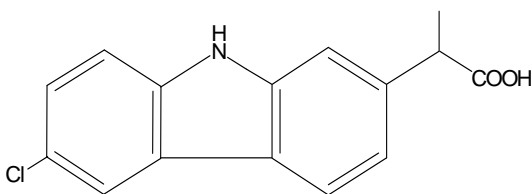
Z chemického hlediska jsou profeny látky kyselé povahy, karboxylová skupina těsně sousedí s chirálním centrem. Struktury studovaných látek jsou znázorněny na obr. 3.



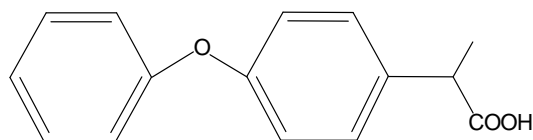
Ketoprofen (Ket)



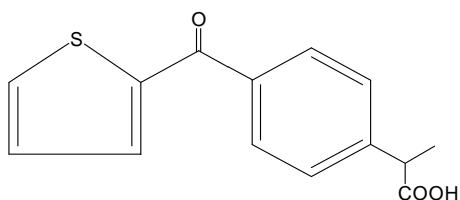
Ibuprofen (Ibu)



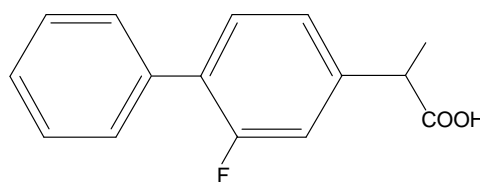
Karprofen (Kar)



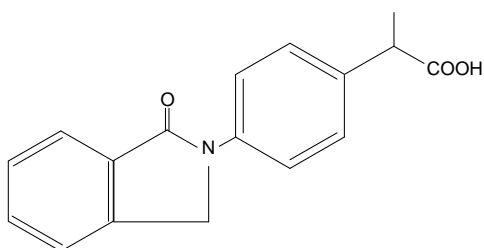
Fenoprofen (Fen)



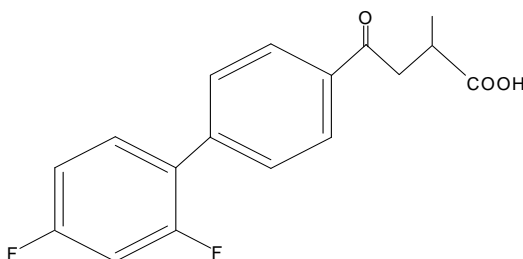
Suprofen (Sup)



Flurbiprofen (Flu)



Indoprofen (Ind)



Flobufen (Flo)

Obr. 3: Strukturní vzorce separovaných profenů

HPLC chirální separace fenoprofenu, flurbiprofenu, ibuprofenu, indoprofenu a ketoprofenu byla úspěšná na CSP na bázi polysacharidů (celulosa i amylosy) v normálním módu⁷¹. Chování derivátů 2-arylpropanové kyseliny bylo také studováno v reverzním separačním módu na CSP s navázaným β -CD⁷². Dále se pro separaci ibuprofenu, ketoprofenu, suprofenu a fenoprofenu osvědčily proteinové CSP, konkrétně CSP na bázi lidského sérového albuminu³⁰ a enzymů⁷³. Retenční a enantioseparační chování flurbiprofenu, fenoprofenu, indoprofenu a ibuprofenu bylo studováno také pomocí metody superkritické fluidní chromatografie na CSP s navázanými makrocyclickými antibiotiky, jmenovitě s teikoplaninem, teikoplanin

aglykonem a ristocetinem A⁷⁴. Pomocí nano-LC s CSP na bázi vankomycinu byly v reverzním módu separovány enantiomery indoprofenu, ketoprofenu a suprofenu⁷⁵. Použití CSP s navázaným vankomycinem bylo úspěšné i v systému HPLC a mobilní fázi tvořenou methanolem, acetonitrilem a octanovým nebo mravenčanovým pufrem⁷⁶ nebo methanolem a triethylaminoctanovým (TEAA) pufrem v různých poměrech⁵⁶. Pro enantioseparaci ibuprofenu, flurbiprofenu, ketoprofenu a fenoprofenu byly testovány i CSP na bázi teikoplaninu, konkrétně teikoplaninu, teikoplanin aglykonu a methylovaného teikoplanin aglykonu⁶³. Avšak enantioseparace při použití methanolu a TEAA pufru v mobilní fázi nebyla příliš úspěšná.

3.5.2 β -blokátory

β -blokátory (aminoalkoholy) tvoří velmi rozsáhlou moderní skupinu léčiv. Indikacemi pro jejich aplikace jsou angina pectoris, akutní koronární syndromy, včetně infarktu myokardu v akutní i chronické fázi, chronické levostranné srdeční selhání a některé druhy arytmií⁷⁷. Méně známý je fakt, že β -blokátory se užívají v oftalmologii k léčbě glaukomu, v endokrinologii při rozvinuté hypertyreóze a v neurologii k prevenci migrény a u některých forem třesu kosterního svalstva. Nejčastější indikací je však hypertenze, především je-li provázena ischemickou chorobou srdeční⁷⁸.

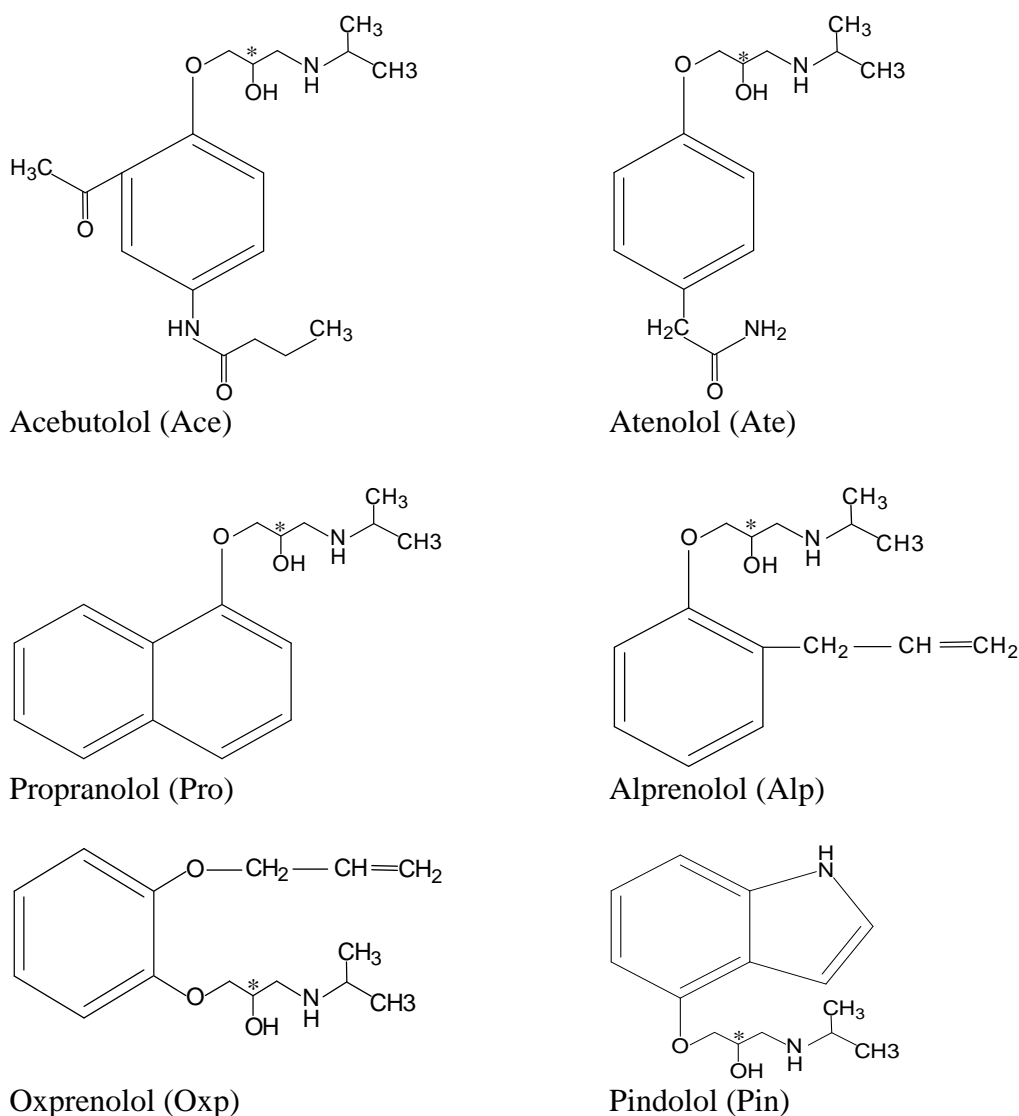
Způsob účinku β -blokátorů není doposud zcela objasněn, pravděpodobně proto, že zahrnuje více biologických efektů. β -blokátory působí na β -receptory, a tím konkurenčně vytěsňují katecholaminy (adrenalin, noradrenalin), vážící se přirozeně na β -receptorová vazebná místa. Jejich eliminací dojde ke snížení spotřeby kyslíku v myokardu vlivem zpomalení srdeční frekvence, poklesu krevního tlaku a snížení srdeční stažlivosti. β -blokátory také zlepšují průtok krve v srdeční oblasti, čímž se zvětšuje přísun kyslíku k ischemickému ložisku⁷⁹. Podle vazby na β_1 a β_2 receptory a podle jejího charakteru se rozlišují β -blokátory na neselektivní, kardioselektivní, s vnitřní sympatomimetickou aktivitou (ISA) a s vazodilatačním účinkem na cévy. β -blokátory s vnitřní sympatomimetickou aktivitou mohou způsobit po navázání na β -receptor jeho strukturní změnu analogickou změně vyvolané agonisty. Mohou se tak vyskytnout poruchy srdečního rytmu (bradykardie, arytmiie), změny krevního tlaku (hypotenze či kolísání TK). Většina léčebných účinků je dána blokadou

β_1 -receptorů („kardioselektivita“), naopak větší počet specifických vedlejších účinků je dán bloádou β_2 -receptorů. β_1 -receptory se vyskytují postsynapticky především v srdci, dále v gastrointestinálním traktu, v ledvinách a v tukových buňkách. β_2 -receptory jsou umístěny postsynapticky především v bronchiálním traktu, cévách, děloze, pankreatu, játrech a také ve žlázách s vnitřní sekrecí. Neselektivní β -blokátory mohou mít nežádoucí účinky v důsledku bloády β_2 -receptorů (zúžení bronchů, snížené uvolňování inzulínu ze slinivky, chlad končetin). Nejsou tedy vhodné u pacientů s plicním onemocněním, cukrovkou a ischemickou chorobou dolních končetin. Přehled účinků studovaných β -blokátorů na adrenergní receptory je uveden v tabulce 2. Za farmakologický účinek β -blokátorů je odpovědný *S*-enantiomer díky pevnější vazbě na β -receptorové místo za přesně vymezených stereochemických podmínek.

Z chemického hlediska jsou β -blokátory relativně málo polární látky, obsahující v těsné blízkosti chirálního centra amino- a hydroxyskupinu. Struktura β -blokátorů umožňuje různé interakce, například tvorbu vodíkových vazeb za účasti funkčních skupin vhodného chirálního selektoru nebo π - π interakce s benzenovým jádrem. Chemické struktury studovaných β -blokátorů jsou znázorněny na obr. 4.

Tab. 2: Přehled působení studovaných β -blokátorů na adrenergní receptory.

β-blokátor	Působení na receptory
Atenolol	β_1 -selektivní bez ISA
Acebutolol	β_1 -selektivní s ISA
Propranolol	β_1, β_2 -neselektivní bez ISA
Pindolol	β_1, β_2 -neselektivní s ISA
Oxprenolol	β_1, β_2 -neselektivní s ISA
Alprenolol	β_1, β_2 -neselektivní s ISA



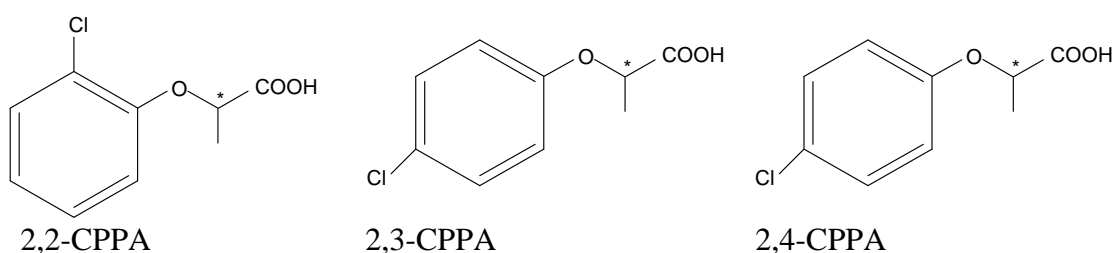
Obr. 4: Strukturální vzorce β -blokátorů

Při enantioseparaci β -blokátorů pomocí HPLC se osvědčily Pirklovy CSP^{80,81}, CSP na bázi cyklodextrinu, zejména β -cyklodextrinové, neboť β -cyklodextrin má díky vhodnému počtu glukopyranosových jednotek příhodně velkou kavitu⁸². Dále byly úspěšně použity polysacharidové CSP na bázi celulosy a amylosy^{83,84,85}, proteinové CSP, zde se jednalo o kyselý α_1 -glykoprotein⁸⁶ a cellobiohydrolasu I⁸⁷. V neposlední řadě byly enantiomery β -blokátorů separovány na CSP na bázi makrocyclických antibiotik^{56,49,88,89}. Struktura makrocyclických antibiotik dovoluje určitou inkluzi hydrofobní části β -blokátorů do kavity, zatímco polární část umožní dipól-dipól interakce a vodíkové vazby s polární skupinou β -blokátorů. Kromě toho mohou separaci podpořit ještě stérické repulze a π - π interakce⁹⁰.

Separace enantiomerů β -blokátorů byla úspěšná také pomocí miniaturizovaných technik – zejména nano-LC na chirální stacionární fázi na bázi teikoplaninu a vankomycinu s mobilní fází tvořenou octanovým pufrem, methanolem a acetonitrilem^{75,91}.

3.5.3 Chlorofenoxypropanové kyseliny

Chlorofenoxypropanové kyseliny (CPPA) patří do skupiny důležitých a široce využívaných selektivních herbicidů odvozených od fenoxipropanové kyseliny. Požadovanou herbicidní aktivitu vykazuje pouze *R*-enantiomer, zatímco *S*-enantiomer je inaktivní. Vzhledem k dobré rozpustnosti ve vodě se mohou tyto látky pohybovat v ekosystému a způsobovat znečištění povrchových a podzemních vod. Proto je žádoucí, aby byl aplikován pouze enantiomer s požadovanou biologickou aktivitou, a tím se snížila zátěž životního prostředí. Z chemického hlediska jsou CPPA polární látky kyselé povahy, u nichž se karboxylová skupina nachází v těsném sousedství chirálního centra (strukturní vzorce viz obr. 5). Právě interakce mezi karboxylovou skupinou analytu a aminoskupinou teikoplaninu hraje velice důležitou roli během enantioseparačního procesu. Pokud je aminoskupina stéricky blokována, jsou elektrostatické interakce nahrazeny vodíkovými vazbami nebo hydrofobními interakcemi⁹². Důsledkem je pak odlišná enantioselektivita separace.



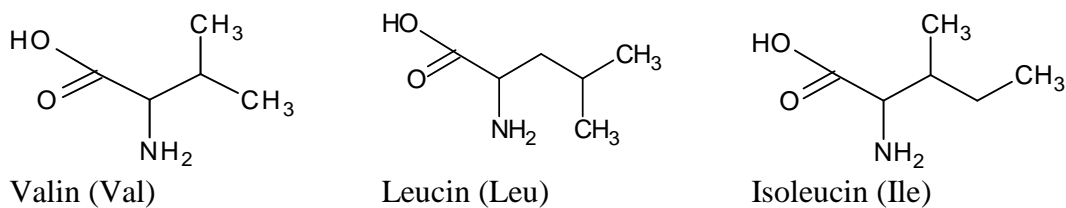
Obr. 5: Strukturní vzorce chlorofenoxypropanových kyselin

Pro dělení enantiomerů CPPA byla v literatuře nalezena řada odkazů. V systému HPLC byly použity např. proteinové CSP na bázi lidského sérového albuminu³⁰ a enzymů⁷³ nebo polysacharidové CSP na bázi celulosy⁹³. Enantioseparace CPPA byla prováděna také s CSP na bázi makrocyclických antibiotik, konkrétně na CSP s navázaným teikoplaninem s binární mobilní fází

methanol/citrátový pufr⁹⁴. Pro enantioseparaci byly testovány i CSP s navázaným teikoplanin aglykonem a methylovaným teikoplanin aglykonem⁶³. Byly zjištěny velmi dobré hodnoty chirálního rozlišení při použití reverzního separačního módu, kdy mobilní fázi tvořil methanol a TEAA pufr v poměru 40/60 (v/v). Nejlepší hodnoty chirálního rozlišení byly získány na TAG CSP (v porovnání s T a Me-TAG CSP).

3.5.4 Aminokyseliny s rozvětveným řetězcem

Mezi aminokyseliny s větveným řetězcem (branched chain amino acid (BCAA)) se řadí 3 esenciální aminokyseliny, a to L-leucin, L-isoleucin a L-valin (struktury jsou uvedeny na obr. 6). Esenciální aminokyseliny si živočišný organismus nedokáže syntetizovat a musí být proto dodávány do organismu s potravou. Tyto tři aminokyseliny hrají důležitou roli při regulaci metabolismu. Představují okamžitý zdroj energie, neboť jsou využitelné přímo z krevního oběhu, odkud přecházejí do svalových buněk. Jsou proto schopné svaly chránit před úbytkem svalové hmoty a mohou také přispívat k nárůstu objemu svalů. Zlepšují regeneraci svaloviny po těžkém tréninku sportovců tím, že potlačují tvorbu toxických látek po namáhavé svalové práci, a také snižují únavu v důsledku zvyšování hladiny serotoninu. Napomáhají udržovat stálou hladinu cukru v krvi, a tak oddálit výkonnostní selhání. Bývají součástí dostupných potravinových doplňků, využívaných především kulturisty a atlety. V těchto preparátech jsou BCAA přítomné jako L-formy, které vykazují biologickou aktivitu a jsou registrovány jako potraviny pro speciální výživu^{95,96}. Během výrobního procesu, či nevhodného skladování ale mohou v těchto produktech vznikat příslušné D-formy daných aminokyselin, které se liší ve svých biologických a fyziologických vlastnostech. Je proto důležité kontrolovat enantiomerní čistotu těchto výrobků, aby nedocházelo k výživovým ztrátám z důvodu nemetabolizovatelných a biologicky nevyužitelných forem těchto aminokyselin⁹⁷.



Obr. 6: Strukturní vzorce aminokyselin s rozvětveným řetězcem

Aminokyseliny a jejich deriváty (blokované analogy) jsou velmi důležité prekurzory v syntéze peptidů. Jsou rezistentní vůči racemizaci během syntézy peptidového řetězce, ale jejich enantiomerní čistota je nezbytná pro kvalitu finálního produktu. Je proto nezbytné vyvinout rychlé a efektivní metody separací těchto prekurzorů a zajistit tak kvalitu vysoce čistých substancí. Aminokyseliny obecně byly podrobeny rozsáhlému studiu. Pomocí HPLC byly separovány ligandově-výměnnou chromatografií⁹⁸, pomocí CSP na bázi cyklodextrinů⁴⁶, proteinů²⁷ nebo polysacharidů³⁴. Enantioseparace aminokyselin s rozvětveným postranním řetězcem byla studována na CSPs s navázanými crown-ethery⁹⁹, polysacharidy¹⁰⁰, na Pirklových CSP¹⁰¹ a s využitím cyklodextrinových CSP¹⁰² a s CSP na bázi makrocyclických antibiotik¹⁰³. Všechny výše zmíněné skupiny látek významně působí (přímo nebo zprostředkovaně) na lidský organismus. Ačkoli jsou analyty z jednotlivých skupin strukturně podobné, mechanismus separace je pro jednotlivé zástupce různý a separační podmínky pro úspěšné rozdělení konkrétních enantiomerů se liší.

4 Experimentální část

V této části jsou shrnuty přístrojová technika a obecné separační podmínky používané v publikacích zahrnutých v disertační práci. Detailnější informace o experimentálních podmínkách jsou k dispozici v jednotlivých publikacích.

4.1 Použité přístroje

HPLC

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:

CHIROBIOTIC TAG (Astec, Whippany, NY, USA) - teikoplanin aglykon vázaný na silikagel (250 x 4,6 mm I.D., zrnění 5 µm)

CHIROBIOTIC T (Astec, Whippany, NY, USA) - teikoplanin vázaný na silikagel (250 x 4,6 mm I.D., zrnění 5 µm, velikost pórů 120 Å)

CHIROBIOTIC T2 (Astec, Whippany, NY, USA) - teikoplanin vázaný na silikagel (250 x 4,6 mm I.D., zrnění 5 µm, velikost pórů 200 Å)

Počítačový program: Clarity™ 2.1, Watrex®, Praha, ČR

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

CLC

Kapalinový chromatograf:

Pumpa: ISCO 100DM, Lincoln, NE, USA

Detektor: LINEAR UV/VIS 205, San Jose, CA, USA, s CE detekční celou

Dávkovací ventil: VALCO s dávkovací smyčkou 60 nl, Schenk, Švýcarsko

Použité kolony:

Protože kapilární chirální kolony nejsou komerčně dostupné, byly použité kapilární kolony s navázaným teikoplanin aglykonem laboratorně připravené Ing. J. Planetou z Ústavu analytické chemie AV ČR v Brně. Pro přípravu chirální kolony byla použita křemenná kapilára (vnitřní průměr 320 µm), která byla naplněna v délce 25 cm stacionární fází Chirobiotic TAG (Astec, Whippany, NY, USA). Výstupní část

naplněné kapiláry byla napojena pomocí převlečné teflonové trubičky na prázdnou křemennou kapiláru o vnitřním průměru 100 μm , na níž bylo vypáleno detekční okénko ve vzdálenosti 70 mm od spoje obou kapilár. Podrobněji je příprava kapilár popsána v publikaci [2] – viz příloha.

4.2 Příprava pufků a mobilních fází

Pro studium retenčního a enantioseparačního chování byly aplikovány dva separační módy - reverzní (RP) a polárně-iontový (PIM). Reverzní separační mód byl realizován mobilní fází složenou z methanolu a vody nebo methanolu a 0,1 nebo 1,0% triethylaminooctanového pufku v různých objemových poměrech. Při přípravě TEAA pufku byl připraven vodný 0,1% roztok triethylaminu, jehož pH bylo upraveno na požadované hodnoty v rozmezí 3,0 – 6,5 přidávkou příslušného množství octové kyseliny. Při přípravě 1% vodného roztoku TEAA pufku bylo postupováno obdobně. Před použitím byla každá mobilní fáze, tj. směs organického modifikátoru a pufku (vody) odvzdušněna v ultrazvukové lázni po dobu nejméně 15 minut.

V polárně-iontovém separačním módu se mobilní fáze skládala z methanolu s velmi malými přídávky triethylaminu a octové kyseliny, řádově v desetinách až setinách obj. procent.

Pro provedení Waltersova testu bylo postupováno dle literatury¹⁰⁴. Ke stanovení indexu hydrofobicity (HI) byla použita mobilní fáze tvořená acetonitrilem a vodou v poměru 65/35 (v/v). Pro stanovení silanolového indexu (SI) tvořil mobilní fázi čistý acetonitril.

4.3 Obecné podmínky měření

Při enantioseparacích bylo pracováno za laboratorní teploty. V systému HPLC byla průtoková rychlost mobilní fáze v RP módu 0,7 $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$ a v PI módu 1,0 $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$. Průtoková rychlost mobilní fáze v systému cLC byla při použití RP módu 4 $\mu\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$. Pro detekci byla použita UV spektrofotometrie při vlnové délce 200 nm pro BCCA, 230 nm pro ibuprofen, indoprofen, karprofen, flurbiprofen, fenoprofen, 2,2-CPPA, 2,3-CPPA, 2,4-CPPA, atenolol, oxprenolol a propranolol, při 254 nm pro alprenolol, acebutolol a pindolol a při 270 nm pro flobufen, ketoprofen a suprofen.

5 Publikované práce

[1] Marie Vadinská, Zuzana Bosáková, Eva Tesařová; Study of Enantioseparation Behaviour of Profen NSAIDs on Teicoplanin Aglycone-Based Chiral Stationary Phase by HPLC; 3th International Student Conference „Modern Analytical Chemistry“, Praha, ISBN 80-86238-96-2, 2007, 17-27.

[2] Marie Vadinská, Zuzana Bosáková, Eva Tesařová, Pavel Coufal, Josef Planeta; LC with a Teicoplanin Aglycone Chiral Sorbent for the Separation of the Enantiomers of Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs; An Evaluation of the Chiral Capillary Columns; *Chromatographia* 67, 2008, 33-40.

[3] Marie Honetschlägerová-Vadinská, Simona Srkalová, Zuzana Bosáková, Pavel Coufal, Eva Tesařová; Comparison of Enantioselective HPLC Separation of Structurally Diverse Compounds on Chiral Stationary Phases with Different Teicoplanin Coverage and Distinct Linkage Chemistry; *J. Sep. Sci.*32, 2009, 1704-1711.

5.1 Komentář k publikovaným pracím

Tématem této disertační práce bylo využití vysokoúčinných chromatografických metod (HPLC a cLC) pro studium retenčního a enantioseparačního chování vybraných skupin biologicky aktivních látek na chirálních stacionárních fázích na bázi makrocyclických antibiotik (glykopeptidů) – teikoplaninu a teikoplanin aglykonu.

Pro separaci vybraných profenů byla v systému HPLC použita chirální stacionární fáze s navázaným teikoplanin aglykonem [1]. Při optimalizaci enantioseparačních podmínek byl sledován vliv složení mobilní fáze (obsah organického modifikátoru, koncentrace TEAA pufru a jeho hodnota pH) na chirální separaci skupiny profenů s cílem najít podmínky, umožňující enantioseparaci co největšího počtu studovaných látek.

Následně byla vyvinutá HPLC metoda aplikována i na kapilární systém [2]. Jak již bylo uvedeno výše, nejsou chirální kapilární kolony komerčně dostupné,

a proto v souvislosti s jejich přípravou a aplikací je nutná jejich evaluace. Za optimalizovaných separačních podmínek byly testovány a evaluovány tři paralelně připravené kapilární kolony s navázaným teikoplanin aglykonem. Důraz byl kladen především na kritické zhodnocení metody přípravy kolony vzhledem k vybraným parametrům – retenci, selektivitě a rozlišení. Výsledky získané na jednotlivých kapilárních kolonách byly porovnány jak mezi sebou, tak i s výsledky získanými v odpovídajícím systému HPLC.

Enantioseparační schopnost dvou chirálních stacionárních fází na bázi teikoplaninu, lišících se pokrytím tímto CS (kolony Chirobiotic T a T2), byla sledována a porovnána pro tři skupiny strukturně odlišných analytů (aminoalkoholy - farmaka, chlorofenoxipropanové kyseliny - herbicidy, aminokyseliny s rozvětveným řetězcem - potravinová aditiva) [3]. V reverzním separačním módu resp. v hydrofilní interakční chromatografii (HILIC) a v polárně-iontovém separačním módu byl sledován vliv experimentálních podmínek na retenční a enantioselektivní mechanismus jednotlivých analytů. Výsledky získané na obou srovnávaných kolonách byly kriticky zhodnoceny.

5.2 Enantioseparace profenů metodou vysokoúčinné kapalinové chromatografie na CSP na bázi teikoplanin aglykonu [1]

Vzhledem ke struktuře profenů a k výsledkům uveřejněným v literatuře pro enantioseparaci profenů na CSP s navázaným teikoplaninem⁸⁹ (velmi krátké retenční časy v RP separačním módu s vysokým obsahem organického modifikátoru) nebyl pro studovanou CSP s navázaným teikoplanin aglykonem testován polárně-iontový separační mód. Bylo pracováno pouze v reverzním separačním módu, tvořeném mobilní fází s methanolem jako organickým modifikátorem a vodným 0,1 nebo 1,0% TEAA pufrům (pH 4,0 - 6,0) v různém objemovém poměru. Objem methanolu se pohyboval v rozmezí 80 - 40 % obj. Hodnota pH pufru může ovlivňovat polární skupiny nejen analytů, ale také chirálního selektoru, a tím i charakter a intenzitu stereoselektivní interakce.

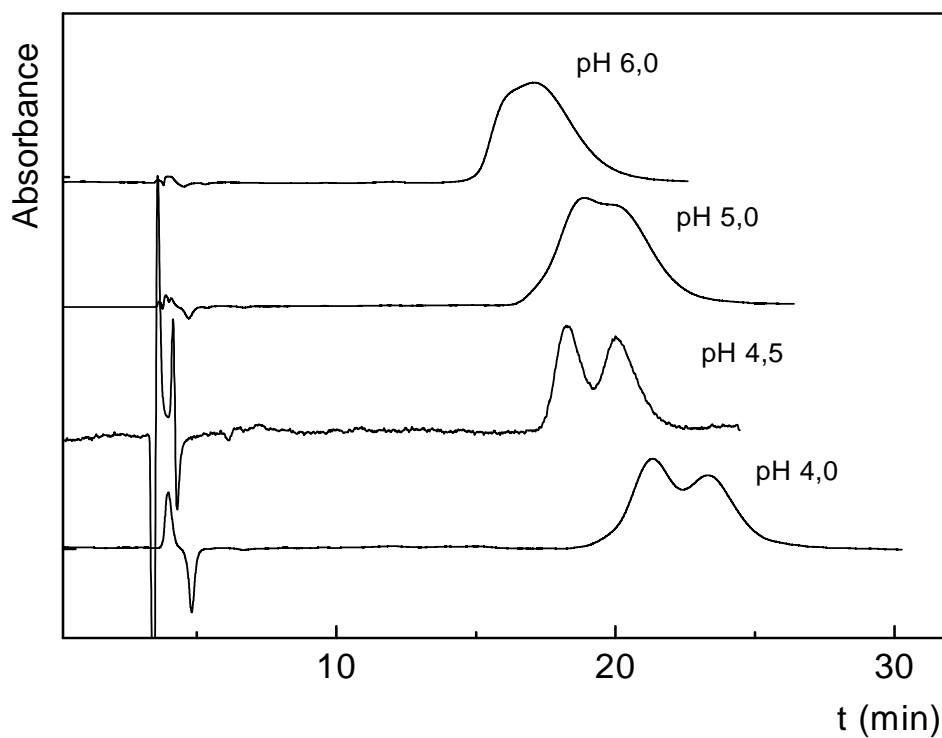
Ze získaných výsledků vyplynulo, že retence všech studovaných látek vzrůstala se snižujícím se obsahem methanolu v mobilní fázi. Jako nejvhodnější se proto jevila mobilní fáze se 40% obsahem methanolu, která se stala základem pro

další experimenty (vliv hodnoty pH a koncentrace pufru). Získané výsledky jsou uvedeny v tabulce 3. Ze všech tří testovaných hodnot pH pufru (pH 4,0, 5,0 a 6,0) se jako nejhorší jevila hodnota pH 6,0, ve které se rozdělily částečně pouze tři, respektive čtyři analyty. Při porovnání výsledků, získaných s oběma koncentracemi TEAA pufru je zřejmé, že nižší koncentrace pufru vede k delší retenci profenů (s výjimkou flobufenu, který se odlišuje svojí strukturou) pouze při pH 4,0. S vyššími hodnotami pH pufru byly získány opačné výsledky, tedy použití 0,1% TEAA pufru vedlo k dramatickému zkrácení retence (zejména při pH 6,0). S výjimkou ibuprofenu a flobufenu bylo dosaženo vyšších hodnot enantioselektivního rozlišení v mobilních fázích s vyšší koncentrací pufru. Na základě těchto výsledků byl vliv pH pufru studován detailněji v mobilní fázi 40/60 (v/v) methanol/1,0% TEAA pufr. Selektivita i rozlišení mírně rostly se stoupající hodnotou pH pufru do hodnoty 4,0 nebo 4,5 a poté opět klesaly. Nejvyšších hodnot rozlišení pro indoprofen a karprofen bylo dosaženo při pH 4,0 a pro ibuprofen, flurbiprofen, suprofen a flobufen při pH 4,5 (viz obr. 7 a 8). Vyšší hodnota pH (6,0) byla příznivá pouze pro enantioseparaci ketoprofenu. K enantioselektivnímu rozlišení fenoprofenu nedošlo v žádné ze studovaných mobilních fází.

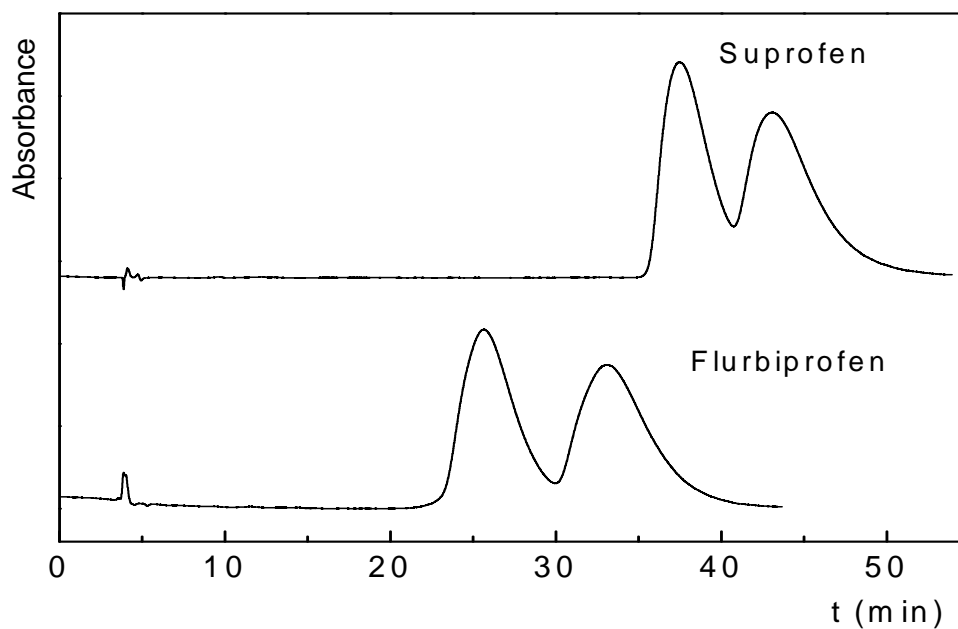
Tyto výsledky lze shrnout konstatováním, že pro různé profeny jsou optimalizované separační podmínky odlišné.

Tab. 3: Vliv koncentrace a hodnot pH TEAA pufru v mobilní fázi na retenci a enantioseparaci profenu v systému HPLC. Stacionární fáze: Chirobiotic TAG, mobilní fáze: MeOH/TEAA pufr 40/60 (v/v), k_1 – retenční faktor, α – selektivita, R – rozlišení.

pH 4,0	0,1% TEAA			1,0% TEAA		
	k_1	α	R	k_1	α	R
Ibuprofen	5,59	1,24	0,54	4,52	1,11	0,51
Indoprofen	14,54	1,13	0,66	12,44	1,14	0,80
Fenoprofen	6,86	1,00	0,00	5,27	1,00	0,00
Karprofen	26,57	1,08	0,29	18,79	1,08	0,50
Flurbiprofen	9,67	1,07	0,26	7,37	1,16	0,78
Ketoprofen	7,33	1,00	0,00	6,54	1,00	0,00
Suprofen	8,12	1,08	0,30	8,23	1,17	1,05
Flobufen	12,48	1,07	0,31	10,64	1,07	0,29
pH 5,0	k_1	α	R	k_1	α	R
Ibuprofen	2,67	1,06	0,39	3,80	1,04	0,14
Indoprofen	6,16	1,14	0,53	10,42	1,15	0,43
Fenoprofen	3,71	1,00	0,00	4,47	1,00	0,00
Karprofen	16,20	1,00	0,00	15,58	1,00	0,00
Flurbiprofen	3,83	1,13	0,29	6,62	1,28	1,03
Ketoprofen	2,66	1,00	0,00	4,94	1,15	0,53
Suprofen	3,58	1,12	0,36	6,90	1,26	1,03
Flobufen	6,28	1,04	0,13	7,03	1,03	0,12
pH 6,0	k_1	α	R	k_1	α	R
Ibuprofen	0,76	1,00	0,00	3,70	1,00	0,00
Indoprofen	2,13	1,07	0,19	8,50	1,15	0,38
Fenoprofen	0,84	1,00	0,00	3,81	1,00	0,00
Karprofen	3,61	1,00	0,00	11,93	1,00	0,00
Flurbiprofen	1,22	1,24	0,36	5,62	1,34	1,06
Ketoprofen	0,98	1,00	0,00	4,13	1,19	0,57
Suprofen	1,32	1,26	0,30	6,06	1,28	0,90
Flobufen	1,92	1,00	0,00	4,71	1,00	0,00



Obr. 7: Vliv pH pufru na separaci ibuprofenu. Experimentální podmínky: TAG CSP; mobilní fáze - methanol/1,0% TEAA 40/60 (v/v).



Obr. 8: Chromatogramy suprofeny a flurbiprofenu za optimalizovaných separačních podmínek: TAG CSP; mobilní fáze - methanol/1,0% TEAA 40/60 (v/v), pH 4,5.

5.3 Enantioseparace profenů metodou kapilární kapalinové chromatografie [2]

Pro separaci profenů byla i v případě kapilární kapalinové chromatografie využita kapilární kolona s teikoplanin aglykonovým chirálním selektorem navázaným na silikagelovém nosiči. Kolony byly připraveny Ing. J. Planetou z Ústavu analytické chemie AV ČR v Brně (postup přípravy viz příslušná publikace).

Aby bylo možno porovnat retenční a enantioseparační chování studovaných analytů za využití vysokoúčinné kapalinové chromatografie na koloně Chirobiotic TAG a kapilární kapalinové chromatografie na kapilární koloně naplněné stejným sorbentem (Chirobiotic TAG), bylo v případě obou metod pracováno za identických separačních podmínek, tzn. při stejném složení mobilních fází.

Nejprve byl opět proměřován vliv obsahu methanolu v mobilní fázi methanol/1,0% TEAA pufr o různých hodnotách pH (4,0, 5,0 a 6,0) na retenční faktor, selektivitu a rozlišení jednotlivých profenů. Získané výsledky (viz tab. 4) vykazovaly obdobné trendy jako v případě HPLC. Hodnoty retenčních faktorů se zvyšovaly v závislosti na vyšších přídavných vodné složky v mobilní fázi. V rámci jednotlivých proměřovaných obsahů methanolu v mobilních fázích, stoupající hodnota pH měla za následek zkracování retence. Nejvýrazněji se tento trend projevoval v mobilních fázích s nejnižším proměřovaným obsahem methanolu (40 obj. %). Vzhledem k hodnotám pK_a profenů (3,9 - 5,0), je jejich karboxylová skupina při pH 6 již disociována a mobilní fáze s nízkým obsahem organického modifikátoru jsou pro deprotonizaci příznivější. Nárůst retence byl doprovázen mírným zlepšením enantioseparace (s výjimkou fenoprofenu, u kterého nedošlo ani k náznaku dělení). V mobilní fázi 40/60 methanol/1,0% TEAA pufr byl vliv pH pufru studován podrobněji. Získané výsledky jsou uvedeny v tabulce 5. Z té je vidět, že se vzrůstající hodnotou pH se hodnoty retenčních faktorů, selektivity a enantiorozlišení (s výjimkami) nejprve zvyšují (do pH 4 nebo 4,5), a pak opět poněkud klesají. Tyto výsledky ukazují na roli disociace karboxylové skupiny profenů v interakčním mechanismu a na její důležitost při chirální diskriminaci. Nejvyšších hodnot enantiorozlišení bylo dosaženo v mobilní fázi methanol/1,0% TEAA pH 4,0 pro karprofen a flobufen, a při pH 4,5 pro ibuprofen, indoprofen, flurbiprofen a suprofen. Výjimku tvořil ketoprofen k jehož částečnému enantiorozlišení došlo až při pH 4,5

a nejvyšší hodnota byla dosažena při pH 5,0. Ani při využití metody cLC nebyla enantioseparace fenoprofenu úspěšná v žádné testované mobilní fázi.

Tab. 4: Vliv složení mobilní fáze na retenci a enantioseparaci profenů. Experimentální podmínky: cLC; TAG CSP, mobilní fáze: methanol/1,0% TEAA (v/v), označení jako v tabulce 3.

MeOH									
pH 4,0	80 %			60 %			40 %		
	k_1	α	R	k_1	α	R	k_1	α	R
Ibuprofen	0,00	1,00	0,00	0,52	1,00	0,00	3,01	1,09	0,81
Indoprofen	0,87	1,13	0,60	1,86	1,14	0,87	9,54	1,10	0,85
Fenoprofen	0,20	1,00	0,00	0,68	1,00	0,00	4,04	1,00	0,00
Karprofen	0,57	1,00	0,00	1,72	1,07	0,54	12,35	1,08	0,62
Flurbiprofen	0,29	1,26	0,51	0,87	1,18	0,98	5,55	1,12	1,05
Ketoprofen	0,38	1,00	0,00	0,81	1,00	0,00	4,75	1,00	0,00
Suprofen	0,51	1,20	0,64	1,12	1,18	1,02	5,93	1,11	0,92
Flobufen	0,29	1,00	0,00	0,90	1,00	0,00	7,81	1,08	0,81

pH 5,0									
Ibuprofen	0,00	1,00	0,00	0,49	1,00	0,00	2,45	1,07	0,56
Indoprofen	0,88	1,14	0,64	1,75	1,14	0,66	8,93	1,12	0,71
Fenoprofen	0,00	1,00	0,00	0,56	1,00	0,00	3,80	1,00	0,00
Karprofen	0,60	1,00	0,00	1,75	1,00	0,00	10,50	1,05	0,43
Flurbiprofen	0,27	1,42	0,67	0,86	1,31	1,27	5,12	1,12	1,08
Ketoprofen	0,34	1,00	0,00	0,74	1,12	0,99	3,74	1,13	1,03
Suprofen	0,56	1,26	0,77	1,05	1,24	1,13	5,89	1,12	1,16
Flobufen	0,00	1,00	0,00	0,70	1,00	0,00	7,12	1,08	0,59

pH 6,0									
Ibuprofen	0,00	1,00	0,00	0,41	1,00	0,00	2,02	1,06	0,44
Indoprofen	0,71	1,22	0,70	1,44	1,60	0,67	8,50	1,15	0,73
Fenoprofen	0,00	1,00	0,00	0,46	1,00	0,00	2,45	1,00	0,00
Karprofen	0,45	1,00	0,00	1,49	1,00	0,00	9,30	1,00	0,00
Flurbiprofen	0,00	1,00	0,00	0,73	1,00	1,30	5,16	1,11	0,92
Ketoprofen	0,00	1,00	0,00	0,60	1,15	0,56	3,60	1,17	0,99
Suprofen	0,40	1,30	0,91	1,01	1,27	1,22	4,65	1,11	0,98
Flobufen	0,00	1,00	0,00	0,51	1,00	0,00	5,90	1,08	0,54

Tab. 5: Vliv pH pufru na chromatografická data studovaných profenů.

Experimentální podmínky: cLC; TAG CSP, mobilní fáze: 40/60 (v/v) methanol/1,0% TEAA, označení jako v tabulce 3.

	pH	3,0	3,5	4,0	4,5	5,0	6,0
Ibuprofen	k_1	1,91	2,69	3,01	3,50	2,45	2,02
	α	1,06	1,08	1,09	1,11	1,07	1,06
	R	0,54	0,63	0,81	0,93	0,56	0,44
Indoprofen	k_1	5,87	8,18	9,54	11,32	8,93	8,50
	α	1,07	1,08	1,10	1,13	1,12	1,15
	R	0,64	0,67	0,85	0,96	0,71	0,73
Fenoprofen	k_1	2,54	3,69	4,04	5,15	3,80	2,45
	α	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
	R	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Karprofen	k_1	6,77	10,21	12,35	12,20	10,50	9,30
	α	1,07	1,08	1,08	1,06	1,05	1,00
	R	0,61	0,60	0,62	0,51	0,43	0,00
Flurbiprofen	k_1	3,28	4,70	5,55	6,90	5,12	5,16
	α	1,00	1,06	1,12	1,17	1,12	1,11
	R	0,00	0,54	1,05	1,40	1,08	0,92
Ketoprofen	k_1	2,97	3,89	4,75	4,92	3,74	3,60
	α	1,00	1,00	1,00	1,04	1,13	1,17
	R	0,00	0,00	0,00	0,46	1,03	0,99
Suprofen	k_1	3,66	4,76	5,93	6,65	5,89	4,65
	α	1,04	1,06	1,11	1,17	1,12	1,11
	R	0,46	0,54	0,92	1,29	1,16	0,98
Flobufen	k_1	3,99	5,54	7,81	7,66	7,12	5,90
	α	1,04	1,06	1,08	1,07	1,08	1,08
	R	0,41	0,54	0,81	0,65	0,59	0,54

5.3.1 Evaluace chirálních kapilárních kolon na bázi teikoplanin aglykonu

Pro evaluaci laboratorně připravených kapilárních kolon naplněných komerčně dostupnou chirální stacionární fází Chirobiotic TAG bylo vybráno pět derivátů profenů, jmenovitě ibuprofen, suprofen, flurbiprofen (vyznačující se dobrými hodnotami rozlišení a relativně krátkou dobou analýzy), indoprofen, (charakteristický velmi dlouhou retencí, ale dobrou hodnotou rozlišení) a fenoprofen (ani částečně se nedělící v žádné ze zkoušených mobilních fází). Enantioseparací těchto analytů za optimalizovaných podmínek (mobilní fáze methanol/1,0% TEAA pufr, pH 4,5, 40/60 (v/v)) probíhalo testování tří identicky naplněných kapilárních kolon v rámci určení opakovatelnosti („run-to-run“) a reprodukovatelnosti („column-

to-column“) výsledků. Průměrné hodnoty ($n = 10$) spolu s relativními směrodatnými odchylkami vybraných retenčních a separačních charakteristik jsou pro jednotlivé kolony uvedeny v tabulce 6. Opakovatelnost měření pro jednotlivé kolony je vyjádřena jako relativní směrodatná odchylka (RSD) měřených parametrů (retenční faktor dříve eluujícího enantiomeru (k_1), enantioselektivita (α), enantiorozlišení (R), počet teoretických pater na metr kolony pro dříve eluující enantiomer (N_1) a faktor asymetrie pro dříve eluující enantiomer (As_1)). Hodnota RSD nepřesáhla pro žádný z vyhodnocovaných parametrů 8 %. Reprodukovatelnost v rámci tří kolon ($n = 3$), vyjádřená jako relativní směrodatná odchylka stejných parametrů, které byly vyhodnocovány v tabulce 6, je uvedena v tabulce 7. Tyto hodnoty RSD jsou podstatně vyšší než RSD získané pro jednotlivé kolony. Rozdíly v separačních vlastnostech jednotlivých kolon nejsou pravděpodobně způsobeny kolonami jako takovými, ale spíše mohou souviset z přípravou keramických frit na koncích kapiláry, které značně ovlivňují impedanci kolony. Dalším zdrojem zvýšených hodnot RSD může být spoj naplněné a prázdné kapiláry.

Tab. 6: Průměrné hodnoty vybraných chromatografických dat ($n = 10$) získaných na třech identicky plněných kapilárních kolonách v mobilní fázi 40/60 (v/v) methanol/1,0% TEAA, pH 4,5; k_1 – retenční faktor prvního enantiomeru, α – selektivita, R – enantiorozlišení, N_1 – počet teoretických pater prvního enantiomeru vztažený na metr kolony, As_1 – asymetrický faktor prvního enantiomeru, RSD – relativní směrodatná odchylka vypočtená z deseti měření (%).

Analyt	Kapilára	k_1	RSD_{k_1}	α	RSD_{α}	R	RDS_R	N_1/m	$RSD_{N_1/m}$	As_1	RSD_{As_1}
Ibu	1	3,50	2,51	1,11	1,00	0,93	5,17	10649	3,36	1,07	6,27
	2	3,36	1,44	1,11	1,19	0,75	4,06	15493	3,67	1,01	7,11
	3	3,67	1,29	1,08	1,02	0,80	2,86	13901	3,60	1,03	6,09
Ind	1	11,32	2,01	1,13	0,99	0,96	5,61	7719	7,25	2,04	7,80
	2	10,92	3,25	1,09	1,36	0,88	4,37	8030	5,34	1,87	7,74
	3	11,42	1,12	1,10	0,89	0,91	3,94	7533	4,91	1,71	7,18
Fen	1	5,15	1,33	1,00	*	0,00	*	4777	7,91	2,06	3,90
	2	4,11	1,19	1,00	*	0,00	*	5847	6,27	2,15	4,99
	3	4,85	1,06	1,00	*	0,00	*	6488	3,37	1,91	3,87
Flu	1	6,90	2,09	1,17	0,67	1,40	4,82	5719	6,43	2,08	7,33
	2	6,40	2,04	1,14	0,92	1,19	4,48	6067	4,13	2,59	6,48
	3	6,68	1,71	1,12	0,91	1,15	3,95	6348	3,10	1,97	7,59
Sup	1	6,65	1,77	1,17	0,80	1,29	4,02	7178	7,42	1,91	7,14
	2	6,75	0,94	1,13	0,99	1,20	3,02	6661	4,80	2,20	6,41
	3	7,42	1,02	1,11	0,81	0,98	4,52	6155	6,72	1,79	7,66

* - žádná enantioseparace

Tab. 7: Reprodukovatelnost dat, získaných na třech identicky naplněných kolonách, vyjádřená relativní směrodatnou odchylkou (RSD %) testovaných parametrů, označení jako v tabulce 6.

Analyt	k_1	α	R	N_1	As_1
Ibu	3,61	1,29	9,18	8,30	2,41
Ind	1,93	1,54	3,59	2,64	7,19
Fen	4,54	*	*	5,33	4,85
Flu	3,07	1,79	8,79	4,26	7,96
Sup	2,30	2,19	8,38	6,27	8,75

* nepočítáno

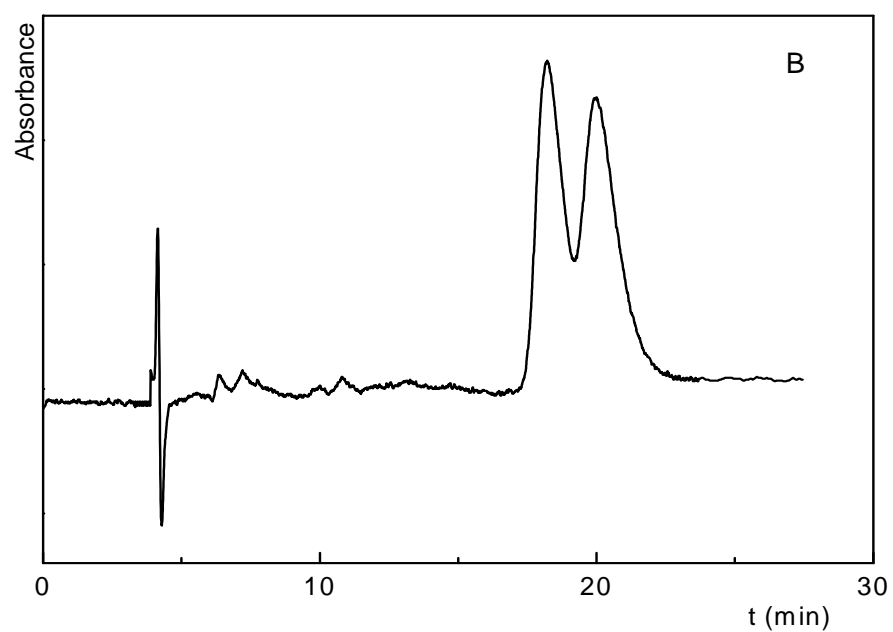
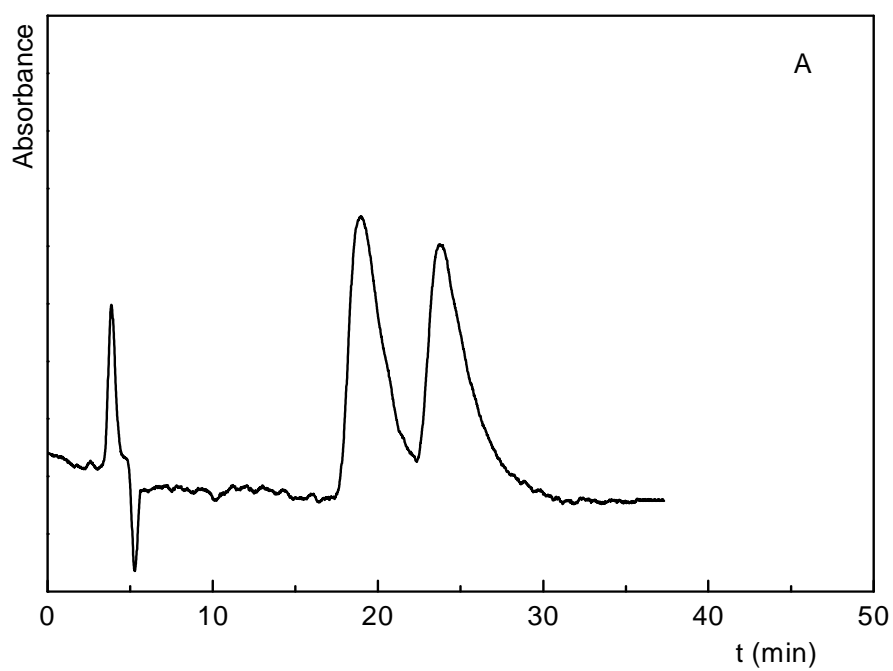
5.3.2 Srovnání chromatografického chování profenů v kapilární kapalinové chromatografii a vysokoúčinné kapalinové chromatografii

Pro srovnávací studii obou separačních systémů byly vybrány korespondující experimentální podmínky. Výsledky, získané v obou separačních systémech v mobilních fázích 40/60 (v/v) methanol/1% TEAA pufr (pH 3,0 - 6,0), jsou sumarizovány v tabulce 8. V rámci studie byly porovnávány následující parametry: retenční faktor dříve eluujícího enantiomeru (k_1), enantiosektivita (α), enantiorozlišení (R), počet teoretických pater na metr kolony pro dříve eluující enantiomer (N_1) a faktor asymetrie pro dříve eluující enantiomer (As_1). Jak je patrné z tabulky 8, jsou hodnoty k_1 , získané pro jednotlivé profeny nižší v systému cLC než při použití HPLC techniky. Všeobecně vyšší hodnoty rozlišení a vyšší počet teoretických pater byly zjištěny v cLC. Vyšší účinnost kapilární kolony může být dána nižšími mimokolonovými příspěvky, které jsou pro techniku kapilární kapalinové chromatografie charakteristické. Na druhou stranu faktory symetrie píků byly mnohem lepší v systému HPLC. Vysvětlení není jednoznačné, tato skutečnost může být patrně způsobena nestereoselektivními interakcemi mezi analyty a volnými silanolovými skupinami v kapiláře. Pro ilustraci je na obr. 9 ukázána enantioseparace ibuprofenu v cLC (A) a HPLC (B). Z obrázku je patrné, že vyšší enantiorozlišení bylo dosaženo v systému cLC při srovnatelné době analýzy.

Tab. 8: Srovnání chromatografických dat získaných v systému cLC a HPLC. Mobilní fáze: MeOH/1,0% TEAA 40/60 (v/v), označení jako v tabulce 6.

	pH	cLC				HPLC			
		3,0	4,0	4,5	5,0	3,0	4,0	4,5	5,0
Ibu	k_1	1,91	3,01	3,50	2,45	2,79	4,52	4,35	3,80
	α	1,06	1,09	1,11	1,07	1,08	1,11	1,12	1,04
	R	0,54	0,81	0,93	0,56	0,44	0,51	0,70	0,56
	N_1	19978	12435	10649	18562	8257	3420	7664	7934
	As_1	0,57	1,27	1,07	0,69	1,12	0,57	1,30	0,75
Ind	k_1	5,87	9,54	11,32	8,93	8,25	12,44	13,46	10,42
	α	1,07	1,10	1,13	1,12	1,09	1,14	1,13	1,15
	R	0,64	0,85	0,96	0,71	0,48	0,80	0,64	0,30
	N_1	8370	7666	7719	8007	6573	6167	4870	6006
	As_1	1,02	2,22	2,04	1,50	1,36	1,53	1,35	1,35
Kar	k_1	6,77	12,35	12,20	10,50	10,80	18,79	20,15	15,58
	α	1,07	1,08	1,06	1,05	1,08	1,08	1,09	1,00
	R	0,61	0,62	0,51	0,43	0,44	0,50	0,40	0,00
	N_1	13692	11329	11822	12258	8301	7876	7076	8060
	As_1	0,94	1,13	1,21	1,15	0,98	0,68	0,90	0,90
Flu	k_1	3,28	5,55	6,90	5,12	4,84	7,37	7,54	6,62
	α	1,00	1,12	1,17	1,12	1,05	1,16	1,16	1,28
	R	0,00	1,05	1,40	1,08	0,27	0,78	1,17	1,03
	N_1	5559	8744	5719	8321	6406	4052	4568	4890
	As_1	1,32	1,92	2,08	1,68	0,93	1,47	1,98	1,60
Ket	k_1	2,97	4,75	4,92	3,74	4,25	6,54	6,70	4,94
	α	1,00	1,00	1,04	1,13	1,00	1,00	1,00	1,15
	R	0,00	0,00	0,46	1,03	0,00	0,00	0,00	0,53
	N_1	9188	4387	5270	8206	4178	2693	2870	3280
	As_1	1,35	1,43	1,41	1,52	1,60	1,55	1,57	1,70
Sup	k_1	3,66	5,93	6,65	5,89	4,99	8,23	8,01	6,90
	α	1,04	1,11	1,17	1,12	1,07	1,17	1,18	1,26
	R	0,46	0,92	1,29	1,16	0,36	1,05	1,11	0,95
	N_1	8836	7939	7178	8956	5822	4115	4128	4879
	As_1	0,40	1,66	1,91	1,70	1,02	1,89	1,96	1,72
Flo	k_1	3,99	7,81	7,66	7,12	4,99	8,23	9,47	6,90
	α	1,04	1,08	1,07	1,08	1,05	1,07	1,09	1,03
	R	0,41	0,81	0,65	0,59	0,28	0,29	0,48	0,12
	N_1	18741	13610	13673	17048	11521	7818	9875	10244
	As_1	0,34	0,95	1,24	0,93	0,54	0,56	0,84	0,62

Ze získaných výsledků lze říci, že chirální stacionární fáze na bázi teikoplanin aglykonového chirálního selektoru jsou vhodné pro enantioseparaci skupiny profenů. Mobilní fáze s nízkým obsahem methanolu, vyšší koncentrací TEAA pufru a jeho pH hodnotou v rozmezí 4,0 - 4,5 zajišťují vhodné separační podmínky pro enantioseparaci profenů v obou separačních technikách - v HPLC i cLC. Lepší hodnoty enantiorozlišení byly získány v miniaturizovaném cLC systému díky vyšší separační účinnosti. V optimalizovaných separačních podmínkách bylo v cLC alespoň částečně chirálně rozděleno sedm z osmi studovaných profenů. Tři kapilární kolony, identicky naplněné sorbentem na bázi teikoplanin aglykonu a testované v rámci opakovatelnosti a reprodukovatelnosti vybraných chromatografických parametrů, vykazovaly hodnoty RSD (spočítané pro sledované parametry) do 10 %, což jsou hodnoty srovnatelné s komerčně dostupnými HPLC kolonami.



Obr. 9: Srovnání separace enantiomerů ibuprofenu v cLC (A) and HPLC (B).
 Experimentální podmínky: TAG CSP; mobilní fáze: 40/60 (v/v) methanol/1,0%
 TEAA, pH 4,5.

5.4 Porovnání enantioselektivní HPLC separace strukturně odlišných látek na stacionárních fázích s rozdílným pokrytím teikoplaninem [3]

Jak již bylo uvedeno v kap. 3.4.5.4, současný vývoj v oblasti chirálních stacionárních fází na bázi makrocyclických antibiotik je, vedle zavádění nově modifikovaných chirálních selektorů, zaměřen i na přípravu nosičů s vyšším pokrytím chirálním selektorem. Vyšší pokrytí poskytuje vyšší počet interakčních míst, které mohou zlepšit stereoselektivní interakci s analyty a kapacitu CSP. Spolu s množstvím navázaného chirálního selektoru na nosič mohou podstatným způsobem ovlivnit retenci, selektivitu, účinnost a enantiorozlišení také způsob navázání chirálního selektoru na nosič a velikost pórů nosiče. V oblasti kapalinové chromatografie bylo tomuto tématu věnováno pouze několik prací. Studie zaměřené na glykopeptidy zahrnovaly pouze laboratorně připravené chirální stacionární fáze na bázi ristocetinu A a komerčně dostupné CSP na bázi vankomycinu a teikoplaninu. Srovnávací studie teikoplaninových CSP s rozdílným stupněm pokrytí byla provedena pro vybrané β -aminokyseliny^{66,67}.

V naší práci byla studována a porovnána schopnost enantioselektivního dělení dvou komerčně dostupných chirálních stacionárních fází na bázi teikoplaninu, lišících se stupněm pokrytí, tj. kolony Chirobiotic T a Chirobiotic T2 (vyšší pokrytí). Pro srovnávací studii byly vybrány tři skupiny strukturně značně odlišných analytů z různých aplikačních oblastí (relativně nepolární aminoalkoholy - farmaka, polární chlorofenoxipropanové kyseliny - herbicidy, amfoterní aminokyseliny s rozvětveným řetězcem - potravinová aditiva), jejich enantioseparace probíhala v různých separačních módech. Získané výsledky byly diskutovány s ohledem na možný retenční mechanismus.

5.4.1 Charakterizace obecných vlastností chirálních stacionárních fází (Waltersův test)

Jak již bylo uvedeno dříve, obě testované chirální stacionární fáze se liší navzájem nejenom stupněm pokrytí silikagelu teikoplaninem, ale také navázáním teikoplaninu na silikagelový nosič a pórovitostí vlastního silikagelu. Proto byl nejprve pro všeobecnou charakterizaci těchto CSP aplikován jednoduchý test,

navržený pro charakterizaci a porovnání reverzních stacionárních fází typu C₁₈, C₈ pro achirální chromatografii, tzv. Waltersův test. Ten je založen na zhodnocení příspěvků dvou základních typů interakcí, projevujících se při retenčním mechanismu v reverzním separačním systému - hydrofobních a silanofilních interakcích. Index hydrofobicity je vyjádřen poměrem retenčních faktorů anthracenu a benzenu v mobilní fázi složené z acetonitrilu a vody (65/35, v/v). Hydrofobní interakce závisí v reverzním separačním systému na množství a délce uhlovodíkových řetězců. Silanolový index je získán z poměrů retenčních faktorů *N,N*-diethyltoluamidu (*N,N*-DETA) a anthracenu v mobilní fázi tvořené čistým acetonitrilem, v jehož prostředí jsou dobře solvatovány alkylové řetězce. Silanolové interakce jsou závislé na počtu volných silanolových skupin¹⁰⁵. Přestože Waltersův test byl navržen pro klasifikaci reverzních achirálních systémů, lze při jeho aplikaci na zvolené chirální kolony z jeho výsledků vyvodit určité závěry. Získané indexy HI a SI na kolonách Chirobiotic T a T2 jsou uvedeny v tabulce 9.

Tab. 9: Index hydrofobicity (HI) a silanolový index (SI), na kolonách Chirobiotic T a T2.

kolona	HI <i>k</i> (anthracen)/<i>k</i> (benzen)	SI <i>k</i> (<i>N,N</i>-DETA)/<i>k</i> (anthracen)
Chirobiotic T	0,95	2,17
Chirobiotic T2	1,18	1,76

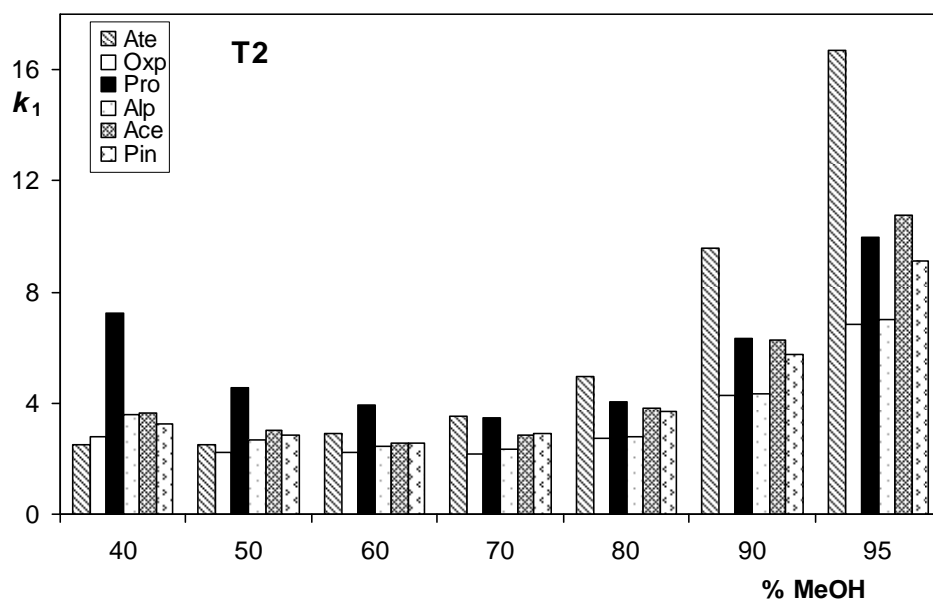
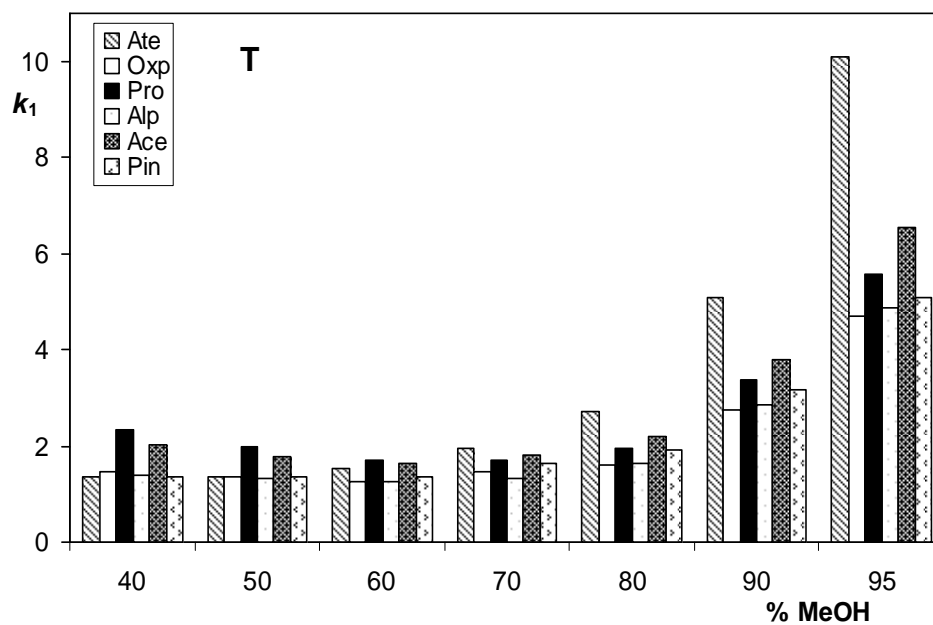
Z tab. 9 vyplývá, že hodnoty HI se od klasických reverzních fází typu C₈ a C₁₈ (HI ~ 3 - 4) značně liší. Podstatně nižší získané hodnoty HI pro obě kolony reflektují přítomnost velkého počtu polárních skupin v molekule teikoplaninu. Poněkud vyšší hodnoty HI získané pro kolonu T2 korespondují s vyšším pokrytím silikagelu teikoplaninem, jehož struktura obsahuje hydrofobní řetězec (viz obr. 1). Také hodnoty SI souvisí s hodnotami HI, tzn. nižší hodnoty HI pro Chirobiotic T odpovídají vyšším hodnotám SI a naopak. Silanolové interakce hrají důležitou roli na CSP s nižším pokrytím silikagelového nosiče teikoplaninem (T kolona). Nižší hodnota silanolového indexu pro T2 kolonu také reflektuje její delší vazebný řetězec, obsahující karbamátovou skupinu, lépe chránící aminy od interakcí se silikagelem.

Z již dosažených výsledků LFER (linear free energy relationship)⁶⁴ vyplývá, že hydrofobní interakce dominují v mobilních fázích s nízkým obsahem organického modifikátoru, zatímco polární interakce hrají významnou roli v mobilních fázích s jeho vysokým obsahem. Druhý zmiňovaný systém může být považován za hydrofilní interakční chromatografii (HILIC)^{106,107}. V HILIC systémech je retence a selektivita polárních analytů primárně určována hydrofilními interakcemi.

5.4.2 Aminoalkoholy

Aminoalkoholy (β -blokátory) jsou bazické sloučeniny s relativně nízkou polaritou obsahující hydroxylovou a aminovou skupinu v těsné blízkosti chirálního centra a obsahující minimálně jedno aromatické jádro ve své struktuře (viz obr. 4).

Vliv obsahu organického modifikátoru v mobilní fázi methanol/1,0% triethylaminoctanový pufr, pH 4,5 na retenci a enantioseparaci jednotlivých analytů je znázorněn na obr. 10. Pro obě studované teikoplaninové kolony byla získána závislost ve tvaru písmene U, výraznější v případě kolony s vyšším pokrytím. Tvar závislosti poukazuje na změnu interakčního mechanismu se změnou množství organického modifikátoru v separačním systému. Při nízkém obsahu methanolu převažují hydrofobní interakce, typické pro reverzní retenční mechanismus. Polární interakce hrají dominantní roli při vysokém obsahu methanolu v mobilní fázi. Hodnoty enantioselektivity i enantiorozlišení se na obou kolonách zvyšovaly s rostoucím obsahem methanolu v mobilní fázi, pro jednotlivé analyty byly hodnoty enantiorozlišení v odpovídajících mobilních fázích vždy vyšší na koloně Chirobiotic T2. Pro ilustraci jsou v tab. 10 uvedeny hodnoty enantioselektivity a enantiorozlišení získané pro obě kolony v mobilních fázích s vysokým obsahem methanolu.

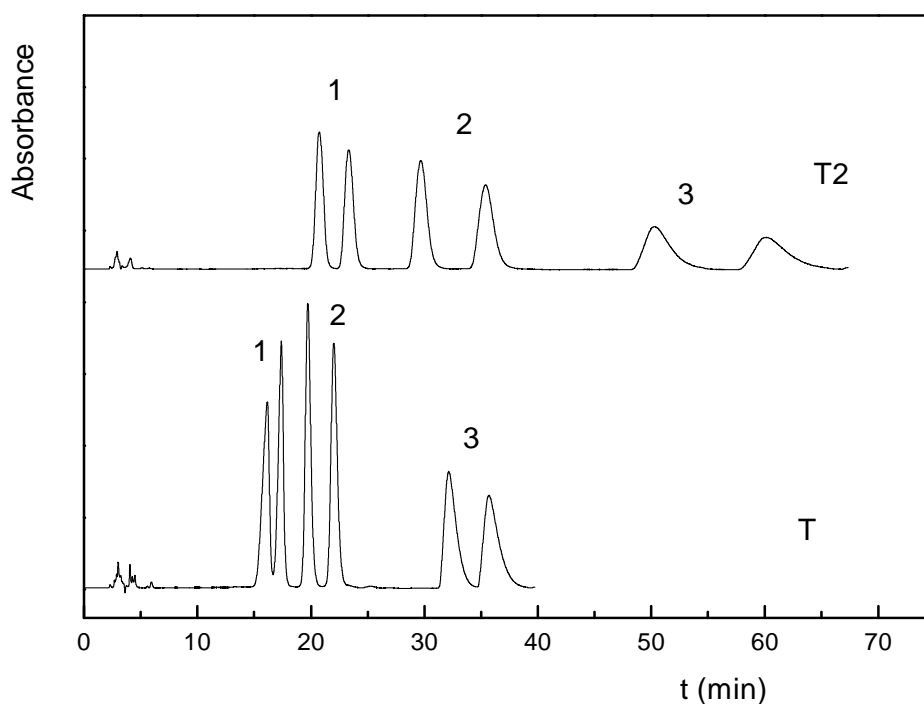


Obr. 10: Závislost retenčních faktorů aminoalkoholů na množství methanolu v mobilní fázi. Stacionární fáze: Chirobiotic T, Chirobiotic T2. Mobilní fáze: MeOH/1,0% TEAA pufr, pH 4,5 (v/v). Ate - atenolol, Oxp - oxprenolol, Pro - propranolol, Alp - alprenolol, Ace - acebutolol, Pin - pindolol.

Tab. 10: Vliv obsahu methanolu v mobilní fázi na enantioselektivitu (α) a enantiorozlišení (R) aminoalkoholů. Mobilní fáze: MeOH/1,0% TEAA pH 4,5 (v/v).

	70%				80%				90%				95%			
	T		T2		T		T2		T		T2		T		T2	
	α	R	α	R	α	R	α	R	α	R	α	R	α	R	α	R
Ate	1,00	0,00	1,05	0,52	1,04	0,59	1,08	0,97	1,07	1,07	1,13	1,44	1,09	1,30	1,17	1,45
Oxp	1,00	0,00	1,04	0,40	1,04	0,55	1,07	0,66	1,06	0,97	1,10	1,10	1,07	0,68	1,12	1,40
Pro	1,04	0,45	1,07	0,65	1,06	0,80	1,10	1,02	1,08	1,47	1,14	1,63	1,10	2,04	1,17	2,12
Alp	1,04	0,49	1,08	0,74	1,06	0,63	1,10	1,06	1,09	1,26	1,15	1,55	1,11	0,60	1,17	1,98
Ace	1,00	0,00	1,06	0,59	1,04	0,58	1,08	0,86	1,06	1,09	1,11	1,24	1,07	1,38	1,13	1,42
Pin	1,02	0,38	1,07	0,64	1,05	0,65	1,09	1,01	1,07	1,38	1,13	1,48	1,09	1,77	1,16	1,77

Na základě dobrých výsledků získaných v mobilních fázích s vysokým podílem methanolu byl aplikován i polárně-iontový mód, realizovaný methanolem s různými přídávky octové kyseliny a triethylaminu (0,05 - 0,10 vol. %) na podporu polárních interakcí. Snížení koncentrace kyseliny i báze (při jejich konstantním objemovém poměru) vedlo k prodloužení retence na obou kolonách. Delší retence byla doprovázena zlepšením enantioseparace na koloně T2, naopak lepší chirální dělení bylo dosaženo na koloně T při redukované retenci za přítomnosti vyššího obsahu obou komponent. Vliv vzájemného poměru kyseliny a báze na rozlišení nebyl pozorován. Nejvhodnější složení mobilní fáze pro dělení enantiomerů β -blokátorů bylo MeOH/HAc/TEA v poměru 100/0,1/0,1 (v/v/v) pro kolonu T a v poměru 100/0,05/0,05 (v/v/v) pro kolonu T2. Na obr. 11 je znázorněna separace směsi enantiomerů oxprenololu, propranololu a atenololu na obou teikoplaninových CSP při stejném složení mobilní fáze.



Obr. 11: Srovnání enantioseparace oxprenololu (1), propranololu (2) a atenololu (3) na kolonách Chirobiotic T a T2. Mobilní fáze: MeOH/HAc/TEA 100/0,05/0,05 (v/v/v).

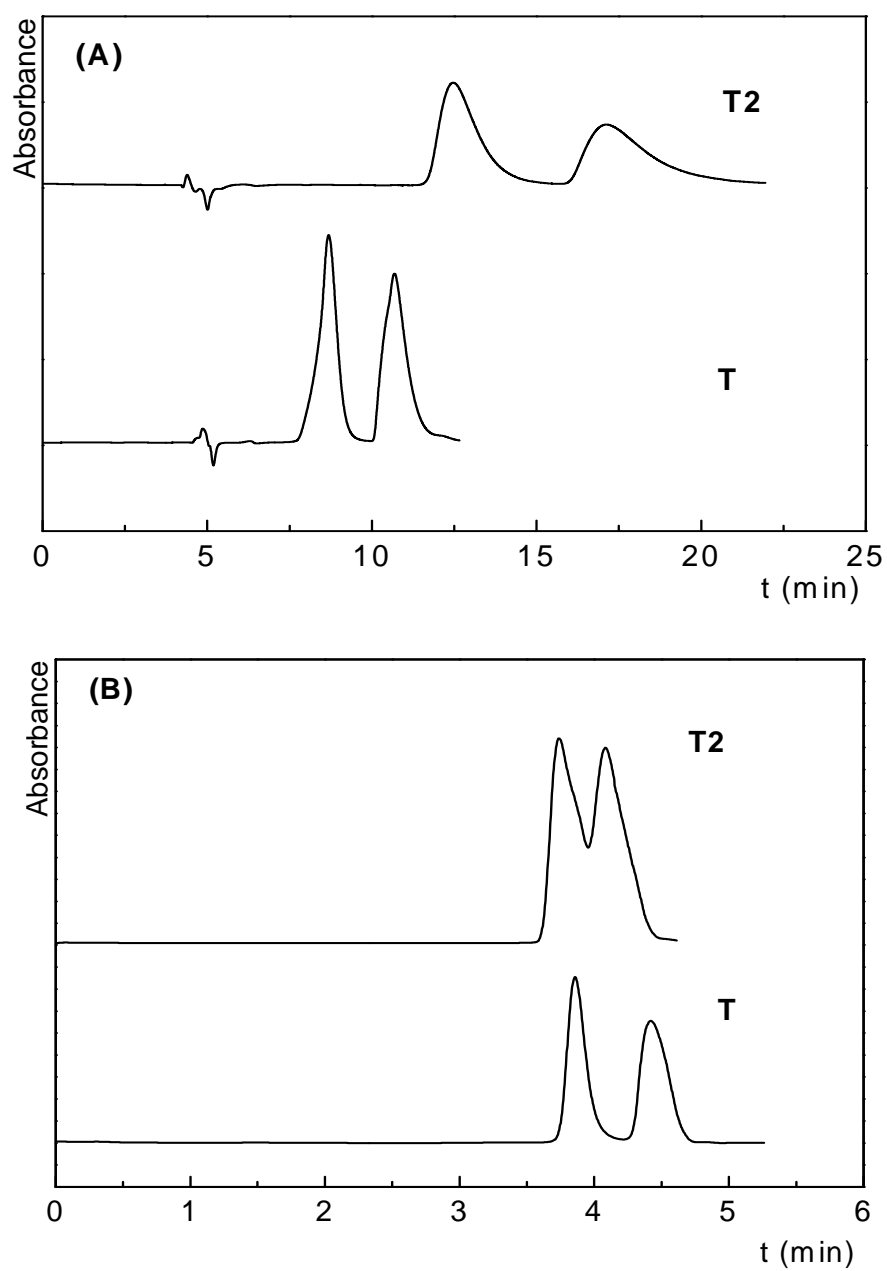
Vyšší retence, doprovázená i lepšími hodnotami rozlišení pro všechny aminoalkoholy ve všech testovaných mobilních fázích byla dosažena na koloně T2.

Lepší výsledky enantioseparace aminoalkoholů byly dosaženy v polárně-iontovém separačním módu.

5.4.3 Chlorofenoxypropanové kyseliny

Chlorofenoxypropanové kyseliny obsahují aromatický kruh blízko chirálního centra a zároveň karboxylovou skupinu, schopnou vytvářet elektrostatické interakce.

Jako první byl testován reverzní separační mód, kdy mobilní fázi tvořil methanol a 1,0% TEAA pufr, pH 4,5 a 6,5 v různých objemových poměrech. Retence těchto derivátů se snižovala s rostoucím podílem methanolu v mobilní fázi. Tato závislost naznačovala, že použití polárně-iontového separačního módu není vhodné. Delší retence byla zaznamenána na CSP s vyšším pokrytím, nicméně při vyšším obsahu methanolu v mobilní fázi se zvýšila retence na koloně T. V mobilních fázích s nižším obsahem methanolu byly lepší hodnoty enantioselektivity a enantioseparace získány na koloně T2. Obr. 12 ilustruje chirální separaci 2,4-CPPA na obou kolonách v závislosti na různém složení mobilní fáze. Derivát 2,3-CPPA vykazoval odlišné chování. Vyšší enantioselektivity tohoto analytu bylo dosaženo na koloně T2 ve všech studovaných mobilních fázích, takže změna poměru methanolu a TEAA pufru neměla podstatný vliv. Získané výsledky jsou shrnuty v tabulce 11.



Obr. 12: Enantioseparace 2,4-CPA na kolonách Chirobiotic T a Chirobiotic T2 při dvou různých složeních mobilních fází: (A) MeOH/1,0% TEAA, pH 4,5 20/80 (v/v); (B) MeOH/1,0%TEAA, pH 4,5 90/10 (v/v).

Tab. 11: Vliv obsahu methanolu v mobilní fázi na enantioselektivitu (α) a enantiorozlišení (R) CPPA na kolonách Chirobiotic T a T2. Mobilní fáze: MeOH/1,0% TEAA, pH 4,5.

	10 %		20%		30%		40%		90%		95%													
	T		T2		T		T2		T		T2													
	α	R	α	R	α	R	α	R	α	R	α	R												
2,2-CPPA	1,22	1,43	1,28	0,95	1,27	1,50	1,33	1,27	1,32	1,77	1,36	1,41	1,34	1,44	1,39	1,50	1,52	1,16	1,48	0,64	1,63	1,44	1,56	1,55
2,3-CPPA	1,09	0,51	1,27	1,15	1,12	0,65	1,32	1,42	1,15	0,65	1,34	1,69	1,16	0,62	1,36	1,39	1,23	0,58	1,27	0,47	1,33	0,69	1,36	0,47
2,4-CPPA	1,30	1,60	1,42	1,45	1,35	1,76	1,49	2,60	1,45	1,99	1,55	2,41	1,47	1,91	1,57	2,14	1,73	1,72	1,55	0,69	1,89	2,07	1,60	0,64

Na obou kolonách s navázaným teikoplaninem bylo dosaženo dobrého rozlišení všech tří chlorofenoxypropanových kyselin. S výjimkou 2,3-CPPA byly při nižším obsahu methanolu v mobilní fázi získány lepší hodnoty rozlišení na koloně T2, zatímco opačné výsledky vykazovala kolona T. To ukazuje na lepší aplikační možnosti chirální stacionární fáze s nižším stupněm pokrytí v HILIC systému.

5.4.4 Aminokyseliny s rozvětveným řetězcem

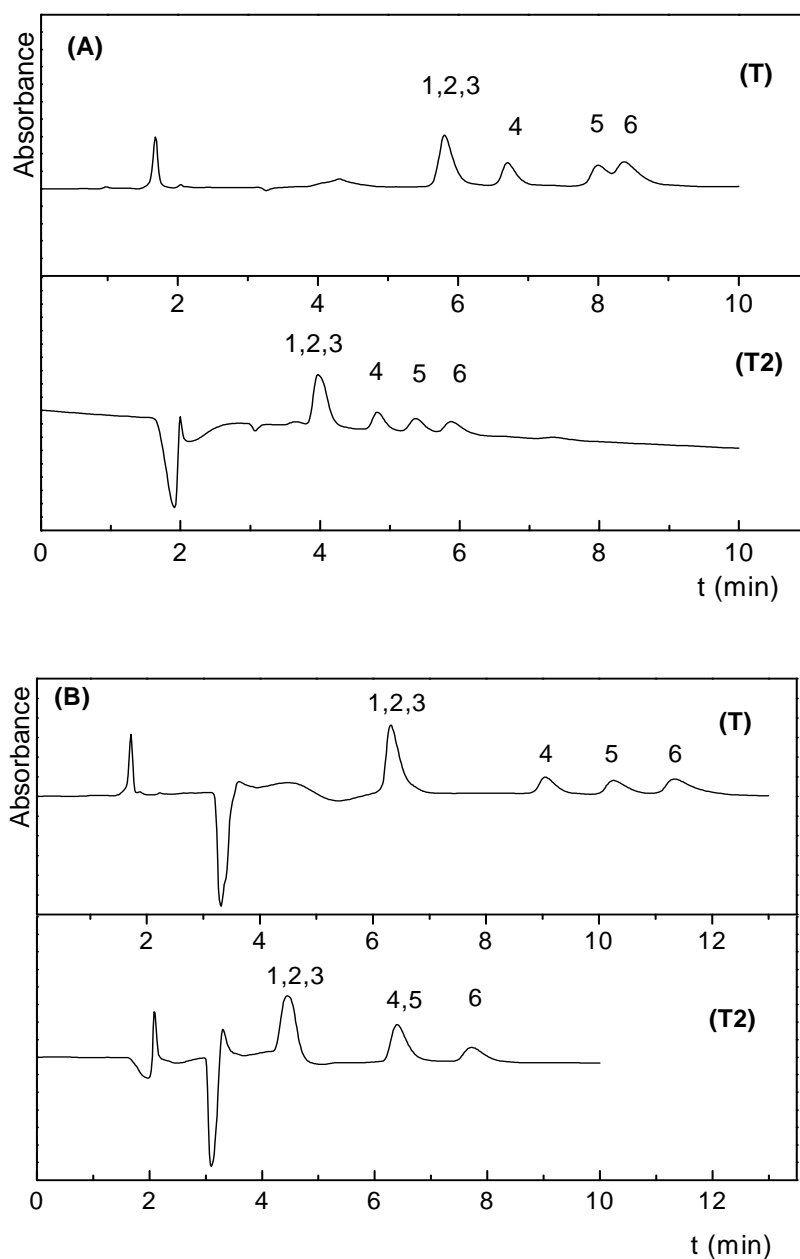
Tři studované aminokyseliny s rozvětveným řetězcem - valin, leucin a isoleucin patří do skupiny hydrofobnějších aminokyselin (jejich $\log D$ při pH 7,0 je -2,26, -1,61 a -1,72)¹⁰⁸. Tyto nativní aminokyseliny jsou důležitými složkami potravinových doplňků a D-enantiomery jsou považovány za nežádoucí nečistoty¹⁰⁹. Z tohoto důvodu byla optimalizace separačních podmínek zaměřena pouze na oddělení D-enantiomerů. Obecně platí, že chirální stacionární fáze na bázi teikoplaninu jsou velice vhodné pro enantioseparaci aminokyselin za použití jednoduchých vodně-organických mobilních fází¹⁰³. Proto bylo chování těchto aminokyselin testováno v mobilních fázích tvořených pouze vodou a methanolem v různých objemových poměrech. Získané výsledky jsou uvedeny v tab. 12. Z ní je zřejmé, že se zvýšením obsahem organického modifikátoru docházelo k prodloužení retence, doprovázené i lepší enantioselektivitou a enantiorozlišením D-enantiomerů. Retenční faktory D-enantiomerů aminokyselin při nízkém obsahu methanolu v mobilní fázi sledovaly hodnoty hydrofobicity jednotlivých aminokyselin a jejich retenční pořadí tedy bylo D-leu > D-ile > D-val. Změna jejich elučního pořadí byla pozorována na obou kolonách, pokud obsah methanolu v mobilní fázi převýšil 40 obj. %. Toto chování může indikovat změnu interakčního mechanismu od reverzního k takovému, ve kterém jsou hydrofobní interakce méně významné.

Srovnání separačního chování D- a L-enantiomerů směsi aminokyselin získané pro obě kolony ve dvou různých mobilních fázích je znázorněno na obr. 13. V obou případech je pozorována nižší retence na koloně T2. V mobilních fázích s nižším obsahem methanolu byly získány lepší hodnoty rozlišení pro D-enantiomery na koloně T2 (obr. 13 A), zatímco v mobilních fázích s vyšším obsahem methanolu byly lepší výsledky rozlišení dosaženy na koloně T (obr. 13 B). Retence odráží typické chování analytů v HILIC systému, ve kterém jsou polární analyty separovány

na polární stacionární fázi s vodně-organickou mobilní fází a zvýšený podíl vodné složky snižuje retenci. Vyšší polarita kolony T (vzhledem ke koloně T2) se zdá být v případě retenčního mechanismu v systému HILIC výhodná.

Tab. 12: Vliv obsahu methanolu v mobilní fázi na retenční faktory (k_1), enantioselektivitu (α) a enantiorozlišení (R) studovaných aminokyselin na kolonách Chirobiotic T a T2. Mobilní fáze: MeOH/H₂O (v/v).

	20 %						40 %						60 %						80 %					
	T			T2			T			T2			T			T2			T			T2		
	k_1	α	R	k_1	α	R	k_1	α	R	k_1	α	R	k_1	α	R	k_1	α	R	k_1	α	R	k_1	α	R
Val	1,90	1,13	1,14	1,45	1,13	0,90	2,20	1,22	2,03	1,60	1,20	1,52	2,70	1,41	3,28	2,08	1,38	2,71	4,30	1,73	4,43	2,76	1,58	4,00
Ile	2,55	1,32	2,43	1,71	1,32	1,86	3,00	1,56	4,09	2,08	1,52	3,00	3,70	1,96	5,28	2,60	1,80	4,21	5,85	2,50	7,00	3,40	2,11	6,28
Leu	2,86	1,34	2,57	2,03	1,29	1,71	3,11	1,51	3,71	2,09	1,39	2,43	3,52	1,77	4,71	2,31	1,54	3,35	5,19	2,08	5,58	2,73	1,69	4,42



Obr. 13: Chirální separace směsi DL-valinu, DL-leucinu a DL-isoleucinu na koloně Chirobiotic T a Chirobiotic T2; mobilní fáze: (A) MeOH/H₂O 60/40 (v/v); (B) MeOH/H₂O 80/20 (v/v). Analyty: 1: L-val, 2: L-leu, 3: L-ile, 4: D-val, 5: D-leu, 6: D-ile.

Enantioseparační chování vykazovalo velmi podobný charakter jako chování chlorofenoxypropanových kyselin. Vyšší retence, selektivity a rozlišení D-enantiomerů těchto aminokyselin bylo dosaženo na CSP s nižším pokrytím chirálním selektorem v HILIC módu. Příspěvek silanolových skupin k retenci se zdá být v tomto typu interakčního mechanismu výhodný, dokonce i pro vytváření

enantiodiskriminačního prostředí. Poměrně rozsáhlá studie zaměřená na srovnání kolon Chirobiotic T a T2 v různých mobilních fázích pro různé typy analytů ukázala značně variabilní chování těchto separačních systémů. Obecné závěry o enantioseparaci vzhledem k odlišnému pokrytí silikagelového nosiče teikoplaninem nelze provést bez korelace se složením mobilní fáze a strukturou analytů.

6 Závěr

Hlavním cílem této disertační práce bylo sledování retenčního a enantioseparačního chování vybraných biologicky aktivních látek na chirálních stacionárních fázích na bázi makrocyclických antibiotik.

Enantioselektivní separace 2-arylpropanových kyselin (profenů) byla studována za využití metod vysokoúčinné kapalinové chromatografie a kapilární kapalinové chromatografie na chirálních stacionárních fázích s navázaným teikoplanin aglykonem v reverzním separačním módu. K částečné enantioseparaci všech studovaných profenů (s výjimkou fenoprofenu) došlo v obou chromatografických systémech. K dělení enantiomerů profenů se lépe osvědčily mobilní fáze tvořené 1,0% triethylaminoctanovým puřrem o hodnotách pH 4,0 a 4,5, s nižším podílem organického modifikátoru. Z porovnání chromatografických parametrů získaných v obou chromatografických systémech (HPLC a cLC) vyplývá, že vyšší účinnosti a lepšího chirálního rozlišení lze dosáhnout v systému kapilární kapalinové chromatografie.

Chirální kolony pro cLC nejsou komerčně dostupné, bylo proto provedeno testování a evaluace postupu přípravy. Testování tří identicky naplněných kolon probíhalo za optimalizovaných separačních podmínek (mobilní fáze: MeOH/1,0% TEAA, pH 4,5 40/60 (v/v)). Opakovatelnost měření pro jednotlivé analyty, vyjádřená jako relativní směrodatná odchylka, nepřesáhla pro žádný z vyhodnocovaných parametrů (retenční faktor dříve eluujícího enantiomeru, selektivita, enantiorozlišení, počet teoretických pater prvního enantiomeru vztažený na metr kolony, asymetrický faktor) 8 %. Reprodukovatelnost, vyjádřená opět jako RSD vyhodnocovaných chromatografických parametrů, vykazovala hodnotu do 10 %, což je výsledek srovnatelný s komerčně dostupnými HPLC kolonami.

V další části práce byl sledován vliv pokrytí silikagelového nosiče chirálním selektorem – teikoplaninem (kolony Chirobiotic T a T2) na schopnost enantioselektivní separace aminoalkoholů (β -blokátorů) - farmak, chlorofenoxypropanových kyselin – herbicidů a amfoterních aminokyselin – součástí potravinových doplňků. Měření bylo prováděno v reverzním a polárně-iontovém separačním módu.

Pro obecnou charakterizaci obou teikoplaninových CSP s rozdílným pokrytím chirálním selektorem byl použit Waltersův test. Vyplynulo z něho, že poněkud vyšší

index hydrofobicity měla stacionární fáze s větším pokrytím chirálním selektorem. Rozdíl v hodnotách HI mezi oběma kolonami však nebyl výrazný. Naopak vyšší hodnotu silanolového indexu měla stacionární fáze s nižším pokrytím teikoplaninem – silanolové interakce se tudíž v retenčním mechanismu zřejmě uplatňují na této koloně více.

Na obou CSP bylo dosaženo rozlišení všech studovaných aminoalkoholů v obou separačních módech. Vyšší retenční faktory doprovázené lepšími hodnotami chirálního rozlišení byly pro všechny aminoalkoholy ve všech testovaných mobilních fázích dosaženy na koloně Chirobiotic T2. Přičemž lepší výsledky enantioseparace byly získány v polárně-iontovém separačním módu, nejvhodnější složení mobilní fáze pro enantioseparaci aminoalkoholů bylo MeOH/HAc/TEA 100/0,1/0,1 (v/v/v).

Dělení enantiomerů chlorofenoxypropanových kyselin bylo úspěšné na obou teikoplaninových CSP v reverzním separačním módu. Obecně lze konstatovat, že při nižším obsahu methanolu v mobilní fázi byly získány lepší výsledky na koloně T2, zatímco kolona T nabízela vhodnější možnosti pro stereoselektivní interakce, a tudíž lepší chirální rozlišení těchto analytů, při použití mobilní fáze s vysokým obsahem organického modifikátoru.

Enantioseparační chování aminokyselin s rozvětveným řetězcem bylo velmi podobné chování chlorofenoxypropanových kyselin. Vyšší retence, selektivity a rozlišení enantiomerů aminokyselin bylo dosaženo na CSP s nižším pokrytím teikoplaninem v mobilních fázích s vyšším obsahem methanolu.

Výsledky získané v této disertační práci ukázaly, že (i) kapilární kapalinová chromatografie může být úspěšně využita pro chirální separace a že je vhodnou alternativou klasické HPLC; (ii) chirální stacionární fáze na bázi glykopeptidů, konkrétně teikoplaninu a teikoplanin aglykonu, poskytují při využití různých separačních módů vhodné enantiodiskriminační prostředí pro separaci strukturně značně odlišných, biologicky aktivních látek.

7 Seznam použitých zkratek

2,2-CPPA	2,(2-chlorofenoxy)propanová kyselina
2,3-CPPA	2,(3-chlorofenoxy)propanová kyselina
2,4-CPPA	2,(4-chlorofenoxy)propanová kyselina
α	separační faktor (faktor selektivity)
Ace	acebutolol
ACN	acetonitril
Alp	alprenolol
As	asymetrický faktor
Ate	atenolol
BCAA	aminokyseliny s rozvětveným řetězcem (z angličtiny branched chain amino acids)
CE	kapilární elektroforéza
cLC	kapilární kapalinová chromatografie
CS	chirální selektor
CSP	chirální stacionární fáze
D,L-ile	DL-soleucin
D,L-leu	DL-leucin
D,L-val	DL-valin
GC	plynová chromatografie
Fen	fenoprofen
Flo	flobufen
Flu	flurbiprofen
HAc	octová kyselina
HI	index hydrofobicity
HILIC	hydrofilní interakční chromatografie (z angličtiny hydrophilic interaction liquid chromatography)
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
Chirobiotic T (T)	teikoplaninová kolona
Chirobiotic T2 (T2)	teikoplaninová kolona s vyšším pokrytím a jinou vazebnou chemií
Ibu	ibuprofen
Ind	indoprofen
k	retenční faktor
Kar	karprofen
Ket	ketoprofen

LFER	linear free energy relationship
Log <i>D</i>	index hydrofobicity pro určité pH
MA	makrocyclická antibiotika
MeOH	methanol
MF	mobilní fáze
mikro-HPLC	mikrokapalinová chromatografie
<i>N</i>	počet teoretických pater na metr délky kolony
<i>N,N</i> -DETA	<i>N,N</i> -diethyltoluamid
nano-LC	nanokapalinová chromatografie
Oxp	oxprenolol
Pin	pindolol
pK_a	disociační konstanta
Pro	propranolol
<i>R</i>	rozlišení
SI	silanolový index
Sup	suprofen
TAG	teikoplanin aglykon
TEA	triethylamin
TEAA pufr	triethylaminooctanový pufr
<i>v/v</i>	objem/objem (poměr objemů složek MF)
V	vankomycin

8 Použitá literatura

1. Subramanian G.: A Practical Approach to Chiral Separation by Liquid Chromatography, VCH Verlagsgesellschaft and VCH Publisher, New York 1994.
2. Feibush B.: Chirality 10 (1998) 382.
3. Štulík K. a kolektiv: Analytické separační metody, Karolinum, Praha 2004.
4. Perrin C., Vu V. A., Matthijs N., Maftouh M., Massart D. L., Vander Heyden Y.: J. Chromatogr. A 947 (2002) 69.
5. Perrin C., Matthijs N., Mangelings D., Granier-Loyaux C., Maftouh M., Massart D. L., Vander Heyden Y.: J. Chromatogr. A 966 (2002) 119.
6. Vissers J. P. C., Claessens H. A., Cramers C. A.: J. Chromatogr. A 779 (1997) 1.
7. Vissers J. P. C.: J. Chromatogr. A 856 (1999) 117.
8. Ishii D., Takeuchi T.: Trends. Anal. Chem. 9 (1990) 152.
9. Jinno K.: Chromatographia 25 (1988) 1004.
10. Ishii D.: Introduction to Microscale High-Performance Liquid Chromatography, VCH Publishers, New York 1988.
11. Chankvetadze L., Kartoziya I., Yamamoto C., Chankvetadze B., Blaschke G., Okamoto Y.: J. Sep. Sci. 25 (2002) 653.
12. Chankvetadze B., Kartoziya I., Yamamoto C., Okamoto Y., Blaschke G.: J. Pharm. Biomed. Anal. 30 (2003) 1897.
13. Červinka O.: Enantioselektivní reakce v organické chemii, Academia, Praha 1985.
14. Červinka O.: Chem. Listy 93 (1999) 294.
15. Waissner K.: Struktura a nomenklatura organických sloučenin, Organická a bioorganická chemie pro Farmaceutickou fakultu UK, UK Praha 1996.
16. Cadwell J.: J. Chromatogr. A 694 (1995) 39.
17. Gilar M., Tesařová E., Patzelová V., Deyl Z.: Chem. Listy 88 (1994) 514.
18. Wright R. W., Jamali F.: J. Chromatogr. 616 (1993) 59.
19. Lindner W. H., Pettersson C.: Liquid Chromatography in Pharmaceutical, Development, I.W. Wainer, ed. Aster, Springfield 1985.
20. Ward T. J., Oswald T. M.: J. Chromatogr. A 792 (1997) 309.
21. Dalgliesh C. E.: J. Chem. Soc. 1952, 3940.
22. Aboul-Enein H. I., Ali I.: Chromatographia 52 (2000) 679.
23. Illisz I., Berkecz R., Péter A.: J. Sep. Sci. 29 (2006) 1305.
24. Beesley T. E., Scott R. P. W.: Chiral Chromatography, Separation Science Series, Anglie, West Sussex 1998.
25. Haginaka J.: J. Chromatogr. A 906 (2001) 253.
26. Milot M. C.: J. Chromatogr. A 797 (2003) 131.
27. Hofstetter O., Lindstrom H., Hofstetter H.: Anal. Chem. 74 (2002) 2119.
28. Balmer K., Persson B. A., Lagerström P. O.: J. Chromatogr. A 660 (1994) 269.
29. Fitos I., Visy J., Simonyi M.: J. Biochem. Biophys. Methods. 54 (2002) 71.
30. Mallik R., Wa C., Hage D. S.: Anal. Chem. 79 (2007) 1411.
31. Matsunaga H., Haginaka J.: J. Chromatogr. A 1106 (2006) 124.
32. Yashima E.: J. Chromatogr. A 906 (2001) 105.
33. Okamoto Y., Kaida Y.: J. Chromatogr. A 666 (1994) 403.
34. Ikai T., Yamamoto C., Kamigaito M., Okamoto Y.: J. Chromatogr. B 875 (2008) 2.
35. Thunberg L., Hashemi J., Anderson S.: J. Chromatogr. B 875 (2008) 72.
36. Wang W., Guo H., Zhong H., Wang Q., Li S.: J. Chromatogr. A 1210 (2008) 178.
37. Franco P., Zhang T.: J. Chromatogr. B 875 (2008) 48.

-
38. Pirkle W. H., House D. W., Finn J. M.: *J. Chromatogr.* 192 (1980) 143.
 39. Pirkle W. H., Burke J. A.: *J. Chromatogr.* 557 (1991) 173.
 40. Sudo Y., Yamaguchi T., Shimbo T.: *J. Chromatogr. A* 813 (1998) 35.
 41. Vaton-Chanvrier L., Peulon V., Combret Y., Combret J. C.: *Chromatographia* 46 (1997) 613.
 42. Schuster A., Gotte C., Bernhardt G., Buschauer A.: *Chirality* 13 (2001) 285.
 43. Grobuschek N., SripHong L., Schmid M.G., Lorand T., Aboul-Enein H.Y., Gubitz G.: *J. Biochem. Bioph. Meth.* 53 (2002) 25.
 44. Ahuja S.: *Chiral Separation by Liquid Chromatography*. Am. Chem. Soc., Washington 1990.
 45. Yanez J. A., Andrews P. K., Davies N. M.: *J. Chromatogr. B* 848 (2007) 159.
 46. Zhong Q., He L., Beesley T. E., Trahanovsky W. S., Sun P., Wang C., Armstrong D. W.: *J. Chromatogr. A* 1115 (2006) 19.
 47. Armstrong D.W., Tang Y., Chen S., Zhou Y., Bagwill C., Chen J.-R.: *Anal. Chem.* 66 (1994) 1473.
 48. Armstrong D. W., Stalcup A. M., Hilton M. L., Duncan J. D., Faulkner J. R., Chang S. C.: *Anal. Chem.* 62 (1990) 1610.
 49. Aboul-Enein H. Y., Ali I.: *J. Sep. Sci.* 25 (2002) 851.
 50. Armstrong D. W., Liu Y., Ekborg-Ott K. H.: *Chirality* 7 (1995) 474.
 51. Wang S.: *Rapid. Commun. Mass. Sp.* 20 (2006) 291.
 52. Aboul-Enein H. Y., Ali I.: *Il Farmaco* 57 (2002) 513.
 53. Berthod A., Yu T., Kullman J. P., Armstrong D. W.: *Anal. Chem.* 72 (2000) 1767.
 54. Fanali S., Catarcini P., Presutti C.: *J. Chromatogr. A* 994 (2003) 227.
 55. *Chirobiotic Handbook*, 5th ed., Advanced Separation Technology, Whippany, New York 2004.
 56. Bosáková Z., Cuřínová E., Tesařová E.: *J. Chromatogr. A* 1088 (2005) 94.
 57. D'Acquarica I.: *J. Pharm. Biomed. Anal.* 23 (2000) 3.
 58. Berthod A., Chen X., Kullman J. P., Armstrong D. W., Gasparrini F., D'Acquarica I., Villani C., Carotti A.: *Anal. Chem.* 72 (2000) 1767.
 59. Tesařová E., Tuzar Z., Nesměrák K., Bosáková Z., Gaš B.: *Talanta* 54 (2001) 643.
 60. Péter A., Török R., Armstrong D. W.: *J. Chromatogr. A* 1057 (2004) 229.
 61. Berthod A., Yu T., Kullman J. P., Armstrong D. W., Gasparrini F., D'Acquarica I., Misiti D., Carotti A.: *J. Chromatogr. A* 897 (2000) 113.
 62. Berthod A., Xiao T. L., Liu Y., Jenks W. S., Armstrong D.W.: *J. Chromatogr. A* 955 (2002) 53.
 63. Xiao T. L., Tesařová E., Anderson J. L., Egger M., Armstrong D. W.: *J. Sep. Sci.* 29 (2006) 429.
 64. Lokajová J., Tesařová E., Armstrong D. W.: *J. Chromatogr. A* 1088 (2005) 57.
 65. Kalíková K., Lokajová J., Tesařová E.: *J. Sep. Sci.* 29 (2006) 1476.
 66. Illisz I., Ballet S., Van Rompaey K., De Wachter R., Tourwé D., Armstrong D. W., Péter A.: *J. Sep. Sci.* 30 (2007) 1881.
 67. Sztojkov-Ivanov, A., Lazar, L., Fulop, F., Armstrong, D. W., Péter, A.: *Chromatographia* 64 (2006) 89.
 68. Landoni M. F., Soraci A.: *Curr. Drug. Metab.* 2 (2001) 37.
 69. Caldwell J., Hutt A. J., Fournel-Gigleux S.: *Biochem. Farmacol.* (1988) 105.
 70. Bhushan R., Martens J.: *Biomed. Chromatogr.* 12 (1998) 309.
 71. Jin J.-Y., Lee W., Baek C.-S.: *Chin. J. Anal. Chem.* 36 (2008) 1207.

-
72. Gilar M., Tesařová E., Deyl Z.: *Chem. Listy* 90 (1996) 461.
 73. Massolini G., Calleri E., De Lorenzi E., Pregnotato M., Terreni M., Félix G., Gandini C.: *J. Chromatogr. A* 921 (2001) 147.
 74. Liu Y., Berthod A., Mitchell C. R., Xiao T. L., Zhang B., Armstrong D. W.: *J. Chromatogr. A* 978 (2002) 185.
 75. D'Orazio G., Aturki Z., Cristalli M., Quaglia M.G., Fanali S.: *J. Chromatogr. A* 1081 (2005) 105.
 76. Ward T., Dann I. C., Brown A. P.: *Chirality* 8 (1996) 77.
 77. Jacek B.: *J. Biochem. Biophys. Methods* 54 (2002) 197.
 78. Špinar J., Vítovec J.: *Medicína po promoci* 3 (2005) 52.
 79. Kaumann A. J., Molenaar P.: *Pharmacol. Therapeut.* 118 (2008) 303.
 80. Zhang X. H., Ouyang J., Yang Y. P.: *Anal. Lett.* 34 (2001) 1851.
 81. Zhang X. H., Ouyang J., Baeyens W. R. G., Zhai S. D., Yang Y. P., Huang G. M.: *J. Pharm. Biomed. Anal.* 31 (2003) 1047.
 82. Bressolle F., Audran M., Pham T. N., Vallon J. J.: *J. Chromatogr. B* 687 (1996) 303.
 83. Pathare D. B., Jadhav A. S., Shingare M. S.: *J. Pharm. Biomed. Anal.* 41 (2006) 1152.
 84. Kitson S. L., Knagg E.: *J. Labelled. Compd. Rad.* 49 (2006) 517.
 85. Marini R. D., Chiap P., Boulanger B., Rudaz S., Rozet E., Crommen J., Hubert P.: *Talanta* 68 (2006) 1166.
 86. Mangani F., Luck G., Fraudeau C., Verette E.: *J. Chromatogr. A* 762 (1997) 235.
 87. Henriksson H., Stahlerg J., Kouvula A., Pettersson G., Divne C., Valtcheva R., Isaksson R.: *J. Biotechnol.* 57 (1997) 115.
 88. Badaloni E., D'Acquarica I., Gasparrini F., Lalli S., Misiti D., Pazzuckoni F., Sirtori C. R.: *J. Chromatogr. B* 796 (2003) 45.
 89. Kafková B., Bosáková Z., Tesařová E., Coufal P.: *J. Chromatogr. A* 1088 (2005) 82.
 90. Wang Z., Ouyang J., Baeyens W. R. G.: *J. Chromatogr. B* 862 (2008) 1.
 91. D'Orazio G., Fanali S.: *J. Pharm. Biomed. Anal.* 40 (2006) 539.
 92. Schlauch M., Frahm A. W.: *J. Chromatogr. A* 868 (2000) 197.
 93. Lee W., Kim B.: *J. High Resol. Chromatogr.* 21 (1998) 189.
 94. Guillaume Y.-C., Ismaili L., Truong T.-T., Nicod L., Millet J., Thomassin M.: *Talanta* 58 (2002) 951.
 95. Tovar L. R., Schwass D. E.: *Xenobiotics in Foods and Feeds* (Finley J. W., Schwass D. E. (Eds.)), American Chemical Society, Washington, DC 1983.
 96. Brückner H., Jaek P., Langer M., Godel H.: *Amino Acids* 2 (1992) 271.
 97. Boniglia C., Carratu B., Sajžini E.: *J. Food Sci.* 67 (2002) 1352.
 98. Gübitz G., Juffman F., Jellenz W.: *Chromatographia* 14 (1982) 103.
 99. Machida Y., Nishi H., Nakamura K., Nakai H., Sato T.: *J. Chromatogr. A* 805 (1998) 85.
 100. Zhang T., Nguyen D., Franco P., Isobe Y., Michita T., Mukarami T.: *J. Pharm. Biomed. Anal.* 46 (2008) 882.
 101. Tan X. L., Hou S. C., Bian Q. H., Wang M.: *Chin. Chemical Letters* 18 (2007) 461.
 102. Branko S. J., Paresh K. P.: *Tetrahedron* 61 (2005) 919.
 103. Berthod A., Liu Y., Bagwill C., Armstrong D. W.: *J. Chromatogr. A* 731 (1996) 123.
 104. Walters M.J.: *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 70 (1987) 465.

-
105. Kafková B., Tesařová E., Suchánková J., Bosáková Z., Coufal P.: *J. Sep. Sci.*, 26 (2003) 686.
 106. Wang C., Jiang C., Armstrong D. W.: *J. Sep. Sci.* 31 (2008) 1980.
 107. Wu J. Y., Bicker W., Lindner W.: *J. Sep. Sci.* 31 (2008) 1492.
 108. Hansh C., Leo D., Hoekman D.: *Exploring QSAR. Hydrophobic, Electronic and Steric Constant*, ACS Professional Reference Book, American Chemical Society, Washington, DC 1995.
 109. Tovar L. R., Schwass D. E.: *Xenobiotics in Foods and Feeds*, American Chemical Society, Washington, DC 1983.