

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA

Katedra analytické chemie

**Studium separačního chování
vybraných biologicky aktivních látek
kapilární kapalinovou chromatografií**

Mgr. Božena Kafková

Praha 2007

Tato dizertační práce byla vypracována na Katedře analytické chemie
Přírodovědecké fakulty Univerzity Karlovy v Praze v letech 2002 – 2007.

Prohlášení

Prohlašuji, že tuto dizertační práci jsem vypracovala samostatně, pod vedením
školitelek doc. RNDr. Zuzany Bosákové, CSc. a doc. RNDr. Evy Tesařové,
CSc., a že veškerou použitou literaturu jsem řádně citovala.

V Praze dne *14. 5. 2007*

podpis: ...*Božena Kaňková*.....

Poděkování

Úvodem bych chtěla poděkovat svým školitelkám doc. RNDr. Zuzaně Bosákové, CSc. a doc. RNDr. Evě Tesařové, CSc. za odborné vedení při řešení této dizertační práce, za jejich cenné rady a připomínky. Všem spolupracovníkům a kolegům z katedry analytické chemie děkuji za vytvoření příjemných pracovních podmínek po celou dobu mého působení na tomto pracovišti.

Dále bych ráda poděkovala rodičům za podporu a pochopení během celého studia.

Tato práce vznikla za podpory MŠMT, projekt MSM 0021620857.

Prohlášení o podílu na výsledcích prezentovaných v níže uvedených publikacích, jež jsou základem mé dizertační práce „Studium separačního chování vybraných biologicky aktivních látek kapilární kapalinovou chromatografií“.

Bosáková Z., Tesařová E., Coufal P., Kafková B., Barbe J.: „Separace a kvantifikace nově syntetizovaných thioderivatů akridinu pomocí kapilární kapalinové chromatografie“, Chem. Listy 95 (2001) 569-574.

Coufal P., Bosáková Z., Tesařová E., Kafková B., Suchánková J., Barbe J.: „Quantification and purity determination of newly synthesized thioacridines by capillary liquid chromatography“, J. Chromatogr. B 770 (2002) 183-189.

Kafková B., Bosáková Z., Tesařová E., Coufal P.: „Chiral separation of beta-adrenergic antagonists, profen non-steroidal anti-inflammatory drugs and chlorophenoxypropionic acid herbicides using teicoplanin as the chiral selector in capillary liquid chromatography“, J. Chromatogr. A 1088 (2005) 82-93.

Kafková B., Bosáková Z., Tesařová E., Coufal P., Messina A., Sinibaldi M.: „Vancomycin as chiral selector for enantioselective separation of selected profen nonsteroidal anti-inflammatory drugs in capillary liquid chromatography“, Chirality 18 (2006) 531-538.

Čestně prohlašuji, že výsledky z výše uvedených prací byly získány v týmu, kde můj příspěvek byl podstatný - 70 %.

V Praze dne 14. 5. 2007

..... *Božena Kafková*

Mgr. Božena Kafková

Za spoluautory vědeckého týmu potvrzují výše uvedený podíl Mgr. Boženy Kafkové na publikacích.

V Praze dne 15. 5. 2007

..... *Zuzana Bosáková*

Doc. RNDr. Zuzana Bosáková, CSc.
školitelka

Klíčová slova: kapilární kapalinová chromatografie, chirální separace, thioderiváty akridinu, β -blokátory, profeny, deriváty chlorofenoxypropanové kyseliny, vankomycin, teikoplanin

OBSAH

1.	ÚVOD	1
2.	CÍLE DIZERTAČNÍ PRÁCE	2
3.	TEORETICKÁ ČÁST	3
3.1	KAPILÁRNÍ KAPALINOVÁ CHROMATOGRAFIE ...	3
3.1.1	Historie mikrokapalinové chromatografie	3
3.1.2	Výhody a nevýhody CLC	4
3.1.3	Mikrokolony a jejich příprava	4
3.2	CHIRÁLNÍ SEPARACE	6
3.2.1	Chiralita	6
3.2.2	Princip separace chirálních látek	7
3.2.2.1	Nepřímý způsob enantioseparace	7
3.2.2.2	Přímý způsob enantioseparace	8
3.2.3	Chirální selektory	9
3.2.3.1	Makrocyclická antibiotika	9
3.2.4	Chirální separace v CLC	13
4.	LITERATURA	14
5.	PUBLIKOVANÉ PRÁCE	17
5.1	KOMENTÁŘ K PUBLIKACÍM	17
5.1.1	Separace a kvantifikace nově syntetizovaných potencionálních léčiv metodou CLC	17
5.1.2	Využití teikoplaninu jako chirálního selektoru v CLC	20
5.1.3	Využití vankomycinu jako chirálního selektoru v CLC	26
6.	ZÁVĚR	29
7.	SEZNAM PUBLIKACÍ	32
8.	SEZNAM ZKRATEK	33
9.	PUBLIKACE	34
9.1	Bosáková Z., Tesařová E., Coufal P., Kafková B., Barbe J.: „Separace a kvantifikace nově syntetizovaných thioderivátů akridinu pomocí kapilární kapalinové chromatografie“, Chem. Listy 95 (2001) 569-574	34

- 9.2** Coufal P., Bosáková Z., Tesařová E., Kafková B., Suchánková J., Barbe J.: „Quantification and purity determination of newly synthesized thioacridines by capillary liquid chromatography“, *J. Chromatogr. B* 770 (2002) 183-189 40
- 9.3** Kafková B., Bosáková Z., Tesařová E., Suchánková J., Coufal P., Štulík K.: „System peaks observed in capillary liquid chromatography with eluents containing triethylamine“, *Chromatographia* 56 (2002) 445-447 47
- 9.4** Kafková B., Tesařová E., Suchánková J., Bosáková Z., Coufal P.: „Capillary liquid chromatography as a tool for separation of hydrophobic basic drugs. Relation between tests for column characterization and real analysis“, *J. Sep. Sci.* 26 (2003) 686-692 50
- 9.5** Kafková B., Bosáková Z., Tesařová E., Coufal P.: „Chiral separation of beta-adrenergic antagonists, profen non-steroidal anti-inflammatory drugs and chlorophenoxypropionic acid herbicides using teicoplanin as the chiral selector in capillary liquid chromatography“, *J. Chromatogr. A* 1088 (2005) 82-93 57
- 9.6** Kafková B., Bosáková Z., Tesařová E., Coufal P., Messina A., Sinibaldi M.: „Vancomycin as chiral selector for enantioselective separation of selected profen nonsteroidal anti-inflammatory drugs in capillary liquid chromatography“, *Chirality* 18 (2006) 531-538. 69
- 9.7** Němcová I., Nesměrác K., Kafková B., Sejbal J.: „Physicochemical properties of 9-(alkylsulfanyl)- and 9-(arylsulfanyl)acridine derivatives and their interaction with (2-hydroxypropyl) cyclodextrins“, *Collect. Czech. Chem. Commun.* 71 (2006) 179–189 77

1. ÚVOD

Během posledních dvaceti let našla vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC) široké uplatnění v analytických laboratořích v oblasti biologie, farmacie, lékařství, průmyslu a životního prostředí. Masové zavedení této metody je založeno na její schopnosti dělit široké spektrum strukturně značně odlišných nízko- i vysokomolekulárních látek jak polárního, tak i nepolárního charakteru s dostatečnou rychlostí, účinností, citlivostí, spolehlivostí a robustností. Jedním z významných trendů ve vývoji separačních technik je miniaturizace separačních systémů. Miniaturizované kapilární systémy umožňují analýzy minimálních (objemových i hmotnostních) množství látek při spotřebě mobilní fáze (resp. základního elektrolytu), tj. organických rozpouštědel a často drahých aditiv, až o několik řádů nižší než při použití běžných separačních metod. Také spotřeba sorbentů je v případě miniaturizovaných chromatografických technik načně snížena. Velmi malá množství vzorku potřebná k analýze jsou důležitá především při stanovování biologicky aktivních látek a jejich metabolitů¹. Kapilární techniky lze s výhodou využít také při optimalizaci separačního systému vyžadujícího drahá aditiva.

Jednou z miniaturizovaných separačních metod je kapilární kapalinová chromatografie (CLC), která využívá separační výhody kapilárních systémů. Zároveň však může používat stejný druh stacionární fáze jako HPLC a ani složení mobilní fáze se příliš neliší od klasické techniky. Vzhledem k velmi malým průtokům mobilní fáze (jednotky $\mu\text{l}/\text{min}$) je tato separační technika vhodná pro spojení s detektory pracujícími na principu ionizace.

Všeobecně sílící poptávka po vývoji nových metodik pro separaci opticky aktivních látek (enantioseparaci) se promítla i do oblasti miniaturizovaných separačních technik, především do kapilární elektroforézy (CE)², micelární elektrokinetické chromatografie (MEKC)³ a kapilární elektrochromatografie (CEC)⁴. 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.

2. CÍLE DIZERTAČNÍ PRÁCE

Náplní této dizertační práce bylo zkoumat možnost použití CLC pro separaci vybraných biologicky aktivních látek. V oblasti achirálních separací byla pozornost zaměřena na analýzu nově syntetizovaných potencionálních chemoterapeutik, dostupných ve velmi malých množstvích, na určení jejich čistoty v reakční směsi. Pro studium retenčního a enantioseparačního chování tří skupin strukturně odlišných chirálních analytů (β -blokátory, profeny, deriváty chlorofenoxypropanové kyseliny) byl zvolen přímý způsob enantioseparace, realizovaný jak formou chirální stacionární fáze (CSP), kdy je příslušný chirální selektor kovalentně navázaný na silikagelovém nosiči, tak přídavkem stejného chirálního selektoru (CS) do mobilní fáze. Jako chirální selektory byly vybrány dva zástupci ze skupiny makrocyclických antibiotik - vankomycin a teikoplanin. Miniaturizované uspořádání kapalinově chromatografického systému mělo umožnit snadnou variaci experimentálních podmínek směřující k pochopení dějů podílejících se na separačním mechanismu.

3. TEORETICKÁ ČÁST

3.1 KAPILÁRNÍ KAPALINOVÁ CHROMATOGRAFIE

3.1.1 Historie mikrokapalinové chromatografie

Jak již bylo zmíněno v úvodu, vedle klasické HPLC se v posledních letech stále více dostává do popředí zájmu mikrokolonová kapalinová chromatografie^{1,5,6}. Historie mikrokapalinové chromatografie začala již v roce 1967, kdy Horváth a kol. použili pro separaci ribonukleotidů kapiláry o vnitřním průměru 1,0 mm^{7,8}. Termín mikro-HPLC je spojen s pracemi Ishii a kol.^{9,10} z osmdesátých let popisujícími použití plněných teflonových mikrokolon s vnitřním průměrem 0,5 mm pro separaci polyaromatických uhlovodíků. Jiné typy mikrokolon, a to plněné skleněné kolony^{11,12}, „microbore“ kolony^{13,14,15} a křemenné kolony^{16,17}, začaly být používány krátce poté. Na základě klíčových prací Novotného^{11,12,15}, Yanga¹⁷ a Scotta^{13,14} a díky úsilí řady dalších laboratoří^{18,19}, byla mikrokolonová chromatografie zavedena jako komplementární technika ke klasické HPLC.

Pro ilustraci je v tab. 1 uveden přehled chromatografických metod, uspořádaných podle zmenšujícího se vnitřního průměru kolon.

Tab. 1: Nomenklatura chromatografických metod podle rozdílného vnitřního průměru kolon¹

Název chromatografické metody	Vnitřní průměr kolony
Vysokoučinná kapalinová chromatografie	2,0 – 4,6 mm
Mikrokapalinová chromatografie	0,5 – 1,0 mm
Kapilární kapalinová chromatografie	100 – 500 μm
Nanokapalinová chromatografie	10 – 100 μm

3.1.2 Výhody a nevýhody CLC^{1,20}

Miniaturizace v kapalinové chromatografii oproti konvenční metodě přináší řadu výhod. Miniaturizace rozměru kolon vede ke snížení objemu dávkovaného vzorku, spotřeby stacionární i mobilní fáze, což umožňuje použití velmi drahých sorbetů a aditiv mobilní fáze. Průtoky mobilní fáze, které se používají v CLC jsou jednotky $\mu\text{l}/\text{min}$ a to vede ke značné úspoře organických rozpouštědel. Touto úsporou vzniká menší množství odpadů, což má pozitivní vliv na zatížení životního prostředí. Další výhodou je vyšší separační účinnost vlivem menšího chromatografického naředění vzorku. Nižší průtoková rychlost mobilní fáze usnadňuje možnost přímého zapojení s hmotnostním detektorem. Miniaturizace přináší i určité nevýhody, jako jsou větší nároky na instrumentaci a menší objemy detekční cely, s nimiž souvisí i menší citlivost detekce a částečné problémy s přípravou kolon.

3.1.3 Mikrokolony a jejich příprava

Pro přípravu mikrokolon jsou často používány křemenné kapiláry. Jsou chemicky inertní, mají tenké stěny, tedy i malý vnější průměr a lze je dobře termostatovat. Velkou předností je i možnost volit kapiláru/kolonu dostatečně dlouhou, a tím dosáhnout potřebného počtu teoretických pater. Vnější povrch kapilár bývá pokrytý polymerní, většinou polyamidovou, vrstvou. Díky tomu jsou křemenné kapiláry mechanicky velmi odolné, ohebné a snesou vysoký vnitřní přetlak¹⁷.

Pro přípravu náplňových kapilárních kolon lze využít různé plnicí techniky, zahrnující použití plynů^{21,22}, kapalin^{22,23} i superkritických kapalin^{24,25} jako transportního média stacionární fáze dovnitř kolony. Základní princip plnění spočívá v záchytu stacionární fáze ve formě suspenze fritou, vytvořenou z kovového kroužku, skelné vaty, polymerní membrány nebo sintrovaným silikagelem, která je umístěna na konci prázdné kapiláry. Separační účinnost kolony je ovlivňována řadou parametrů jako např. tlakem při plnění, výběrem rozpouštědla, koncentrací suspenze, výběrem frity a především minimalizací mrtvých objemů^{23,26,27}.

Při plnění kapiláry vzniká problém, jak vybavit kolonu zábranou na výstupu, která by bránila úniku sorbentu z kolony. Jednoduchým v praxi používaným řešením²⁸ je uzavření kolony tím, že se na její konec nasadí kapilára (křemenná nebo

teflonová) o délce 5 až 15 mm, jejíž vnitřní průměr odpovídá vnějšímu průměru plněné křemenné kapiláry. Tato kapilára je opatřena fritou ze skelné vaty. Volným koncem se k vrstvě skelné vaty zasune výstupní křemenná kapilára s menším vnitřním průměrem než jaký má separační kapilára. Délka této výstupní kapiláry je volena podle použitého detektoru, neboť tvoří spoj mezi separační kolonou a detektorem.

V současné době je komerčně dostupné velké množství náplňových kapilárních kolon (vnitřní průměr 180 – 800 μm), se širokou nabídkou achirálních sorbentů různé polarity. Samostatnou kapitolu pak tvoří monolitické kapilární kolony na bázi silikagelu^{5,29} či organických polymerů^{30,31}. Různé typy monomerů (hydrofilní - metakrylamid, hydrofobní - styren nebo divinylbenzen, ionogenní - kyselina vinylsulfonová) zajišťují široké využití monolitických kolon³⁰. Jak již bylo zmíněno v úvodu, chirální kapilární kolony nejsou komerčně dostupné a jejich použití je omezeno na laboratorní přípravu.

V průběhu posledních několika let nabývá na významu spojení mikroseparačních technik s hmotnostně spektrometrickou detekcí nebo nukleární magnetickou rezonancí. Vysoká separační účinnost spolu se značnou citlivostí detekce zmíněných kombinovaných technik určují hlavní aplikační oblast mikro- a nanoseparačních metod – bioanalýzu, zahrnující výzkum proteinů, peptidů, fragmentů DNA a řady dalších biologicky aktivních látek^{31,32,33}.

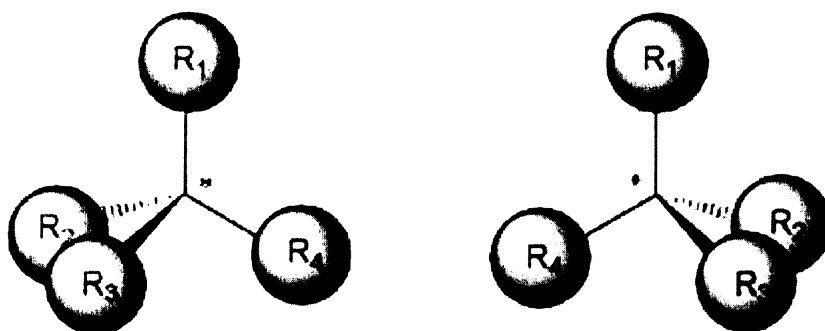
3.2 CHIRÁLNÍ SEPARACE

3.2.1 Chiralita

Slovo chiralita je odvozeno od řeckého slova *chiros*, což znamená dlaň, ruka. Právě levá a pravá ruka jsou typickými příklady zrcadlového obrazu, a jsou to tedy chirální objekty. Pojmu chiralita bylo poprvé ve vědecké terminologii použito fyzikem lordem Kelvinem³⁴ roku 1884. Ale byl to Louis Pasteur³⁵, kdo v roce 1848 jako první izoloval krystaly čistých optických izomerů z racemické směsi vinanu sodno-amonného.

Nejčastějším zdrojem chiralidy je atom uhlíku se čtyřmi různými substituenty. Takto se odvozují dva prostorové izomery (tzv. enantiomery), z nichž každý je zrcadlovým obrazem toho druhého (obr. 1). Chirálními centry mohou být i jiné atomy, např. křemík, fosfor, síra či dusík³⁶. Chiralita však nemusí být spjata pouze s přítomností tzv. asymetrického atomu, ale jejím zdrojem může být i omezená rotace substituentů kolem jednoduché vazby (chiralita axiální), jak je tomu např. u disubstituovaných bifenylů či binaftylů. Deformace molekuly v důsledku sterického pnutí může být zdrojem planární chiralidy, jako je tomu v případě helicenů.

V přírodě je většinou preferován jeden z enantiomerů. Bílkoviny a jejich stavební jednotky aminokyseliny, nukleové kyseliny, cukry, steroidní hormony, enzymy a některé vitaminy jsou přísně stereoizomerní.



Obr. 1: Dva enantiomery chirální molekuly obsahující asymetrický atom uhlíku

Zatímco v achirálním prostředí vykazují enantiomery prakticky identické vlastnosti, v chirálním prostředí, jakým je i lidský organizmus, může být jejich chování podstatně rozdílné.

První zmínka o rozdílech ve farmakologických účincích chirálního léčiva (epinefrinu) se nachází v literatuře z roku 1908 od Abderhaldera a Mellera. Od té doby se farmakologické a klinické studie začaly zabývat otázkou enantiomerů léčiv lišících se svými farmakokinetickými, farmakodynamickými a toxikologickými profily.^{37,38} Nejznámějším příkladem léku s rozdílnými farmakologickými účinky je thalidomid, kde *R*-thalidomid vykazuje sedativní účinky a *S*-thalidomid má teratogenní vlastnosti. V řadě případů vykazuje jeden z enantiomerů podstatně vyšší terapeutickou aktivitu než druhý, jak je tomu například u většiny β -blokátorů, kde *S*-enantiomer je asi stokrát aktivnější než *R*-enantiomer. *S*-Timolol je silnější β -blokátor než *R*-timolol, oba jsou však stejně účinné pro léčbu nitroočního tlaku u pacientů se zeleným zákalem³⁹.

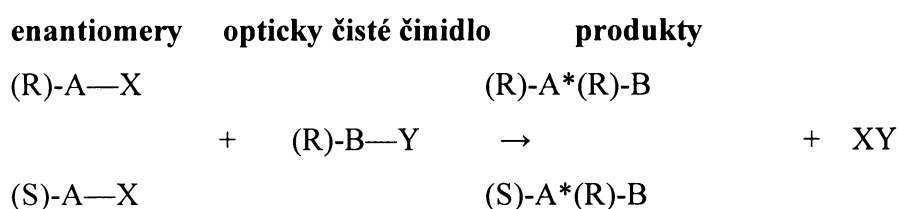
3.2.2 Princip separace chirálních látek

Vzhledem k tomu, že kromě specifického prostorového uspořádání vykazují enantiomery prakticky totožné fyzikálně-chemické vlastnosti³⁶, bývá separace jejich směsi na čisté enantiomery obtížná. Pro dostatečně účinnou a selektivní separaci optických izomerů přicházejí v úvahu především vysokoúčinné separační techniky, které využívají interakcí s chirálním selektorem. Obecně lze metody separace opticky aktivních látek rozdělit na metody přímé a nepřímé.

3.2.2.1 Nepřímý způsob enantioseparace

Nepřímá metoda spočívá v derivatizaci dělených enantiomerů vhodným chirálně čistým činidlem za vzniku stabilních diastereoizomerů (viz obr. 2), lišících se svými fyzikálně-chemickými vlastnostmi, které lze rozdělit již v achirálním separačním systému. Nespornou výhodou nepřímého způsobu enantioseparace je možnost použití levnější achirální kolony často vykazující vyšší separační účinnost. Nevýhodou jsou vysoké požadavky na chemickou i optickou čistotu činidla použitého pro derivatizaci. Přítomností druhého enantiomeru derivatizačního činidla by vznikly další dva nežádoucí diastereoizomery, které jsou v enantiomerním vztahu

k diastereoizomerům děleným. Jejich retenční charakteristiky na achirální koloně jsou tudíž identické a vzniká tak chyba při kvantifikaci jednotlivých enantiomerů. Dalším důležitým faktorem ovlivňujícím následnou separaci diastereoizomerů je vzdálenost obou chirálních center ve vzniklém derivátu, která by měla být co nejmenší, aby rozdíl chromatografických vlastností byl co největší. Deriváty, ve kterých vzdálenost center přesahuje čtyři vazby, prakticky nelze pro separace využít⁴⁰.



Obr. 2: Schéma principu chirální derivatizace, jejímž výsledkem je tvorba dvou stabilních diastereoizomerů

3.2.2.2 Přímý způsob enantioseparace

Přímá separace se v kapalinové chromatografii může realizovat dvěma způsoby. Chirální selektor (opticky čistá látka) může být přidáván do mobilní fáze, což je výhodné pro poměrně rychlé vyzkoušení více typů chirálních selektorů o různých koncentracích, a to za použití levnější achirální kolony. Nevýhodou však může být omezená rozpustnost a stabilita CS v mobilní fázi, jeho velká spotřeba a někdy i nepříznivý vliv na detekci. Proto se častěji používá CSP, kdy je CS navázán na pevném nosiči, zpravidla na silikagelu. Princip tohoto přímého dělení spočívá ve stereoselektivní interakci enantiomerů s chirální složkou stacionární fáze za tvorby dvou přechodných diastereoizomerních párů lišících se velikostí příslušných konstant stability. Důsledkem toho dochází i k rozdílné retenci jednotlivých enantiomerů.

Podle Dalglieshova⁴¹ pravidla tříbodové interakce je pro separaci enantiomerů nezbytné, aby oba enantiomery rozdílně interagovaly s opticky čistou složkou, přítomnou v separačním systému, minimálně třemi současně působícími interakcemi, mezi kterými dominují, podle typu CS, vodíková vazba, dipól-dipól

a elektrostatické interakce, interakce přenosu náboje, hydrofobní interakce, ale i repulzní síly.

3.2.3 Chirální selektory

Vývoj vysokoúčinných metod pro chirální dělení látek je doprovázen i nově navrhovanými chirálními selektory, resp. chirálními stacionárními fázemi. Některé CS/CSP se osvědčily pro enantioseparace úzké skupiny látek, jiné byly aplikovány pro široký okruh strukturně odlišných opticky aktivních látek. Přehled úspěšně použitých CS, respektive CSP, je uveden v tab. 2. K nejčastěji využívaným chirálním selektorům patří především proteiny, deriváty polysacharidů, cyklodextriny (CD) a jejich deriváty a makrocyklická antibiotika a jejich analogy.

Tab. 2: Přehled významných CS/CSP

Typ chirálního selektoru	Příklady
Sérové proteiny ^{42,43}	hovězí sérový albumin α_1 -glykoprotein
Polysacharidy ^{44,45}	deriváty celulózy, např.: celulóza tris(4-methylbenzoát) deriváty amylózy, např.: amylóza tris(3,5-dimethylfenylkarbamát)
Cyklodextriny ^{46,47}	α , β , γ -CD, derivatizované CD
Makrocyklická antibiotika ^{48,49,50,51}	vankomycin teikoplanin teikoplanin aglykon ristocetin A
Pirklovy (π -donorové a π -akceptorové) ⁵²	dinitroarylové fáze

3.2.3.1 Makrocyklická antibiotika

Makrocyklická antibiotika (glykopeptidy a ansamyciny) patří do skupiny moderních multimodálních chirálních selektorů zavedených do praxe v roce 1994

prof. D. W. Armstrongem⁵³. Během několika let se zejména glykopeptidy (vankomycin, teikoplanin, ristocetin A a avoparcin) zařadily mezi nejpoužívanější chirální selektory jak v kapalinové chromatografii⁵¹, tak v kapilární elektroforéze² či v kapilární elektrochromatografii⁵⁴.

Glykopeptidová makrocyclická antibiotika obsahují mnoho chirálních center a funkčních skupin umožňujících celou řadu interakcí s chirálními analyty, např. hydrofobní, dipól-dipól a π - π interakce, vodíkovou vazbu a také stérické repulze. Díky tomu jsou schopny dělit velké množství chirálních sloučenin s dostatečně velkou enantioselektivitou⁵⁵. Celkový náboj glykopeptidů určuje počet ionizovatelných skupin a hodnota pH pufru. Přehled vybraných vlastností glykopeptidových makrocyclických antibiotik je uveden v tab. 3⁵⁶.

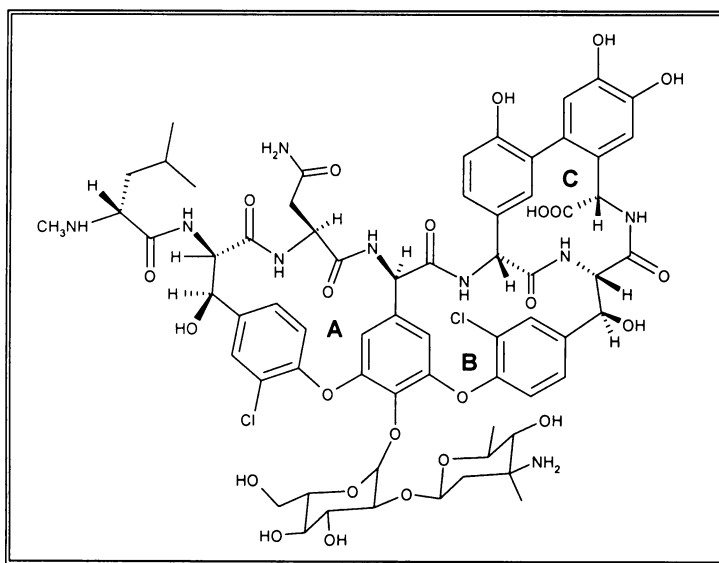
Tab. 3: Vybrané charakteristiky makrocyclických antibiotik

Charakteristika	Vankomycin	Teikoplanin	Ristocetin A	Avoparcin
molekulová hmotnost	1449	1877	2066	1907
chirální centra	18	23	38	32
inkluzní prstence	3	4	4	3
sacharidové složky	2	3	6	5
aromatické kruhy	5	7	7	7
hydroxyskupiny	9	15	21	16
karboxylové skupiny	1	1	0	1
aminoskupiny	2	1	2	3
pI	7,2	4,2; 6,5	7,5	7,5
stabilita v roztoku	1-2 týdny	2-3 týdny	3-4 týdny	3-4 týdny
produkováni bakterií	<i>Streptomyces oreintalis</i>	<i>Actinoplanes teicomyceticus</i>	<i>Norcardia lurida</i>	<i>Streptomyces cardidas</i>

Principles of complementary separations

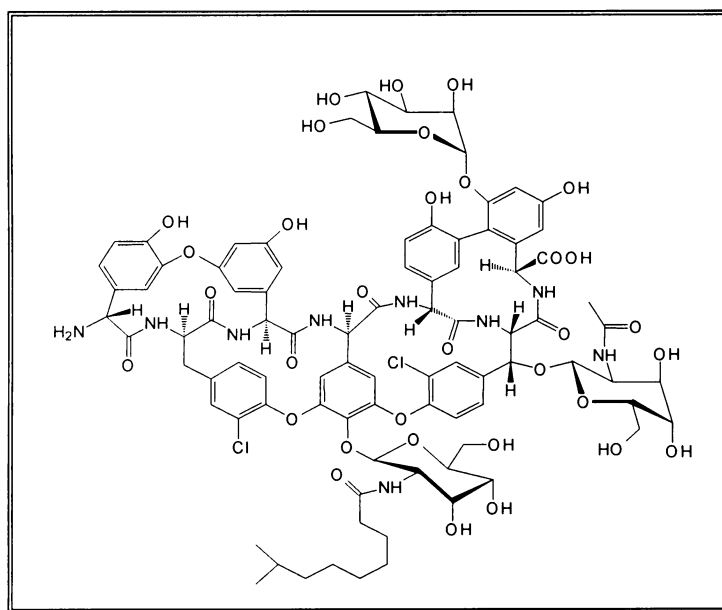
Na obr. 3 a 4 jsou uvedeny strukturální vzorce vankomycinu a teikoplaninu, které byly ve vlastní experimentální práci využity jako chirální selektory.

Molekula vankomycinu je tvořena peptidovým řetězcem s navázanými cukernými složkami, aromatickými strukturami a funkčními skupinami (obr. 3). Tři nabitě skupiny (dvě amino- a jedna karboxylová skupina) jsou odpovědné za ionizaci vankomycinu, která závisí na hodnotě pH⁵⁷. Během komplexace s analytem dochází k sevření celé molekuly vankomycinu. Vankomycin je velmi dobře rozpustný ve vodě a v polárních rozpouštědlech⁵⁷. Roztoky vankomycinu jsou stálé ve vodném prostředí o pH v rozmezí 3,0 až 6,0 a při nižších teplotách. Z hlediska enantioseparace je vhodný pro sloučeniny, mající aniontový charakter, zvláště pak pro ty, které obsahují ve své struktuře karboxylovou skupinu. Vankomycinová CSP vykazuje selektivitu mimo jiné pro barbituráty, cyklické imidy⁵⁸, semisyntetické námelové alkaloidy⁵⁹ a fenothiazinová léčiva⁶⁰.



Obr. 3: Struktura vankomycinu

Teikoplanin, strukturně podobný vankomycinu, je tvořen rovněž glykopeptidovým řetězcem s navázanými cukernými složkami, aromatickými kruhy a ionizovatelnými skupinami (viz obr. 4). Na rozdíl od vankomycinu má teikoplanin na jednom ze tří cukerných zbytků, a to na 2-amino-2-deoxy- β -D-glukopyranosylu, připojen postranní hydrofobní acylový řetězec odpovídný za malou rozpustnost teikoplaninu ve vodě a za jeho schopnost tvořit agregáty. Hodnota kritické micelární koncentrace je 0,18 mmol/l v nepufrovaném vodném prostředí⁶¹.



Obr. 4: Struktura teikoplaninu

Chirální stacionární fáze založené na bázi glykopeptidů mohou pracovat ve třech rozdílných separačních módech⁶² - v normálním, reverzním a polárně organickém, z nichž každý upřednostňuje jiné stereoselektivní i nestereoselektivní interakce. Normální separační mód, který je realizován nepolární mobilní fází (nejčastěji hexan s přísadkou polárního rozpouštědla - např. propan-2-olu, ethanolu), upřednostňuje π - π interakce, vodíkové vazby a elektrostatické interakce. Současně s nimi může působit i vodíková vazba vznikající mezi polární skupinou analytu a vhodným akceptorovým místem chirální stacionární fáze, modulovaná přítomností polárního alkoholu v mobilní fázi. V reverzním separačním módu převládá především hydrofobní interakce a inkluzní komplexace. Polárně organický mód, který byl poprvé použit D. W. Armstrongem⁶³ pro cyklodextrinové CSP, je realizován kombinací acetonitrilu (ACN) a methanolu (MeOH) s velmi malými

přídavky kyseliny (nejčastěji kyseliny octové) a báze (nejčastěji triethylaminu), potřebnými pro elektrostatické interakce.

3.2.4 Chirální separace v CLC

Trend miniaturizace se v separačních metodách promítl i do oblasti chirálních separací. V CE^{6,64,65} a zejména v CEC^{66,67} tvoří separace chirálních analytů podstatnou část jejich aplikací. Podstatně méně je do problematiky separace optických izomerů zapojována CLC. Velmi malá spotřeba veškerého materiálu umožňuje vyzkoušet různé typy chirálních stacionárních fází, které by jinak představovaly značnou finanční položku a díky malé průtokové rychlosti mobilní fáze lze použít přídavek drahého chirálního činidla do mobilní fáze v kombinaci s achirální stacionární fází poskytující v řadě případů vyšší separační účinnost a selektivitu než systém, kde je stejný typ chirálního selektoru navázán na stacionární fázi. Chirální separace v CLC byly realizovány pomocí chirálních selektorů navázaných ve formě CSP (polysacharidy^{5,66,67} a CD⁶⁸) nebo ve formě přídavku do mobilní fáze (CD^{6,69}).

Pro srovnávací studii mezi kapilární kapalinovou chromatografií a kapilární elektrochromatografií byly použity kapilární kolony naplněné derivatizovanou celulózou lišící se obsahem navázaného chirálního selektoru. Bylo zjištěno, že schopnost enantioseparace roste se zvyšujícím se obsahem CS navázaného na silikagelovém nosiči. Pro dané analyty nebyl pozorován významný rozdíl mezi enantioselektivitou dosaženou v CEC a CLC, ale počet teoretických pater a hodnoty enantiorozlišení byly vyšší v CEC v porovnání s CLC^{66,67}. Pro chirální separaci byly vyzkoušeny i monolitické kolony na bázi silikagelu s navázaným L-fenylalaninamidem, L-alaninamidem²⁹ a avidinem⁷⁰

Chirální kapilární kolony s navázanými glykopeptidovými chirálními selektory doposud použity nebyly.

4. LITERATURA

1. Vissers J. P. C., Claessens H. A., Cramers C. A., *J. Chromatogr. A* 779 (1997) 1.
2. Kang J. W., Yang Y. T., You J. M., Ou Q. Y., *J. Chromatogr. A* 825 (1998) 81.
3. Mohanty A., Dey J., *Talanta* 71 (2007) 1211.
4. Liu H., Yu A., Liu F., Shi Y., Han L., Chen Y., *J. Pharm. Biomed. Anal.* 41 (2006) 1376.
5. Chankvetadze B., Yamamoto Ch., Kamigaito M., Tanaka N., Nakanishi K., Okamoto Y., *J. Chromatogr. A* 1110 (2006) 46.
6. Diagone C. A., Ogawa C. A., Lancas F. M., *J. Liq. Chromatogr. Related Technol.* 26 (2003) 505.
7. Horváth C. G., Preiss B. A., Lipsky S. R., *Anal. Chem.* 39 (1967) 1422.
8. Horváth C. G., Lipsky S. R., *Anal. Chem.* 41 (1969) 1227.
9. Ishii D., Asai K., Hibi K., Jonokuchi T., Nagaya M., *J. Chromatogr.* 144 (1977) 157.
10. Ishii D., Hibi K., Asai K., Jonokuchi T., *J. Chromatogr. A* 151 (1978) 147 .
11. Tsuda T., Novotný M., *Anal. Chem.* 50 (1978) 632.
12. Tsuda T., Novotný M., *Anal. Chem.* 50 (1978) 271.
13. Scott R. P. W., Kučera P., *J. Chromatogr. A* 169 (1979) 51.
14. Scott R. P. W., Kučera P., Munroe M., *J. Chromatogr. A* 186 (1979) 475.
15. Hirata Y., Novotný M., *J. Chromatogr. A* 186 (1979) 521.
16. Takeuchi T., Ishii D., *J. Chromatogr. A* 213 (1981) 25.
17. Yang. F. J., *J. Chromatogr. A* 236 (1982) 265.
18. Kok W. Th., Brinkman U. A. Th., Frei R. W., Hanekamp H. B., Nooitgedacht F., Poppe H., *J. Chromatogr. A* 237 (1982) 357.
19. Eckers C., Cuddy K. K., Henion J. D., *J. Liq. Chromatogr. Related Technol.* 6 (1983) 2383.
20. Jinno K., *Chromatographia* 25 (1988) 1004.
21. Guan Y., Zhou L., Shang Z., *J. High Res. Chromatogr.* 15 (1992) 434.
22. Grescentini G., Mastrogiacomo A. R., *J. Microcol. Sep.* 3 (1991) 539.
23. Gluckman J. C., Hirose A., McGuffin V. L., Novotný M., *Chromatographia* 17 (1983) 303.
24. Li W., Malik A., Lee M. L., *J. Microcol. Sep.* 6 (1994) 557.
25. Trones R., Iveland A., Greibrokk T., *J. Microcol. Sep.* 7 (1995) 505.
26. Zimina T. M., Smith R. M., Myers P., King B. W., *Chromatographia* 40 (1995) 662.

27. Vissers J. P. C., *J. Chromatogr. A* 856 (1999) 117.
28. Kahle V., Janeček M., *Chem. Listy* 83 (1989) 867.
29. Chen Z., Uchiyama K., Hobo T., *J. Chromatogr. A* 942 (2002) 83.
30. Svec F., *J. Sep. Sci.* 27 (2004) 1419.
31. Hemstrom P., Nordborg A., Irgum K., Svec F., Frechet J. M. J., *J. Sep. Sci.* 29 (2006) 25.
32. Wunschel D., Wahl J., Willse A., Valentine N., Wahl K., *J. Chromatogr. B* 843 (2006) 25.
33. Mechref Y., Novotny M. V., *J. Chromatogr. B* 841 (2006) 65.
34. Kelvin W. T., *The Baltimore Lectures on Molecular Dynamics and the Wave Theory of Light*, J. Clay & Sons, London 1904, 619.
35. Pasteur L., *Ann. Chim.* 24 (1848) 457.
36. Potatov V. M., *Stereochemie*, Praha SNTL 1986.
37. Ahuja S., Dong M. W., *Handbook of pharmaceutical analysis by HPLC*, Elsevier 2005, 448.
38. Krieg H. M., Breytenbach J. C., Keizer K., *J. Membr. Sci* 180 (2000) 69.
39. Grahame-Smith D. G., Aronson J. K., *Oxford Textbook of Clinical Pharmacology and Drug Therapy*, 2nd ed., Oxford University Press, New York 1992.
40. Allenmark S. G., *Chromatographic Enantioseparation: Methods and Applications*, 1st ed., J. Wiley, Chichester 1988, 51.
41. Dalglisch C. E., *J. Chem. Soc.* 47 (1952) 3940.
42. Hofstetter H., Hofstetter O., Schurig V., *J. Chromatogr. A* 764 (1997) 35.
43. Hermansson J., Hermansson I., *J. Chromatogr. A* 666 (1994) 181.
44. Overbeke V. A., Baeyens W., Oda H., Aboul-Enein H. Y., *Chromatographia* 43 (1996) 599.
45. Teng X. W., Wang S. W. J., Davies N. M., *J. Pharm. Biomed. Anal.* 33 (2003) 95.
46. Bhushan R., Gupta D., *J. Chromatogr. B* 837 (2006) 133.
47. Zhong Q., He L., Beesley T. E., Trahanovsky W. S., Sun P., Wang C., Armstrong D. W., *J. Chromatogr. A* 1115 (2006) 19.
48. Péter A., Vékes E., Armstrong D. W., Tourwé D., *Chromatographia* 56 (2002) 41.
49. Grobuschek N., Schmid M. G., Koidl J., Gübitz G., *J. Sep. Sci.* 25 (2002) 1297.
50. Poulton M. S. F., Boyle F., Gu X. Q., Mather L. E., *J. Chromatogr. B* 831 (2006) 48.
51. Péter A., Vékes E., Gera L., Stewart J. M., Armstrong D. W., *Chromatographia* 56 (2002) 79.

52. Pirkle W. H., Hyun M. H., Bank B., *J. Chromatogr. A* 316 (1984) 585.
53. Armstrong D. W., Tang Y., Chen S., Zhou Y., Bagwill C., Chen J. R., *Anal. Chem.* 66 (1994) 1473.
54. Aboul-Enein H. Y., Ali I., *Chromatographia* 52 (2000) 679.
55. Desiderio C., Fanali S., *J. Chromatogr. A* 807 (1998) 37.
56. Ward T. J., Farris III A. B., *J. Chromatogr. A* 906 (2001) 73.
57. Armstrong D. W., Rundlett K. L., Chen J. R., *Chirality* 6 (1994) 496.
58. Aboul-Enein H. Y., Serignese V., *Chirality* 10 (1998) 358.
59. Tesařová E., Záruba K., Flieger M., *J. Chromatogr. A* 844 (1999) 137.
60. Bosáková Z., Kloučková I., Tesařová E., *J. Chromatogr. B* 770 (2002) 63.
61. Gasper M. P., Berthod A., Nair U. B., Armstrong D. W., *Anal. Chem.* 68 (1996) 2501.
62. *Chirobiotic Handbook*, Advanced Separation Technology Inc., Whippany, NY, USA 2004.
63. Armstrong D. W., Chen S., Chang C., Chang S., *J. Liq. Chromatogr. Related Technol.* 15 (1992) 545.
64. Miura M., Terashita Y., Funazo K., Tanaka M., *J. Chromatogr. A* 846 (1999) 359.
65. Cucinotta V., Giuffrida A., Grasso G., Maccarrone G., Vecchio G., *J. Chromatogr. A* 916 (2001) 61.
66. Chankvetadze L., Kartoziya I., Yamamoto C., Chankvetadze B., Blaschke G., Okamoto Y., *J. Sep. Sci.* 25 (2002) 653.
67. Chankvetadze B., Kartoziya I., Yamamoto C., Okamoto Y., Blaschke G., *J. Pharm. Biomed. Anal.* 30 (2003) 1897.
68. Gong Y., Xiang Y., Yue B., Xue G., Bradshaw J. S., Lee H. K., Lee M. L., *J. Chromatogr. A* 1002 (2003) 63.
69. Mangelings D., Maftouh M., Massart D. L., Heyden Y. V., *J. Pharm. Biomed. Anal.* 35 (2004) 789.
70. Liu Z., Otsuka K., Terabe S., Motokawa M., Tanaka N., *Electrophoresis* 23 (2002) 2973.

5. PUBLIKOVANÉ PRÁCE

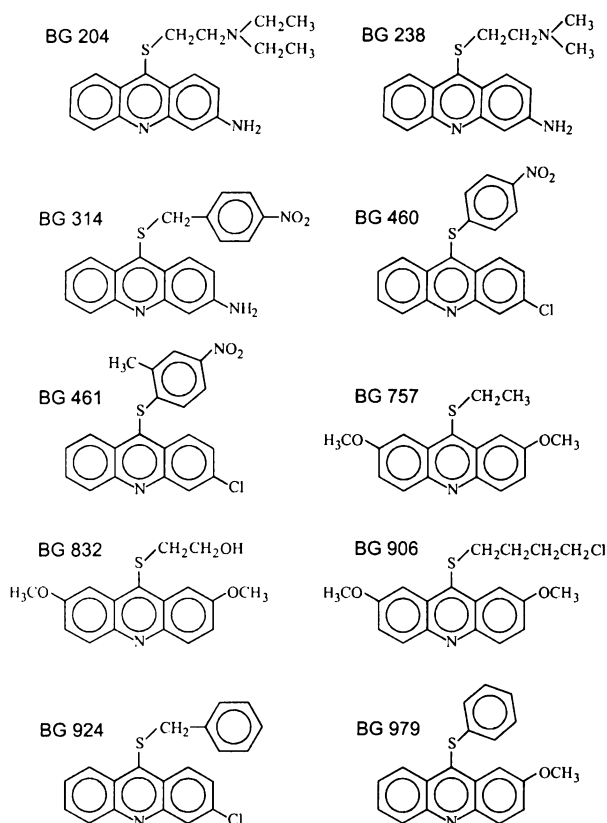
5.1 KOMENTÁŘ K PUBLIKACÍM

Tématem této dizertační práce bylo využití kapilární kapalinové chromatografie jak pro achirální, tak pro chirální separace vybraných biologicky aktivních látek. Z celkového počtu sedmi publikací byly vybrány čtyři, tematicky nejvíce propojené, o nichž je zde podrobněji diskutováno. V případě achirálních separací [1,2] byla práce zaměřena na vyvinutí metody pro kontrolu čistoty nově syntetizovaných derivátů akridinu, umožňující zároveň i jejich kvantifikaci.

Jak již bylo uvedeno v úvodu této práce, použití chirálních kapilárních kolon je podmíněné jejich laboratorní přípravou. To s sebou přináší řadu úskalí, jakými jsou homogenita naplnění, způsob přípravy frit (jejich těsnost a zároveň dostatečná propustnost), eliminace mrtvých objemů aj. Chirální kapilární kolony použité v našich experimentech byly připraveny Ing. J. Planetou z Ústavu analytické chemie v Brně. Pro separaci vybraných opticky aktivních látek (β -blokátory, profeny, herbicidy) byly použity chirální selektory na bázi makrocyclických antibiotik (teikoplanin, vankomycin) vázané jako chirální stacionární fáze nebo volné ve formě přídavku CS do mobilní fáze [5,6]. V obou systémech byl studován vliv experimentálních podmínek (typ a obsah organického modifikátoru, koncentrace a hodnota pH triethylaminoctanového pufru (TEAA), případně koncentrace CS) na retenční a enantioseparační chování studovaných analytů. Porovnání takto získaných výsledků vedlo k lepšímu porozumění interakčního mechanismu mezi analytem a chirálním selektorem.

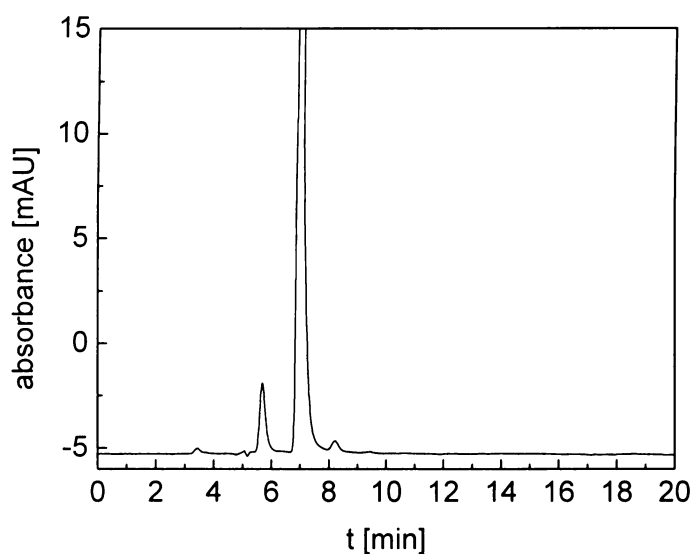
5.1.1 Separace a kvantifikace nově syntetizovaných potencionálních léčiv metodou CLC [1,2]

Metoda kapilární kapalinové chromatografie, která je vhodná pro analýzy látek dostupných ve velmi malých množstvích, byla použita pro separaci a kvantifikaci jednotlivých thioderivátů akridinu, potencionálně farmaceuticky významných chemoterapeutik, která byla syntetizována v miligramových množstvích na Farmaceutické fakultě v Marseille ve Francii v oddělení profesora J. Barbeho. Strukturální vzorce studovaných thioderivátů akridinu jsou uvedeny na obr. 5.



Obr. 5: Strukturní vzorce studovaných thioderivátů akridinu

Vlastní akridin se chová jako slabá báze. Zachování bazických vlastností lze předpokládat i u syntetických derivátů a jejich degradačních produktů, pouze s určitou změnou hodnoty disociační konstanty danou povahou a polohou substituentů. S ohledem na strukturu studovaných derivátů byl pro jejich analýzu vybrán reverzní separační mód realizovaný kapilární kolonou Nucleosil C18 v kombinaci s binární mobilní fází acetonitril/voda v různých objemových poměrech. Bylo zjištěno, že pro dostatečnou separaci hlavní komponenty od doprovodných nečistot je nejvhodnější mobilní fáze s vysokým obsahem acetonitrilu (90 obj. %), jak je vidět na obr. 6. Téměř všechny nečistoty vykazovaly nízké retenční faktory, ukazující na jejich značně polární charakter. Tyto nečistoty patrně odpovídají výchozím složkám ze syntézy derivátů 9-(alkylthio)akridinu.



Obr. 6: Chromatogram studovaného derivátu akridinu BG 832 v mobilní fázi acetonitril/voda (90/10, v/v).

Záměnou vodné složky za 0,2 mol/l roztok octanového pufru o pH 3,5 v mobilní fázi s 90% obsahem acetonitrilu došlo ke zlepšení symetrie píků, což je výhodné z hlediska kvantitativní analýzy. Silné nebo dokonce ireverzibilní zadržení thioderivátů akridinu, které ve své struktuře obsahovaly aminoskupinu, bylo pozorováno na výše zmíněné koloně Nucleosil C18 v důsledku vysoké aktivity silanolových skupin této stacionární fáze s nedeaktivovaným povrchem, projevující se velkou afinitou k bazickým látkám. Proto byla pro separaci této skupiny derivátů vybrána kolona LiChrosorb RP-select B, která je doporučována pro analýzu bazických látek. Pro separaci byly použity identické mobilní fáze jako při použití kolony Nucleosil C18. Ukázalo se, že retenční chování derivátů thioakridinu s aminoskupinou na kapilární koloně LiChrosorb RP-select B bylo velmi podobné retenčnímu chování derivátů thioakridinu bez aminoskupiny na kapilární koloně Nucleosil C18.

Za optimalizovaných separačních podmínek byla určena čistota jednotlivých derivátů. Vzhledem k absenci standardů majoritních složek i nečistot byla čistota určena metodou vnitřní normalizace, a to: 100 % pro derivát BG 757; 90,2 % pro BG 832; 92,9 % pro BG 906; 92,3 % pro BG 924; 100 % pro BG 979; 100 % pro BG 460; 100 % pro BG 461; a pro deriváty s aminoskupinou 96,5 % pro BG 314; 95,9 % pro BG 204 a 96,7 % pro BG 238.

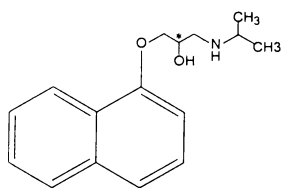
Pro všechny analyty byly při dvou vlnových délkách detekce (214 a 230 nm) proměřeny kalibrační závislosti a byly určeny lineární dynamické rozsahy v oblasti 10^{-6} až 10^{-3} mol/l. Meze detekce a stanovení činily jednotky až desítky $\mu\text{mol/l}$. Z dosažených výsledků vyplývá, že se vypracovaná CLC metoda jeví jako vhodná jak pro kvalitativní, tak pro kvantitativní analýzu thioderivátů akridinu.

5.1.2 Využití teikoplaninu jako chirálního selektoru v CLC [5]

Po úspěšném využití kapilární kapalinové chromatografie pro achirální separace byla testována možnost použití kapilární kapalinové chromatografie i pro separace opticky aktivních látek. Pro studium separačního a enantioseparačního chování strukturně odlišných skupin léčiv (vybrané β -blokátory, profeny) a herbicidů (deriváty chlorofenoxipropanové kyseliny) byla vybrána teikoplaninová CSP. Kapilární kolona s vnitřním průměrem 320 μm a délkou 22,5 cm byla naplněna komerčně dostupným chirálním sorbentem obsahujícím teikoplaninový CS navázaný na silikagelový nosič – CHIROBIOTIC T.

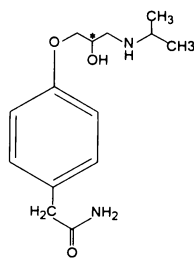
Jednou ze skupin léčiv vyznačujících se chiralitou jsou blokátory β -adrenergických receptorů. Do této skupiny patří látky, které blokují nadměrnou aktivitu sympatického nervového systému, případně korigují změny, ke kterým dochází při ischemické chorobě srdeční, hypertenzi nebo poruše srdečního rytmu. Oba enantiomery nemají stejnou terapeutickou účinnost. Mechanismus účinku jednotlivých enantiomerů β -blokátorů je vysvětlován pevnější vazbou jednoho z nich (většinou *S*-enantiomeru) na β -receptorové místo za přesně vymezených stereochemických podmínek.

Z chemického hlediska jsou β -blokátory aryloxyaminoethanoly. Jde o relativně málo polární látky obsahující v těsné blízkosti chirálního centra důležité funkční skupiny, a to amino- a hydroxyskupinu. Struktura β -blokátorů umožňuje různé interakce, například tvorbu vodíkových vazeb za účasti funkčních skupin nebo π - π interakce s benzenovým jádrem. Strukturní vzorce β -blokátorů jsou uvedeny na obr. 7.



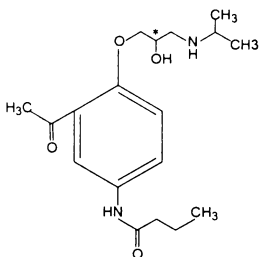
Propranolol

pKa 9.5

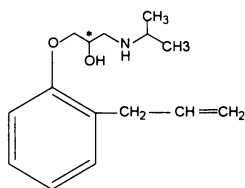


Atenolol

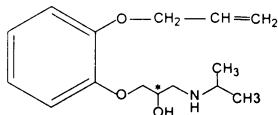
pK 9.6



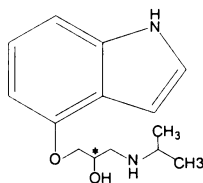
Acebutolol



Alprenolol



Oxprenolol



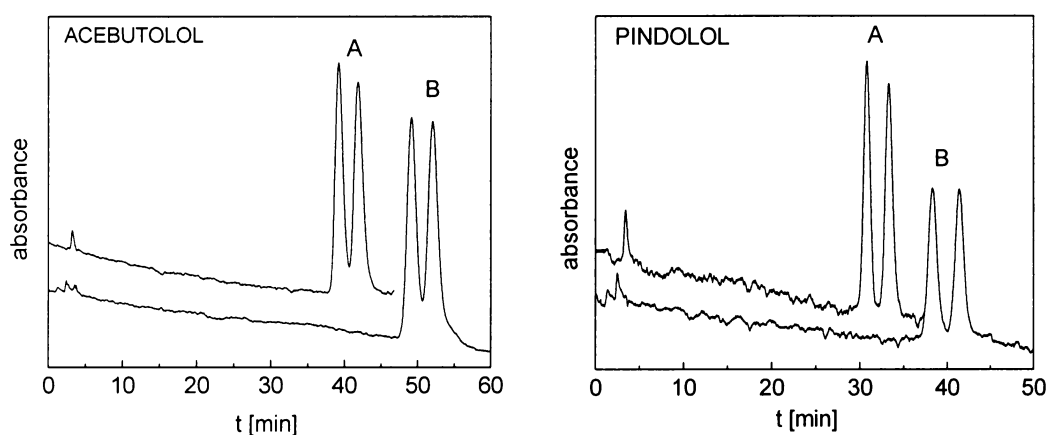
Pindolol

Obr. 7: Strukturální vzorce β -blokátorů

h20E 96 TEAA maximální pufru

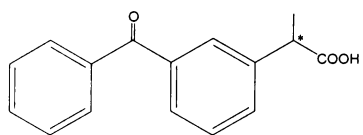
Nejprve byl v reverzním separačním módu studován vliv složení mobilní fáze, tvořené MeOH a TEAA pufrům na separaci enantiomerů β -blokátorů. Ukázalo se, že pro enantioseparaci těchto léčiv je vhodná mobilní fáze MeOH/TEAA s vysokým obsahem MeOH (95 %). Zvyšování koncentrace pufru v mobilní fázi 95/5 MeOH/TEAA (0,1%, 0,5% nebo 1,0%) při pH 5,0 vedlo ke zkracování retenčních časů u všech studovaných derivátů, které bylo pro 0,5% koncentraci TEAA doprovázené vyššími hodnotami chirálního rozlišení (s výjimkou alprenololu). V případě nejvyšší proměřované koncentrace pufru byly v důsledku podstatného zkrácení retence omezeny všechny typy interakcí (stereoselektivní i nestereoselektivní) a hodnoty rozlišení opět klesly. Vzhledem ke struktuře separovaných β -blokátorů nelze očekávat, že by změna hodnoty pH pufru výrazně ovlivnila jejich disociaci a protonizaci, ale může mít vliv na ionizovatelné skupiny

chirálního selektoru, a tím i na charakter a intenzitu stereoselektivní interakce. Potvrdilo se, že enantioseparace β -blokátorů je ovlivňována hodnotou pH TEAA pufru jen velmi málo. Jelikož se v reverzním systému ukázala být výhodná mobilní fáze s vysokým obsahem MeOH, byl pro enantioseparaci β -blokátorů vyzkoušen také polárně organický mód tvořený MeOH s velmi malými přídávky kyseliny octové (HAc) a triethylaminu (TEA). Z hlediska enantioseparace vykazoval nejlepší výsledky poměr 100/0,01/0,01 (v/v/v) MeOH/HAc/TEA. Z porovnání polárně organického a reverzního separačního módu je zřejmé, že selektivita je v obou systémech velmi podobná, ale symetrie píků a tím i účinnost separace je lepší při použití polárně organického módu, jak ilustruje obr. 8.



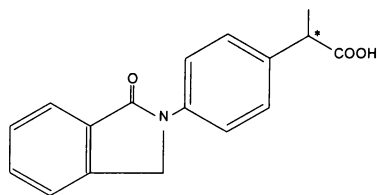
Obr. 8: Chromatogramy enantioseparace acebutololu a pindololu za podmínek: teikoplaninová stacionární fáze, mobilní fáze: A) MeOH/HAc/TEA 100/0,01/0,01 (v/v/v) a B) 95/5 (v/v) MeOH/ 0,5% TEAA, pH 5,0.

Podstatně méně se teikoplaninová CSP osvědčila pro enantioseparaci vybraných profenů a derivátů chlorofenoxypropanové kyseliny (CPPA). Profeny, deriváty 2-arylpropanové kyseliny (strukturní vzorce viz obr. 9) jsou běžně používány jako nesteroidní protizánětlivá léčiva (NSAID) inhibující aktivitu cyklooxygenázy, enzymu katalyzujícího první stupeň přeměny kyseliny arachidonové na prostaglandiny. Prostaglandiny jsou produkovány při úrazu, zánětu nebo určitých nemocech projevujících se bolestí, otokem nebo zánětem.

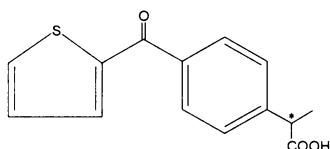


Ketoprofen

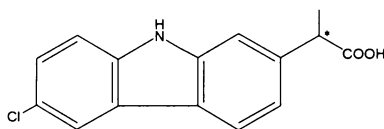
$C_{16}H_{14}O_3$ *WuXu 2024*



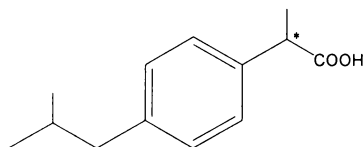
Indoprofen



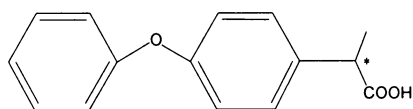
Suprofen



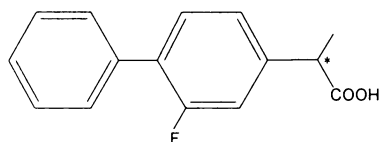
Carprofen



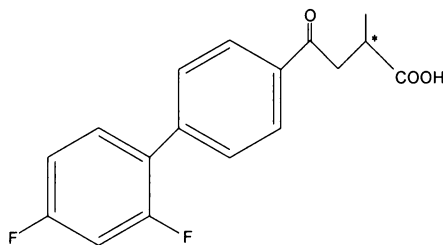
Ibuprofen



Fenoprofen



Flurbiprofen

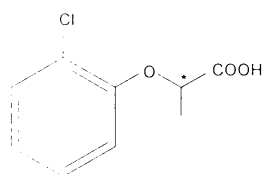


Flobufen

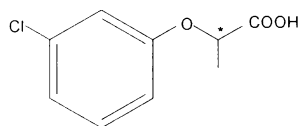
$C_{17}H_{14}F_2O_3$
WuXu 2024

Obr. 9: Strukturální vzorce derivátů profenu

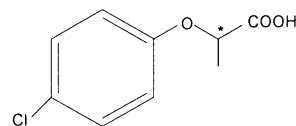
CPPA (strukturální vzorce viz obr. 10) jsou důležité a široce využívané jako selektivní herbicidy. Požadovanou herbicidní aktivitu vykazuje pouze *R*-enantiomer, zatímco *S*-enantiomer je inaktivní. Vzhledem k dobré rozpustnosti ve vodě se mohou pohybovat v ekosystému a způsobovat znečištění povrchových a podzemních vod. V případě obou studovaných skupin analytů se z chemického hlediska jedná o polární látky kyselé povahy, u nichž se karboxylová skupina nachází v těsném sousedství chirálního centra.



2,2-CPPA



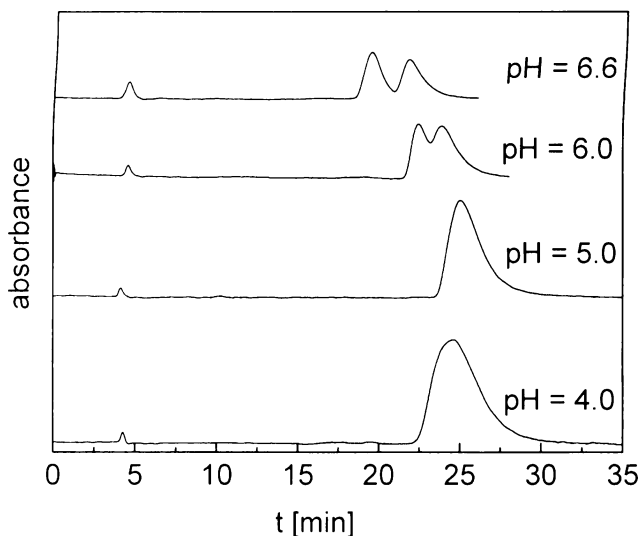
2,3-CPPA



2,4-CPPA

Obr. 10: Strukturní vzorce CPPA

Pro separaci podstatně polárnějších profenů a CPPA byl, na rozdíl od β -blokátorů, vhodnější reverzní separační systém s nižším obsahem MeOH (10 - 30 %), protože při vysokých obsazích MeOH v mobilní fázi docházelo k velmi rychlé eluci (téměř shodné s mrtvým časem) všech studovaných derivátů. Se zvyšující se koncentrací pufru v mobilní fázi se prodlužovala retence a částečně se zlepšovala enantioseparace. Významnější zvýšení retence profenů i CPPA bylo zjištěno při změně koncentrace TEAA pufru z 0,1% na 0,5%. Tyto výsledky ukazují, že triethylamin pravděpodobně vytváří iontové páry s analytem (nebo teikoplaninem), a tím zvyšuje jejich hydrofobicitu. Silnější hydrofobní interakce (stereoselektivní nebo nestereoselektivní) mezi analytem a chirálním selektorem v polárnější mobilní fázi jsou důležité v reverzním retenčním mechanismu a zlepšují enantioseparaci při 0,5% (nebo 1,0%) koncentraci TEAA. V případě profenů a CPPA byl vliv hodnoty pH na jejich enantioseparaci výraznější než u β -blokátorů. Retence profenů v mobilní fázi MeOH/TEAA 20/80 (v/v) při pH 4,0 a 5,0 zůstala téměř nezměněna, zatímco dalším zvyšováním pH pufru došlo ke zkrácení retence. Hodnota pK_a pro deriváty profenu se pohybuje v rozmezí 3,9 až 5,0 a pro úspěšnou enantioseparaci je nezbytné, aby karboxylová skupina analytu byla disociována. Nejlepší enantioseparace většiny profenů bylo dosaženo v mobilní fázi 20/80 (v/v) MeOH/1,0% TEAA pufr o pH 6,6. Vliv pH TEAA na enantioseparaci flobufenu je ukázán na obr.11. Obdobné separační a enantioseparační chování bylo pozorováno i pro CPPA.



Obr. 11: Vliv pH pufru na enantioseparaci flobufenu za podmínek: teikoplaninová stacionární fáze, mobilní fáze: 20/80 (v/v) methanol/1,0% TEAA, pH (4,0-6,6).

Pro srovnávací studii - chirální selektor vázaný ve formě CSP nebo volný v mobilní fázi - byly vybrány CPPA, u kterých bylo na teikoplaninové CSP dosaženo dobré enantioseparace v mobilních fázích s nízkým obsahem MeOH vhodných z hlediska rozpustnosti teikoplaninu.

Pro systém s přidavkem teikoplaninu do mobilní fáze byla použita achirální kapilární kolona Nucleosil 100 C18 (25 cm x 300 μ m I. D.). Zkoumáním vlivu jednotlivých parametrů (obsah MeOH, koncentrace a pH TEAA pufru) byl pro přidavek teikoplaninu do mobilní fáze vybrán systém 30/70 (v/v) MeOH/0,1% TEAA, pH 5,0. V dané mobilní fázi bez teikoplaninu eluovaly všechny tři deriváty do 25 min. Zatímco v téže mobilní fázi s přidavkem teikoplaninu o koncentraci 0,10 mmol/l došlo k enantioseparaci derivátů 2,2-CPPA a 2,4-CPPA až na základní linii v čase do 100 min. Derivát 2,3-CPPA nebyl chirálně rozdělen. Vzhledem k omezené rozpustnosti teikoplaninu v použité mobilní fázi nebylo možné jeho koncentraci zvýšit.

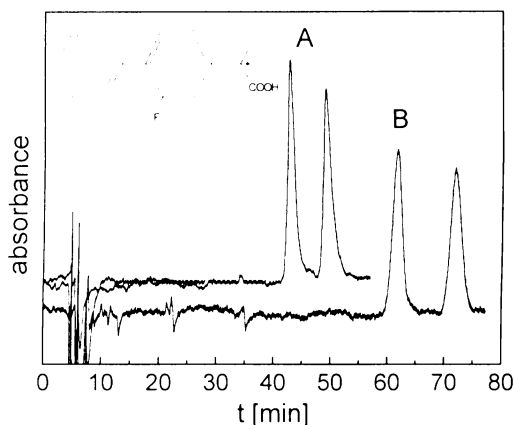
Porovnáním výsledků získaných v obou systémech - teikoplanin vázaný ve formě CSP versus volný, přidaný do mobilní fáze - se ukázalo, že použití CSP je z analytického hlediska vhodnější vzhledem k dosažení lepších hodnot chirálního rozlišení pro všechny studované deriváty a podstatně kratší době analýzy.

5.1.3 Využití vankomycinu jako chirálního selektoru v CLC [6]

Porovnání interakčního chování v systému chirální selektor vázaný ve formě CSP nebo přidáný do mobilní fáze bylo provedeno i s vankomycinovým chirálním selektorem pro sérii vybraných profenů. Pro studii s přidavkem chirálního selektoru do mobilní fáze byly použity dvě achirální kapilární kolony s rozdílnou délkou chemicky navázaného nepolárního řetězce, a to Nucleosil 100 C8 HD a Nucleosil 100 C18 HD, v reverzním separačním systému, kde mobilní fáze byly tvořeny směsí MeOH/0,1% TEAA, pH 5,0 v různých objemových poměrech. Následně byla vybrána mobilní fáze MeOH/0,1% TEAA, pH 5,0 50/50 (v/v), která zajišťovala akceptovatelnou dobu retence všech profenů a zároveň umožňovala dostatečnou rozpustnost vankomycinu. Obecně vyšší hodnoty retence (jak v nepřítomnosti, tak při přidavku vankomycinu do mobilní fáze) byly pro studované profeny pozorovány na koloně s kratším nepolárním řetězcem - Nucleosil 100 C8 HD. Zvyšováním koncentrace vankomycinu (0 – 4,0 mmol/l) v mobilní fázi docházelo k prodlužování retence všech analytů. Tento trend byl výraznější na koloně s delším nepolárním řetězcem.

Vyšší retence analytu při vyšší koncentraci vankomycinu může být výsledkem silnější interakce asociátu analyt-vankomycin se stacionární fází. Asociát může být vytvořen nejprve v mobilní fázi a poté může komplex analyt-vankomycin interagovat se stacionární fází. Možná je i adsorpce vankomycinu na stacionární fázi a jeho následná interakce s analytem. Retenční mechanismus je pravděpodobně kombinací obou přístupů. Velmi podobné retenční chování na obou kolonách vykazovaly profeny v rámci tří skupin - (1) suprofen, indoprofen a ketoprofen; (2) flurbiprofen a fenoprofen a (3) flobufen a carprofen. Vliv koncentrace vankomycinu na enantioselektivní rozlišení profenů se projevoval u všech derivátů, kromě flobufenu, analogicky. Rozlišení se zvyšovalo se zvyšující se koncentrací vankomycinu v mobilní fázi. Nejlepší separace enantiomerů všech studovaných profenů (s výjimkou flobufenu) bylo dosaženo při nejvyšší použité koncentraci vankomycinu (4,0 mmol/l). V žádném z testovaných separačních systémů však nedošlo k enantioseparaci flobufenu. Porovnáním výsledků získaných na obou kolonách vyplynulo, že obecně vyšší hodnoty rozlišení enantiomerů (menší asymetrie píků) byly získány na kapilární koloně Nucleosil 100 C8 HD než na

koloně Nucleosil 100 C18 HD v mobilní fázi 50/50 (v/v) MeOH/0,1% TEAA, pH 5,0. Pro ilustraci je na obr. 12 ukázána enantioseparace flurbiprofenu.



Obr. 12: Chromatogram enantioseparace flurbiprofenu na dvou rozdílných stacionárních fázích: A) Nucleosil 100 C18 HD a B) Nucleosil 100 C8 HD. Mobilní fáze: 50/50 (v/v) MeOH/ 0,1% TEAA, pH 5,0, s přidavkem 4,0 mmol/l vankomycinu.

V druhé části této práce byl vankomycin použit vázaný jako CSP ve spojení s achirální mobilní fází. Při 50 % (obj.) obsahu MeOH v mobilní fázi MeOH/0,1% TEAA, pH 5,0 docházelo na vankomycinové CSP k velmi rychlé eluci všech studovaných derivátů, bez náznaku enantioseparace. Snížením obsahu MeOH na 30 až 20 % (obj.) došlo k prodloužení retence, které bylo v případě carprofenu, flurbiprofenu, flobufenu, ketoprofenu a surprofenu doprovázené alespoň částečným chirálním rozlišením, ale s nižšími hodnotami, než jaké byly získány v separačním systému s achirální kolonou Nucleosil 100 C8 a se 4,0 mmol/l přidavkem vankomycinu do mobilní fáze. Úspěšná enantioseparace flobufenu na vankomycinové CSP ve srovnání s neúspěšnou enantioseparací na achirální koloně v kombinaci s přidáním vankomycinu do mobilní fáze může být vysvětlena jeho rozdílnou strukturou. Aromatická část molekuly flobufenu nacházející se dále od chirálního centra molekuly, než jak je tomu v případě struktury ostatních studovaných profenů, a keto skupina mohou k chirální diskriminaci ze sterických důvodů lépe přispívat v tomto uspořádání.

Z dané studie vyplynulo, že vankomycinový chirální selektor vede k lepší enantioseparaci derivátů profenu (s výjimkou flobufenu), jestliže je použit jako aditivum mobilní fáze než ve formě chirální stacionární fáze. Volný vankomycin má

zřejmě více dostupných interakčních míst (neblokovaných vazbou k nosiči) pro enantioselektivní interakce oproti navázanému CS.

6. ZÁVĚR

Hlavním cílem této dizertační práce bylo posoudit možnosti využití kapilární kapalinové chromatografie jako účinné analytické metody pro achirální i chirální separaci (a kvantifikaci) biologicky aktivních farmaceuticky významných látek.

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

Pro chirální separace vybraných opticky aktivních léčiv (β -blokátory, profeny) a herbicidů (deriváty chlorofenoxypropanové kyseliny) byly použity dva glykopeptidy - vankomycin a teikoplanin - patřící do skupiny nejmodernějších multimodálních chirálních selektorů na bázi makrocyclických antibiotik. Chirální selektory byly použity jak vázané na silikagelové matrici ve formě chirální stacionární fáze, tak volné ve formě přídavku do mobilní fáze. V obou uspořádáních byl zkoumán vliv experimentálních podmínek (druh a obsah organického modifikátoru, koncentrace a hodnota pH triethylaminoctanového pufru) na retenci a enantioseparaci studovaných analytů. V případě přídavku vankomycinového chirálního selektoru do mobilní fáze byl sledován i vliv délky alkylového řetězce achirální reverzní stacionární fáze.

Bylo zjištěno, že teikoplaninová chirální stacionární fáze je v reverzním, a zejména polárně organickém separačním módu vhodná pro separaci enantiomerů většiny studovaných β -blokátorů. Z hlediska enantioseparace vykazovala nejlepší výsledky mobilní fáze o složení 100/0,01/0,01 (v/v/v) MeOH/HAc/TEA. Z porovnání obou separačních módů vyplynulo, že selektivita je v obou systémech velmi podobná, ale symetrie píků, a tím i účinnost separace, jsou lepší při použití polárně organického módu.

Podstatně méně se teikoplaninová CSP osvědčila pro enantioseparaci polárnějších profenů a CPPA. Snížení obsahu methanolu, zvýšení koncentrace a hodnoty pH TEAA pufru v mobilní fázi vedlo ke zvýšení retence doprovázené alespoň částečným chirálním rozlišením většiny profenů i CPPA. Nejlepší výsledky

enantioseparace většiny profenů byly dosaženy v mobilní fázi 20/80 (v/v) MeOH/1,0% TEAA, pH 6,6.

Pro přidavek teikoplaninu do mobilní fáze byl vybrán systém 30/70 (v/v) MeOH/0,1% TEAA, pH 5,0 zajišťující potřebnou rozpustnost teikoplaninu v mobilní fázi, ale poskytující dostatečnou retenci pouze pro CPPA. Na achirální stacionární fázi Nucleosil 100 C18 v kombinaci s mobilní fází s přidavkem teikoplaninu o výsledné koncentraci 0,1 mmol/l došlo k enantioseparaci dvou ze tří derivátů CPPA až na základní linii. Použití vyšší koncentrace teikoplaninu nebylo z hlediska jeho rozpustnosti v mobilní fázi o daném obsahu methanolu možné.

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

Pro studium přidavku vankomycinu do mobilní fáze za použití dvou achirálních stacionárních fází lišících se délkou navázaného alkylového řetězce (C8 a C18), byla variací jednotlivých experimentálních parametrů vybrána mobilní fáze 50/50 (v/v) MeOH/0,1% TEAA, pH 5,0, která zajišťovala akceptovatelnou dobu retence všech profenů a zároveň zajišťovala dostatečnou rozpustnost vankomycinu (0 – 4,0 mmol/l). Obecně vyšší hodnoty retence (jak v nepřítomnosti, tak při přidavku vankomycinu do mobilní fáze) byly pro studované profeny pozorovány na koloně s kratším nepolárním řetězcem. Zvyšováním koncentrace vankomycinu v mobilní fázi docházelo k prodlužování retence všech analytů. Tento trend byl výraznější na koloně s delším nepolárním řetězcem. Vyšší retence analytu při vyšší koncentraci vankomycinu může být výsledkem silnější interakce asociátu analyt-vankomycin se stacionární fází. Nejlepší separace enantiomerů všech studovaných profenů (s výjimkou flobufenu) bylo dosaženo při nejvyšší použité koncentraci vankomycinu (4,0 mmol/l). V žádném z testovaných separačních systémů však nedošlo k enantioseparaci flobufenu.

Obecně nižší byly hodnoty rozlišení enantiomerů profenů získané s vankomycinovou CSP a mobilní fází MeOH/1,0% TEAA, pH 5,0 s nízkým obsahem methanolu (20 -30 obj. %). Jedinou výjimkou byla úspěšná enantioseparace flobufenu, jehož aromatická část molekuly nacházející se dále od chirálního centra (ve srovnání s ostatními profeny) a keto skupina mohou ze sterického hlediska

k chirální diskriminaci lépe přispívat v případě vankomycinu vázaného na silikagelovém nosiči.

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

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

7 SEZNAM PUBLIKACÍ

1. **Bosáková Z., Tesařová E., Coufal P., Kafková B., Barbe J.:** „Separace a kvantifikace nově syntetizovaných thioderivátů akridinu pomocí kapilární kapalinové chromatografie“, *Chem. Listy* 95 (2001) 569-574.
2. **Coufal P., Bosáková Z., Tesařová E., Kafková B., Suchánková J., Barbe J.:** „Quantification and purity determination of newly synthesized thioacridines by capillary liquid chromatography“, *J. Chromatogr. B* 770 (2002) 183-189.
3. **Kafková B., Bosáková Z., Tesařová E., Suchánková J., Coufal P., Štulík K.:** „System peaks observed in capillary liquid chromatography with eluents containing triethylamine“, *Chromatographia* 56 (2002) 445-447.
4. **Kafková B., Tesařová E., Suchánková J., Bosáková Z., Coufal P.:** „Capillary liquid chromatography as a tool for separation of hydrophobic basic drugs. Relation between tests for column characterization and real analysis“, *J. Sep. Sci.* 26 (2003) 686-692.
5. **Kafková B., Bosáková Z., Tesařová E., Coufal P.:** „Chiral separation of beta-adrenergic antagonists, profen non-steroidal anti-inflammatory drugs and chlorophenoxypropionic acid herbicides using teicoplanin as the chiral selector in capillary liquid chromatography“, *J. Chromatogr. A* 1088 (2005) 82-93.
6. **Kafková B., Bosáková Z., Tesařová E., Coufal P., Messina A., Sinibaldi M.:** „Vancomycin as chiral selector for enantioselective separation of selected profen nonsteroidal anti-inflammatory drugs in capillary liquid chromatography“, *Chirality* 18 (2006) 531-538.
7. **Němcová I., Nesměrák K., Kafková B., Sejbal J.:** „Physicochemical properties of 9-(alkylsulfanyl)- and 9-(arylsulfanyl)acridine derivatives and their interaction with (2-hydroxypropyl) cyclodextrins“, *Collect. Czech. Chem. Commun.* 71 (2006) 179-189.

8. SEZNAM ZKRATEK

ACN	acetonitril
CD	cyklodextrin
CE	kapilární elektroforéza
CEC	kapilární elektrochromatografie
CLC	kapilární kapalinová chromatografie
CPPA	deriváty chlorofenoxypropanové kyseliny
CS	chirální selektor
CSP	chirální stacionární fáze
DNA	deoxyribonukleová kyselina
HAc	kyselina octová
HPLC	vysokoučinná kapalinová chromatografie
I. D.	vnitřní průměr
MEKC	micelární elektrokinetická chromatografie
MeOH	methanol
NSAID	nesteroidní protizánětlivá léčiva
pI	izoelektrický bod
TEA	triethylamin
TEAA	triethylaminooctanový pufr