

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

KATEDRA ANALYTICKÉ CHEMIE

**VYUŽITÍ MAKROCYKlickÝCH
GLYKOPEPTIDOVÝCH SORBENTŮ V CHIRÁLNÍ
ANALÝZE BETA-BLOKÁTORŮ METODOU HPLC**

Diplomová práce

Hradec Králové 2007

Ivana Zdarsová

Děkuji PharmDr. Radkovi Sladkovskému, Ph.D. a PharmDr. Lucii Novákové, Ph.D. za jejich odborné vedení, cenné rady a pomoc při vypracování této diplomové práce.

Také bych ráda poděkovala pracovníkům na Katedře analytické chemie a všem, kteří mi byli během mé práce jakkoliv nápomocni.

Obsah

Obsah	3
Seznam použitých zkratk.....	6
1 Úvod a cíl práce	7
1.1 Úvod.....	8
1.2 Cíl práce.....	9
2 Teoretická část.....	10
2.1 Chromatografické metody	11
2.1.1 Obecné principy chromatografie	11
2.1.2 Kapalinová chromatografie.....	12
2.1.2.1 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC)	12
2.2 Obecné pojmy týkající se chiraloty	18
2.3 Chirální separace s využitím vysokoúčinné kapalinové chromatografie... 21	
2.3.1 Důležité interakce mezi enantiomerem a chirální fází.....	22
2.3.1.1 Interakce mezi enantiomerem a kovovým iontem.....	22
2.3.1.2 Tvorba vodíkových můstků	22
2.3.1.3 Interakce spojené s výměnou nábojů.....	22
2.3.1.4 Vytvoření komplexu host-hostitel	23
2.3.1.5 Kombinace interakcí.....	23
2.4 Chirální stacionární fáze	23
2.4.1 Stacionární fáze s navázanými proteiny	24
2.4.2 Pirklovy stacionární fáze	24
2.4.3 Chirální stacionární fáze na bázi derivátů celulosy a amylosy	25
2.4.4 Chirální stacionární fáze na bázi cyklodextrinů	25
2.4.5 Chirální stacionární fáze na bázi makrocyclických glykopeptidů	26
2.4.5.1 CHIROBIOTIC V	26
2.4.5.2 CHIROBIOTIC T	29
2.5 Farmakologické vlastnosti β -blokátorů	30
2.5.1 Terapeutické použití β -blokátorů.....	32
2.5.2 Nežádoucí účinky β -blokátorů.....	32
2.5.3 Obecná chemická struktura β -blokátorů	32
2.5.4 Fyzikálně - chemické vlastnosti použitých β -blokátorů	33
2.6 Metody chirální separace	34
3 Experimentální část.....	38
3.1 Použité chemikálie:.....	39
3.2 Přístrojové vybavení	39
3.3 Příprava roztoků.....	40
3.3.1 Zásobní roztoky	40
3.3.2 Příprava mobilních fází.....	40
3.4 Vývoj metody - optimalizace podmínek.....	40
4 Výsledky a diskuze	42

4.1	Chirální separace β -blokátorů v polárně iontovém módu při použití CHIROBIOTIC V	49
4.2	Chirální separace β -blokátorů v reverzním módu při použití CHIROBIOTIC V	52
4.3	Chirální separace β -blokátorů v polárně-iontovém módu při použití CHIROBIOTIC T	53
4.4	Chirální separace β -blokátorů v reverzním módu při použití CHIROBIOTIC T	65
5	Závěr	66
6	Použitá literatura.....	68
7	Abstrakt	72

Seznam použitých zkratk

HPLC	vysokoučinná kapalinová chromatografie
FID	plamenoionizační detektor
UV	ultrafialová spektroskopie
MS	hmotnostní spektroskopie
MF	mobilní fáze
ISA	vnitřní sympatomimetická aktivita
SF	stacionární fáze

1 Úvod a cíl práce

1.1 Úvod

Studium enantioselektivních vlastností farmaceutických substancí je důležitým stupněm při hodnocení léčiv. Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (High performance liquid chromatography – HPLC) je rychlá, účinná analytická technika, úspěšně používaná pro chirální separace jednotlivých enantiomerů řady léčiv. V HPLC se nejčastěji využívá tzv. chirálních stacionárních fází. Je znám velký počet chirálních stacionárních fází a ve výzkumu nových fází se stále pokračuje. Jedním ze současných trendů ve vývoji nových fází je kromě vývoje nových nebo modifikovaných skupin navázaných na silikagel také snaha připravit nové sorbenty, které by byly schopny na sebe připoutat více chirálních skupin pro zlepšení stereoselektivních interakcí s analytem [1].

V posledním desetiletí, chirální stacionární fáze na bázi makrocyclických glykopeptidů se staly velice významnou pomocí při separaci velké řady strukturálně odlišných chirálních sloučenin. Nejvíce používané a komerčně dostupné jsou vankomycinová a teikoplaninová chirální fáze [2].

β -blokátory jsou skupinou léčiv používanou k léčbě arteriální hypertenze, srdeční insuficience, ischemické choroby srdeční i dalších chorob. Většina β -blokátorů jsou chirální látky, z nichž S-enantiomer je mnohonásobně (až 100x) farmakologicky účinnější než R-enantiomer. Navíc bylo zjištěno, že některé R-izomery jsou toxické a jsou zodpovědné za nežádoucí účinky [3].

Kromě HPLC lze použít i další techniky, např. plynovou chromatografii - GC [3], kapilární elektroforézu – CE [4], nebo micelární elektrokinetickou chromatografii – MEC [5] ve spojení s vhodnou detekční technikou (FID, UV, MS).

1.2 Cíl práce

Cílem práce bylo především seznámení s možnostmi makrocyclických glykopeptidů (vankomycinu a teikoplaninu), vysoce účinných chirálních stacionárních fází, při separaci vybraných látek ze skupiny β -blokátorů metodou HPLC s diode array detekcí - DAD. Byly sledovány jednotlivé vlivy např. změna složení mobilní fáze, teplota, rychlost průtoku mobilní fáze na retenci a separaci enantiomerů při rozdílných separačních módech - polárně-iontovým a reverzním módu. Dalším cílem bylo určit optimální podmínky (kolona, složení mobilní fáze, teplota, průtok mobilní fáze) pro separaci daných enantiomerů.

2 Teoretická část

2.1 Chromatografické metody

2.1.1 Obecné principy chromatografie

Chromatografické metody jsou účinné separační metody, sloužící k oddělení analyzovaných složek ze směsi a zároveň k jejich kvalitativní i kvantitativní analýze [6]. V praxi se použitím chromatografie mohou analyzovat organické i anorganické látky nepolární, polární i iontové povahy ve vysokých i nízkých koncentracích [7].

Podstatou dělicího procesu komponent vzorku při chromatografii je opakované ustavování rozdělovacích rovnováh vzorku mezi dvěma fázemi, tzv. mobilní a stacionární fází. Mobilní fáze unáší vzorek prostorem, ve kterém dochází k separaci, stacionární fáze představuje nepohybující se náplň separačního prostoru [8]. Separace vzorku se dosáhne tím, že jednotlivé složky se pohybují chromatografickým systémem různou rychlostí, která závisí na interakci složek s mobilní a stacionární fází. Složka, jejíž interakce se stacionární fází jsou nejsilnější, se bude nejdéle zdržovat v chromatografickém systému a bude ze systému vycházet jako poslední.

Chromatografické metody lze dělit podle mnoha hledisek:

- | | |
|-------------------------------|-------------------------------|
| 1. Podle použité mobilní fáze | 2. Podle separačního principu |
| kapalinová | adsorpční |
| plynová | rozdělovací |
| | iontově výměnná |
| | gelová |
| | afinitní |
| 3. Podle použité techniky | 4. Podle způsobu vyvíjení |
| kolonová | eluční |
| tenkovrstevná | vytěšňovací |
| papírová | frontální [9] |

2.1.2 *Kapalinová chromatografie*

V současnosti jsou používány tři varianty kapalinové chromatografie. Nízkotlaká kolonová kapalinová chromatografie se pro analytické účely využívá jen výjimečně a nachází uplatnění převážně v oblasti preparativní, při čištění směsí látek.

Zejména pro svou instrumentální jednoduchost a nenáročnost provedení se pro analytické i mikropreparativní účely používá technika planární chromatografie.

V současnosti má v analytické chemii dominantní postavení vysokoúčinná kapalinová chromatografie.[8].

2.1.2.1 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC)

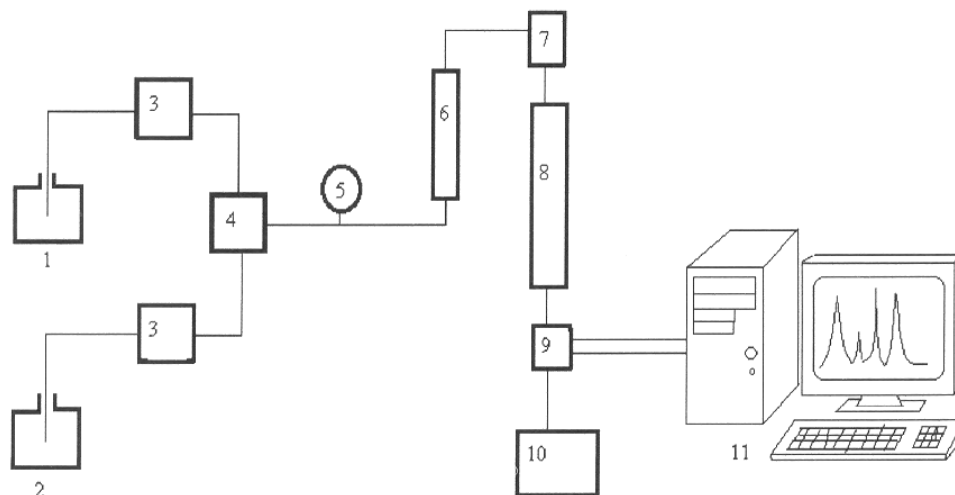
V HPLC (High Performance Liquid Chromatography) je dosahováno vysoké účinnosti separačního procesu použitím kolon naplněných stacionární fází o malé a dobře definované velikosti částic. Separační kolony pro HPLC se vyznačují vysokou hustotou a homogenitou náplně stacionární fáze, a tedy i velkým hydrodynamickým odporem. Pro dosažení dostatečného průtoku MF (řádově ml/min) je nutno aplikovat přetlak jednotek až desítek MPa [6]. Účinnost separace závisí na velikosti a tvaru částic stacionární fáze a zejména na jejich chemické modifikaci [9].

Při dělení směsi látek se používají dva typy eluce. Pokud se příliš neliší eluční parametry analyzovaných látek, používá se izokratická eluce mobilní fází, jejíž složení se během analýzy nemění. Jestliže se jednotlivé složky směsi významně liší svými elučními parametry, je vhodné použít gradientovou eluci, při které se k jedné mobilní fázi plynule nebo skokem přidává druhá mobilní fáze s větším elučním účinkem. Vytváří se tak koncentrační gradient. Obdobným způsobem lze pro eluci využít i gradient pH, tlaku nebo průtoku [6].

Po nástřiku směsi látek na kolonu je tato unášena mobilní fází, ustanovuje se několikanásobná rovnováha mezi stacionární a mobilní fází. Rozdělené látky poté prochází detektorem, kde jsou zaznamenávány a jako odezva na signál detektoru je zakreslen pík [9].

Kapalinový chromatograf

Kapalinový chromatograf se skládá z částí, které zabezpečují průchod mobilní fáze, dávkování vzorku, separaci látek, jejich detekci a vyhodnocení výsledků analýzy. Základní schéma přístroje pro HPLC je znázorněno na obr. 1.



Obr. 1: Schéma kapalinového chromatografu

Jsou to: zásobníky mobilní fáze (1, 2), vysokotlaké čerpadlo (3), směšovač (4), manometr (5), dávkovací zařízení (6), předkolona (7), kolona (8), detektor (9), sběrač frakcí (10), počítač (11). Přítomen může být ještě odplyňovač mobilní fáze (degasser) i více za sebou spojených detektorů [9].

Čerpadla mobilní fáze

Tok mobilní fáze je zajišťován vysokotlakým čerpadlem. V HPLC jsou používány dva typy čerpadel, tzv. lineární čerpadlo a v současnosti nejvíce používané reciproční uspořádání čerpadla.

U lineárního čerpadla je mobilní fáze před analýzou naplněna do válce a posuvem pístu následně vytlačována do dávkovacího ventilu a separační kolony. Rovnoměrného pohybu pístu ve válci je dosaženo otáčením závitového posuvu s pomocí krokového motorku. Výhodou tohoto čerpadla je bezpulzní pohyb, hlavním nedostatkem je nemožnost změny složení mobilní fáze během analýzy.

U recipročního uspořádání čerpadla píst ve válci (o objemu desítek až stovek μl) periodicky nasává a vytlačuje mobilní fázi. Definovaný směr toku mobilní fáze ze zásobníku do dávkovacího ventilu a na kolonu zajišťuje dvojice kuličkových

ventilů. Funkce tohoto čerpadla tedy není bezpulzní, eliminace tlakových pulsů je možno dosáhnout zařazením druhého pracovního válce s pístem pracujícím v opačné periodě. U recipročního typu čerpadla lze měnit složení mobilní fáze před jejím vstupem do pracovního válce [8].

Dávkovací zařízení

Dávkování roztoku se provádí buďto speciální injekční stříkačkou nebo dávkovacím kohoutem, kterým lze dávkovat pevně daný objem roztoku avšak mnohem přesněji [6]. Při dávkování nesmí dojít k výrazným fluktuacím průtokové rychlosti mobilní fáze. Běžně se používá šesticestný ventil s dávkovací smyčkou [8].

Chromatografické kolony

Chromatografické kolony pro HPLC jsou ocelové nebo tlustostěnné skleněné trubice o vnitřním průměru 2-4,6 mm a délce 30-150 mm [8]. Kolona musí odolávat relativně vysokým tlakům, chemickému působení mobilní fáze a separovaných látek. Vnitřní průměr a délka kolony pro preparativní a semipreparativní použití jsou větší.

Při analýze složitých směsí, zejména biologických materiálů, se často používají předkolony. Na předkoloně mohou být zachyceny některé nečistoty, vzorky přicházejí na analytickou kolonu „čistší“ a prodlužuje se tak životnost analytické kolony. Předkolony slouží také k lepšímu ustálení průtoku mobilní fáze, a tak k rychlejšímu ustálení rovnováhy na analytické koloně [9].

Kolony jsou naplněny vhodnou stacionární fází [8]. Je důležité, aby náplň kolony byla homogenní a rovnoměrná. Na účinnost separace má vliv kvalita sorbentu, velikost a stejnoměrnost částic, jejich tvar, porozita a struktura [9]. Obvykle se jako stacionární fáze používá silikagel (oxid křemičitý) vhodné zrnitosti (o velikosti 1,8 - 5 μm), nejčastěji chemicky modifikovaný navázáním vhodných funkčních skupin. Typ funkční skupiny navázaný na povrch oxidu křemičitého určuje výslednou polaritu stacionární fáze [8]. V praktické aplikaci převažuje použití nepolárních, tzv. reverzních fází. Jsou to zejména hydrofobní stacionární fáze s navázanými uhlovodíkovými funkčními skupinami, stacionární fáze je pojmenována podle délky uhlovodíkových řetězců (např. C8 - oktylsilikagel, C18 - oktadecylsilikagel atd.). Zde se pak jako mobilní fáze používají polární kapaliny. Nejčastěji se jedná o ultračistou vodu v kombinaci s polárními rozpouštědly, např. s acetonitrem, methanolem, ethanolem nebo tetrahydrofuranem [9]. Jako stacionární fáze může být

použit i granulovaný iontoměnič, tvořený nejčastěji síťovaným polystyrenem s navázanými kationtovými nebo aniontovými funkčními skupinami. Obdobně lze jako stacionární fázi použít mikroporézních sorbentů [8].

Detektory

K detekci se využívá mnoha instrumentálních metod s tím, že vlastní detekční cela je konstrukčně přizpůsobena k tomu, aby byla použitelná k detekci v HPLC. Zpravidla se jedná o přizpůsobení rozměrové. Objem detekční cely musí být tak malý, aby v detektoru nedocházelo k rozmývání zón látek separovaných v koloně [8]. K detekci se zpravidla využívá obecných nebo specifických vlastností separovaných látek, jimiž se liší od mobilní fáze. Citlivost detektoru je limitací citlivosti analytické metody [9]. Na detektory pro HPLC jsou kladeny mimořádné požadavky:

- vysoká citlivost (detekce látek v roztoku v koncentracích ng až $\mu\text{g/ml}$) [6]
- reprodukovatelnost
- linearita odezvy (odpověď detektoru je přímo úměrná koncentraci látky)
- nezávislost odezvy na změně vnějších podmínek (složení mobilní fáze při gradientové eluci, teplota)
- univerzálnost (detekce všech oddělených složek vzorku) a selektivita
- nedestruktivnost
- spolehlivost, jednoduchost manipulace, přiměřená cena
- minimální mrtvý objem [9]

Nejběžněji používaný fotometrický detektor umožňuje sledovat absorpenci látek vystupujících z chromatografické kolony. Základem detektoru je průtoková křemenná cela, spojená s výstupem chromatografické kolony. Přes stěnu kyvety prochází světelný paprsek přicházející ze zdroje přes fokusační čočku a štěrbinu. Typ světelného zdroje závisí na sledovaném rozsahu vlnových délek, pro ultrafialovou oblast (200 nm - 350 nm) se používá deuteriová výbojka, pro oblast viditelného záření (350 nm - 700 nm) wolframová žárovka. Za měrnou celou je umístěna disperzní mřížka a vhodný detektor dopadajícího záření. Fotometrický detektor pracující v ultrafialové oblasti je pro organické látky prakticky univerzální, vykazuje velmi široký lineární dynamický rozsah a nízké meze detekce. V současnosti se často

používá detektor s diodovým polem, jehož výhodou je možnost okamžitého záznamu celého spektra ve zvolené oblasti vlnových délek, což napomáhá identifikaci látek v jednotlivých zónách.

Pro látky vykazující fluorescenci je možno použít fluorimetrický detektor. Jako zdroj záření se používá nejčastěji miniaturní vysokotlaká xenonová výbojka nebo laser, fluorescenční záření se měří ve směru kolmém k paprsku budícího záření. Záření je doplněno dvěma monochromátory, umožňujícími vybrat jak vlnovou délku budícího, tak i emisního záření. Fluorescenční detektor umožňuje dosáhnout velmi nízkých mezí detekce, jež se pro silně fluoreskující látky pohybují v řádu jednotek pg.

Stále častěji se v HPLC používá hmotnostní detektor s možností přímé identifikace jednotlivých separovaných látek vycházejících z kolony na základě získaných hmotnostních spekter.

Alternativně lze v HPLC užít elektrochemické detektory. Ampérometrické detektory se využívají pro detekci látek, jež je možné elektrochemicky redukovat či oxidovat. V iontové chromatografii se při analýze anorganických iontů běžně používá detektor vodivosti [8].

Parametry separace v kolonové chromatografii

Výsledkem analýzy při použití kolonové chromatografie a detektoru je záznam odezvy detektoru na čase - tzv. chromatogram. Protože detektory používané v chromatografii většinou poskytují odezvu úměrnou koncentraci analytu, jsou zóny separovaných látek procházející detektorem zaznamenány jako charakteristické koncentrační profily s maximem, tzv. chromatografické píky. Z chromatogramu lze určit hodnoty parametrů charakterizující retenční chování separovaných látek a parametry detegovaných chromatografických píků:

Mrtvý čas kolony t_M - představuje časový interval od nástřiku vzorku do okamžiku detekce maximální koncentrace složky, jež není stacionární fází zadržována a pohybuje se rychlostí toku mobilní fáze.

Retenční čas komponenty vzorku t_R - představuje časový interval od nástřiku vzorku do okamžiku detekce odpovídající průchodu maximální koncentrace detektorem. Z chromatogramu je odečítán jako vzdálenost mezi okamžikem nástřiku

a maximem příslušného chromatografického píku. Hodnoty retenčních časů jsou udávány většinou v minutách nebo sekundách [8].

Retenční objem V_R - je objem mobilní fáze, který proteče chromatografickou kolonou od okamžiku nadávkování vzorku až do doby, než se z chromatografické kolony vymyje maximální koncentrace uvažované látky [7]. Retenční objem lze vypočítat z retenčního času podle vzorce $V_R = t_R \cdot v$, v němž v značí průtokovou rychlost a t_R retenční čas.

Hmotnostně distribuční objem D_m - je známý také jako kapacitní faktor k' nebo retenční faktor k a je definován jako:

$$D_m = \frac{n_s}{n_m} = K_c \cdot \frac{V_s}{V_m},$$

v němž značí:

n_s - množství rozpuštěné látky ve stacionární fázi

n_m - množství rozpuštěné látky v mobilní fázi

K_c - rovnovážný distribuční koeficient (známý jako distribuční konstanta)

V_s - objem stacionární fáze

V_m - objem mobilní fáze.

Může být také určen z chromatogramu s použitím vzorce:

$$k = \frac{t_r - t_m}{t_m},$$

v němž značí:

t_r - retenční čas

t_m - mrtvý čas

Pík může být definován plochou píku (A) nebo výškou píku (h) a šířkou píku v poloviční výšce (w_h) nebo výškou píku (h) a šířkou píku mezi body inflexe (w_i).

Faktor symetrie (A_s) - podává informaci o symetrii píku a vypočítá se podle vzorce:

$$A_s = \frac{w_{0,05}}{2d},$$

v němž značí:

$w_{0,05}$ - šířku píku v jedné dvacetině jeho výšky

d - vzdálenost mezi kolmicí spuštěnou z vrcholu píku a vzestupnou částí píku v jedné dvacetině jeho výšky

Hodnota faktoru symetrie 1,0 značí úplnou (ideální) symetrii píku.

Rozlišení (R_s) - určuje stupeň překrytí dvou píků. Pokud píky mají podobnou výšku, rozlišení může být vypočteno ze vzorce:

$$R_s = \frac{1,18(t_{R2} - t_{R1})}{w_{h1} + w_{h2}}, \text{ kde } t_{R2} > t_{R1},$$

v němž značí :

t_{R2} a t_{R1} - retenční časy nebo vzdálenosti podél základní linie od bodu nástřiku ke kolmicím spuštěným z vrcholů dvou sousedních píků.

w_{h1} a w_{h2} - šířky píků v poloviční výšce

Rozlišení větší než 1,5 odpovídá rozdělení píků na základní linii [10].

Separční faktor (α) - umožňuje číselně vyjádřit selektivitu zvoleného systému mobilní a stacionární fáze vůči separovaným látkám [11]. Může být vypočten ze vzorce:

$$\alpha = \frac{k_2}{k_1}, \text{ kde } k_2 > k_1$$

v němž značí:

k_2 , k_1 - retenční faktory separovaných látek [10].

2.2 Obecné pojmy týkající se chiralit

Základním pojmem týkající se chiralit je symetrie. Symetrii molekuly pro danou konfiguraci, případně konformaci, lze popsat pomocí operací symetrie

podle odpovídajících prvků symetrie. Prvky symetrie jsou jednoduchá rotační osa symetrie, rovina symetrie, střed symetrie a rotačně-reflexní osa. Operace symetrie, které se provádějí podle uvedených prvků symetrie jsou otáčení kolem osy, zrcadlení v rovině symetrie, inverze kolem středu symetrie a otáčení kolem osy se současným zrcadlením v rovině kolmé na osu otáčení.

Molekula může mít více prvků symetrie najednou a tyto prvky vytvářejí grupu. Rovina symetrie rozděluje molekulu na dvě části, které jsou navzájem zrcadlovými obrazy. Otočením modelu kolem rotační osy symetrie o úhel $360^\circ/p$ se převede model ke krytí se sebou samým. Jmenovatel pak udává tzv. četnost osy.

Střed symetrie má význam u cyklických sloučenin, tvořených sudým počtem atomů. Myšlená přímka procházející každým atomem a středem molekuly protíná na druhé straně kruhu ve stejné vzdálenosti stejný atom nebo skupinu atomů.

Model, který žádnou z operací symetrie nelze přivést ke krytí, se nazývá asymetrickým a vlastnost asymetrií.

Asymetrický atom je atom vázaný tetraedrálně ke čtyřem různým atomům nebo skupinám atomů, z nichž žádná není zrcadlovým obrazem některé z ostatních. Asymetrický atom lze označit za střed chiralidy .

Některé dvojice látek o stejné konstituci mají prostorové uspořádání jako předmět a zrcadlový obraz a žádným přemostěním v prostoru (tj.translací a rotací) nelze docílit shody [14]. Takový model, který nemá než nejvýše jednoduchou osu symetrie, se nazývá chirální (odvozeno od slova cheir, ruka) a příslušná vlastnost chiralita. Molekuly, které jsou zrcadlovými obrazy jedna druhé, se nazývají enantiomery a chiralita je vlastnost nutná pro jejich existenci. Enantiomery se chovají různě v chirálním prostředí. Nejznámějším chirálním prostředím je polarizované světlo. Oba enantiomery otáčejí rovinu polarizovaného světla o stejný úhel, který se liší směrem otáčení. Chemické i ostatní fyzikální vlastnosti (bod tání, bod varu, hustota, index lomu) jsou shodné. Enantiomery rozlišujeme v názvu sloučenin afixem (+) nebo (-), vztahujícím se ke smyslu otáčení roviny polarizovaného světla definované vlnové délky. Enantiomery se strukturně vzájemně liší absolutní konfigurací. Jednoznačným a zcela obecným způsobem vyjádření známé absolutní konfigurace je nakreslení obrazu molekuly, případně v určité konvenční projekci. Ve spojení s názvem sloučeniny se používá jednoznačného, dnes obecně přijatého záznamu R/S [12-14].

Stereoizomery, které nejsou enantiomery, se nazývají diastereoizomery, případně epimery. U sloučenin obsahujících n chirálních center může být až 2^n stereoizomerů a $(2^n)/2$ dvojic enantiomerů.

Každá látka bez ohledu na její skupenství, obsahující ekvimolární množství enantiomerních molekul, se nazývá racemát.

Separace enantiomerů znamená získání čistých enantiomerů z racemátu. Racemizace představuje nevratnou tvorbu racemátu z neracemické chirální výchozí sloučeniny.

Enantiomerizace znamená přeměnu jednoho enantiomeru v druhý.

Složení směsi enantiomerů se zjišťuje měřením optické otáčivosti (pokud je známá optická otáčivost jednoho enantiomeru) nebo využitím moderních analytických metod, které jsou založeny na skutečnosti, že enantiomery jsou rozlišitelné za chirálních neracemických podmínek. Nejčastěji se používá chromatografických metod na chirálních nosičích a chirálních posunových činidel v NMR spektroskopii.

Enantiomerně čistou je látka, která obsahuje pouze jeden enantiomer. Při použití jiných metod než měření optické otáčivosti se vyjadřuje složení směsi enantiomerním nadbytkem tzv. Enantiomeric Excess.

$$ee(\%) = \frac{m_+ - m_-}{m_+ + m_-} 100$$

(m_+ , m_- je množství (+) a (-) enantiomeru)

Při použití měření optické otáčivosti se čistota vyjadřuje optickou čistotou.

$$op(\%) = \frac{\alpha}{\alpha_{\max}} \cdot 100$$

Diastereoselektivitu vyjadřuje diastereoizomerní poměr.

$$d_r = \frac{m_{D1} \cdot 100}{m_{D1}} : \frac{m_{D2} \cdot 100}{m_{D2}} : \frac{m_{D3} \cdot 100}{m_{D3}}$$

(m_{D1} , m_{D2} , ... je množství diastereoizomerů D_1 , D_2 , ...)

Enantioselektivní reakce jsou reakce, při nichž vzniká jeden enantiomer v přebytku.

Diastereoselektivní reakce představují reakce, při nichž vzniká jedna z možných diastereoizomerních sloučenin v přebytku.

Diastereoizomerizace je přeměna jednoho diastereoizomeru v druhý [12, 14].

2.3 Chirální separace s využitím vysokoúčinné kapalinové chromatografie

K separaci směsi enantiomerů lze využít jak přímý tak nepřímý způsob separace.

Při nepřímém způsobu se nejdříve vytvoří stabilní diastereoizomery chemickou derivatizací enantiomerů s chirálním činidlem, které jsou následně separovány v nechirálním systému. Nevýhody této metody jsou, že derivatizace je časově náročná, musí probíhat kvantitativně a je spjata s možností racemizace. Výhodou je využití nechirálních fází, které jsou levnější a komerčně dostupnější.

Při přímém způsobu se vytváří nestabilní diastereoizomery přímo v chirálním systému interakcí s chirální fází. Interakce mezi enantiomerem a chirální fází zahrnuje vznik např. π - π vazby, koordinační vazby, vodíkových můstků nebo tvorbu inkluzních komplexů. Vazby vznikají mezi skupinou navázanou na chirálním centru enantiomeru a odpovídající skupinou chirální fáze. Po vytvoření těchto hlavních interakcí, kdy se do těsné blízkosti dostanou molekuly enantiomeru a chirální fáze, se mezi molekulami vytvoří i vazby s nižší energií (van der Waalsovy, vazby dipól-dipól). Enantioselektivitu určuje kromě všech výše zmíněných interakcí také velikost, tvar, polarita a postavení nenavázaných skupin analytu vzhledem ke chirální fázi.

V chromatografickém systému se látky, které interagují s enantiomery, buď přidávají do mobilní fáze (chirální mobilní fáze), nebo jsou navázány ke stacionární fázi (chirální stacionární fáze).

2.3.1 *Důležité interakce mezi enantiomerem a chirální fází.*

2.3.1.1 Interakce mezi enantiomerem a kovovým iontem

Při této interakci dochází ke vzniku reverzibilního komplexu mezi chirálním činidlem a kovovými ionty, připevněnými k chirální stacionární fázi. Obvykle používané kovové ionty jsou měďnaté a nikelnaté ionty. Při separaci se uplatňují také vazby mezi chirálním činidlem a matricí (silikagelem), sterické stínění a přitažlivé nebo odpudivé síly.

2.3.1.2 Tvorba vodíkových můstků

Vodíkové můstky se vytvářejí mezi dvojicí elektronegativních prvků. Povaha vodíkové vazby jsou elektrostatické interakce typu dipól-dipól, s kovalentním příspěvkem charakteru donor-akceptorové interakce. Donorem je volný elektronový pár elektronegativního atomu, akceptorem je částečně vakantní vodíkový atom [10].

Interakce mezi dvěma molekulami mohou být upravovány změnou elučních podmínek. S rostoucí polaritou prostředí, je vodíková vazba silnější. Enantioselektivita je určena silou vodíkové vazby, která je ovlivněna sterickým stíněním a přitažlivými nebo odpudivými interakcemi mezi enantiomerem a chirální fází.

2.3.1.3 Interakce spojené s výměnou nábojů

Komplex enantiomer – chirální fáze může být tvořen také slabými interakcemi, ve kterých dochází k přenosu π elektronů mezi sloučeninou, která je akceptorem elektronů a sloučeninou, která je jejich donorem. Nezbytnou podmínkou pro vytvoření tohoto komplexu je přítomnost obsazeného molekulového orbitalu s dostatečně velkou energií v molekule, která je donorem elektronů, a přítomnost neobsazeného molekulového orbitalu v molekule, která je akceptorem elektronů. Donorem π elektronů jsou např. vícejaderné aromatické uhlovodíky a sloučeniny, které obsahují ve své molekule alkyl-, alkoxy- nebo aminoskupinu. Aromatické

molekuly obsahující skupiny jako např. NO_2^- , Cl^- , CN jsou vhodné akceptory elektronů. Stabilita komplexů se zvyšuje se zvyšováním polaridy rozpouštědla.

2.3.1.4 Vytvoření komplexu host-hostitel

Cyklodextriny a crown-ethery vytvářejí s enantiomery inkluzní komplexy. Tyto komplexy jsou závislé na polaritě, lipofilitě, velikosti a geometrii enantiomeru a na velikosti dutiny cyklodextrinu. Enantioselektivita je určována tvarem dutiny a interakcemi mezi substituenty v blízkosti chirálního centra enantiomeru a sekundárními hydroxylovými skupinami u ústí dutiny. Teplota, pH a složení mobilní fáze ovlivňuje stabilitu tohoto komplexu. Inkluzní komplex je nejstabilnější ve vodě a jeho stabilita se snižuje přidáváním organické složky do mobilní fáze.

2.3.1.5 Kombinace interakcí

Při interakci enantiomeru se stacionární fází na bázi polymerů, proteinů nebo makrocyclických antibiotik dochází k interakcím, které zahrnují tvorbu vodíkových můstků, přenos elektronů i tvorbu inkluzních komplexů. Popsání mechanismu separace je obtížné a závislé na složitosti těchto stacionárních fází [15].

2.4 Chirální stacionární fáze

V kapalinové chromatografii se nejvíce používá pět základních chirálních stacionárních fází:

- Stacionární fáze s navázanými proteiny
- Pirklovy stacionární fáze
- Stacionární fáze na bázi derivátů celulosy a amylosy
- Stacionární fáze na bázi makrocyclických peptidů
- Stacionární fáze na bázi cyklodextrinů

2.4.1 *Stacionární fáze s navázanými proteiny*

Tyto fáze mají na silikagelovou matici navázané přírodní proteiny. Proteiny obsahují velké množství chirálních center a selektivně interagují s analytem. Proteiny ale mohou interagovat s analytem i na jiném místě než je chirální centrum, a tím dochází k možnému snížení chirální selektivity. Tomu se zabráňuje použitím přídavku např. oktylaminu do mobilní fáze. Příkladem tohoto typu stacionárních fází je stabilní α_1 - kyselý glykoprotein, komerčně známý jako CHIRAL-AGP, navázaný na silikagelu a používaný pro separaci enantiomerů obsahujících ve své molekule sekundární nebo terciární aminy nebo pro substance obsahující dusík v cyklu.

Komerčně známý CHIRAL-CBH, obsahující enzym cellobiohydrolázu, se využívá pro separaci enantiomerů obsahujících primární aminoskupinu.

Jiný protein využívající se jako chirální stacionární fáze je lidský albumin, komerčně dostupný jako CHIRAL-HSA.

Separční účinnost je u všech vyjmenovaných proteinů ovlivněna pH a koncentrací organického rozpouštědla. Nejčastěji se používá fosfátový pufr a jako organické rozpouštědlo 2-propanol nebo acetonitril o koncentraci 1%-10%. U cellobiohydrolázy je nutný přídavek chelatační látky, protože tento enzym je deaktivován přítomností kovů v systému.

2.4.2 *Pirklovy stacionární fáze*

Jako Pirklovy fáze se označují chirální látky s malou molekulovou hmotností navázané na silikagel (např. LC-(R)- a LC-(S)-dinitrobenzoylfenylglycin nebo LC-(R)-fenylurea). Pirklovy fáze mají limitovaný počet chirálních center. Relativně krátká vzdálenost mezi chirální látkou a silikagelem omezuje interakce mezi chirálními centry látky a chirálními centry stacionární fáze. Pro určité molekuly je toto uspořádání ideální, protože se stacionární fází může interagovat jen jeden z enantiomerů.

Pro zvýšení chirální účinnosti tohoto typu fází, lze do molekuly zavést polární nebo polarizovatelné skupiny. Tyto fáze pak mají větší uplatnění. V praxi se používají pro separaci alkoholů, diolů, amidů, imidů a karbamátů. Mobilní fáze v tomto systému mohou být polární i nepolární rozpouštědla.

2.4.3 Chirální stacionární fáze na bázi derivátů celulosy a amylosy

Deriváty celulosy a amylosy používané jako chirální stacionární fáze mají molekulovou hmotnost do 40.000 Daltonů. Hlavní rozdíl mezi oběma typy je v prostorovém uspořádání molekul. Celulosa má lineární konformaci, zatímco amylosa má spirálovité uspořádání. Celulosa i amylosa mají pět chirálních center. Polymery jako celek tedy obsahují velké množství chirálně aktivních míst, a proto relativně velkou možnost interakcí s rozpuštěnou látkou.

Deriváty, které se nejčastěji používají, jsou tris(3,5-dimethylphenyl)karbamát a tris(4-methylbenzoát). Tyto deriváty mají ve své molekule polární i jiná rozptýlená vazebná místa, navíc k tomu samotné aromatické jádro může být polarizované, a proto může interagovat se silně polární skupinou separované látky.

Vzhledem k faktu, že stacionární fáze není chemicky připevněna na silikagelovou matici, musí být splněny určité podmínky na složení mobilní fáze, průtokovou rychlost a teplotu systému. Doporučené složení mobilní fáze je směs heptanu a alkoholu [2].

2.4.4 Chirální stacionární fáze na bázi cyklodextrinů

Nativní cyklodextriny jsou cyklické oligosacharidy skládající se z α -1,4 spojených D-glukosopyranosových jednotek. Vznikají enzymatickou degradací škrobu (amylosy) glukosyltransferasami bakteriálního původu (*Bacillus macerans*) [16].

Jako chirální stacionární fáze se používají nativní α (6 jednotek), β (7 jednotek) a γ (8 jednotek) cyklodextriny a jejich deriváty, které jsou syntetizovány pro zlepšení chirální selektivity. Volné hydroxylové skupiny jsou orientovány směrem vně, tudíž molekula nativního cyklodextrinu je zevně hydrofilní, vnitřní prostor dutiny je málo polární, lipofilní. Cyklodextriny jsou navázané na silikagel [17].

Při separaci se využívá dvou odlišných postupů. Při prvním se využívá interakcí po inkluzi analytu, výběrem vlastní velikosti dutiny se dosahuje požadované selektivity. Tohoto postupu se využívá, jsou-li molekuly relativně malé a nepolární. Druhý postup zahrnuje obvyklé interakce na povrchu stacionární fáze. Toto platí pro velké molekuly, u nichž inkluze není možná.

Cyklodextriny jsou stabilní v širokém rozmezí pH, hodnoty pH mohou být 3-14. Cyklodextrinový typ stacionární fáze lze použít při polární i reverzní fázi. Derivatizací na sekundárních hydroxylových skupinách v polohách 2,3 se dosáhne větší separace určitých párů enantiomerů [2].

2.4.5 Chirální stacionární fáze na bázi makrocyclických glykopeptidů

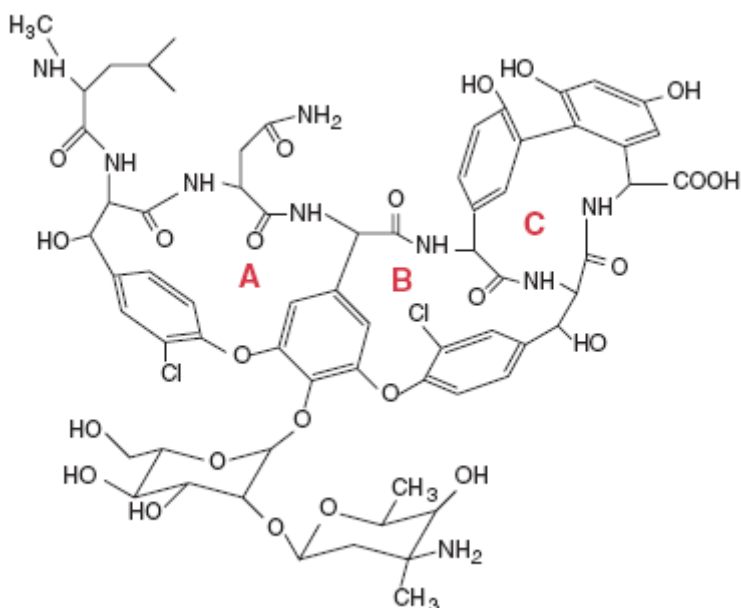
Molekula makrocyclických glykopeptidů obsahuje velké množství chirálních center. V prostoru molekula glykopeptidu vytváří dutiny, do kterých molekula analytu může vstupovat, na základě svého prostorového uspořádání, a interagovat s chirálními centry molekul stacionární fáze. Konformace molekuly analytu bude tedy určovat stupeň vstupu, sílu interakce a následně velikost retence.

K separaci nedochází pouze na základě vstupu analytu do dutiny, ale uplatňují se zde i další mechanismy jako π - π interakce, tvorba vodíkových můstků a hydrofóbní interakce [18].

Tento typ stacionární fáze je stabilní při použití MF obsahující 0-100% organického rozpouštědla, a proto se dá využít mnoha módů MF (polárně-organický mód, polárně-iontový mód, reverzní fáze a normální fáze). Makrocyclické glykopeptidy jsou stabilní v určitém definovaném rozmezí pH. Hodnoty pH mohou být v rozmezí 4-7 u vankomycinové kolony a 3,8-6,5 u teikoplaninové kolony. Nejčastěji se pro tento typ stacionární fáze využívají antibiotika vankomycin a teikoplanin ko-valentně navázané na silikagel. Vankomycin je komerčně dostupný pod názvem CHIROBIOTIC V, a teikoplanin je komerčně dostupný pod názvem CHIROBIOTIC T [2].

2.4.5.1 CHIROBIOTIC V

Vankomycin obsahuje 18 chirálních center obklopujících tři dutiny, které jsou přemostěny pěti aromatickými kruhy. Silně polární skupiny v blízkosti kruhů nabízejí silně polární interakce s rozpuštěnou látkou. Struktura vankomycinu je znázorněna na obr 2.



Obr 2: Struktura vankomycinu

Tento typ stacionární fáze je stabilní v mobilní fázi obsahující 0-100% organického rozpouštědla.

Tato stacionární fáze spojuje výhody proteinových fází s vyšší kapacitou a větší stabilitou a výhody celulosových a amylosových fází s větší možností výběru rozpouštědla a vyšší chirální účinností. Je komplementární k CHIROBIOTIC T

Typy chirálních analytů pro CHIROBIOTIC V

Značnou enantioselektivitu na této fázi vykazují různé neutrální molekuly, amidy, kyseliny, estery a aminy. V polárně iontových modech jsou separovány i mnohé sekundární a terciární aminy.

Módy pro CHIROBIOTIC V

Nejvhodnější módy pro určité typy sloučeniny jsou uvedeny v tab 1.

Typ sloučeniny	Polárně organický mód	Polárně iontový mód	Reverzní fáze	Normální fáze
Kyseliny			√	
Zásady		√	√	
Neutrální látky	√		√	√

Tab. 1: Módy pro CHIROBIOTIC V

Separace látek pomocí polárně iontového módu

Polárně iontový mód lze aplikovat na všechny molekuly, které obsahují nejméně jednu ionizovatelnou skupinu blízko chirálního centra a další funkční skupinu kdekoli ve struktuře dané molekuly. Větší selektivitu při použití této mobilní fáze ukazovaly bazické látky. Pro analýzu chirálních látek se jako výchozí složení mobilní fáze pro polárně iontový mód doporučuje směs methanol/kys. octová/triethylamin 100/0,1/0,1 (v/v/v) Lze využít i soli např. trifluoracetát amonný, mravenčan amonný nebo acetát amonný.

Optimalizace mobilní fáze pro polárně iontový mód probíhá v několika krocích.

Krok 1: Volba optimálního poměru kyseliny a báze v mobilní fázi - protože tato mobilní fáze je vhodná hlavně pro bazické látky, zvýšením podílu kyseliny se dosahuje výraznější separace než při zvyšování podílu báze. Je to dáno tím, že okyselením MF dochází k větší protonaci bazických látek. Podíl kyseliny nesmí být vyšší, než je nezbytně nutné, protože pak dochází ke snižování selektivity. Určení optimálního podílu jiných kyselin a bází se provádí výměnou methanolu za vodu a změřením pH. Při použití jiných bází jako např. amoniaku, se nastaví pH na stejnou hodnotu a zaznamená se použité množství.

Krok 2: Úprava průtokové rychlosti - nižší průtoková rychlost má za následek vyšší separaci. Pro kolonu 250x4,6mm je udána průtoková rychlost 0,3ml/min.

Krok 3: Úprava teploty systému - větší rozlišovací schopnost je při nižší teplotě. Při vyšší teplotě se může redukovat rozmývání píku a snižovat retence.

Krok 4: Využít CHIROBIOTIC V2.

Separace látek pomocí reverzního módu

V reverzním módu obsahuje mobilní fáze 10-20% organického rozpouštědla. Zbytek tvoří vhodný pufr. Výběr organického rozpouštědla závisí na analyzované látce. Optimální výchozí složení mobilní fáze je 20/80: methanol/20mM octan amonný, pH 4,0.

Optimalizace v reverzním módu probíhá v několika krocích.

Krok 1: Výběr optimálního organického rozpouštědla - jako základní se používají tetrahydrofuran, methanol a acetonitril.

Krok 2: Zjištění optimální koncentrace organického rozpouštědla - vyšší koncentrace organického rozpouštědla má za následek nižší retenci.

Krok 3: Zjištění optimálního pH pufru

Krok 4: Výběr vhodného pufru - používá se TEAA, octan amonný, dusičnan amonný nebo citrát sodný.

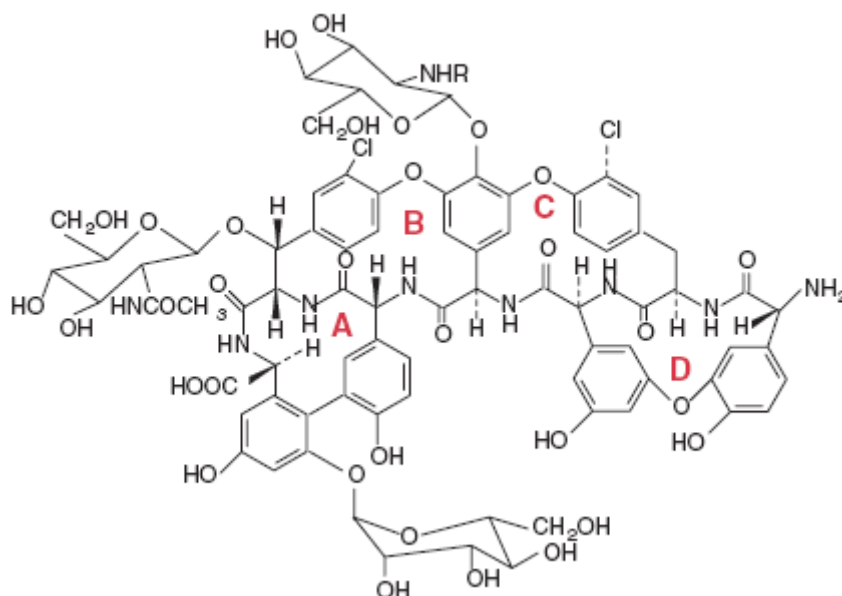
Krok 5: Výběr vhodné koncentrace pufru - vhodná koncentrace pufru se pohybuje v rozmezí 0,05-1,0%.

Krok 6: Volba průtokové rychlosti - nižší průtoková rychlost vede k větší retenci.

Krok 7: Výběr optimální teploty - nižší teploty často vedou k většímu rozlišení.

2.4.5.2 CHIROBIOTIC T

Teikoplanin obsahuje 20 chirálních center uspořádaných kolem čtyřech dutin. Skupiny sousedící s chirálními centry jsou silně polární a aromatické kruhy jsou polarizovatelné. Struktura teikoplaninu je znázorněna na obr. 3.



Obr. 3: Struktura teikoplaninu

Tato stacionární fáze je komplementární k vankomycinové fázi a mohou být použity stejné mobilní fáze i stejné postupy při optimalizaci mobilních fází. Teikoplanin se může používat v reverzním módu s použitím silně polární mobilní fáze jako je acetonitril/pufr 10/90 (v/v), tetrahydrofuran/pufr 10/90 (v/v) a ethanol/pufr 20/80 (v/v). Tento systém je vhodná alternativa ke crown etherům pro separaci aminokyselin a hydroxykyselin.

Typy chirálních analytů pro CHIROBIOTIC T

Mezi typy sloučenin, jejichž enantiomery může teikoplaninová fáze dělit patří nederivatizované α , β , γ nebo cyklické aminokyseliny, N-derivatizované aminokyseliny, α -hydroxykyseliny, sloučeniny obsahující karboxylové kyseliny a fenoly, krátké peptidy, neutrální aromatické analyty a cyklické aromatické a alifatické aminy. Všechny známé beta blokátory a dihydrokumariny mohou být na této fázi separovány.

Módy pro CHIROBIOTIC T

Nejvhodnější módy pro určité typy sloučeniny jsou uvedeny v tab 2.

Typ sloučeniny	Polárně organický mód	Polárně iontový mód	Reverzní fáze	Normální fáze
Kyseliny		√	√	
Zásady		√	√	
Neutrální látky	√		√	√

Tab. 2: Módy pro CHIROBIOTIC T [18]

2.5 Farmakologické vlastnosti β -blokátorů

Všechny β -blokátory (β -sympatolytika, β -adrenergní blokátory, β -adrenolytika) kompetitivně antagonistizují účinky sympatické nervové stimulace a sympatomimetik na β -adrenergních receptorech.

Podle selektivity na různé typy β -receptorů se rozlišuje několik skupin β -blokátorů:

- neselektivní β -blokátory bez vnitřní sympatomimetické aktivity (ISA) - např. metipranolol, propranolol, timolol
- neselektivní beta-blokátory s ISA - např. pindolol, bopindolol
- selektivní β_1 -blokátory bez ISA - např. betaxolol, metoprolol, bisoprolol
- selektivní β_1 -blokátory s ISA - např. acebutolol, celiprolol
- β -blokátory s kombinovaným účinkem - např. labetalol, karvedilol
- selektivní β_2 - blokátory - butoxamin

Účinky β -blokátorů se manifestují nejvýrazněji v kardiovaskulárním systému. Blokádou β_1 -receptorů snižují β -blokátory sílu a frekvenci srdečních stahů a snižují vodivost převodního systému; antagonizují pozitivně inotropní, chronotropní, dromotropní a batmotropní účinky sympatické nervové stimulace a sympatomimetik a snižují spotřebu kyslíku myokardem. Účinek β -blokátorů je závislý na stupni aktivace sympatiku. Je výrazně vyšší při stresu a při zátěži, kdy je sympatikus aktivován, než v klidu.

Ve vysokých koncentracích (přibližně 50- až 100krát vyšších, než jsou koncentrace terapeutické) má mnoho β -blokátorů lokálně anestetický účinek. Tento účinek má význam pouze při intoxikaci.

Velmi důležité jsou účinky β -blokátorů na pulmonální systém. Blokádou β_2 -receptorů inhibují neselektivní β -blokátory bronchodilatační účinky sympatomimetik a u pacientů s astmatem či chronickou obstrukční bronchopulmonální nemocí mohou vyvolat život ohrožující bronchokonstrikce.

Neselektivní β -blokátory blokádou β_1 - a β_2 -receptorů antagonizují i metabolické účinky katecholových aminů, tj. lipolýzu a glykolýzu. Toto má vliv především u pacientů s diabetem, zejména u labilních diabetiků, protože β -blokátory prodlužují dobu zotavení z hypoglykémie a navíc blokují tachykardii, která je jedním z důležitých příznaků hypoglykémie. Zásahem do metabolismu lipidů zvyšují neselektivní β -blokátory plazmatické hladiny triacylglycerolů a snižují hladinu HDL-lipoproteinů; tento účinek se však neprojevuje po selektivních látkách ani po β -blokátorech s ISA.

2.5.1 *Terapeutické použití β -blokátorů*

Indikace podávání β -blokátorů jsou rozsáhlé, β -blokátory jsou využívány především pro své kardiovaskulární účinky v následujících situacích:

- hypertenze
- arytmie - β -blokátory se používají u supraventrikulárních tachykardií, blokují tachykardii při hyperfunkci štítné žlázy
- angina pectoris a ostatní formy ischemické choroby srdeční - β -blokátory mají také ochranný účinek při infarktu myokardu.
- další srdeční onemocnění - hypertrofická kardiomyopatie, srdeční insuficience aj.
- glaukom
- další indikace - prevence migrény, třesy kosterního svalstva

2.5.2 *Nežádoucí účinky β -blokátorů*

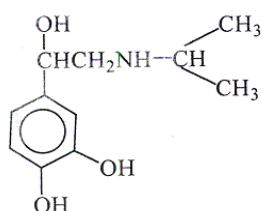
Nežádoucí účinky β -blokátorů nejsou příliš časté a většinou souvisí s blokadou adrenergických receptorů. Mezi nejdůležitější patří srdeční insuficience, poruchy vedení vzruchu, hypotenze, bronchokonstrikce, chladné končetiny, hyperkalémie, u diabetiků prodlužují zotavení z hypoglykémie. Závažný může být při náhlém ukončení léčby β -blokátory tzv. „rebound“ fenomén. Lipofilní β -blokátory pronikají hematoencefalickou bariérou do CNS a mohou vyvolat únavu, poruchy spánku (nospavost, živé sny) i deprese [19].

2.5.3 *Obecná chemická struktura β -blokátorů*

β -blokátory tvoří značně strukturně jednotnou skupinu látek odvozenou modifikací molekuly isoprenalinu (obr.4). Všechna β -adrenolytika obsahují jako základní strukturní element skupinu $-\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_2\text{NH}-$, která je pro účinek nezbytná. Dusík postranního řetězce má vždy charakter sekundární aminoskupiny se substitucí odpovídající isoprenalinu, tj. s isopropylovou skupinou, kterou lze obměnit za skupinu terc.-butylovou.

Aromatická část molekuly je tvořena různými karbocyklickými nebo heterocyklickými systémy, které mohou být také různě substituovány. Struktura aromatického jádra určuje, zda látka bude mít vnitřní sympatomimetickou aktivitu.

Sekundárně alkoholická skupina je pro účinek nutná, její obměna je možná pouze formou proléčiva. Uhlík, na kterém je navázaná sekundární alkoholová skupina, je chirálním centrem molekuly. Ve srovnání s pravotočivou formou má levotočivý enantiomer více než 100násobně vyšší afinitu vůči β -receptorům. Převážná většina prakticky používaných β -adrenolytik vznikla prodloužením spojovacího řetězce vsunutím skupiny $-OCH_2-$ mezi aromatickou část molekuly a uhlík s alkoholovou skupinou.



Obr. 4: Vzorec isoprenalinu [20]

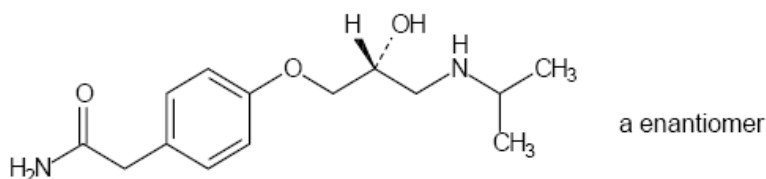
2.5.4 Fyzikálně - chemické vlastnosti použitých β -blokátorů

Atenolol (Atenololum)

2-{4-[(2RS)-2-hydroxy-3-(isopropylamino)propoxy]fenyl}acetamid

Vzorec je uveden na obr. 5. Počítáno na vysušenou látku, obsahuje 99,0 % až 101,0% sloučeniny $C_{14}H_{22}N_2O_3$.

Atenolol je bílý nebo téměř bílý prášek. Je mírně rozpustný ve vodě, dobře rozpustný v ethanolu, těžce rozpustný v dichlormethanu, prakticky nerozpustný v etheru.



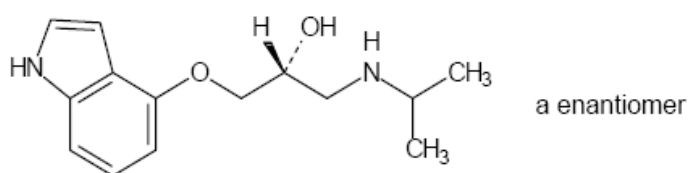
Obr. 5: Atenololum

Pindolol (Pindololum)

(2RS)-1-(1H-indol-4-yloxy)-3-(isopropylamino)propan-2-ol

Vzorec je uveden na obr. 6. Počítáno na vysušenou látku, obsahuje 99,0% až 101,0% sloučeniny $C_{14}H_{20}N_2O_2$.

Pindolol je bílý nebo téměř bílý krystalický prášek. Je prakticky nerozpustný ve vodě, těžce rozpustný v methanolu. Rozpouští se ve zředěných minerálních kyselinách.



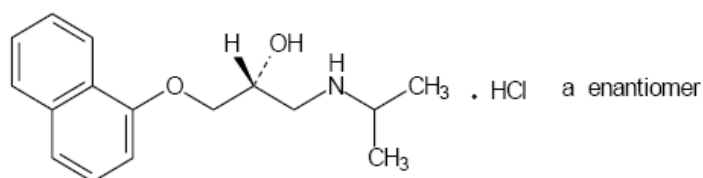
Obr. 6: Pindololum

Propranolol-hydrochlorid (Propranololum-hydrochloridum)

(2RS)-1(isopropylamino)-3-(naftalen-1-yloxy)propan-2-ol-hydrochlorid

Vzorec je uveden na obr. 7. Počítáno na vysušenou látku, obsahuje 99,0% až 101,0% sloučeniny $C_{16}H_{22}ClNO_2$.

Propranolol je bílý nebo téměř bílý krystalický prášek. Je dobře rozpustný ve vodě a v lihu 96%.



Obr. 7: Propranololi hydrochloridum [10]

2.6 Metody chirální separace

Byla vypracována stručná rešerše možností chirální separace β -blokátorů (tab. 3).

Tab. 3: Výsledky rešerže na HPLC chirální separaci β -blokátorů

Stacionární fáze	Kolona [mm]	Mobilní fáze	Průtok [ml/min]	Detekce	Hodnocené látky	Analyzovaný vzorek	Citace
Chiral-AGP	100 x 4,0	10 mM fosfátový pufr pH=7,2	0,9	UV (254 nm)	atenolol, pindolol, propranolol	-	[21]
APEX ODS	250 x 4,6	voda : methanol (v různých poměrech)	0,8	UV (254 nm)	12 β -blokátorů	deriváty s chirálními činnidly	[22]
R- α -Burke 1	250 x 4,6	dichlormethan : alkohol (ethanol nebo methanol) s přídavkem octanu amonného (0,5g/l); 25°C	2,0	UV (230 nm)	18 β -blokátorů	dichlormethanový roztok	[23]
LiChrosorb Si 60	120 x 4,6	methanol : dichlormethan : heptan (v různých poměrech)	-	UV (290 nm)	18 β -blokátorů	deriváty s chirálními činnidly	[24]
LiChrosorb RP-18	120 x 4,6	2mM 1-dodecylsulfonát sodný v triethylaminu : kys.octová(ledová) : methanol : voda (0,2:0,2:7,5:25)	-	UV (290 nm)	18 β -blokátorů	deriváty s chirálními činnidly	[24]

Stacionární fáze	Kolona [mm]	Mobilní fáze	Průtok [ml/min]	Detekce	Hodnocené látky	Analyzovaný vzorek	Citace
SINU-PC	250 x 4,6	pufr(1% TEA, pH=5,11) : methanol (70 : 30); 23°C	1,0	UV (254 nm)	propranolol, alprenolol, acebutolol, pindolol, metoprolol	standard rozpuštěný v mobilní fázi	[25]
N-3,5-dinitrobenzoyl- α - amino fosfát	120 x 4,6	dichlormethan : ethanol (19 : 1), obsahuje 0,5g/l octanu amonného	2,0	UV (254 nm)	metoprolol, oxprenolol, propranolol, pindolol	oxazolidonové deriváty	[26]
tris-(3,5- dimethylphenylkarba- mátové) deriváty amylosy	250 x 4,6	methanol : ethanolamin (100:0,1); 24°C	0,2	UV (254 nm)	9 β -blokátorů	-	[27]
m-[(+)- α -methylben- zylkarboxamid]	250 x 4,6	acetátový pufr pH=4,1 : acetonitril (40:60); 25°C	0,8	UV (254 nm)	atenolol, metoprolol, popranolol	methanolicke roztoky	[28]
(+)-(18-crown-6)- 2,3,11,12- tetrakarboxylová kys.	150 x 4,6	kys. trifluoroctová : triethylamin : ethanol : acetonitril (0,1:0,5:20:80); 20°C	1,0	UV (254 nm)	11 β -blokátorů	methanolicke roztoky	[29]

Stacionární fáze	Kolona [mm]	Mobilní fáze	Průtok [ml/min]	Detekce	Hodnocené látky	Analyzovaný vzorek	Citace
3,5-dinitrobenzoyl derivát trans-1,2-diaminocyklohexanu	250 x 4,0	dichlormethan : n-hexan (80:20); 25°C	2,0	UV (254 nm)	alprenolol	oxazolidinový derivát	[30]
3,5-dinitrobenzoyl derivát trans-1,2-diaminocyklohexanu	250 x 4,0	dichlormethan : methanol (99:1); 25°C	2,0	UV (254 nm)	betaxolol, metoprolol, propranolol, sotalolol, acebutolol	oxazolidinové deriváty	[30]
3,5-dinitrobenzoyl derivát trans-1,2-diaminocyklohexanu	250 x 4,0	dichlormethan : methanol (90:10); 25°C	2,0	UV (254 nm)	pindolol, atenolol	oxazolidinové deriváty	[30]
(R,R)-tartramidové deriváty	150 x 2,0 (2 kolony v serii)	n-hexan : dichlormethan : diethylamin (94:5:1); 25°C	0,2	UV (254 nm)	propranolol, metoprolol, bisoprolol	močovinnové deriváty	[31]

3 Experimentální část

3.1 Použité chemikálie:

Acetonitril HPLC gradient grade (SIGMA-ALDRICH, Praha, Česká Republika)

Methanol HPLC gradient grade (SIGMA-ALDRICH, Praha, Česká Republika)

Tetrahydrofuran HPLC gradient grade (SIGMA-ALDRICH, Praha, Česká Republika)

Ultračistá voda Millipore MilliQRG (Millipore Corp. MA, USA)

Triethylamine puriss. p.a. 99,5%, (Fluka, Buchs, Švýcarsko)

Acetic acid purum 99,%, (Fluka, Buchs, Švýcarsko)

Ammonium aceticum purum, (Lachema Brno, závod Neratovice)

Pindolol 97,%, (ALDRICH, Praha, Česká Republika)

Propranolol hydrochloride 99%, (SIGMA -ALDRICH, Praha, Česká Republika)

Atenolol 98%, (SIGMA-ALDRICH, Praha, Česká Republika)

3.2 Přístrojové vybavení

automatické analytické váhy: SARTORIUS 2004 MP (Německo)

laboratorní pH metr: Microprocessor pH Meter pH212, HANNA instruments

pumpa: LC-10 ADvp SHIMADZU (Kyoto, Japonsko)

odplyňovač: DGU - 14A SHIMADZU (Kyoto, Japonsko)

dávkovací jednotka: SIL - Hta, autosampler SHIMADZU (Kyoto, Japonsko)

termostat: CTO-10ACvp column oven, SCHIMADZU (Kyoto, Japonsko)

detektory: SPD-M10Avp diode array detektor, SCHIMADZU (Kyoto, Japonsko)

RF10Ax1 fluorescence detector, SCHIMADZU (Kyoto, Japonsko)

Program: LC solution for Windows v.1.1

kolony: CHIROBIOTIC V (250x4,6 mm) 5 µm (Astec, Whippany, USA)

CHIROBIOTIC T (250x4,6 mm) 5 µm (Astec, Whippany, USA)

3.3 Příprava roztoků

3.3.1 Zásobní roztoky

Zásobní roztok betablokátoru (atenololu, propranololu, pindololu) o koncentraci 20 mg/ml byl připraven rozpuštěním 0,1 g standardu v methanolu a doplněn methanolem do 5,00 ml.

Navážky standardů jednotlivých β -blokátorů o přibližně přesné koncentraci 20 mg/ml byly rozpuštěny v odměrné baňce 5,0 ml v čistém methanolu. Pro další práci byly tyto zásobní roztoky standardů ředěny methanolem na požadovanou koncentraci 2 mg/ml.

Pracovní roztok octanu amonného o koncentraci 20 mM byl připraven rozpuštěním 0,7708 g octanu amonného v odměrné baňce 500,00 ml superčistou vodou a doplněn po rysku. Úprava pH na požadovanou hodnotu (4,0; 4,5; 5,0) byla prováděna přidáním potřebného množství kyseliny octové.

3.3.2 Příprava mobilních fází

Mobilní fáze pro polárně iontový mód byla připravena přidáním daného množství kys. octové a triethylaminu do organického rozpouštědla (methanolu nebo směsi methanolu a acetonitrilu). Přesná množství jsou uvedena v tab. 4, 6 a 7.

Mobilní fáze pro reverzní mód byla připravena smícháním roztoku 20mM octanu amonného o daném pH s organickým rozpouštědlem (tetrahydrofuranem, acetonitrem nebo methanolem) v poměrech uvedených v tab. 5 a 8.

3.4 Vývoj metody - optimalizace podmínek

Nejdříve bylo nutné najít vhodné podmínky pro analýzu. Pro měření odezvy byly zvoleny 2 vlnové délky, 230 nm pro atenolol a propranolol a 254 nm pro pindolol. Při těchto vlnových délkách látky vykazovaly své absorpční maximum.

Byla zvolena průtoková rychlost u obou použitých kolon. Při analýze na vancomycinové koloně byla zvolena průtoková rychlost 2 ml/min pro polárně-iontový

mód a 1 ml/min pro reverzní mód. Při analýze na teikoplaninové koloně byla zvolena průtoková rychlost 2 ml/min pro oba módy.

Nástřik vzorků pindololu a propranololu byl 10 μ l a nástřik vzorku atenololu byl 20 μ l (při použití menšího množství byla malá odezva detektoru).

Byla použita teplota 30°C, pokud v poznámce v tab. 4-8 není uvedeno jinak.

4 Výsledky a diskuze

Jako chirální selektory byly použity dva druhy glykopeptidových antibiotik, jmenovitě vankomycin (Chirobiotic V) a teikoplanin (Chirobiotic T). Tato glykopeptidová makrocyclická antibiotika jsou jedny z nejúčinnějších chirálních selektorů a v posledním desetiletí nabývá na významu jejich použití při analýze enantiomerů neutrálních látek, amidů kyselin, esterů i aminů. Při separaci chirálních látek na vankomycinové a teikoplaninové koloně se uplatňuje více typů interakcí mezi analytem a chirální stacionární fází. Toto vyplývá z chemické struktury makrocyclických glykopeptidů - přítomnost kavit, polárních skupin, velkého množství chirálních center i krátké rovětvené uhlovodíkové řetězce umožňuje vznik silných polárních, vodíkových i slabých hydrofóbních interakcí mezi analytem a stacionární fází. Vliv má i tvorba inkluzí, která není tak silná jako v případě cyklodextrinů, svoji roli hrají i sterická stínění.

Tato práce se zaměřila na enantioseparaci látek ze skupiny β -blokátorů (látek s chirálním centrem a aminovou skupinou). Byl prostudován vliv jednotlivých experimentálních parametrů na enantioseparaci. Pozornost byla věnována zejména volbě použitého chromatografického módu (reverzní nebo polárně iontový) a s ním spojenou optimalizací dalších parametrů. V případě reverzního módu se jednalo především o volbu vhodného organického rozpouštědla plus koncentraci, pH vodné fáze mobilní směsi, teplotu a průtokovou rychlost. V dalším použitém módu se jednalo v první řadě o volbu organického rozpouštědla a přídavku vhodné kyseliny a baze, jejich koncentraci a poměr s následnou optimalizací dalších parametrů zmíněných výše.

Atenolol byl vybrán jako výchozí β -blokátor, jelikož v rámci doporučených výchozích podmínek (složení mobilní fáze doporučené výrobcem) na daném sorbentu, vykazoval z vybraných β -blokátorů nejmenší rozlišení a eluoval se z kolony v nejdelším retenčním čase. Pindolol i propranolol měli při daných podmínkách lepší chromatografické parametry (viz tab. 4-8).

Tab 4: Chromatografické parametry β -blokátorů (polárně-iontový mód; CHIROBIOTIC V)

Mobilní fáze	Atenolol					Pindolol					Propranolol					pozn
	t_r	k	A_S	R_S	α	t_r	k	A_S	R_S	α	t_r	k	A_S	R_S	α	
methanol : kys. octová : triethylamin 100 : 0,01 : 0,01	15,61	8,72	-	1,21	1,08	11,05	5,88	0,75	1,39	1,09	11,88	6,36	0,87	1,84	1,11	
	16,75	9,42	-	-	-	11,86	6,38	0,78	-	-	12,98	7,04	0,99	-	-	
methanol : kys. octová : triethylamin 100 : 0,02 : 0,02	11,30	6,23	-	1,35	1,09	7,69	3,76	1,01	1,52	1,09	8,23	3,97	1,04	1,64	1,11	
	12,17	6,79	-	-	-	8,23	4,10	0,99	-	-	8,95	4,41	1,20	-	-	
methanol : kys. octová : triethylamin 100 : 0,02 : 0,01	10,89	5,76	-	1,05	1,07	7,55	3,69	-	1,20	1,09	8,12	3,90	0,79	1,55	1,11	
	11,53	6,16	-	-	-	8,09	4,03	-	-	-	8,83	4,33	0,86	-	-	
methanol : kys. octová : triethylamin 100 : 0,01 : 0,02	14,52	7,99	-	1,33	1,10	10,28	5,37	0,90	1,53	1,08	10,42	5,25	1,09	1,92	1,11	
	15,83	8,80	-	-	-	10,99	5,81	0,99	-	-	11,38	5,82	1,25	-	-	

(t_r -retenční čas; k -kapacitní faktor; A_S -faktor symetrie píku; R_S -rozlišení; α -separační faktor)

Tab 5: Chromatografické parametry β -blokátorů (reverzní mód; CHIROBIOTIC V)

Mobilní fáze	Atenolol				Pindolol				Propranolol				poz n		
	t_r	k	A_S	R_S	α	t_r	k	A_S	R_S	α	t_r	k		A_S	R_S
tetrahydrofuran : 20 mM octan amonný pH=4 20 : 80	nedošlo k separaci enantiomerů														
methanol : 20 mM octan amonný pH=4 20 : 80	13,86	3,284	-	-	1,04	14,31	3,423	-	-	1,04	21,65	5,43	-	-	1,05
methanol : 20 mM octan amonný pH=4,5 15 : 85	22,55	5,70	-	-	1,05										
methanol : 20 mM octan amonný pH=5 15 : 85	nedošlo k separaci enantiomerů														
acetonitril : 20 mM octan amonný pH =4,5 15/85	12,76	2,97	-	-	1,03	13,04	3,06	-	-	1,03					
	nedošlo k separaci enantiomerů														

(t_r -retenční čas; k -kapacitní faktor; A_S -faktor symetrie píku; R_S -rozišení; α -separační faktor)

Tab 6: Chromatografické parametry β -blokátorů (polárně-iontový mód; CHIROBIOTIC T)

	Atenolol					Pindolol					Propranolol					pozn
Mobilní fáze	t_r	k	A_S	R_S	α	t_r	k	A_S	R_S	α	t_r	k	A_S	R_S	α	
methanol : kys. octová : triethylamin 100 : 0,01 : 0,01	42,92 46,88	25,48 27,92	2,43 3,03	1,78	1,10	27,06 29,47	15,78 17,27	0,94 1,17	2,13	1,09	26,42 29,08	14,86 16,45	1,13 1,32	2,42	1,11	
methanol : kys. octová : triethylamin 100 : 0,02 : 0,02	30,39 33,71	17,56 19,59	2,18 2,62	1,89	1,12	15,89 17,77	8,73 9,88	1,55 1,17	1,54	1,13	17,56 19,95	9,33 10,74	1,178 1,058	2,49	1,15	20°C
methanol : kys. octová : triethylamin 100 : 0,02 : 0,02	29,78 32,54	17,53 19,25	2,30 2,74	1,67	1,10	16,48 18,26	9,18 10,27	1,75 1,21	1,34	1,12	17,99 20,35	9,72 11,13	1,08 0,89	2,18	1,14	30°C
methanol : kys. octová : triethylamin 100 : 0,02 : 0,02	29,37 31,83	16,41 17,87	2,21 2,55	1,65	1,09	17,06 19,07	9,64 10,90	0,94 0,71	1,73	1,13	18,69 20,44	10,28 11,34	0,75 0,91	1,97	1,10	40°C
methanol : kys. octová : triethylamin 100 : 0,02 : 0,01	34,71 37,79	20,42 22,31	2,21 2,74	1,73	1,10	19,48 21,13	11,10 12,12	0,84 0,93	2,07	1,10	21,00 23,14	11,59 12,87	0,95 1,08	2,52	1,11	

(t_r -retenční čas; k -kapacitní faktor; A_S -faktor symetrie píku; R_S -rozdílení; α -separační faktor)

Tab 7: Chromatografické parametry β -blokátorů (polárně-iontový mód; CHIROBIOTIC T)

	Atenolol					Pindolol					Propranolol					pozn
Mobilní fáze	t_r	k	A_S	R_S	α	t_r	k	A_S	R_S	α	t_r	k	A_S	R_S	α	
methanol : kys. octová : triethylamin 100 : 0,05 : 0,05	15,38 16,88	8,38 9,29	2,18 2,28	1,51	1,11	8,77 9,62	4,33 4,85	0,78 0,97	1,48	1,12	9,47 10,46	4,76 5,36	0,92 1,12	2,05	1,13	20°C
methanol : kys. octová : triethylamin 100 : 0,05 : 0,05	14,75 16,03	7,65 8,41	2,20 -	1,429	1,10	8,52 9,24	4,23 4,67	0,82 0,93	1,57	1,10	9,58 10,48	4,74 5,28	0,78 0,95	1,74	1,11	30°C
methanol : kys. octová : triethylamin 100 : 0,05 : 0,05	15,17 16,38	8,00 8,72	1,92 4,08	1,51	1,10	9,28 9,97	4,75 5,18	0,84 0,93	1,684	1,09	9,77 10,63	5,07 5,60	0,92 1,01	20,5	1,10	40°C
methanol : kys. octová : triethylamin 100 : 0,1 : 0,1	9,32 10,11	4,92 5,42	1,52 -	1,493	1,10	5,62 6,06	2,45 2,72	0,86 0,97	1,36	1,11	5,94 6,45	2,68 2,99	0,89 1,01	1,43	1,12	
methanol : acetonitril : kys. octová : triethylamin 90:10:0,01:0,01	-	-	-	-	-	30,77 33,38	18,29 19,93	1,11 1,33	1,98	1,09	32,68 36,37	18,98 21,23	1,12 0,99	2,89	1,12	

(t_r -retenční čas; k -kapacitní faktor; A_S -faktor symetrie píku; R_S -rozlišení; α -separační faktor)

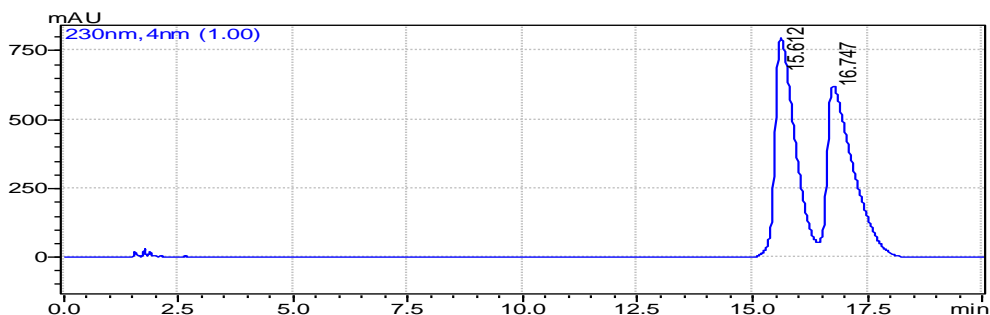
Tab 8: Chromatografické parametry β -blokátorů (reverzní mód; CHIROBIOTIC T)

	Atenolol					Pindolol					Propranolol					pozn
	t_r	k	A_S	R_S	α	t_r	k	A_S	R_S	α	t_r	k	A_S	R_S	α	
Mobilní fáze																
methanol : 20mM octan amonný pH=4 20 : 80	nedošlo k separaci enantiomerů															
methanol : 20mM octan amonný pH=4,5 20 : 80	nedošlo k separaci enantiomerů															

(t_r -retenční čas; k -kapacitní faktor; A_S -faktor symetrie píku; R_S -rozdílení; α -separační faktor)

4.1 Chirální separace β -blokátorů v polárně iontovém módu při použití CHIROBIOTIC V

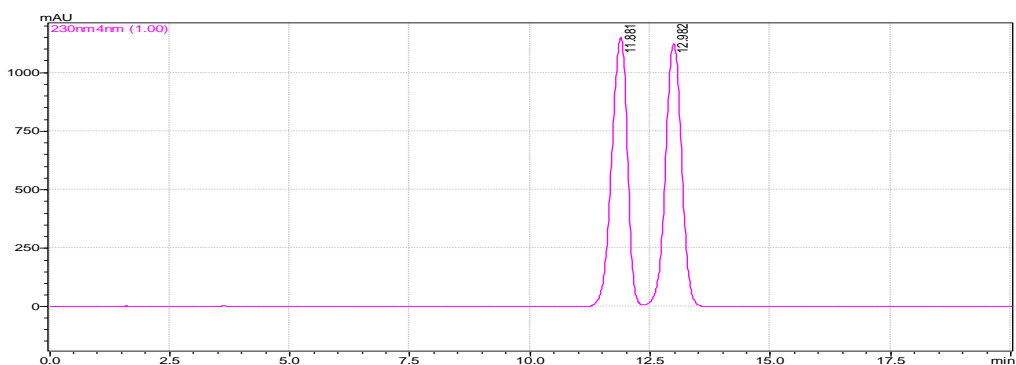
Jako výchozí složení mobilní fáze byla zvolena směs methanol/kys. octová/triethylamin 100/0,01/0,01 (viz chromatogram 1).



Chromatogram 1: Enantioseparace atenololu

SF: CHIROBIOTIC V; MF: methanol/kys.octová/triethylamin 100/0,01/0,01; 2,0 ml/min; UV 230 nm; 30°C.

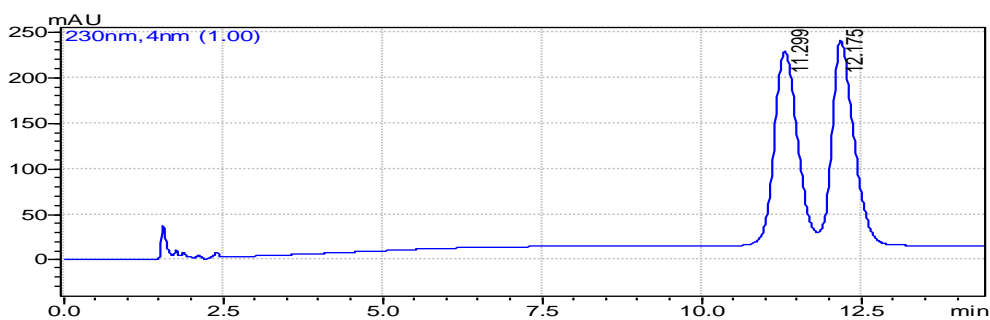
Při těchto podmínkách parametr rozlišení atenololu byl nižší než 1,50 ($R_S=1,20$). Rozlišení mezi jednotlivými enantiomery vyšší než 1,5 bylo zjištěno pouze u propranololu ($R_S=1,84$) (viz chromatogram 2).



Chromatogram 2: Enantioseparace propranololu

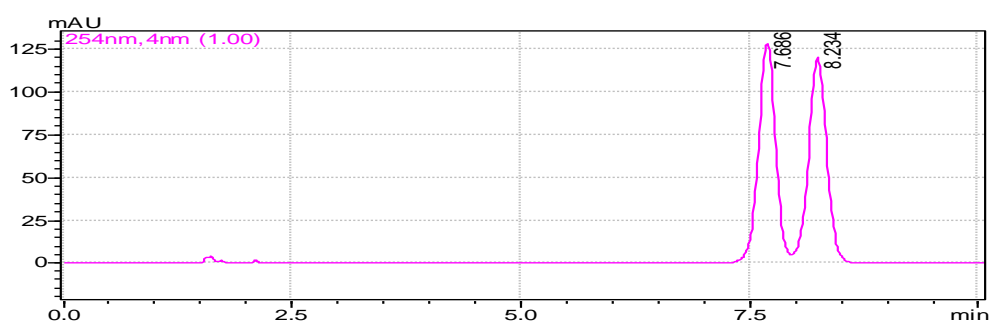
SF: CHIROBIOTIC V; MF: methanol/kys.octová/triethylamin 100/0,01/0,01; 2,0 ml/min; UV 230 nm; 30°C.

Na základě viz výše uvedených výsledků se v dalším kroku zvolila dvojnásobná koncentrace kys. octové i triethylaminu v mobilní fázi. Parametr rozlišení atenololu se mírně zvýšil ($R_S=1,35$). K výraznému zlepšení separace izomerů došlo u pindololu ($R_S=1,52$) i propranololu ($R_S=1,64$) (viz chromatogramy 3-5).



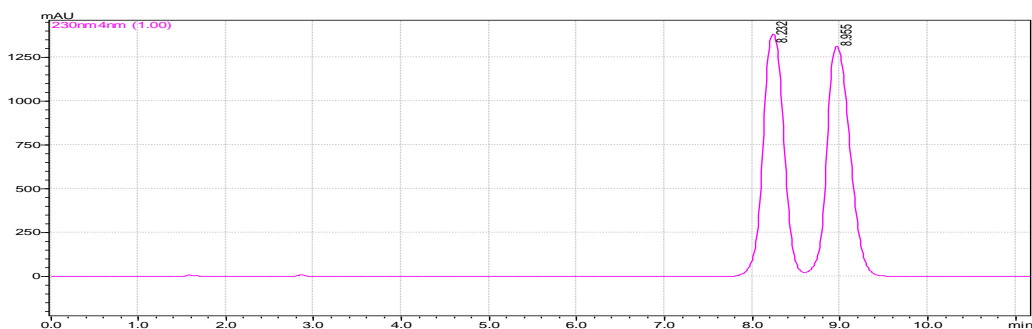
Chromatogram 3: Enantioseparace atenololu

SF: CHIROBIOTIC V; MF: methanol:kys. octová : triethylamin 100:0,02:0,02; 2 ml/min; UV 230 nm; 30°C



Chromatogram 4: Enantioseparace pindololu

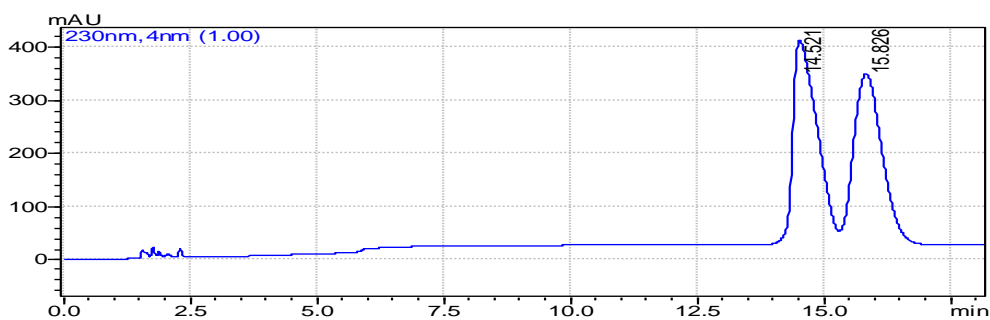
SF: CHIROBIOTIC V; MF: methanol:kys. octová : triethylamin 100:0,02:0,02; 2 ml/min; UV 254 nm; 30°C.



Chromatogram 5: Enantioseparace propranololu

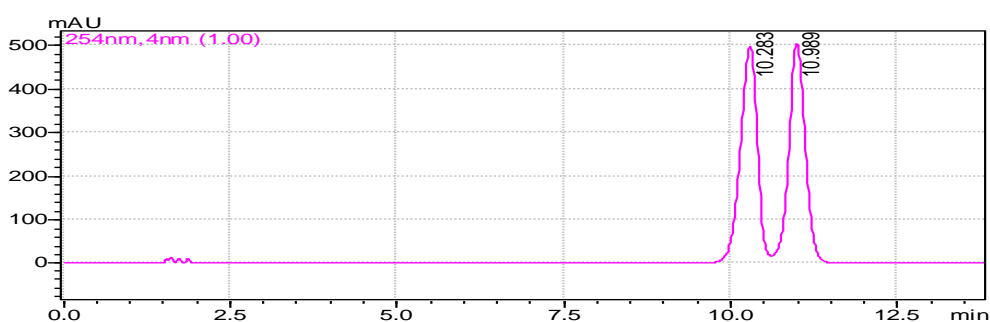
SF: CHIROBIOTIC V; MF: methanol:kys. octová : triethylamin 100:0,02:0,02; 2 ml/min; UV 230 nm; 30°C

Dále byl optimalizován parametr - poměr kyselina/baze k zjištění významnosti tohoto parametru z důvodu dalšího zlepšení enantioseparace. Nejdříve byla použita MF methanol/kys. octová/triethylamin 100/0,02/0,01 a poté byl poměr kyselina/baze obrácen. K lepší enantioseparaci atenololu došlo při větší koncentraci zásady, ale rozlišení vyšší než 1,5 ($R_S = 1,33$) nebylo dosaženo. I rozlišení dalších látek, pindololu ($R_S = 1,53$) a propranololu ($R_S = 1,92$), bylo vyšší při vyšší koncentraci zásady (viz chromatogramy 6-8).



Chromatogram 6: Enantioseparace atenololu

SF: CHIROBIOTIC V; MF: methanol : kys. octová : triethylamin 100:0,01:0,02; 2 ml/min; UV 230 nm; 30°C



Chromatogram 7: Enantioseparace pindololu

SF: CHIROBIOTIC V; MF: methanol : kys. octová : triethylamin 100:0,01:0,02; 2 ml/min; UV 254 nm; 30°C



Chromatogram 8: Enantioseparace propranololu

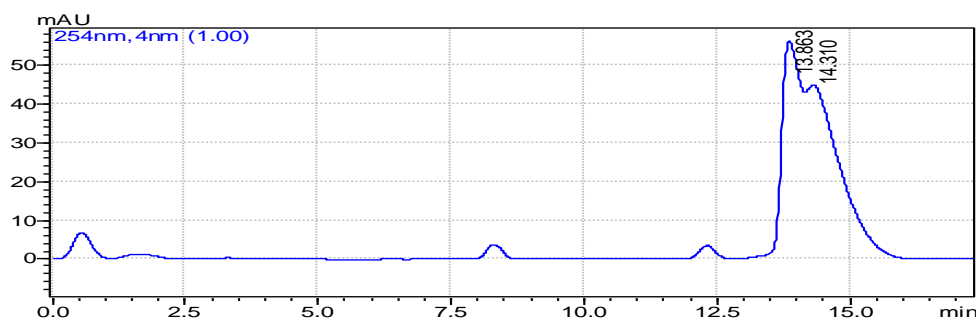
SF: CHIROBIOTIC V; MF: methanol : kys. octová : triethylamin 100:0,01:0,02; 2 ml/min; UV 230 nm; 30°C

β -blokátory obsahují ve své molekule sekundární alkoholickou skupinu na chirálním centru a sekundární aminoskupinu, která je od chirálního centra vzdálenější. Na základě výše uvedených výsledků dochází na vankomycinové koloně k lepší separaci β -blokátorů při zvyšující se koncentraci baze.

4.2 Chirální separace β -blokátorů v reverzním módu při použití CHIROBIOTIC V

Jako výchozí složení mobilní fáze byla zvolena směs tetrahydrofuran/20 mM octan amonný o pH 4,0 v poměru 20/80 na základě uvedených v teoretické části, kdy při optimalizaci MF v prvním kroku je výběr vhodného rozpouštědla.

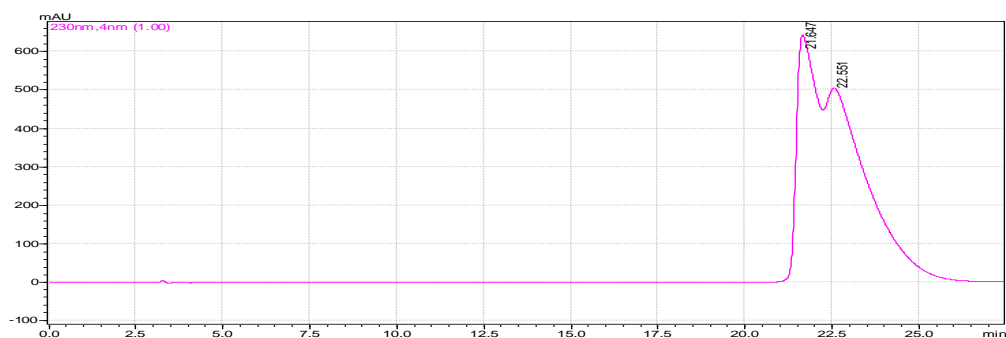
Tetrahydrofuran byl zvolen na základě doporučení dané výrobcem (v eluotrické řadě rozpouštědel běžně používaných v reverzní chromatografii má největší eluční sílu vzhledem k snižující se polaritě). Při této mobilní fázi nedošlo k separaci atenololu, pindololu ani propranololu a retenční časy byly pro atenolol $t_R=4,28$ min, pindolol $t_R=5,73$ min a propranolol $t_R=8,02$ min. Proto v dalším kroku byl použit methanol, jako více polární organické rozpouštědlo (MF tedy byla methanol/20 mM octan amonný pH=4,0). Při této MF nedošlo u atenololu ani pindololu k separaci izomerů. U propranololu bylo možné pozorovat náznak separace (viz chromatogram 9).



Chromatogram 9: Enantioseparace propranololu

SF: CHIROBIOTIC V; MF: methanol/20 mM octan amonný pH 4,0 20/80; 1 ml/min; UV 230 nm; 30°C

V dalším kroku byl zvyšován parametr pH (na pH 4,5). Pro zvýšení retence byl změněn i poměr organické složky k polární složce (methanol/20 mM octan amonný pH=4,5 15/85), protože vyšší koncentrace organické látky má za následek nižší retenci, a tím i separaci. Při této MF také nedošlo k separaci izomerů atenololu a pindololu. U propranololu byl pouze náznak separace ($R_S=0,34$) (viz chromatogram 10).

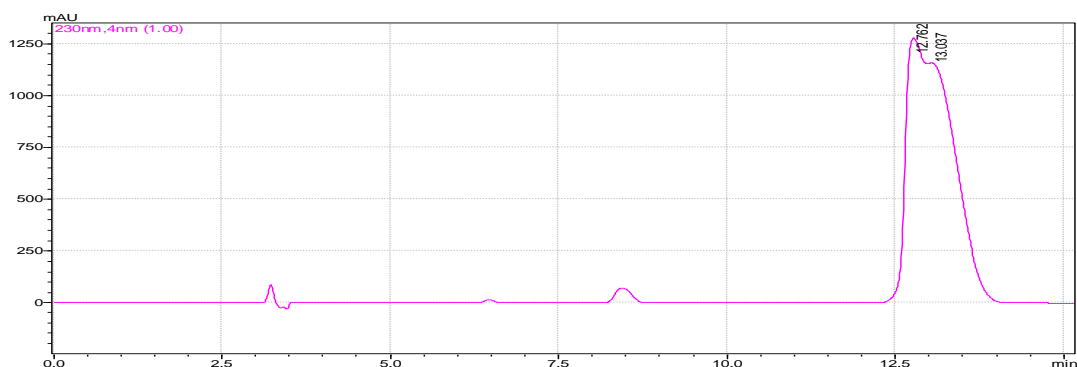


Chromatogram 10: Enantioseparace propranololu

SF: CHIROBIOTIC V; MF: methanol/20 mM octan amonný pH 4,5 15/85; 1 ml/min; UV 230 nm; 30°C

Dále byl měněn parametr pH na pH=5, poměr methanol/pufr zůstal 15/85. Při této MF nedošlo k enantioseparaci ani u jednoho β -blokátoru.

Byla vyzkoušena i další změna v selektivitě použitím acetonitrilu v MF o složení acetonitril/20 mM octan amonný pH=4,5. Při této mobilní fázi nedošlo k separaci enantiomerů atenololu, propranololu a pindololu a retenční časy byly 6,51 min., 13. min resp. 8,15 min.(viz chromatogram 11).



Chromatogram 11: Enantioseparace propranololu

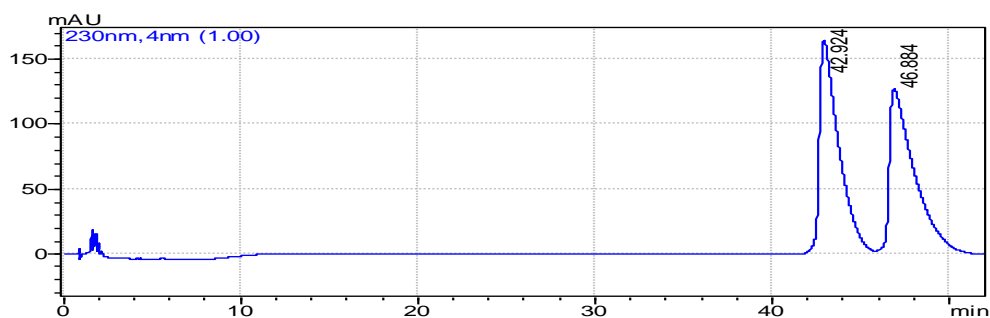
SF: CHIROBIOTIC V; MF: acetonitril/20 mM octan amonný pH 4,5 15/85; 1 ml/min; UV 230 nm; 30°C

Na základě výše uvedených výsledků bylo od dalších experimentů na daném sorbentu při použití módu upuštěno.

4.3 Chirální separace β -blokátorů v polárně-iontovém módu při použití CHIROBIOTIC T

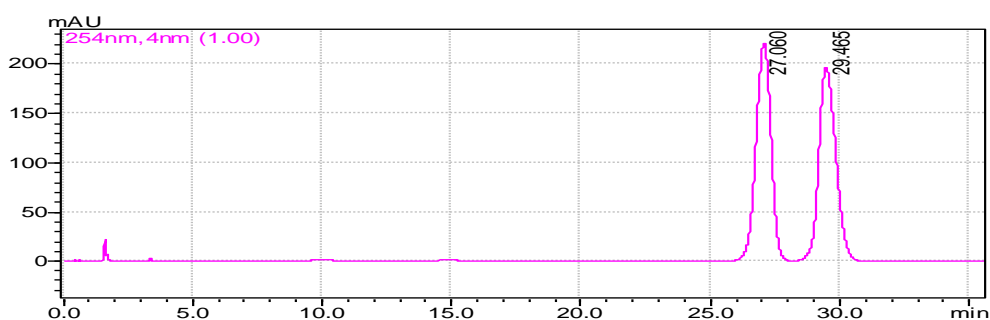
Výchozí podmínky byly zvoleny stejné jako při použití CHIROBIOTIC V. Výchozí složení MF bylo methanol/kys. octová/triethylamin 100/0,01/0,01. Při těchto podmínkách parametr rozlišení atenololu byl $R_S=1,78$. Ale retenční čas daných

enantiomerů byl až 42., resp. 47. min., což je pro analytickou analýzu velmi nevhodné vzhledem k ekonomice provozu. Rozlišení pindololu ($R_S=2,13$) a propranololu ($R_S=2,42$) bylo vyšší než 1,5, ale analýza u obou β -blokátorů trvala 30 minut (viz chromatogram 12-14).



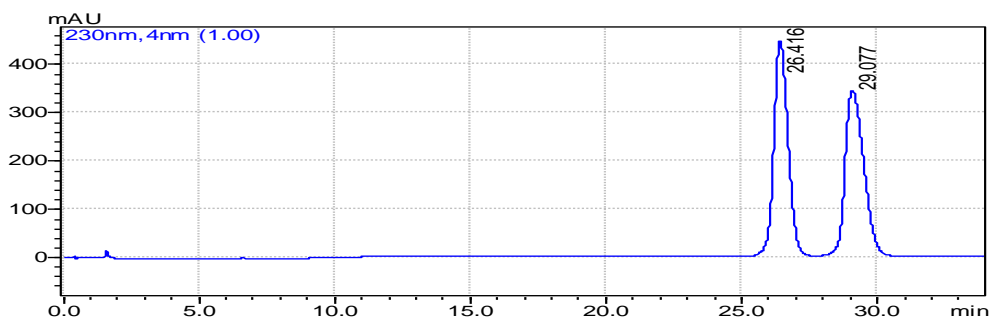
Chromatogram 12: Enantioseparace atenololu

SF: CHIROBIOTIC T; MF: methanol/kys. octová/triethylamin 100/0,01/0,01; 2 ml/min; UV 230 nm; 30°C



Chromatogram 13: Enantioseparace pindololu

SF: CHIROBIOTIC T; MF: methanol/kys. octová/triethylamin 100/0,01/0,01; 2 ml/min; UV 254 nm; 30°C

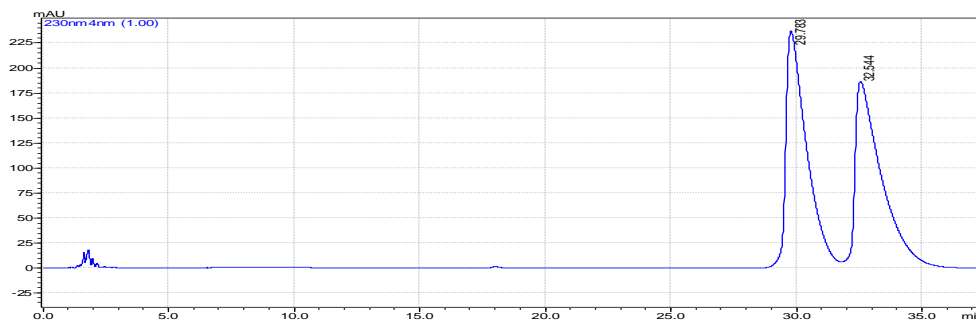


Chromatogram 14: Enantioseparace propranololu

SF: CHIROBIOTIC T; MF: methanol/kys. octová/triethylamin 100/0,01/0,01; 2 ml/min; UV 230 nm; 30°C

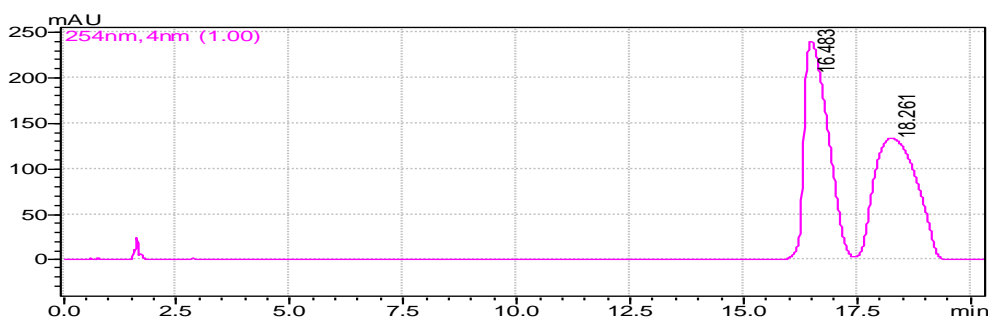
Dále byl proto optimalizován parametr - koncentrace kyseliny/báze - pro urychlení analýzy při zachování rozlišení nad 1,5. Poměr methanol/kyselina/báze byl

nejprve zvýšen na 100/0,02/0,02, v dalším kroku na 100/0,05/0,05 a nakonec na 100/0,1/0,1. Při použití MF methanol/kyselina/baze 0,02/0,02 /100,0 se doba analýzy separace atenololu se zkrátila na 32 minut a rozlišení bylo nad 1,5 ($R_S=1,67$). Doby analýzy pindololu a propranololu se zkrátily v průměru o 10 minut, ale rozlišení pindololu bylo nižší než 1,5 ($R_S= 1,34$). Rozlišení propranololu bylo $R_S=2,18$ (viz chromatogramy 15-17).



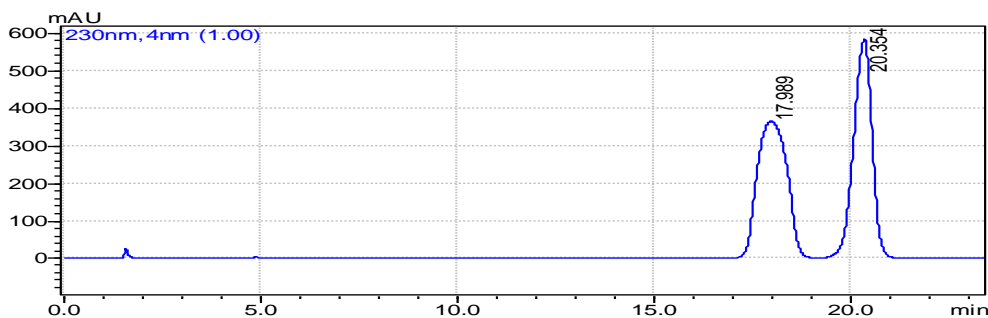
Chromatogram 15: Enantioseparace atenololu

SF: CHIROBIOTIC T; MF: methanol/kys. octová/triethylamin 100/0,02/0,02; 2 ml/min; UV 230 nm; 30°C



Chromatogram 16 : Enantioseparace pindololu

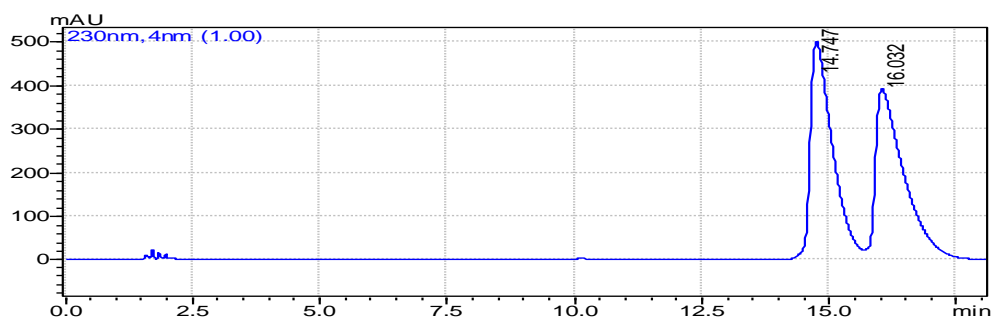
SF: CHIROBIOTIC T; MF: methanol/kys. octová/triethylamin 100/0,02/0,02; 2 ml/min; UV 254 nm; 30°C



Chromatogram 17: Enantioseparace propranololu

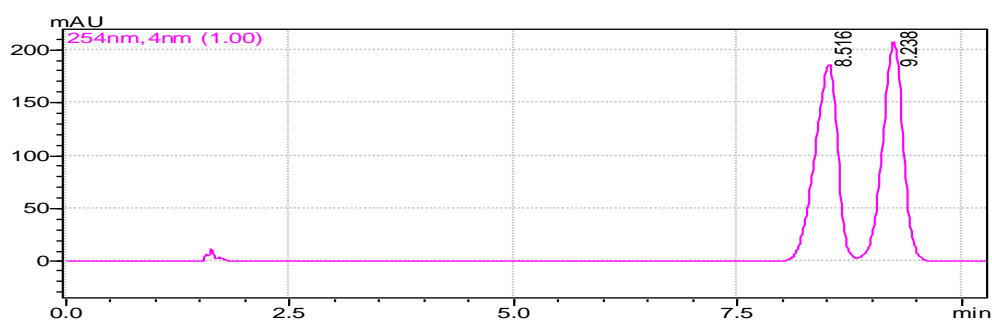
SF: CHIROBIOTIC T; MF: methanol/kys. octová/triethylamin 100/0,02/0,02; 2 ml/min; UV 230 nm; 30°C

Při použití MF methanol/kys./baze 100/0,05/0,05 rozlišení atenololu bylo $R_S=1,43$ a retenční časy izomerů byly 14,75 min. a 16,03 min. Rozlišení pindololu bylo $R_S=1,57$, rozlišení propranololu bylo $R_S=1,74$ a analýzy trvaly do 10 minut (viz chromatogramy 18-20).



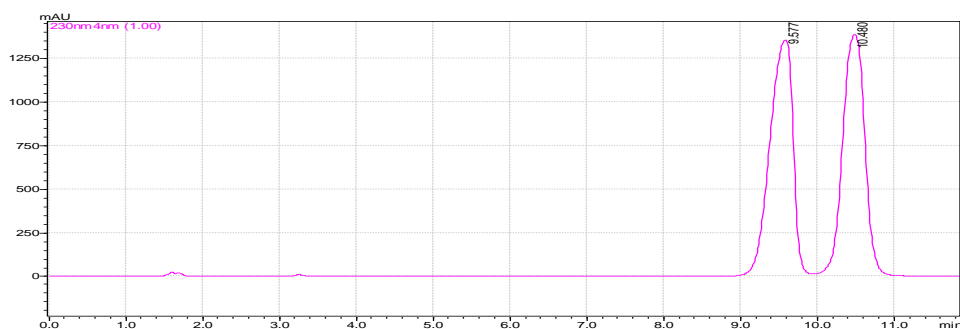
Chromatogram 18: Enantioseparace atenololu

SF: CHIROBIOTIC T; MF: methanol/kys. octová/triethylamin 100/0,05/0,05; 2 ml/min; UV 230 nm; 30°C



Chromatogram 19: Enantioseparace pindololu

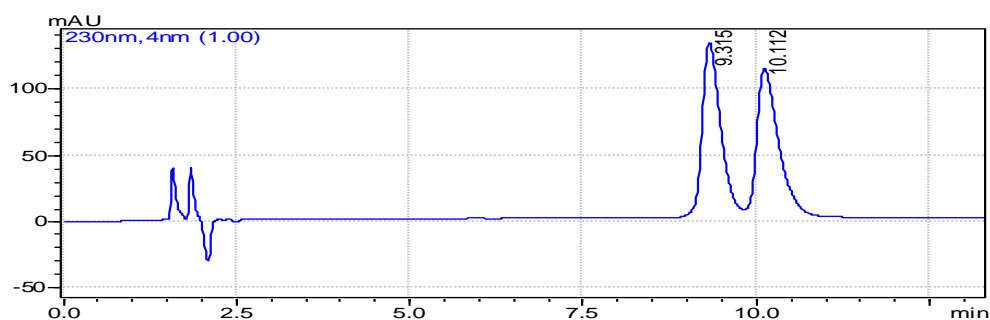
SF: CHIROBIOTIC T; MF: methanol/kys. octová/triethylamin 100/0,05/0,05; 2 ml/min; UV 254 nm; 30°C



Chromatogram 20: Enantioseparace propranololu

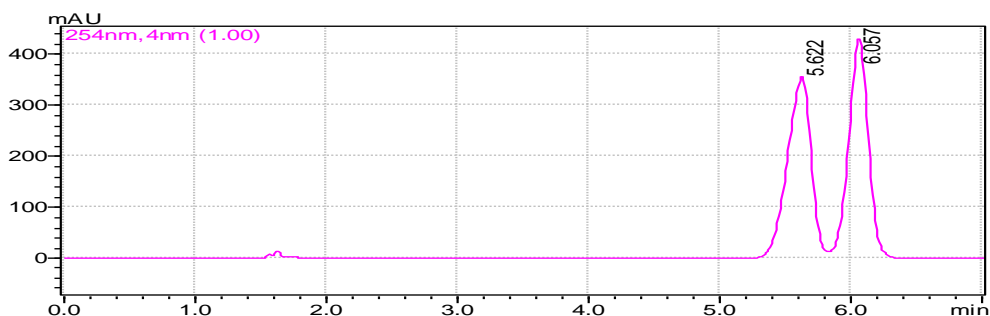
SF: CHIROBIOTIC T; MF: methanol/kys. octová/triethylamin 100/0,05/0,05; 2 ml/min; UV 230 nm; 30°C

Při dalším zvýšení koncentrace kyseliny/baze na poměr 100/0,1/0,1 došlo ke snížení rozlišení pod 1,5 u atenololu ($R_S=1,49$), pindololu ($R_S=1,36$) i propranololu ($R_S=1,43$). Retenční časy se zkrátily u atenololu na 9,32 resp. 10,11 min., u pindololu na 5,62 resp. 6,06 min. a u propranololu na 5,94 resp. 6,45 min. (viz chromatogramy 21-23).



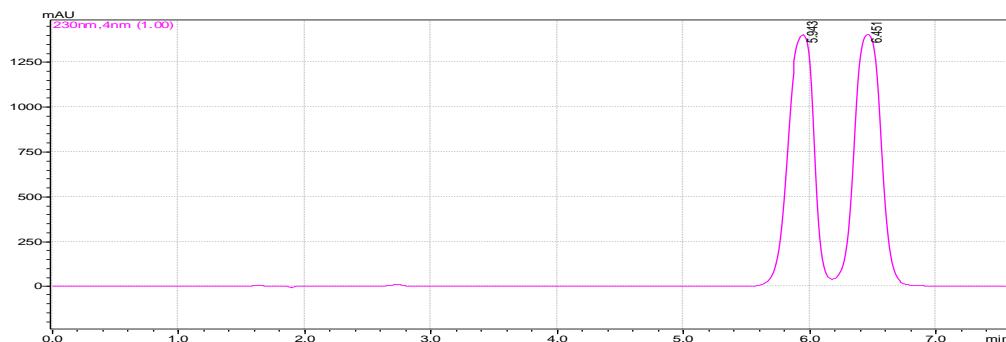
Chromatogram 21: Enantioseparace atenololu

SF: CHIROBIOTIC T; MF: methanol/kys. octová/triethylamin 100/0,1/0,1; 2 ml/min; UV 230 nm; 30°C



Chromatogram 22: Enantioseparace pindololu

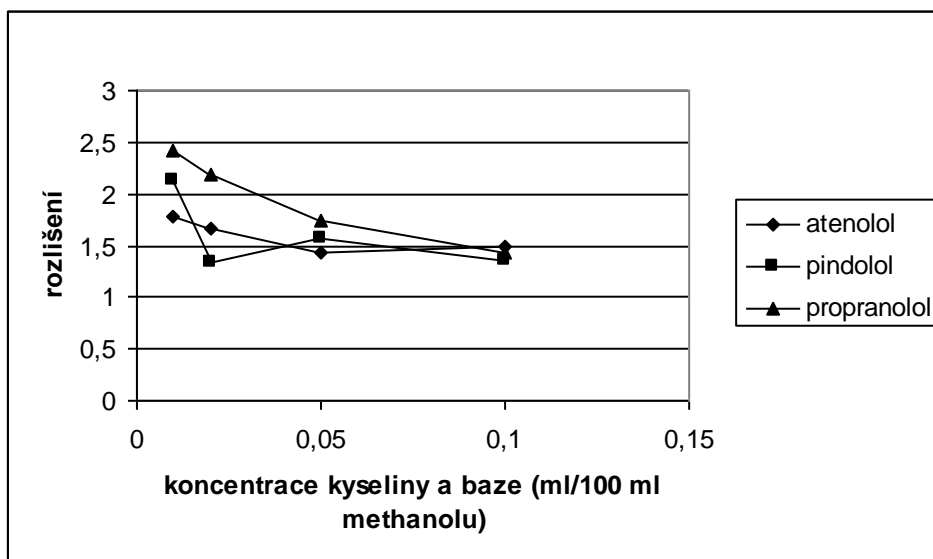
SF: CHIROBIOTIC T; MF: methanol/kys. octová/triethylamin 100/0,1/0,1; 2 ml/min; UV 254 nm; 30°C



Chromatogram 23: Enantioseparace propranololu

SF: CHIROBIOTIC T; MF: methanol/kys. octová/triethylamin 100/0,1/0,1; 2 ml/min; UV 230 nm; 30°C

Graficky je vliv koncentrace kyseliny/baze na parametr rozlišení znázorněn na obr. 8.

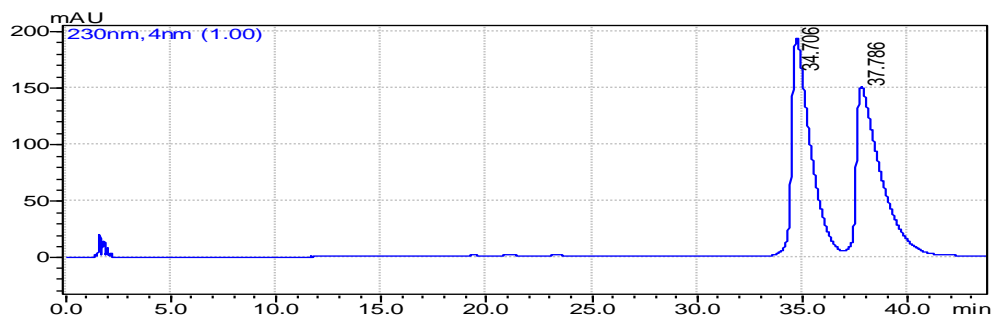


Obr. 8: Vliv koncentrace kyseliny/baze na rozlišení

SF: CHIROBIOTIC T; MF: methanol/kys. octová/triethylamin 100/x/x; 2,0ml/min; UV 230 nm (atenolol, propranolol) 254 nm (pindolol); 30°C

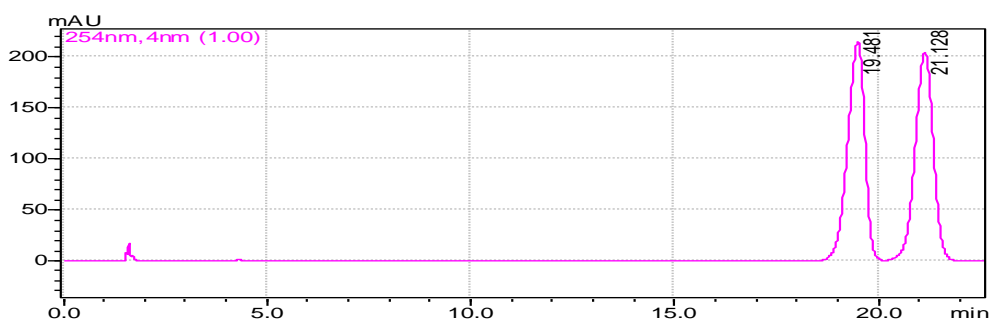
Z grafu je patrné, že rozlišení všech tří látek klesá se zvyšující se koncentrací kyseliny/baze. Pokles rozlišení je patrný i u atenololu. Tento jev je velmi dobře patrný především u propranololu v celém rozmezí změny koncentrace kys./baze, na rozdíl od atenolu. U pindololu došlo k výrazné změně především při nižších koncentracích. Zajímavý je výrazný pokles rozlišení pindololu při koncentraci kys./baze 0,02/0,02/100,0 ml methanolu, následné zvýšení a poté snižování tohoto parametru při zvyšování koncentrace kys./baze.

Také byla zkoušena mobilní fáze, ve které poměr kyseliny/baze není stejný. Použita byla MF methanol/kys. octová/triethylamin 100/0,02/0,01. Při této MF rozlišení atenololu bylo $R_S=1,73$, ale retenční časy enantiomerů byly 34,71 resp. 37,79 min. Rozlišení pindololu bylo $R_S=2,07$ a retenční časy enantiomerů byly 19,48 a 21,13 min a rozlišení propranololu bylo $R_S=2,52$ a retenční časy enantiomerů byly 21,00 a 23,16 min. (viz chromatogramy 24-26).



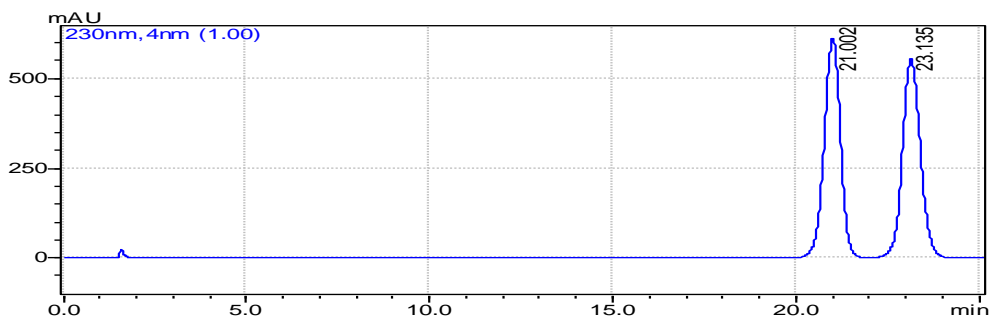
Chromatogram 24: Enantioseparace atenololu

SF: CHIROBIOTIC T; MF: methanol/kys. octová/triethylamin 100/0,02/0,01; 2ml/min; UV 230 nm; 30°C



Chromatogram 25: Enantioseparace pindololu

SF: CHIROBIOTIC T; MF: methanol/kys. octová/triethylamin 100/0,02/0,01; 2ml/min; UV 254 nm; 30°C

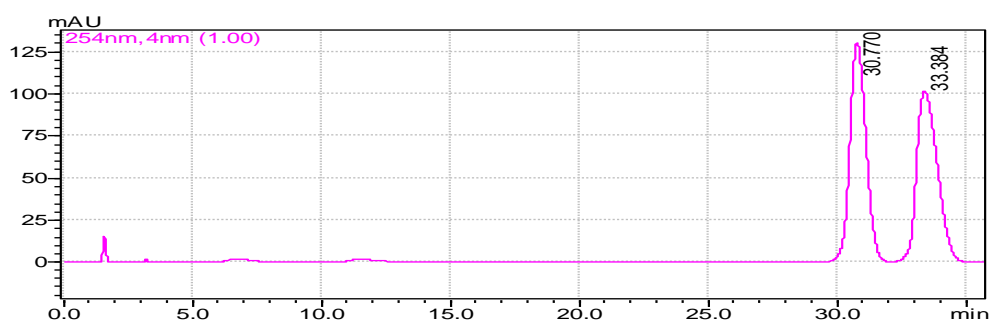


Chromatogram 26: Enantioseparace propranololu

SF: CHIROBIOTIC T; MF: methanol/kys. octová/triethylamin 100/0,02/0,01; 2ml/min; UV 230 nm; 30°C

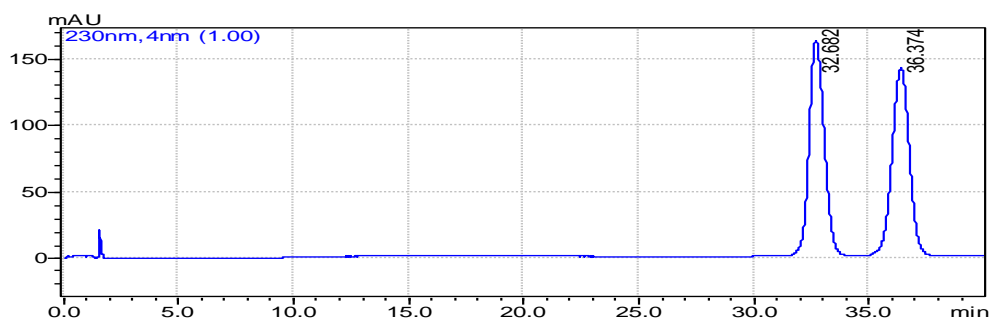
Byla zkoušena i mobilní fáze s přidavkem acetonitrilu. Použita byla směs methanol/acetonitril/kys. octová/triethylamin 90/10/0,01/0,01. Při této mobilní fázi byla zkoušena separace pindololu a propranololu. Separace atenololu zkoušena nebyla, protože u ostatních β -blokátorů docházelo k separaci po 30. min. a kapacitní faktory se pohybovaly v rozmezí od 18,93 do 21,23, což je neúměrné vzhledem k optimálnímu rozmezí kapacitního faktoru (2-10), a také proto, že atenolol se ze zkoušených β -blokátorů separoval nejhůře a kapacitní faktor by byl tedy ještě větší.

Rozlišení pindololu při této MF bylo $R_S=1,98$ a rozlišení propranololu bylo $R_S=2,89$ (viz chromatogramy 27 a 28).



Chromatogram 27: Separace pindololu

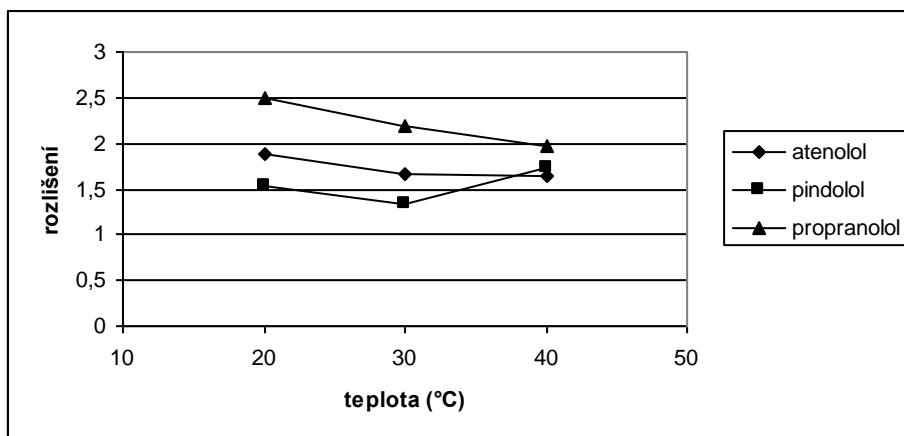
SF: CHIROBIOTIC T; MF: methanol/acetonitril/kys. octová/triethylamin 90/10/0,01/0,01; 2 ml/min; 30°C



Chromatogram 28: Separace propranololu

SF: CHIROBIOTIC T; MF: methanol/acetonitril/kys. octová/triethylamin 90/10/0,01/0,01; 2 ml/min; 30°C

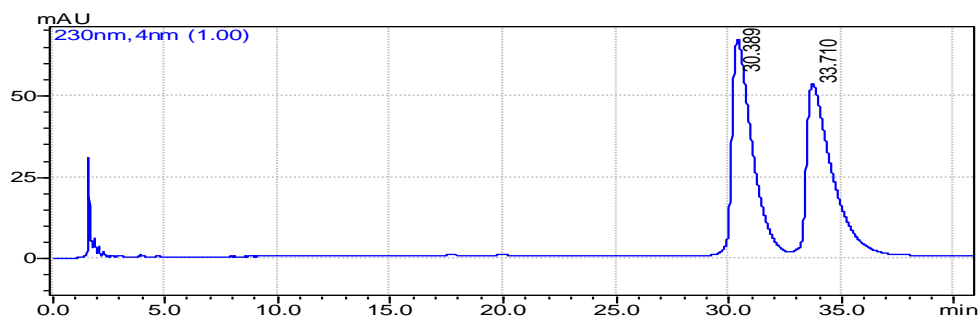
Dále byl ověřován vliv jiného významného parametru - teploty – pro další případnou optimalizaci separace u vybraných dvou mobilních fází. Separace enantiomerů atenololu, pindololu a propranololu byla měřena při použití MF methanol/kys. octová/triethylamin 100/0,02/0,02 při teplotách 20°C, 30°C, 40°C. Graficky je vliv teploty na rozlišení uveden na obr. 9.



Obr. 9: Vliv teploty na rozlišení

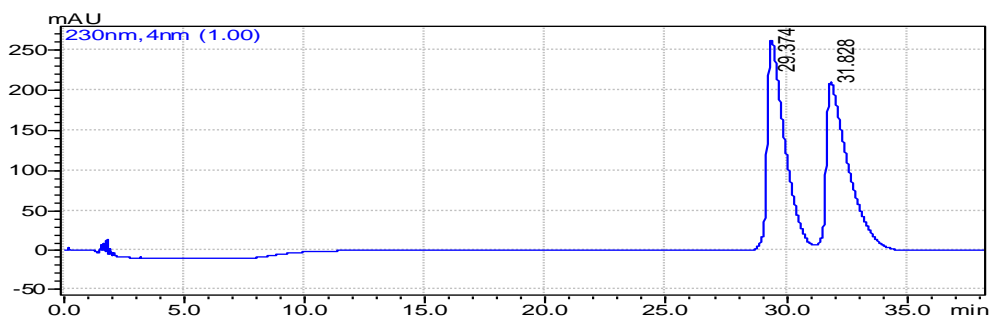
SF: CHIROBIOTIC T; MF: methanol/kys. octová/triethylamin 100/0,02/0,02; 2,0 ml/min; UV 230 nm (atenolol, propranolol), 254 nm (pindolol)

Rozlišení se zvyšující teplotou u atenololu klesá ($R_{S(20^{\circ}\text{C})}=1,89$; $R_{S(30^{\circ}\text{C})}=1,67$; $R_{S(40^{\circ}\text{C})}=1,65$) (viz chromatogramy 29, 15 a 30).



Chromatogram 29: Enantioseparace atenololu

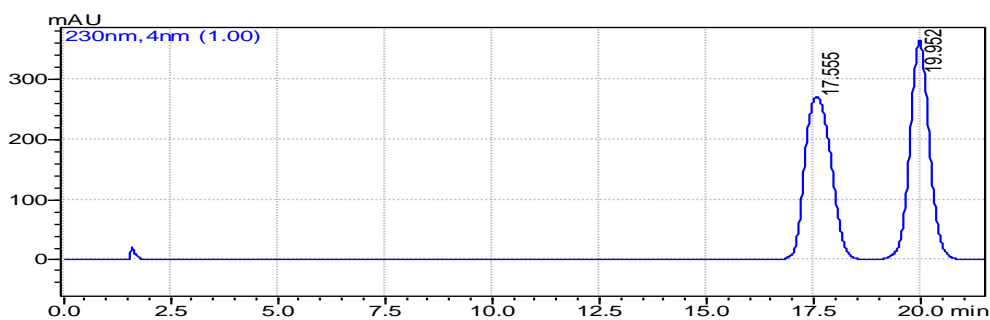
SF: CHIROBIOTIC T; MF: methanol/kys. octová/triethylamin 100/0,02/0,02; 2 ml/min; UV 230 nm; 20°C



Chromatogram 30: Enantioseparace atenololu

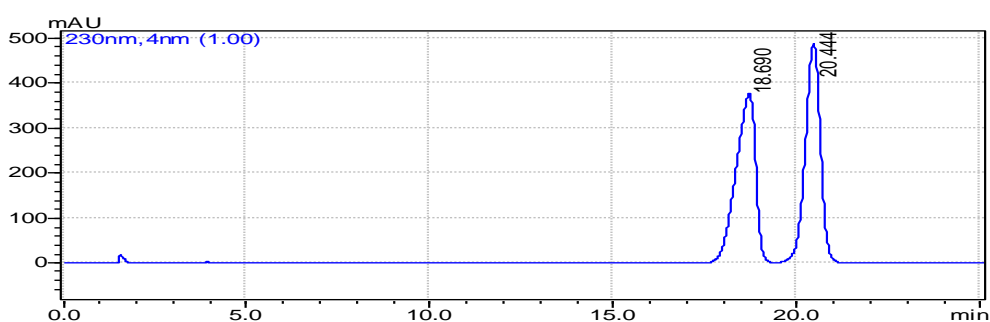
SF: CHIROBIOTIC T; MF: methanol/kys. octová/triethylamin 100/0,02/0,02; 2 ml/min; UV 230 nm; 40°C

Rozlišení klesá i u propranololu ($R_{S(20^{\circ}\text{C})}=2,49$; $R_{S(30^{\circ}\text{C})}=2,18$; $R_{S(40^{\circ}\text{C})}=1,97$) (viz chromatogramy 31, 17 a 27).



Chromatogram 31: Enantioseparace propranololu

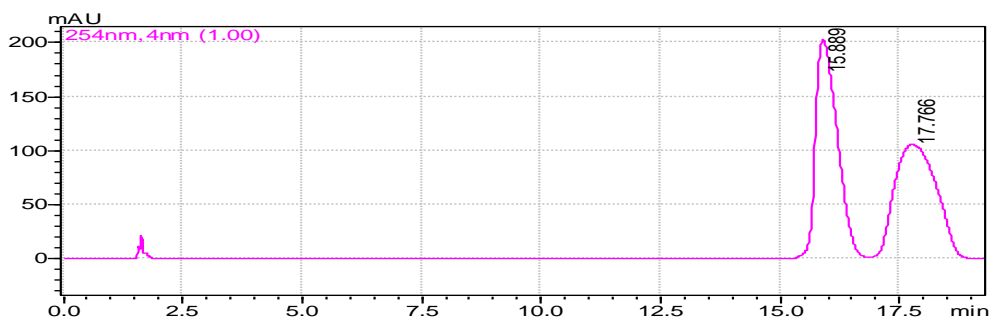
SF: CHIROBIOTIC T; MF: methanol/kys. octová/triethylamin 100/0,02/0,02; 2 ml/min; UV 230 nm; 20°C



Chromatogram 32: Enantioseparace propranololu

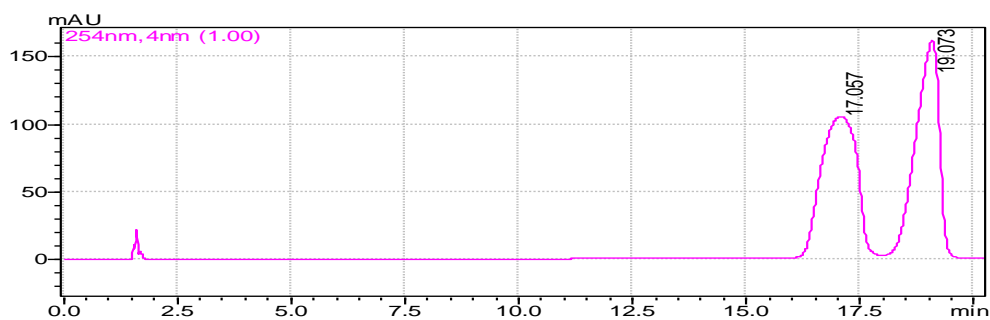
SF: CHIROBIOTIC T; MF: methanol/kys. octová/triethylamin 100/0,02/0,02; 2 ml/min; UV 230 nm; 40°C

K velmi zajímavé inverzi v rozlišení došlo u pindololu na rozdíl od ostatních dvou analytů, který má nejnižší rozlišení při 30°C ($R_{S(30^{\circ}\text{C})}=1,34$), při zvyšování teploty se parametr rozlišení opět zvyšuje ($R_{S(20^{\circ}\text{C})}=1,54$; $R_{S(40^{\circ}\text{C})}=1,73$) (viz chromatogramy 33, 16 a 34).



Chromatogram 33: Enantioseparace pindololu

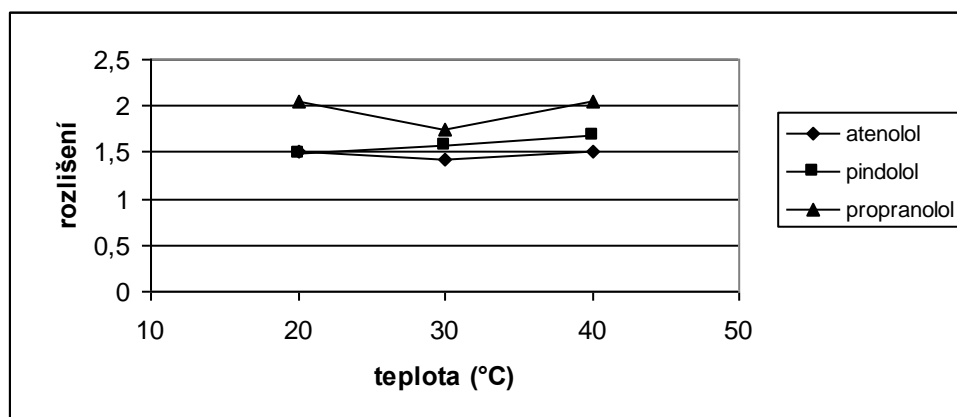
SF: CHIROBIOTIC T; MF: methanol/kys. octová/triethylamin 100/0,02/0,02; 2 ml/min; UV 254 nm; 20°C



Chromatogram 34: Enantioseparace pindololu

SF: CHIROBIOTIC T; MF: methanol/kys. octová/triethylamin 100/0,02/0,02; 2 ml/min; UV 254 nm; 40°C

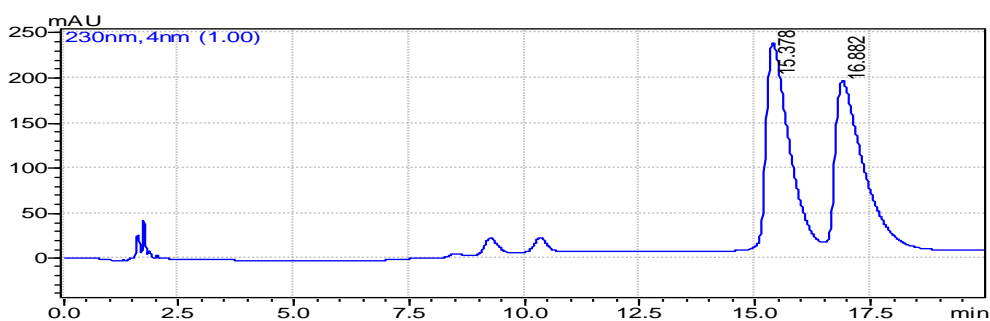
Při použití MF methanol/kys. octová/triethylamin 100/0,05/0,05 rozdíly v rozlišení při různých teplotách nebyly tak výrazné jako při použití MF s nižší koncentrací kys./baze. Graficky je vliv teploty na rozlišení znázorněn na obr. 10.



Obr. 10: Vliv teploty na rozlišení

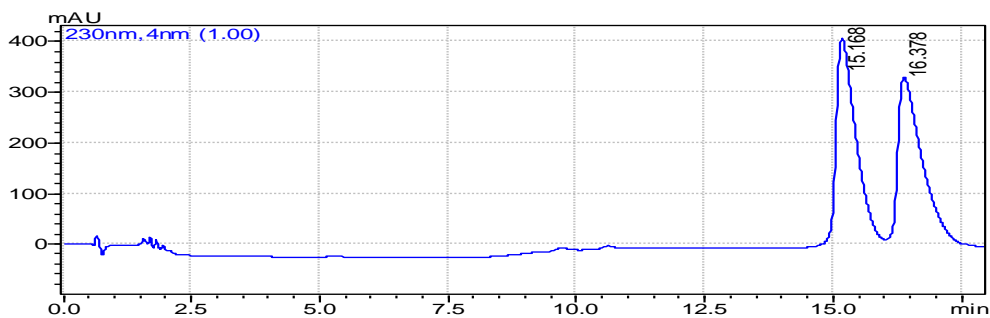
SF: CHIROBIOTIC T; MF: methanol/kys. octová/triethylamin 100/0,05/0,05; 2,0 ml/min; UV 230 nm (atenolol, propranolol), 254 nm (pindolol)

U atenololu rozlišení mírně klesá při 30°C ($R_S=1,43$), při teplotě 20°C a 40°C je stejné ($R_S=1,51$) (viz chromatogramy 35, 18 a 36).



Chromatogram 35: Enantioseparace atenololu

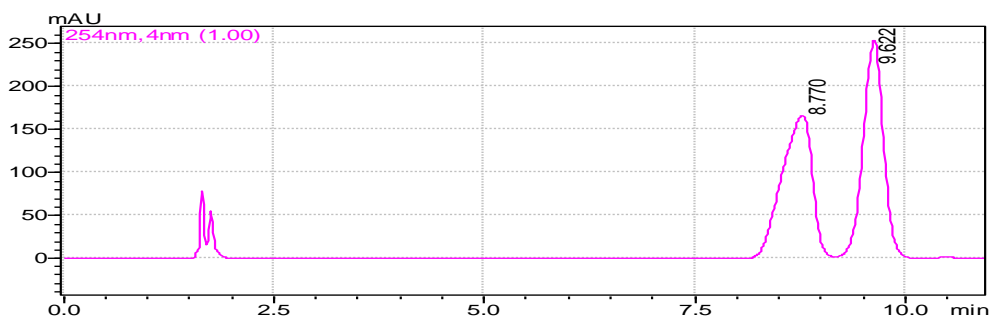
SF: CHIROBIOTIC T; MF: methanol/kys. octová/triethylamin 100/0,05/0,05; 2 ml/min; UV 230 nm; 20°C



Chromatogram 36: Enantioseparace atenololu

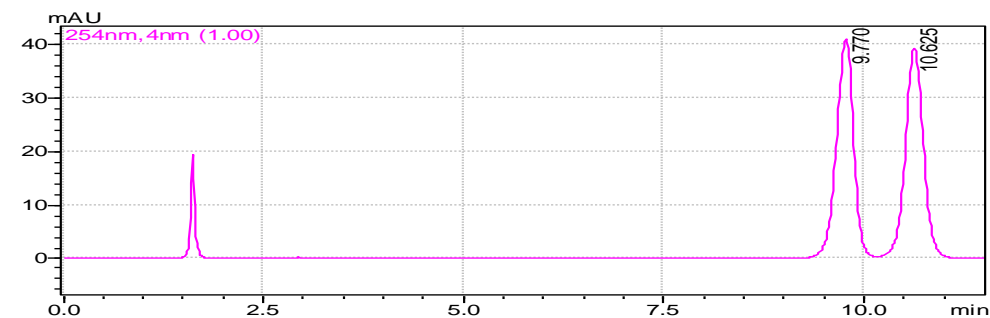
SF: CHIROBIOTIC T; MF: methanol/kys. octová/triethylamin 100/0,05/0,05; 2 ml/min; UV 230 nm; 40°C

Rozlišení pindololu se mírně zvyšuje se zvyšující se teplotou ($R_{S(20^{\circ}\text{C})}=1,48$; $R_{S(30^{\circ}\text{C})}=1,57$; $R_{S(40^{\circ}\text{C})}=1,68$) (viz chromatogramy 36, 19 a 37).



Chromatogram 36: Enantioseparace pindololu

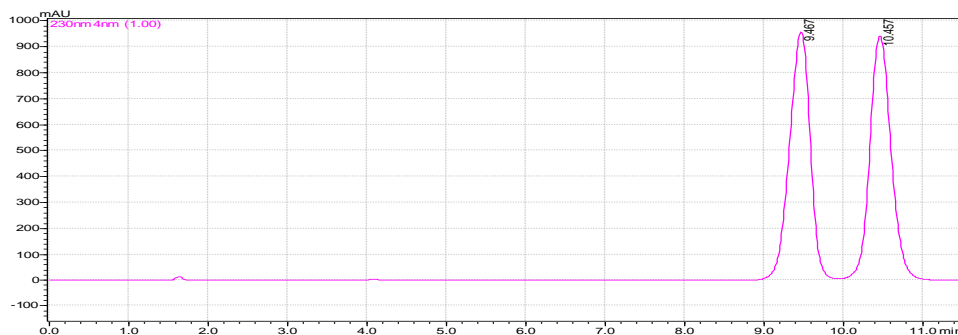
SF: CHIROBIOTIC T; MF: methanol/kys. octová/triethylamin 100/0,05/0,05; 2 ml/min; UV 254 nm; 20°C



Chromatogram 37: Enantioseparace pindololu

SF: CHIROBIOTIC T; MF: methanol/kys. octová/triethylamin 100/0,05/0,05; 2 ml/min; UV 254 nm; 40°C

Ohledně vlivu teploty na změnu rozlišení u propranolu dochází opět k postupnému snížení rozlišení s následnou inverzí ($R_{S(20^{\circ}\text{C})}=2,05$; $R_{S(30^{\circ}\text{C})}=1,74$; $R_{S(40^{\circ}\text{C})}=2,05$) (viz chromatogramy 38, 20 a 39).



Chromatogram 38: Enantioseparace propranololu

SF: CHIROBIOTIC T; MF: methanol/kys. octová/triethylamin 100/0,05/0,05; 2 ml/min; UV 230 nm; 20°C



Chromatogram 39: Enantioseparace propranololu

SF: CHIROBIOTIC T; MF: methanol/kys. octová/triethylamin 100/0,05/0,05; 2 ml/min; UV 230 nm; 40°C

4.4 Chirální separace β -blokátorů v reverzním módu při použití CHIROBIOTIC T

Na základě výsledků z měření kolonou CHIROBIOTIC V byla separace v reverzním módu zkoušena při dvou MF. Jako výchozí MF byla zvolena směs methanol/20 mM octan amonný pH=4,0 20/80. Při této mobilní fázi nedošlo k separaci atenololu, pindololu ani propranololu. Proto bylo zvýšeno pH na 4,5 při stejném poměru organické a vodné složky. Ani při této MF nedošlo k chirální separaci.

Na základě výše uvedených výsledků a také na prodlužování retenčních časů analýz v závislosti na zvyšujícím se pH bylo od dalších experimentů na tomto sorbentu při reverzním módu opuštěno.

5 Závěr

- V rámci diplomové práce byla zpracována rešerše na téma chirální separace β -blokátorů metodou HPLC.
- Na základě získaných informací bylo zkoušeno chromatografické chování dvou kolon obsahující makrocyclické glykopeptidové sorbenty (CHIROBIOTIC V - vankomycin; CHIROBIOTIC T - teikoplanin).
- Při vlastním chromatografickém procesu byla využita UV detekce při 230 nm (pro atenolol a propranolol) a 254 nm (pro pindolol).
- Tyto chromatografické sorbenty byly zkoušeny při polárně-iontovém módu a reverzním módu.
- U polárně-iontového módu byl sledován vliv koncentrace kyseliny a baze, teploty, případně složení organické složky MF na separaci enantiomerů.
- U reverzního módu byl sledován vliv pH, poměru organické složky a vodné složky a složení (výběr vhodné) organické složky MF na separaci enantiomerů.
- Při použití reverzního módu u CHIROBIOTIC V i CHIROBIOTIC T nedocházelo k separaci enantiomerů β -blokátorů.
- Při použití polárně-iontového módu u CHIROBIOTIC V nedošlo k takové separaci izomerů atenololu, aby rozlišení bylo větší než 1,5. Rozlišení pindololu bylo větší než 1,5 při použití MF methanol/kys. octová/triethylamin 100/0,02/0,02 ($R_S=1,52$) a methanol/kys. octová/triethylamin 100:0,01:0,02 ($R_S=1,53$). Rozlišení propranololu bylo větší než 1,5 při použití všech mobilních fází při tomto módu.
- Při použití polárně-iontového módu u CHIROBIOTIC T docházelo k chirální separaci atenololu, proto podmínky (teplota, složení MF) byly upravovány tak, aby separace probíhala v přijatelném čase.
- Jako optimální podmínky pro chirální separaci vybraných β -blokátorů byly zvoleny tyto podmínky:

chromat. kolona	CHIROBIOTIC T
mobilní fáze	methanol/kys. octová/triethylamin 100/0,05/0,05
průtok	2,0 ml/min
teplota	40°C

6 Použitá literatura

- [1] Bosáková Z., Cuřínová E., Tesařová E.: Comparison of vancimycin - based stationary phases with different chiral selector coverage for enantioselective separation of selected drugs in high - performance liquid chromatography, *J. Chromatogr. A* 1088 (2005), s. 94-103
- [2] Beesley T. E., Scott R. P. W.: *Chiral Chromatography*, John Wiley & Sons (1998), s. 229-264
- [3] Paik M. J., Nguyen D. T.: N-methoxycarbonylation combined with trimethylsilylation for enantioseparation of β -blockers by achiral dual-column gas chromatography, *J. Chromatogr. A* 1103 (2006), s. 177-181
- [4] Schmid M. G., Lecník O. et al.: Application of ligand-exchange capillary electrophoresis to the chiral separation of α -hydroxyacids and β -blockers, *J. Chromatogr. A* 875 (2000), s. 307-314
- [5] Mertzman M. D., Foley J. P.: Temperature effects on chiral microemulsion electrokinetic chromatography employing the chiral surfactant dodecoxycarbonylvaline, *J. Chromatogr. A* 1073 (2005), s. 181-189
- [6] Karlíček R. a kol.: *Analytická chemie pro farmaceuty*, Karolinum (2001), s. 267-281
- [7] Garaj J. a kol.: *Analytická chemia*, SNTL (1983), s. 92-94
- [8] Opekar F. a kol.: *Základní analytická chemie*, Karolinum (2002), s. 149-167
- [9] Špačková J.: *Optimalizace separačních podmínek pro HPLC stanovení simvastatinu a atorvastatinu v biologickém materiálu (diplomová práce)*, Hradec Králové (2006)
- [10] *Český lékopis 2002*, Grada Publishing a.s., Praha 2002
- [11] http://tomcat.bf.jcu.cz/sima/amalyticka_chemie/separa.htm
- [12] Červinka O.: Chiralita a pojmy s ní související, *Chemické listy* 93 (1999), s. 294-305
- [13] Červinka O. a kol.: *Organická chemie*, SNTL (1969), s. 105-107
- [14] Waisser K., *Organická chemie I*, Karolinum (1999), s. 63-64
- [15] Cazes J.: *Encyclopedia of Chromatography*, Marcel Dekker Inc. (2001), s. 169-175
- [16] www.uochb.cas.cz/Zpravy/PostGrad2004/8_Kraus.pdf
- [17] Chalabala M. et al.: *Technologie léků*, Galén (1997), s. 161-162
- [18] www.astecusa.com/publications/AstecChromaGuide.pdf

- [19] Lincová D. et al.: Základní a aplikovaná farmakologie, Galén, Karolinum (2002), s. 92-95
- [20] Hartl et al.: Farmaceutická chemie II/1, Karolinum (2001), s. 32-34
- [21] Enquist M., Hermansson J.: Separation of the enantiomers of β -receptor blocking agents and other cationic drugs using a CHIRAL-AGP column - Binding properties and characterization of immobilized α_1 -acid glycoprotein, J. Chromatogr. A 519 (1990), s. 285-298
- [22] Péter M., Gyéres A., Fülöp: Liquid Chromatographic enantioseparation of β -blocking agents with (1R, 2R)-1,3-diacetoxy-1-(4-nitrophenyl)-2-propyl isothiocyanate as chiral derivatizing agent, J. Chromatogr. A 910 (2001), s.247-253
- [23] Petersen P. V., Ekelund J., Olsen L, Ovesen S. V.: Chiral separation of β -blocking drug substances using the Pirkle-type α -Burke 1 chiral stationary phase, J. Chromatogr. A 757 (1997), s. 65-71
- [24] Olsen L., Brønnum-Hansen K., Helboe P., Jørgensen G. H., Kryger S.: Chiral separation of β - blocking drug substances using derivation with chiral reagents and normal-phase high-performance liquid chromatography, J. Chromatogr. A 636 (1993), s. 231-241
- [25] Poon Y., Muderawan W., Siu-Choon Ng: Synthesis and application of mono 2^A-azido-2^A-deoxyperphenylcarbamoyleated β -cyclodextrin and mono 2^A-azido-2^A-deoxyperacetylated β -cyclodextrin as chiral stationary phases for high-performance liquid chromatography, J. Chromatogr. 1011 (2006), s. 185-197
- [26] Pirkle W.H., Burke J. A.: Chiral stationary phase designed for β -blockers, J. Chromatogr. A 557 (1991), s. 173-185
- [27] Ghanem A. Hoenen H.: Application and comparison of immobilized and coated amylose tris-(3,5-dimethylphenylkarbamate) chiral stationary phases for the enantioselective separation of β - blockers enantiomers by liquid chromatography, Talanta 68 (2006), s. 602-609
- [28] Agrawal Y. K., Patel R.N.: Chiral chromatographic separation of β - blockers, J. Chromatogr. B 820 (2005), s. 23-31
- [29] Zhang D.: Resolution of β -blockers on a chiral stationary phase based on (+)-(18-crown-6)-2,3,11,12- tetracarboxylic acid: Unusual temperature effect, J. Chromatogr. A 1083 (2005), s. 89-95

- [30] Gasparrini F, Misiti D, Villani C.: Chromatographic resolution of 1,2-aminoalcohols on a chiral stationary phase containing N,N'-(3,5-dinitrobenzoyl)-trans-1,2-diaminocyclohexane, *J. Chromatogr. A* 539 (1991), s. 25-36
- [31] Machida Y.: Enantiomeric separation of diols and β -aminoalcohols by chiral stationary phase derived from (R,R)-tartramide, *J. Chromatogr.* 757 (1997), s.73-79

7 Abstrakt

Využití makrocyclických glykopeptidových sorbentů v chirální analýze beta-blokátorů metodou HPLC

Ivana Zdarsová

Abstrakt

Cílem práce bylo seznámení s možnostmi makrocyclických glykopeptidů (vankomycinu a teikoplaninu) při separaci vybraných látek ze skupiny β -blokátorů (atenolol, pindolol, propranolol) metodou HPLC s diode array detekcí - DAD. Dalším cílem bylo určit optimální podmínky (kolona, složení mobilní fáze, teplota a průtok mobilní fáze) pro separaci daných enantiomerů. Chromatografické sorbenty byly zkoušeny při polárně-iontovém módu a reverzním módu. Při vlastním měření byla využita UV detekce při 230 nm (pro atenolol a propranolol) a 254 nm (pro pindolol).

U polárně-iontového módu byl sledován vliv koncentrace kyseliny a baze v mobilní fázi, teplota, případně složení organické složky MF na separaci enantiomerů. U reverzního módu byl sledován vliv pH vodné složky, poměru organické a vodné složky a výběr vhodné organické složky na separaci enantiomerů.

Při použití reverzního módu u CHIROBIOTIC V i CHIROBIOTIC T nedocházelo k separaci enantiomerů β -blokátorů. Při použití polárně iontového módu u CHIROBIOTIC V nedošlo k takové separaci izomerů atenololu, aby rozlišení bylo větší než 1,5. Rozlišení pindololu bylo větší než 1,5 u dvou mobilních fází. Rozlišení propranololu bylo větší než 1,5 při použití všech mobilních fází při tomto módu. Při použití polárně-iontového módu u CHIROBIOTIC T docházelo k chirální separaci vybraných β -blokátorů s rozlišením nad 1,5, proto byly podmínky (teplota, složení mobilní fáze) upravovány tak, aby separace probíhala v přijatelném čase. Jako optimální podmínky pro chirální separaci vybraných β -blokátorů byly zvoleny: CHIROBIOTIC T; mobilní fáze: methanol/kys. octová/triethylamin 100/0,05/0,05; průtok 2,0 ml/min; teplota 40°C.

Using of macrocyclic glycopeptide sorbents in a chiral analysis of beta-blockers by method HPLC

Ivana Zdarsová

Abstract

The aim of this work was to introduce with possibilities of macrocyclic glycopeptides stationary phases (vancomycin and teicoplanin) to separation from chosen β -blockers (atenolol, pindolol and propranolol) by HPLC method with diode array detection. The next aim was to arrange optimal conditions (column, composition of mobile phase, temperature and flow of mobile phase) for enantioseparation. Vancomycin and teicoplanin sorbent were tested by using the polar-ionic mode and reverse mode.

The influence of concentration of acid and base in an organic solvent, the temperature and composition of the organic solvent was tested in the polar-ionic mode. The influence of pH aqueous part, the rate of organic and aqueous components of the mobile phase was tested in the reverse mode.

There was no separation of enantiomers from β -blockers at all, when was used reverse mode in CHIROBIOTIC V and CHIROBIOTIC T. There was no enantioseparation of atenolol in the polar-ionic mode in CHIROBIOTIC T with a resolution above 1,5. There was enantioseparation of pindolol with a resolution above 1,5 when two mobile phase was used and enantioseparation of propranolol with resolution above 1,5 was when all mobile phase in this mode was used. There was resolution above 1,5 when the polar-ionic mode in CHIROBIOTIC T for chosen drugs was used, and so the conditions were adjusted to obtain optimal separation. The optimal conditions were chosen for chiral separation of chosen β -blockers: CHIROBIOTIC T column; mobile phase: methanol/acetic acid/triethylamin 100/0,05/0,05; flow 2,0 ml/min; temperature 40°C.