

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE  
Přírodovědecká fakulta

---

Studijní program: Klinická a toxikologická analýza



Bc. Denisa Plecítá

CHIRÁLNÍ STACIONÁRNÍ FÁZE NA BÁZI CELULOSY  
PRO REVERZNÍ HPLC

Cellulose-based chiral stationary phases  
for reversed phase HPLC

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: RNDr. Květa Kalíková, Ph.D.

Praha 2014

## Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

Jsem si vědoma toho, že případné využití výsledků, získaných v této práci, mimo Univerzitu Karlovu v Praze je možné pouze po písemném souhlasu této univerzity.

V Praze dne 8. května 2014

-----  
podpis

## Abstrakt

Tato diplomová práce je zaměřena na porovnání chirálních stacionárních fází na bázi derivatizované celulosy metodou vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC). Polysacharidové chirální stacionární fáze jsou vhodné pro enantioseparaci různých chirálních látek. V této práci byly použity kolony Chiralpak IB, obsahující chirální selektor tris(3,5-dimethylfenylkarbamát) celulosy imobilizovaný na silikagel, a Chiralpak IC, obsahující chirální selektor tris(3,5-dichlorofenylkarbamát) celulosy imobilizovaný na silikagel. Jejich enantioseparační potenciál byl testován na 28-mi strukturálně odlišných chirálních analytech. Separace chirálních látek byla prováděna v reverzním módu. Mobilní fáze byly tvořeny organickými modifikátory acetonitrilem, nebo methanolem a vodná složka byla zvolena dle povahy analytů. U analytů kyselé povahy obsahovala mobilní fáze vodný roztok kyseliny mravenčí (pH 2,1). Látky bifunkční povahy byly separovány za přítomnosti roztoku kyseliny mravenčí (pH 2,1), 10 mM octanu amonného (pH 8,8), nebo 100 mM roztoku KPF<sub>6</sub>. Pro bazické analyty byla zvolena vodná složka mobilní fáze 10 mM octan amonný (pH 8,8) a 100 mM roztok KPF<sub>6</sub>.

Na koloně Chiralpak IB bylo z celkového počtu 28-mi chirálních analytů částečně separováno dvanáct a na základní linii pět analytů.

Kolona Chiralpak IC vykazovala rozdílnou enantioselektivitu, sedm látek bylo separováno částečně a sedm analytů na základní linii.

Bylo zjištěno, že kolony Chiralpak IB a Chiralpak IC jsou k sobě komplementární.

Klíčová slova: celulosové chirální stacionární fáze, chirální separace, HPLC

## Abstract

This diploma thesis is focused on the comparison of enantioselective potential of chiral stationary phases based on derivatized cellulose by high performance liquid chromatography (HPLC). Polysaccharide – based chiral stationary phases are suitable choice for enantioseparation of various chiral compounds. In this work Chiralpak IB column containing cellulose tris(3,5-dimethylphenylcarbamate) selector immobilized onto silica gel and Chiralpak IC column containing cellulose tris(3,5-dichlorophenylcarbamate) selector immobilized onto silica gel were used. Their ability of enantioseparation was tested on 28 structurally different chiral analytes. Reversed-phase separation mode was used for enantioseparation. Mobile phases were composed of organic modifiers acetonitrile or methanol and the aqueous part was selected according to the nature of analytes. Acidic analytes were separated in mobile phases containing aqueous solution of formic acid (pH 2.1). Analytes of bifunctional nature were separated in the presence of aqueous solution of formic acid (pH 2.1), 10 mM ammonium acetate buffer (pH 8.8) or 100 mM solution of KPF<sub>6</sub>. Mobile phases containing 10 mM ammonium acetate buffer (pH 8.8) or 100 mM solution of KPF<sub>6</sub> were used for enantioseparation of alkaline chiral analytes.

Twelve chiral analytes were separated partially and five were baseline separated from the set composed of 28 compounds on Chiralpak IB column.

Chiralpak IC column showed a different enantioselectivity, seven chiral analytes were partially separated while seven analytes were baseline separated.

The complementarity of compared columns Chiralpak IB and Chiralpak IC was observed.

Keywords: cellulose chiral stationary phase, chiral separation, HPLC

## **Poděkování**

Ráda bych poděkovala své školitelce RNDr. Květě Kalíkové, Ph.D., za její výborné rady a připomínky a za její příjemné a odborné vedení. Dále bych ráda poděkovala prof. RNDr. Evě Tesařové, CSc. za poskytnuté konzultace.

Práce vznikla za finanční podpory projektů KONTAKT AM 2010 projekt LH11018 a CEEPUS projekt CIII-RO-0010-08-1314.

# Obsah

1 Úvod .....	8
2 Teoretická část.....	9
2.1 Chiralita .....	9
2.2 Metody pro chirální separace .....	10
2.2.1 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie.....	10
2.3 Chirální stacionární fáze .....	11
2.3.1 Polysacharidové CSP .....	12
2.3.1.1 Kolona Chiralpak IB .....	13
2.3.1.2 Kolona Chiralpak IC .....	14
2.4 Normální a reverzní mód na polysacharidových CSP .....	14
2.5 Separované chirální analyty.....	15
2.5.1 Analyty kyselé povahy - profeny a blokové aminokyseliny .....	15
2.5.2 Analyty bazické povahy - $\beta$ -blokátory, tramadol, thalidomid, BP 34, BP 766.....	15
2.5.3 Analyty bifunkční povahy - tiazidová diuretika .....	16
3 Experimentální část .....	17
3.1 Použité chemikálie.....	17
3.2 Použité přístroje a pomůcky .....	18
3.3 Struktura analyzovaných látek.....	19
3.4 Příprava vzorků.....	20
3.5 Příprava mobilních fází .....	20
3.6 Podmínky separace .....	21
3.7 Výpočty chromatografických parametrů .....	21
4 Výsledky a diskuze.....	23
4.1 Chirální separace analytů kyselé povahy.....	23
4.1.1 Vliv organického modifikátoru na separaci .....	23
4.1.1.1 Mobilní fáze s acetonitrilem .....	23
4.1.1.2 Mobilní fáze s methanolem.....	25
4.2 Chirální separace analytů bifunkční povahy.....	29
4.2.1 Mobilní fáze s vodným roztokem kyseliny mravenčí (pH 2,1) .....	29
4.2.2 Mobilní fáze s 10 mM pufrem (pH 8,8).....	33
4.2.3 Mobilní fáze se 100 mM roztokem KPF <sub>6</sub> .....	35
4.3 Chirální separace analytů bazické povahy.....	38
4.3.1 Mobilní fáze s 10 mM pufrem (pH 8,8).....	39
4.3.2 Mobilní fáze se 100 mM roztokem KPF <sub>6</sub> .....	41
5 Závěr.....	48
6 Použitá literatura.....	50

## Seznam použitých zkratek a symbolů

---

Zkratka	Název
$\alpha$	faktor selektivity
ACN	acetonitril
CE	kapilární elektroforéza
CSP	chirální stacionární fáze
GC	plynová chromatografie
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
$k$	retenční faktor
MeOH	methanol
MF	mobilní fáze
NP	normální separační mód
PTFE	polytetrafluorethylen
$R_{1/2}$	rozlišení
RP	reverzní separační mód
SFC	superkritická fluidní chromatografie
$t_M$	mrtvý čas kolony
$t_R$	retenční čas

---

# 1 Úvod

Většina biologicky aktivních látek zahrnující léčiva, agrochemikálie či potraviny je chirálních a jejich farmakologické, toxické a metabolické účinky se liší v závislosti na tom, o jaký enantiomer se jedná. Během posledních několika desetiletí, se přímá enantioseparace pomocí HPLC výrazně vyvinula a přispěla k pokroku v mnoha oblastech, které se zabývají chirálními sloučeninami. Separace chirálních analytů pomocí HPLC může být dosaženo na základě různě silných interakcí dvou enantiomerů na chirálním selektoru. Proto má výběr chirálního selektoru na tuto separaci velice důležitý vliv. Počet komerčně dostupných chirálních stacionárních fází (CSP) se výrazně zvýšil a dnes je jich dostupných více než sto. Přes širokou škálu CSP se ukázaly jako nejúčinnější pro své separační vlastnosti polysacharidové CSP [1].

V současné době je komerčně dostupných několik polysacharidových kolon. V této práci používané kolony Chiralpak IB a Chiralpak IC obsahují chirální selektory tris(3,5-dimethylfenylkarbamát) a tris(3,5-dichlorofenylkarbamát) celulosy imobilizované na silikagelový nosič. Tyto imobilizované CSP jsou robustní, kompatibilní s širokou škálou mobilních fází a jsou velice užitečné pro enantioseparaci chirálních látek [2].

Cílem této práce bylo porovnat enantioseparační potenciál dvou kolon Chiralpak IB a Chiralpak IC v reverzním módu HPLC.



## 2 Teoretická část

### 2.1 Chiralita

Významná část přírodních látek je chirálních, vyskytují se ve formě enantiomerů, případně diastereomerů [3]. Chiralita je odvozena z řeckého slova *chiros* – ruka, proto si lze enantiomery představit jako pravou a levou ruku [3, 4]. Z hlediska chemického se jedná o stejnou sloučeninu lišící se však uspořádáním své molekuly v prostoru. V nechirálním prostředí mají enantiomery prakticky stejné fyzikálně-chemické vlastnosti jako např. bod tání a varu nebo rozpustnost, a proto nelze jednotlivé enantiomery v takovémto prostředí odlišit. Naopak v chirálním prostředí mají jednotlivé enantiomery odlišné účinky, což se projevuje rozdílným chováním a enantiomery lze od sebe vzájemně rozlišit. Nejběžnějším chirálním prostředím jsou živé organismy, pro které je důležité, s jakým enantiomerem se dostanou do kontaktu, neboť na úrovni molekulového rozpoznávání se jednotlivé enantiomery liší svými biologickými a fyziologickými funkcemi [3]. Chiralita molekuly může být vyvolána přítomností určitých strukturních částí v molekule organické sloučeniny, zvaných prvky chiralidy. Setkáváme se se třemi prvky chiralidy:

1. Chirální centrum (centrální chiralita)
2. Chirální osa (axiální chiralita)
3. Chirální rovina (planární chiralita) [5]

Přítomností jednoho z předchozích prvků se stává molekula jako celek chirální, ale pokud jsou přítomny dva a více prvků současně, může to vést k vzájemnému vyrušení a vzniká tzv. mesoforma [4, 5].

Odlišnému chování přírodních i synteticky připravených enantiomerů je třeba věnovat náležitou pozornost především u léčiv, ale také u agrochemikálií a při kontrole složek potravin [3, 6]. V případě léčiv může dojít v důsledku různého prostorového uspořádání k tomu, že oba enantiomery vytváří různé prostorové vztahy v asymetrickém prostředí receptorů a enzymů, které jsou téměř výhradně složeny z L-aminokyselin. Za těchto podmínek mohou být značné rozdíly v jejich farmakodynamickém působení a jejich farmakokinetických vlastnostech. Rozdíly v účinnosti enantiomerů mohou být v souvislosti s rozdíly v jejich afinitě a vnitřní aktivitě na receptorech následující:

1. Veškerá farmakologická aktivita se může nacházet v jednom enantiomeru, přičemž v tomto případě druhý enantiomer může být považován za nečistotu (nečistota může být neaktivní-např. metadon, nebo mající žádoucí či nežádoucí účinek).
2. Dva enantiomery mohou mít téměř identickou kvalitativní a kvantitativní farmakologickou aktivitu.
3. Enantiomery mohou mít účinek, který je kvalitativně podobný, ale kvantitativně odlišný (např. warfarin, verapamil).
4. Enantiomery mohou mít kvalitativně jinou farmakologickou aktivitu (např. ketamin) [7].

## **2.2 Metody pro chirální separace**

Vývoj metod pro chirální separace přilákal velkou pozornost v posledních třiceti letech. Mezi nejčastěji používané metody patří separační metody zahrnující hlavně vysokoúčinnou kapalinovou chromatografii (HPLC), superkritickou fluidní chromatografii (SFC), plynovou chromatografii (GC) a kapilární elektroforézu (CE). HPLC je nejpoužívanější technikou pro separaci enantiomerů ve farmaceutickém průmyslu, neboť existují rozsáhlé znalosti o této metodě, zavedené aplikace a dále jsou dostupné moderní robustní přístroje a široké spektrum chirálních stacionárních fází [8].

### **2.2.1 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie**

HPLC patří mezi separační metody, které jsou založeny na rozdílné distribuci separovaných látek mezi dvě fáze, kde jedna fáze je mobilní a druhá je stacionární [9]. Pro svou rychlost, citlivost a reprodukovatelnost se stává HPLC metodou první volby v analytických laboratořích po celém světě v různých odvětvích [10].

Základem pro rozlišení enantiomerů, ať už v biologickém nebo chromatografickém systému, je transformace enantiomerů na diastereomery, nebo vytvoření diastereomerního komplexu mezi enantiomerem a receptorem nebo chirálním selektorem. Základním způsobem, jak lze dosáhnout chirální separace v HPLC, je buď metoda přímá, nebo nepřímá.

Nepřímá metoda je založena na derivatizaci separované látky pomocí derivatizačního činidla za vzniku diastereomerů. Vzniklé diastereomery jsou následně separovány na achirální stacionární fázi s achirálními mobilními fázemi.

Další metodou, ale již přímou, je přidavek chirálního selektoru do mobilní fáze. Při separaci se vytváří reverzibilní přechodné diastereomery, které jsou separovány na achirální stacionární fázi.

Oba výše uvedené způsoby jsou však v dnešní době méně používané. Důvodem je jednak náročnost splnit požadavky na čistotu derivatizačního činidla, možný výskyt interferencí z použitých chirálních aditiv a vysoká spotřeba chirálních aditiv, respektive selektorů přidávaných do mobilních fází [11, 12].

Nejpoužívanější metodou je další způsob přímé metody. Chirální selektor je zde vázán na vhodný podklad (nejčastěji silikagel) a vytváří chirální stacionární fázi, kde dochází k chirální separaci za přítomnosti nechirální mobilní fáze [12].

Mezi chirálním selektorem a enantiomery se obecně uplatňují různé typy interakcí. Mezi nejvýznamnější interakce patří vodíková, koordinační, elektrostatická,  $\pi$ - $\pi$  interakce, van der Waalsovy interakce, stérické odpuzování, dipól-dipól interakce a disperzní interakce. Tyto interakce jsou však všeobecné a jejich výskyt je závislý na typu použitého chirálního selektoru [13].

## 2.3 Chirální stacionární fáze

V současné době existuje přes sto druhů CSP, které jsou komerčně dostupné a které jsou vhodné pro chirální separace v různých chemických oborech (především v farmaceutickém výzkumu, potravinářském průmyslu nebo pro analýzy polutantů) [14, 15].

CSP se obvykle skládají buď z malých chirálních molekul nebo chirálních polymerů vázaných na nosiči, jako je silikagel [15]. Podle chemického složení můžeme CSP rozdělit na polysacharidové, cyklodextrinové, cyklofruktanové, ligand-výměnné, Pirklovy, proteinové, korunové étery a CSP na bázi makrocyclických antibiotik [10, 14].

Cyklodextrinové CSP jsou složeny z  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -cyklodextrinů, což jsou cyklické oligosacharidy tvořené šesti, sedmi a osmi glukosovými jednotkami spojenými

$\alpha$ -(1,4)-glykosidickými vazbami [16]. Cyklofruktanové CSP jsou tvořeny z makrocyclických oligosacharidů, které se skládají ze šesti nebo více fruktofuranosových jednotek spojených  $\beta$ -(2,1)-vazbami [17]. Ligand-výměnné chirální separace jsou založeny na tvorbě koordinačních komplexů mezi chirálním selektorem, který obsahuje vázaný ion kovu, a separovanými enantiomery. Pirklovy stacionární fáze můžeme rozdělit do tří skupin:  $\pi$ -elektron akceptorové,  $\pi$ -elektron donorové a  $\pi$ -elektron donorové/akceptorové. Tyto interakce se podílejí na separaci enantiomerů [10]. Proteinové CSP jsou vhodné pro širokou škálu sloučenin z důvodu několika vazebných míst na povrchu chirálního selektoru. Jako proteinový chirální selektor může být použit například sérový albumin,  $\alpha_1$ -kyselý glykoprotein, penicilin G-acylasa nebo glukoamylasa [18]. Chirální separaci na CSP na bázi makrocyclických antibiotik umožňuje několik stereogenních center a různých funkčních skupin obsažených v těchto molekulách. Makrocyclická antibiotika poskytují hydrofobní interakce, interakce dipól-dipól,  $\pi$ - $\pi$  interakce, vodíkové vazby a dále se může uplatňovat sterický efekt. Mezi tyto chirální selektory patří například teikoplanin, vankomycin, ristocetin A [19]. Korunové étery jsou makrocyclické polyétery s kavitou o určité velikosti a jsou vhodné hlavně k enantioseparaci látek obsahující amino skupinu [10]. Polysacharidové deriváty (zejména celulosy a amylosy) sorbované nebo imobilizované na silikagelu se staly nejpoužívanějším materiálem pro chirální stacionární fáze s nejširším výběrem chirálních selektorů pro kapalinovou a superkritickou fluidní chromatografii [20].

### 2.3.1 Polysacharidové CSP

Polysacharidy jako například celuloza a amylosa, jsou přirozeně se vyskytující polymery, které jsou díky své asymetrické struktuře vhodné pro chirální separace [21]. Nativní celuloza a amylosa nejsou příliš účinné chirální selektory v HPLC, proto se vyrábí a používají jejich různé deriváty jako chirální selektory [2]. Nejvíce se jako deriváty osvědčily triacetáty, trifenyلكarbamáty a benzoáty [5].

Amylosa je složena z jednotek D-glukosy, které jsou propojeny  $\alpha$ -(1,4)-vazbou a celuloza je ze stejných jednotek, jen vzájemně spojených  $\beta$ -(1,4)-vazbou [22].

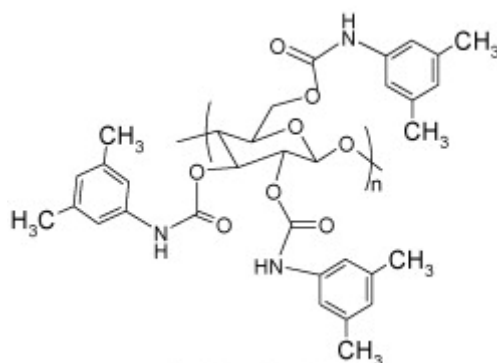
Mezi první polysacharidové selektory patřila mikrokrytalická triacetylceluloza, která byla použita bez jakéhokoliv nosiče. Pro omezené mechanické a fyzikální vlastnosti (nízká účinnost, nízká odolnost vůči tlaku, bobtnání v některých

rozpouštědlech) byly tedy první kolony s touto čistou triacetylcelulosou nevhodné pro HPLC [23]. Zmíněným problémům se zabránilo sorpcí polysacharidových derivátů na makroporézní  $\gamma$ -aminopropylsilikagel, kde polysacharidové CSP jsou připraveny reakcí daného polysacharidu s benzoylchloridem nebo fenylisokyanátem k získání příslušného benzoátu nebo karbamátu [23]. Tyto sorbované CSP však mají omezenou stabilitu v různých rozpouštědlech, které jsou používány jako složky mobilních fází [24]. I přesto jsou běžně používány přes dvě desetiletí jak v akademickém, tak v průmyslovém prostředí. Nicméně neustále existuje snaha o zvyšování stability těchto CSP a snaha o rozšíření použití. Těchto výsledků se dosáhlo pomocí imobilizace polysacharidových derivátů na vhodný nosič, kterým je stále nejčastěji silikagel. Tyto imobilizované CSP kombinují výhodu předchozích stacionárních fází (jejich široký rozsah aplikace a preparativní potenciál) s výhodami spojenými s imobilizací, mezi které patří především robustnost CSP a prakticky neomezená kompatibilita s rozpouštědly [11, 25].

Následující dvě kapitoly přiblíží strukturu dvou použitých stacionárních fází v této práci. Jedná se o deriváty celulosy, které jsou imobilizovány na silikagelový nosič. Schopnost chirální separace CSP na bázi polysacharidů závisí nejen na struktuře chirálních polymerů, ale také na substituentech na fenylové skupině [26, 27].

### 2.3.1.1 Kolona Chiralpak IB

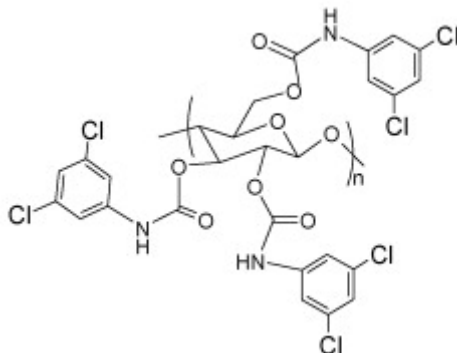
Na Obrázku 1 je zobrazena struktura chirálního selektoru kolony Chiralpak IB, kde je patrné, že na hydroxylových skupinách glukosy je navázán dimethylfenylkarbamát. Po chemické stránce je to tedy tris(3,5-dimethylfenylkarbamát) celulosy [28].



**Obrázek 1.** Struktura chirálního selektoru tris(3,5-dimethylfenylkarbamát) celulosy [21].

### 2.3.1.2 Kolona Chiralpak IC

Na Obrázku 2 je zobrazena struktura chirálního selektoru kolony Chiralpak IC, kde je na hydroxylových skupinách glukosy navázán dichlorofenylkarbamát. Po chemické stránce je to tedy tris(3,5-dichlorofenylkarbamát) celulosy [24].



**Obrázek 2.** Struktura chirálního selektoru tris(3,5-dichlorofenylkarbamát) celulosy [21].

## 2.4 Normální a reverzní mód na polysacharidových CSP

Nejčastěji se pro chirální separace na polysacharidových CSP používá normální (NP) nebo reverzní (RP) separační mód [29].

Jako první byl pro polysacharidové CSP na bázi derivatizované celulosy a amylosy použit NP mód, přičemž mobilní fáze je složena ze směsi alkan/alkohol, často je to směs hexan/2-propanol [30, 31]. Přestože polysacharidové CSP neobsahují žádné iontové funkční skupiny, je chirální separace možná především díky vodíkovým vazbám,  $\pi$ - $\pi$  interakcím a dipól-dipól interakcím. Úspěšné chirální separace však může být dosaženo i správně zvolenými polárními mobilními fázemi [31, 32].

Mezi výhody RP módu patří například dobrá rozpustnost polárních analytů, jednodušší příprava vzorků ze séra a plasmy a použití levnějších rozpouštědel. V RP módu je mobilní fáze složena ze směsi vodná složka/alkohol, nebo vodná složka/acetonitril. Při použití těchto polysacharidových CSP je nanejvýš důležité, aby byl analyt neutrální, respektive nedisociovaný, protože nejsou k dispozici žádné funkční skupiny v polysacharidu, které jsou iontové povahy a interagovaly by tak s nabitými analyty [31]. Složení mobilní fáze, respektive obsah vodné složky, určuje povaha chirální látky. Pro neutrální látky lze použít jako vodnou složku pouze vodu. Pro látky

kyselé povahy je vodná složka kyselina nebo pufr o nízké hodnotě pH (např. vodný roztok kyseliny mravenčí, vodný roztok kyseliny fosforečné, fosfátový pufr). Amonný pufr ( $\text{NH}_4^+/\text{HCO}_3^-$ ) nebo jiný pufr o hodnotě pH, který udrží separovanou látku v nenabitěm stavu, je vhodný pro chirální separaci bazických analytů [33]. Mobilní fáze může také obsahovat látku, která je schopná nabitou chirální látku udržet v „nenabitěm“ stavu díky iontovému párování. Příkladem mohou být takzvaná chaotropní činidla, která díky svému zápornému náboji dokáží s kladně nabitými analyty vytvořit neutrální sloučeninu. Nejvýraznějšího efektu je docíleno s  $\text{PF}_6^-$  a klesá v řadě:  $\text{BF}_4^-$ ,  $\text{ClO}_4^-$ ,  $\text{SCN}^-$ ,  $\text{I}^-$ ,  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$ ,  $\text{Br}^-$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{AcO}^-$  [31].

## 2.5 Separované chirální analyty

Pro porovnání separační účinnosti CSP na bázi celulosy byla použita převážně chirální léčiva různých chemických struktur. Tyto analyty byly rozděleny do tří hlavních skupin, které budou představeny v následujících kapitolách. Struktury těchto analytů jsou ukázány na Obrázku 3.

### 2.5.1 Analyty kyselé povahy - profeny a blokové aminokyseliny

Profeny, nebo též deriváty 2-arylpropionové kyseliny, představují důležitou skupinu nesteroidních protizánětlivých léčiv, vyznačujících se přítomností chirálního atomu uhlíku v blízkosti karboxylové skupiny [34].

Dále byly v této práci použity chirální blokové aminokyseliny, které mají blokovanou aminoskupinu benzyloxykarbonylovou skupinou. Tyto blokové aminokyseliny mohou být významnými prekurzory při syntéze peptidů a právě díky blokování jsou odolné vůči racemizaci během syntézy peptidového řetězce [35].

### 2.5.2 Analyty bazické povahy - $\beta$ -blokátory, tramadol, thalidomid, BP 34, BP 766

$\beta$ -blokátory, které obsahují amino a hydroxylové skupiny a obsahují alespoň jeden aromatický zbytek v molekule, se globálně používají jako léky první volby v léčbě hypertenze, anginy pectoris, srdeční arytmie a glaukomu. Obecně platí, že

*S*-enantiomery jsou farmakologicky účinné a vykazují asi 50-500× vyšší aktivitu, která je způsobená jejich vyšší afinitou k receptorům. Většina léků je však podávána ve formě racemátů, což nemusí být vždy zdraví prospěšné. Příkladem je propranolol, který při dlouhodobém podávání ve formě racemátu může mít za následek diabetes. Toto onemocnění způsobuje *S*-enantiomer, přičemž *R*-enantiomer se používá k léčbě hypertyreózy [36].

Tramadol, obsahující na svém cyklohexanovém kruhu dvě stereogenní místa, je racemické opioidní analgetikum, kde *S,S*-enantiomer vykazuje 10× nižší analgetickou účinnost než *R,R*-enantiomer [37].

Thalidomid, obsahující ve své struktuře heterocyklus a aromatické jádro, byl dříve prodáván jako racemát, dokud nebylo zjištěno, že *S*-enantiomer je teratogenní, zatímco *R*-enantiomer má sedativní účinky [38].

Látka BP 34, obsahující hydroxylovou skupinu navázanou přímo do stereogenního centra, je produktem degradace fluridilu. Fluridil je látka používající se při androgenní alopecii (vypadávání vlasů) [39].

Látka BP 766 je trifluoroacetylovaný derivát látky BP 34.

### **2.5.3 Analyty bifunkční povahy - tiazidová diuretika**

Tiazidová diuretika obsahující ve své struktuře sulfonamidovou skupinu, jsou založena hlavně na snížení zpětné resorpce sodných a chloridových iontů do distálního tubulu, což způsobuje zvýšené vylučování draselných iontů a snížené vylučování vápenatých iontů [40].



## 3 Experimentální část

### 3.1 Použité chemikálie

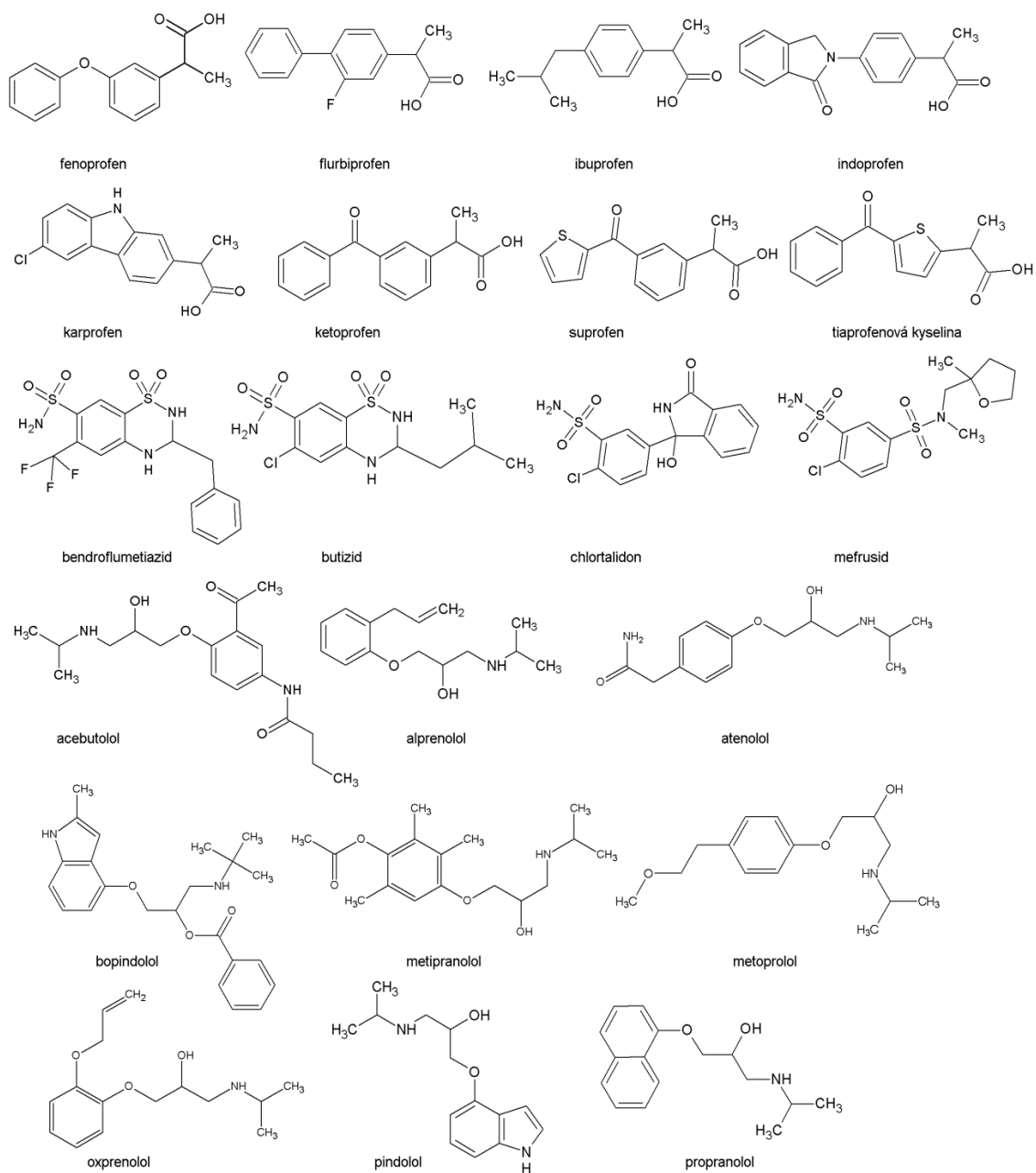
- deionizovaná voda (upravena pomocí zařízení Ultrapur pro přípravu ultra čisté vody deionizací, Watrex, Praha, Česká republika)
- acetonitril (ACN  $\geq 99,9\%$ , Chromasolv gradient grade for HPLC, Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo)
- amoniak (28-30%, ACS reagent, Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo)
- hexafluorofosforečnan draselný (KPF<sub>6</sub> 98%, Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo)
- kyselina mravenčí (HCOOH  $\geq 95\%$ , reagent grade, Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo)
- methanol (MeOH  $\geq 99,9\%$ , Chromasolv gradient grade for HPLC, Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo)
- octan amonný ( $\geq 99\%$ , Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo)
- karprofen, fenoprofen, flurbiprofen, ibuprofen, indoprofen, ketoprofen, kyselina tiaprofenová, suprofen (Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo)
- acebutolol, alprenolol, atenolol, bopindolol, metipranolol, metoprolol, oxprenolol, pindolol, propranolol (Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo)
- bendroflumetiazid, butizid, chlortalidon, mefrusid (prof. M. G. Schmid z Karl Franzens University, Graz, Rakousko)
- BP 34, BP 766 (Radiology research, University of California, San Diego, USA)
- thalidomid, tramadol (Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo)
- Z-D,L-2-F-fenylalanin, Z-D,L-3-F-fenylalanin, Z-D,L-4-F-fenylalanin (prof. Tamara Pajpanova, Institute of Molecular Biology, Bulgarian Academy of Sciences, Sofie, Bulharsko); Z-předpona označuje *N* – benzyloxykarbonylovou skupinu

### 3.2 Použité přístroje a pomůcky

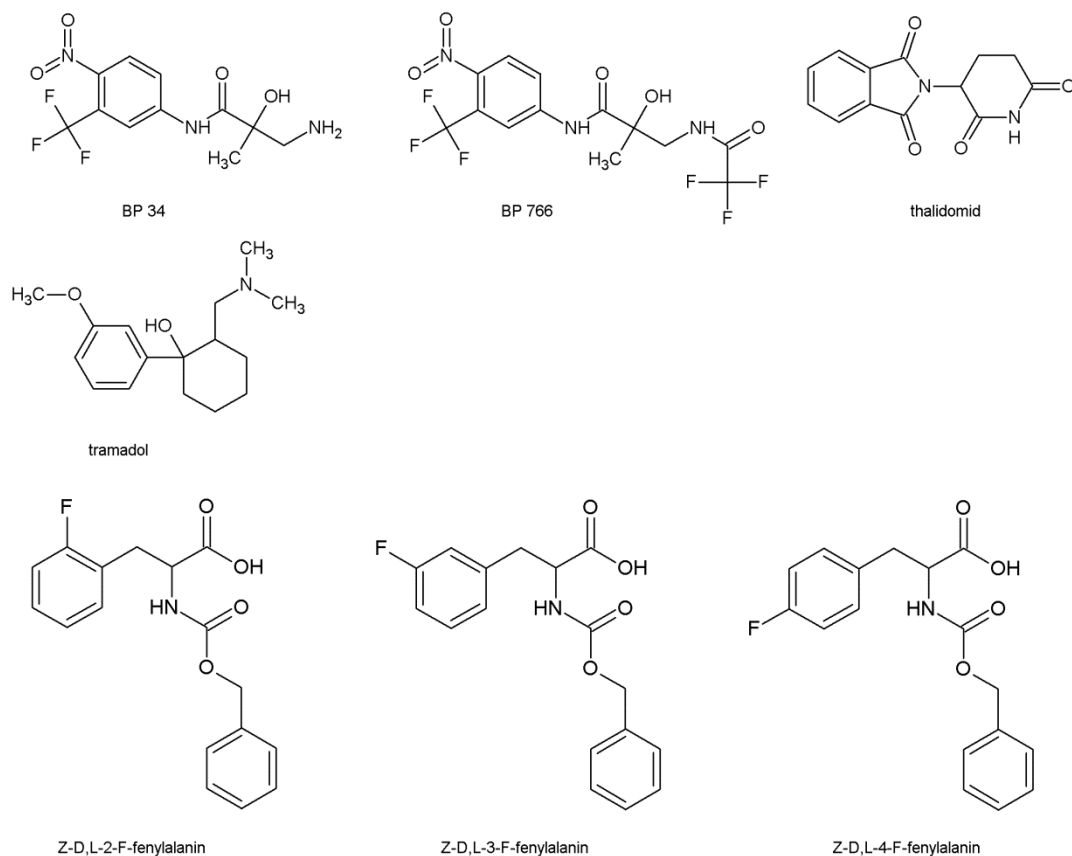
- vysokoúčinný kapalinový chromatograf od firmy Agilent technologies (Waldbroon, Německo)  
detektor 1260 Infinity G1315C 1260 DAD VL+  
kolonový termostat 1290 Infinity G1316C 1290 TCC  
autosampler 1260 Infinity G1367E 1260 HiP ALS  
termostat 1290 Infinity G1330B 1290 Thermostat  
pumpa 1200 Series G1311B 1260 Quat. Pump  
software ChemStation verze B.04.03
- chromatografické kolony:  
Chiralpak IB (tris(3,5-dimethylfenylkarbamát) celulosy), velikost částic 5 $\mu$ m, rozměry 250 mm  $\times$  4,6 mm (Chiral Technologies Europe, Illkirch, Francie)  
Chiralpak IC (tris(3,5-dichlorofenylkarbamát) celulosy), velikost částic 5 $\mu$ m, rozměry 250 mm  $\times$  4,6 mm (Chiral Technologies Europe, Illkirch, Francie)
- analytické váhy Mettler AE 240 (Greifensee, Švýcarsko)
- pH metr PHM 240 (Radiometr Analytical SAS, Villeurbanne Cedex, Francie)
- magnetická míchačka Stuart heat-stir CB 162 (Keison Products, Chelmsford, Essex, Anglie)
- ultrazvuková lázeň Ultrasonic LC 320 (ELMA, Německo)
- software:  
Origin, verze 6.1  
ACD/ChemSketch, verze 12.0.12.0

### 3.3 Struktura analyzovaných látek

Struktury jednotlivých analyzovaných látek jsou zobrazeny na Obrázku 3a a 3b.



Obrázek 3a. Struktury separovaných látek.



**Obrázek 3b.** Struktury separovaných látek.

### 3.4 Příprava vzorků

U všech vzorků byl navážen 1 mg standardu a rozpuštěn v 1 ml acetonitrilu. Všechny vzorky byly následně přefiltrovány přes 0,45  $\mu\text{m}$  PTFE filtr.

### 3.5 Příprava mobilních fází

Použité mobilní fáze (MF) a jejich složení jsou uvedeny v Tabulce 1.

Pro přípravu 1 l 10 mM amonného pufru ( $\text{NH}_4^+/\text{CH}_3\text{COO}^-$ ) bylo naváženo požadované množství octanu amonného, které bylo rozpuštěno v deionizované vodě. Následně bylo přidáním amoniaku upraveno pH na požadovanou hodnotu (pH 8,8) a roztok byl doplněn deionizovanou vodou do objemu 1 l. Pufr byl poté přefiltrován přes 0,45  $\mu\text{m}$  PTFE filtr. Pro tento pufr se bude dále používat označení pufr (pH 8,8).

Pro přípravu 1 l 100 mM roztoku  $\text{KPF}_6$  bylo naváženo požadované množství  $\text{KPF}_6$  a rozpuštěno v 1 l deionizované vody. Roztok byl poté přefiltrován přes 0,45  $\mu\text{m}$  PTFE filtr.

Vodný roztok kyseliny mravenčí byl připraven titrací kyseliny mravenčí na hodnotu pH 2,1.

**Tabulka 1.** Mobilní fáze použité pro separaci a rozmezí jejich složení.

Složky mobilní fáze	Poměr jednotlivých složek
ACN/HCOOH (pH 2,1)	40/60 (v/v) – 20/80 (v/v)
ACN/10 mM pufr (pH 8,8)	40/60 (v/v) – 15/85 (v/v)
ACN/100 mM $\text{KPF}_6$	40/60 (v/v) – 15/85 (v/v)
MeOH/HCOOH (pH 2,1)	70/30 (v/v) – 40/60 (v/v)
MeOH/10 mM pufr (pH 8,8)	60/40 (v/v) – 50/50 (v/v)
MeOH/100 mM $\text{KPF}_6$	60/40 (v/v) – 40/60 (v/v)

### 3.6 Podmínky separace

Separace probíhala izokraticky za teploty 25 °C s průtokem mobilní fáze 1 ml/min. Bylo dávkováno 10  $\mu\text{l}$  vzorku a každé měření probíhalo třikrát. Pro detekci byla použita vlnová délka 254 nm. Tlak působící na kolonu se měnil podle složení mobilní fáze.

Mrtvý čas byl určen podle prvního systémového píku na hodnotu 2,39 minut.

### 3.7 Výpočty chromatografických parametrů

Chromatografické parametry popisující separaci, které jsou diskutovány v kapitole Výsledky a diskuze jsou: retenční faktor ( $k$ ), faktor selektivity ( $\alpha$ ) a rozlišení ( $R_{1/2}$ ). Tyto parametry byly vypočteny pomocí následujících rovnic (1-3).

## Retenční faktor

Retenční faktor prvního a druhého eluujícího enantiomeru ( $k_1$  a  $k_2$ ) byl vypočítán podle vzorce, který uvádí Rovnice 1.

$$k = \frac{t_R - t_M}{t_M} \quad (1)$$

$t_R$  je retenční čas enantiomeru,  $t_M$  je mrtvý čas kolony

## Faktor selektivity

Faktor selektivity ( $\alpha$ ) byl vypočítán softwarem ChemStation podle vzorce, který uvádí Rovnice 2.

$$\alpha = \frac{k_2}{k_1} \quad (2)$$

$k_1$  a  $k_2$  označují retenční faktor prvního a druhého eluujícího enantiomeru

## Rozlišení

Rozlišení dvou píků ( $R_{1/2}$ ) bylo vypočteno softwarem ChemStation podle vzorce, který vyjadřuje Rovnice 3.

$$R_{1/2} = \frac{1,18 (t_{R2} - t_{R1})}{w_1 + w_2} \quad (3)$$

$t_{R1}$  a  $t_{R2}$  jsou retenční časy prvního a druhého eluujícího enantiomeru,  $w_1$  a  $w_2$  jsou šířky píků prvního a druhého eluujícího enantiomeru v polovině výšky

## 4 Výsledky a diskuze

### 4.1 Chirální separace analytů kyselé povahy

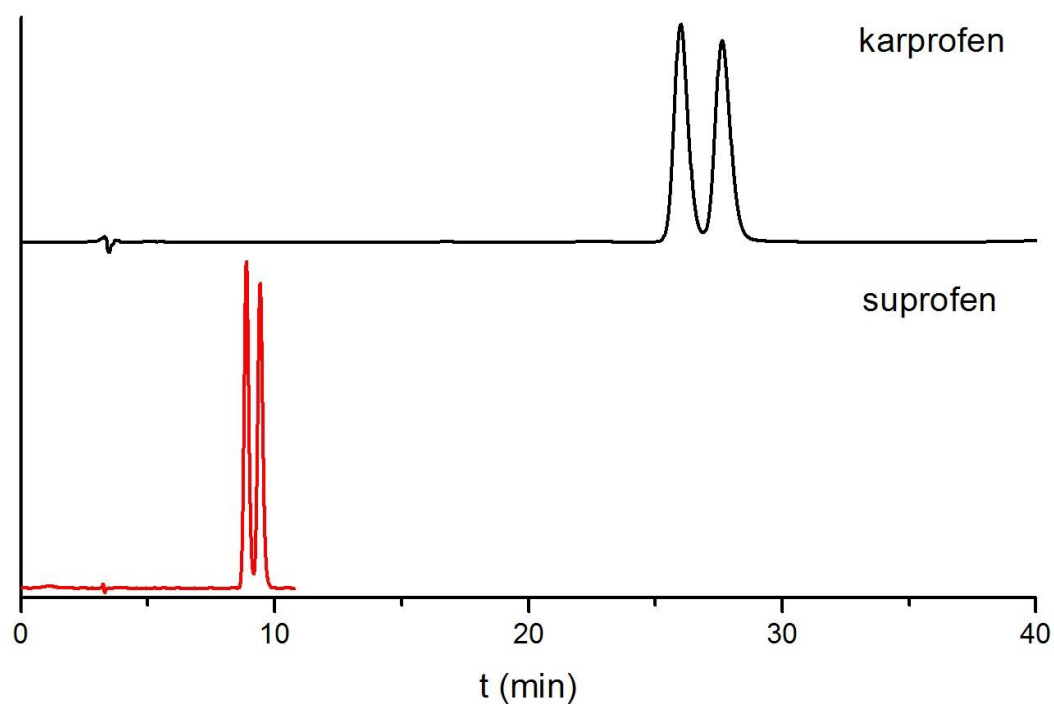
Pro testování enantioselektivity polysacharidových chirálních stacionárních fází byla vybrána skupina profenů patřící mezi nesteroidní antiflogistika a skupina tří blokovaných aminokyselin. Pro chirální separace látek kyselé povahy byly použity na obou kolonách mobilní fáze obsahující ACN nebo MeOH a vodný roztok kyseliny mravenčí (pH 2,1), jelikož při této hodnotě pH jsou analyty nenabitě a tudíž vhodné k separaci [31, 33]. Pro počáteční screening se zvolilo složení mobilní fáze ACN/HCOOH (pH 2,1) 40/60 (v/v) a MeOH/HCOOH (pH 2,1) 60/40 (v/v). Pro separaci enantiomerů blokovaných aminokyselin na koloně Chiralpak IC bylo počáteční složení MF MeOH/HCOOH (pH 2,1) 70/30 (v/v). Chromatografické parametry: retenční faktor, faktor selektivity a rozlišení enantiomerů jsou shrnuty v Tabulkách 2 a 3.

#### 4.1.1 Vliv organického modifikátoru na separace

##### 4.1.1.1 Mobilní fáze s acetonitrilem

Acetonitril má v RP módu vyšší eluční sílu, tudíž retence s mobilní fází obsahující tento organický modifikátor jsou kratší a analýza rychlejší, než s MeOH (při stejném objemovém poměru organického modifikátoru a vodné složky). Při porovnání výsledků z Tabulky 2 je patrné, že na koloně Chiralpak IB se z celkového počtu dvanácti analytů částečně separovaly dvě látky (indoprofen a Z-D,L-3-F-fenylalanin) a karprofen se separoval až na základní linii. Kolona Chiralpak IC vykazuje vyšší enantioselektivitu pro studované látky kyselé povahy než kolona Chiralpak IB. Ze skupiny profenů se separoval na základní linii suprofen, a dále došlo k částečné separaci dalších čtyř profenů (ibuprofen, indoprofen, ketoprofen a tiaprofenová kyselina). Největší rozdíl v selektivitě těchto CSP je vidět u chirálních separací blokovaných aminokyselin, které byly všechny separovány na základní linii na koloně Chiralpak IC. Toto chování je dáno rozdílnými substituenty na chirálním selektoru, tj. dimethylfenylkarbamát (kolona Chiralpak IB) versus dichlorofenylkarbamát (kolona Chiralpak IC).

Na Obrázku 4 jsou ukázány chromatogramy separace karprofenu na koloně Chiralpak IB a suprofenů na koloně Chiralpak IC.



**Obrázek 4.** Chromatogramy separace karprofenu na koloně Chiralpak IB a suprofenů na koloně Chiralpak IC, složení mobilní fáze ACN/HCOOH (pH 2,1) 40/60 (v/v).

Další rozdíl mezi porovnávanými kolonami je v retenčním chování. Z retenčních faktorů uvedených v Tabulce 2 je vidět, že při použití ACN v MF jsou retence analytů na koloně Chiralpak IC kratší, než na koloně Chiralpak IB.



**Tabulka 2.** Chromatografické parametry separovaných analytů při složení mobilní fáze ACN/HCOOH (pH 2,1) 40/60 (v/v). Retenční faktor prvního eluujícího enantiomeru ( $k_1$ ), faktor selektivity ( $\alpha$ ), rozlišení ( $R_{1/2}$ ).

Kolona Chiralpak	IB	IC	IB	IC	IB	IC
Analyt	$k_1$		$\alpha$		$R_{1/2}$	
<b>fenoprofen</b>	7,05	2,78	1,00	1,00	0,00	0,00
<b>flurbiprofen</b>	7,65	3,17	1,00	1,00	0,00	0,00
<b>ibuprofen</b>	6,53	3,37	1,00	1,02	0,00	0,59
<b>indoprofen</b>	3,91	3,54	1,03	1,03	0,70	0,61
<b>karprofen</b>	9,87	3,09	1,07	1,00	1,59	0,00
<b>ketoprofen</b>	4,18	2,49	1,00	1,02	0,00	0,52
<b>suprofen</b>	4,11	2,72	1,00	1,06	0,00	1,52
<b>tiaprofenová kyselina</b>	4,53	3,03	1,00	1,02	0,00	0,43
<b>Z-D,L-4-F-fenylalanin</b>	4,32	1,52	1,00	1,24	0,00	2,72
<b>Z-D,L-3-F-fenylalanin</b>	4,37	1,46	1,01	1,21	0,48	2,41
<b>Z-D,L-2-F-fenylalanin</b>	4,05	1,63	1,00	1,15	0,00	1,73

#### 4.1.1.2 Mobilní fáze s methanolem

Při použití MeOH jako organického modifikátoru se očekává vyšší retence ve srovnání s acetonitrilem, proto se zvolil pro většinu analytů počáteční objemový poměr MeOH/HCOOH (pH 2,1) 60/40 (v/v). Pro chirální separace blokových aminokyselin na koloně Chiralpak IC byla zvolena počáteční mobilní fáze MeOH/HCOOH (pH 2,1) 70/30 (v/v). Z Tabulky 3 je patrné, že na koloně Chiralpak IB došlo k částečné separaci pěti analytů za výše uvedených podmínek (flurbiprofen, ibuprofen, indoprofen, Z-D,L-4-F-fenylalanin, Z-D,L-2-F-fenylalanin). Za těchto počátečních podmínek nedošlo k žádné separaci studovaných analytů až na základní linii. Při použití kolony Chiralpak IC došlo k separaci všech blokových aminokyselin na základní linii

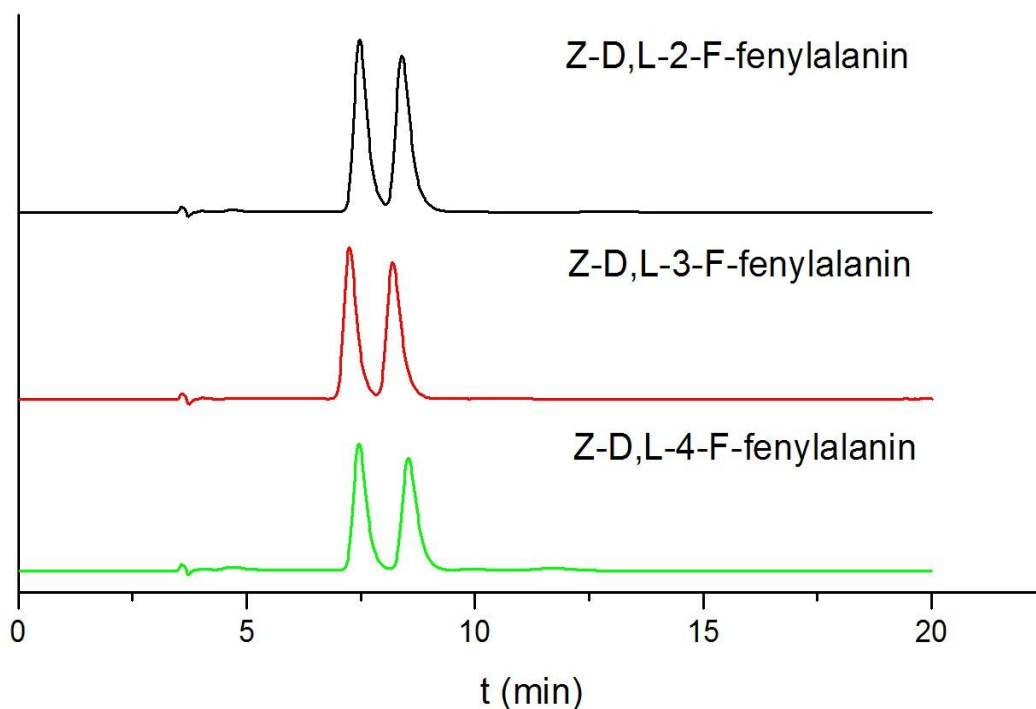
v MF MeOH/HCOOH (pH 2,1) 70/30 (v/v). Chromatogramy těchto chirálních separací jsou ukázány na Obrázku 5. Separace profenů se při použití MeOH zhoršila. Například suprofen, který se v MF s ACN separoval až na základní linii na koloně Chiralpak IC, se nyní separoval pouze částečně, a také došlo k významnému zvýšení retence.

Při porovnání retenčních faktorů analytů na obou kolonách nelze obecně říci, že je separace na některé z kolon rychlejší (jak tomu bylo při použití mobilních fází s ACN). Ketoprofen, kyselina tiaprofenová a částečně se dělicí indoprofen a suprofen, mají retenci na koloně Chiralpak IC vyšší (viz Tabulka 3).

**Tabulka 3.** Chromatografické parametry separovaných analytů při složení mobilní fáze MeOH/HCOOH (pH 2,1) 60/40 (v/v), respektive 70/30 (v/v) pro blokované aminokyseliny. Retenční faktor prvního elujícího enantiomeru ( $k_1$ ), faktor selektivity ( $\alpha$ ), rozlišení ( $R_{1/2}$ ).

<b>Kolona Chiralpak</b>	<b>IB</b>	<b>IC</b>	<b>IB</b>	<b>IC</b>	<b>IB</b>	<b>IC</b>
<b>Analyt</b>	<b><math>k_1</math></b>		<b><math>\alpha</math></b>		<b><math>R_{1/2}</math></b>	
<b>fenoprofen</b>	8,10	3,67	1,00	1,00	0,00	0,00
<b>flurbiprofen</b>	8,56	4,33	1,03	1,00	0,43	0,00
<b>ibuprofen</b>	7,19	4,46	1,04	1,00	0,50	0,00
<b>indoprofen</b>	7,12	18,18	1,05	1,05	0,63	0,63
<b>karprofen</b>	16,46	4,39	1,00	1,00	0,00	0,00
<b>ketoprofen</b>	4,68	6,16	1,00	1,00	0,00	0,00
<b>suprofen</b>	4,77	7,62	1,00	1,07	0,00	0,66
<b>tiaprofenová kyselina</b>	5,26	8,68	1,00	1,00	0,00	0,00
<b>Z-D,L-4-F-fenylalanin</b>	6,62	1,33 <sup>a</sup>	1,04	1,27 <sup>a</sup>	0,63	1,92 <sup>a</sup>
<b>Z-D,L-3-F-fenylalanin</b>	6,76	1,26 <sup>a</sup>	1,00	1,25 <sup>a</sup>	0,00	1,74 <sup>a</sup>
<b>Z-D,L-2-F-fenylalanin</b>	5,66	1,33 <sup>a</sup>	1,04	1,23 <sup>a</sup>	0,75	1,68 <sup>a</sup>

<sup>a</sup> MF MeOH/HCOOH (pH 2,1) 70/30 (v/v)



**Obrázek 5.** Chromatogramy separace blokovanych aminokyselin, složení mobilní fáze MeOH/HCOOH (pH 2,1) 70/30 (v/v).

Vzhledem k dosaženým výsledkům za výše uvedených screeningových podmínek bylo následně optimalizováno složení mobilní fáze, respektive poměr organického modifikátoru a vodného roztoku kyseliny mravenčí. Další měření probíhala pro skupinu profenů při složení MF ACN/HCOOH (pH 2,1) 30/70 (v/v) a pro některé látky byl zkoušen i poměr 20/80 (v/v) a MeOH/HCOOH (pH 2,1) 50/50 (v/v). Pro blokové aminokyseliny byly použity mobilní fáze ACN/HCOOH (pH 2,1) 30/70 (v/v) a MeOH/HCOOH (pH 2,1) 55/45 (v/v) pro kolonu Chiralpak IB. Pro kolonu Chiralpak IC probíhalo měření při složení mobilní fáze ACN/HCOOH (pH 2,1) 45/55 (v/v) a 42/58 (v/v).

Získané chromatografické parametry při různém složení mobilní fáze jsou uvedeny v Tabulce 4.

**Tabulka 4.** Chromatografické parametry separovaných analytů při různém složení mobilní fáze. Retenční faktor prvního eluujícího enantiomeru ( $k_1$ ), faktor selektivity ( $\alpha$ ), rozlišení ( $R_{1/2}$ ).

Analyt	Chiralpak	$k_1$	$\alpha$	$R_{1/2}$	Složení MF (v/v)
<b>fenoprofen</b>	<b>IB</b>	27,65	1,04	0,56	MeOH/A 50/50
	<b>IC</b>	8,67	1,03	0,60	ACN/A 30/70
<b>flurbiprofen</b>	<b>IB</b>	29,99	1,05	0,61	MeOH/A 50/50
<b>ibuprofen</b>	<b>IB</b>	20,80	1,06	0,69	MeOH/A 50/50
	<b>IC</b>	11,09	1,04	0,68	ACN/A 30/70
<b>indoprofen</b>	<b>IB</b>	11,32	1,04	1,02	ACN/A 30/70
	<b>IB</b>	7,12	1,05	0,63	MeOH/A 60/40
	<b>IC</b>	55,23	1,05	0,78	ACN/A 20/80
	<b>IC</b>	18,18	1,05	0,63	MeOH/A 60/40
<b>karprofen</b>	<b>IB</b>	9,87	1,07	1,59	ACN/A 40/60
<b>ketoprofen</b>	<b>IC</b>	32,40	1,06	1,24	ACN/A 20/80
<b>suprofen</b>	<b>IC</b>	2,72	1,06	1,52	ACN/A 40/60
	<b>IC</b>	7,62	1,07	0,66	MeOH/A 60/40
<b>tiaprofenová kyselina</b>	<b>IC</b>	8,89	1,03	0,62	ACN/A 30/70
<b>Z-D,L-4-F-fenylalanin</b>	<b>IB</b>	7,52	1,04	0,68	MeOH/A 55/45
	<b>IC</b>	1,38	1,22	1,83	ACN/A 42/58
	<b>IC</b>	1,33	1,27	1,92	MeOH/A 70/30
<b>Z-D,L-3-F-fenylalanin</b>	<b>IB</b>	10,52	1,03	0,67	ACN/A 30/70
	<b>IC</b>	1,32	1,20	1,67	ACN/A 42/58
	<b>IC</b>	1,26	1,25	1,74	MeOH/A 70/30
<b>Z-D,L-2-F-fenylalanin</b>	<b>IB</b>	6,41	1,05	0,91	MeOH/A 55/45

Analyt	Chiralpak	$k_1$	$\alpha$	$R_{1/2}$	Složení MF (v/v)
Z-D,L-2-F-fenylalanin	IC	1,63	1,15	1,73	ACN/A 40/60
	IC	1,33	1,23	1,68	MeOH/A 70/30

A značí vodný roztok kyseliny mravenčí (pH 2,1)

## 4.2 Chirální separace analytů bifunkční povahy

Chirální léčiva ze skupiny tiazidových diuretik byla vybrána jako modelové sloučeniny pro testování enantioselektivity CSP na bázi derivatizované celulosy. Chromatografické chování těchto analytů by mělo být nezávislé na pH použité mobilní fáze. Proto byl sledován i vliv vodné složky mobilní fáze na chirální separaci. Byly použity mobilní fáze s vodným roztokem kyseliny mravenčí (pH 2,1), 10 mM pufrem (pH 8,8) a 100 mM roztokem KPF<sub>6</sub> a MeOH nebo ACN jako organickými modifikátory.

### 4.2.1 Mobilní fáze s vodným roztokem kyseliny mravenčí (pH 2,1)

Pro měření s kyselinou mravenčí se nejdříve použila při screeningu stejná MF jako u látek kyselé povahy, tedy ACN/HCOOH (pH 2,1) 40/60 (v/v) a MF s methanolem byla opět zvolena MeOH/HCOOH (pH 2,1) 60/40 (v/v). Výsledky screeningu jsou shrnuty v Tabulce 5.

**Tabulka 5.** Chromatografické parametry separovaných analytů při složení mobilní fáze ACN/HCOOH (pH 2,1) 40/60 (v/v) a MeOH/HCOOH (pH 2,1) 60/40 (v/v). Retenční faktor prvního elujícího enantiomeru ( $k_1$ ), faktor selektivity ( $\alpha$ ), rozlišení ( $R_{1/2}$ ).

<b>MF ACN/HCOOH (pH 2,1) 40/60 (v/v)</b>						
<b>Kolona Chiralpak</b>	IB	IC	IB	IC	IB	IC
<b>Analyt</b>	$k_1$		$\alpha$		$R_{1/2}$	
<b>bendroflumetiazid</b>	4,47	1,59	1,06	1,05	0,43	0,96
<b>butizid</b>	2,53	1,20	1,09	1,07	1,53	1,56
<b>chlortalidon</b>	1,11	0,68	1,00	1,00	0,00	0,00
<b>mefrusid</b>	3,24	2,03	1,00	1,00	0,00	0,00

<b>MF MeOH/HCOOH (pH 2,1) 60/40 (v/v)</b>						
<b>Kolona Chiralpak</b>	IB	IC	IB	IC	IB	IC
<b>Analyt</b>	$k_1$		$\alpha$		$R_{1/2}$	
<b>bendroflumetiazid</b>	2,43	1,55	1,08	1,21	0,70	0,65
<b>butizid</b>	1,40	1,31	1,08	1,27	0,69	1,06
<b>chlortalidon</b>	0,98	1,19	1,00	1,00	0,00	0,00
<b>mefrusid</b>	2,80	5,41	1,00	1,00	0,00	0,00

Z Tabulky 5 je patrné, že dochází k chirální separaci dvou analytů z této skupiny, tj. bendroflumetiazidu a butizidu na obou testovaných kolonách. Tyto chromatografické podmínky nejsou vhodné pro chirální separace chlortalidonu ani mefrusidu. Při použití mobilní fáze s ACN jsou testované analyty více zadržovány na koloně Chiralpak IB, ale vyšší enantioselektivitu poskytuje kolona Chiralpak IC. V mobilních fázích s MeOH se tento trend neuplatňuje.

Vzhledem k dosaženým výsledkům za výše uvedených podmínek bylo následně optimalizováno složení mobilní fáze, resp. poměr organického modifikátoru a vodné

složky. Další měření probíhala při složení MF ACN/HCOOH (pH 2,1) 30/70 (v/v) a MF MeOH/HCOOH (pH 2,1) 50/50-40/60 (v/v). Změnou složení mobilní fáze, tj. snížením množství organického modifikátoru, došlo ke zvýšení rozlišení enantiomerů butizidu a bendroflumetiazidu a k současnému zvýšení retence. Žádný z testovaných separačních systémů nebyl vhodný pro chirální separace mefrusidu a chlortalidonu, nedošlo ani k částečné separaci enantiomerů těchto analytů. V Tabulce 6 je uvedeno složení nejvhodnějších MF pro bendroflumetiazid a butizid na obou kolonách.

**Tabulka 6.** Chromatografické parametry separovaných analytů při nejvhodnějším složení mobilní fáze s HCOOH. Retenční faktor prvního eluujícího enantiomeru ( $k_1$ ), faktor selektivity ( $\alpha$ ), rozlišení ( $R_{1/2}$ ).

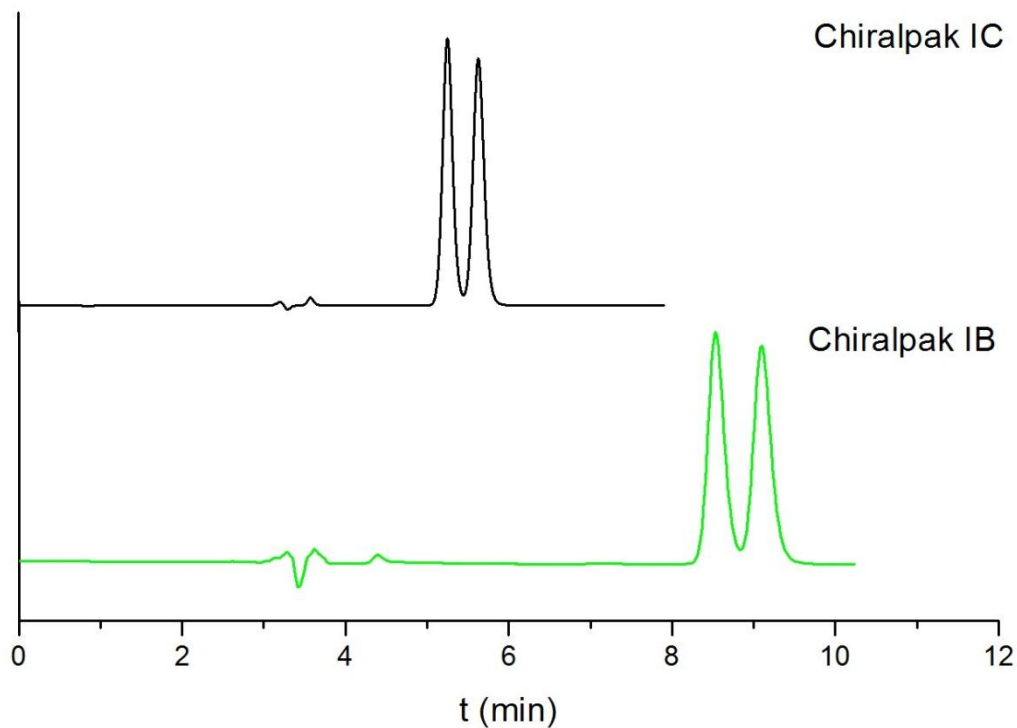
Analyt	Chiralpak	$k_1$	$\alpha$	$R_{1/2}$	Složení MF (v/v)
<b>bendroflumetiazid</b>	<b>IB</b>	14,62	1,04	1,04	ACN/HCOOH 30/70
	<b>IB</b>	21,97	1,11	1,04	MeOH/HCOOH 40/60
	<b>IC</b>	4,59	1,09	1,71	ACN/HCOOH 30/70
	<b>IC</b>	1,55	1,21	0,65	MeOH/HCOOH 60/40
<b>butizid</b>	<b>IB</b>	2,53	1,09	1,53	ACN/HCOOH 40/60
	<b>IB</b>	8,21	1,17	1,41	MeOH/HCOOH 40/60
	<b>IC</b>	1,20	1,07	1,56	ACN/HCOOH 40/60
	<b>IC</b>	1,31	1,27	1,06	MeOH/HCOOH 60/40

Z Tabulky 6 je patrné, že kolona Chiralpak IC je vhodnější pro separaci bendroflumetiazidu a butizidu. Oba analyty se podařilo separovat až na základní linii, zatímco na koloně Chiralpak IB došlo k separaci na základní linii pouze u butizidu.

Pro chirální separace na obou polysacharidových kolonách jsou pro tyto látky z hlediska retence a hodnot rozlišení vhodnější mobilní fáze tvořené acetonitrilem.

Na Obrázku 6 jsou ukázány chirální separace butizidu na obou kolonách při použití mobilní fáze ACN/HCOOH (pH 2,1) 40/60 (v/v).

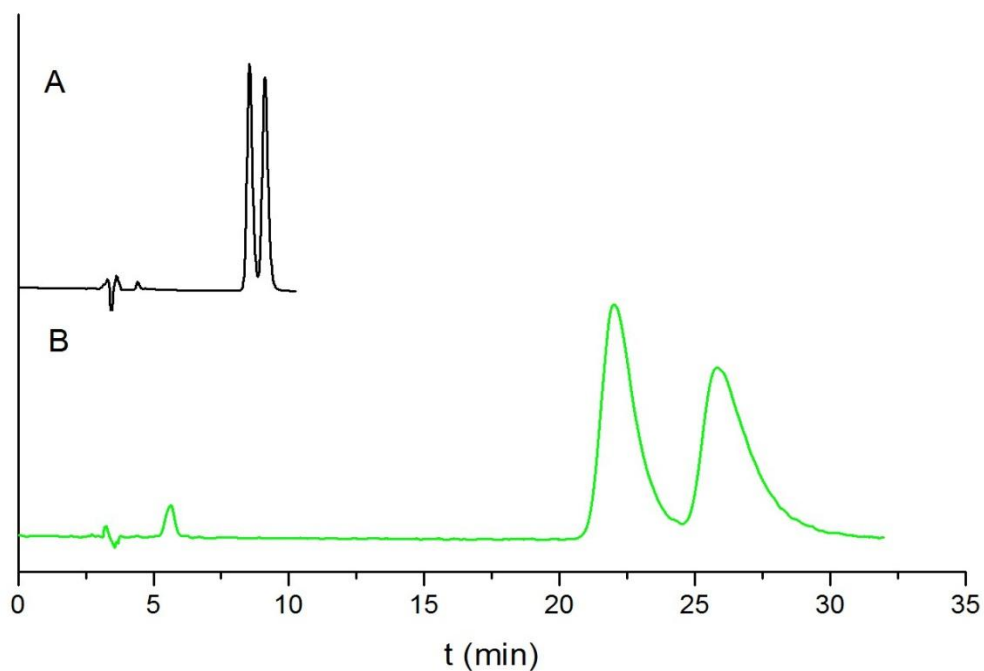
Z Obrázku 6 a Tabulky 6 je patrné, že lze dosáhnout stejného rozlišení enantiomerů butizidu na obou kolonách při stejném složení MF, ale při delší době analýzy na koloně Chiralpak IB.



**Obrázek 6.** Chromatogramy separace butizidu na kolonách Chiralpak IB a Chiralpak IC, složení mobilní fáze ACN/HCOOH (pH 2,1) 40/60 (v/v).

Lze také říci, že MeOH jako složka mobilní fáze má nepříznivý vliv na tvar píků. Symetrie píků je výrazně horší v mobilních fázích s MeOH v porovnání s mobilními fázemi s ACN (viz. Obrázek 7). K rozmývání píků vlivem MeOH dochází na obou kolonách.





**Obrázek 7.** Chromatogramy separace butirididu na koloně Chiralpak IB, složení mobilní fáze A: ACN/HCOOH (pH 2,1) 40/60 (v/v) a B: MeOH/HCOOH (pH 2,1) 40/60 (v/v).

#### 4.2.2 Mobilní fáze s 10 mM pufr (pH 8,8)

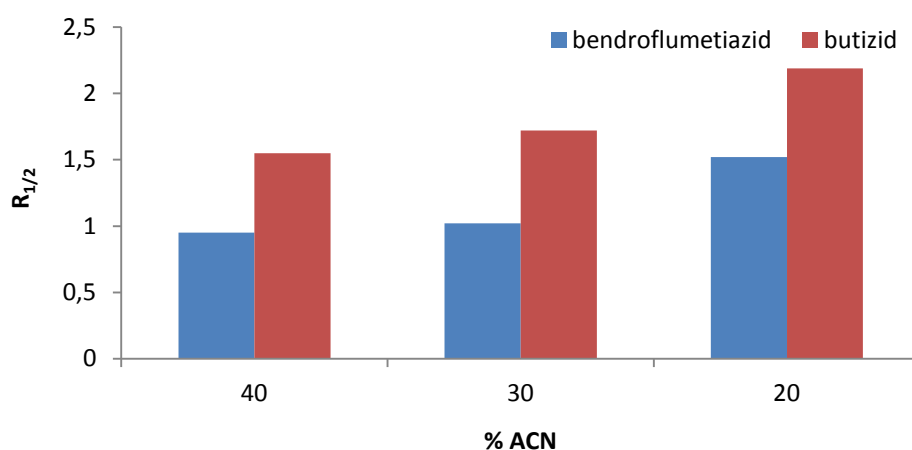
Další mobilní fáze, která byla zkoušena, obsahovala 10 mM pufr (pH 8,8) s ACN jako organickým modifikátorem. Byla zkoušena i MF s methanolem, ale výsledky byly v porovnání s acetonitrilem výrazně horší, proto se dále používaly MF pouze s ACN.

Počáteční složení mobilní fáze bylo jako v předchozích měřeních ACN/pufr (pH 8,8) 40/60 (v/v). Získané výsledky při použití této mobilní fáze jsou shrnuty v Tabulce 7.

**Tabulka 7.** Chromatografické parametry separovaných analytů při složení mobilní fáze ACN/pufr (pH 8,8) 40/60 (v/v). Retenční faktor prvního eluujícího enantiomeru ( $k_1$ ), faktor selektivity ( $\alpha$ ), rozlišení ( $R_{1/2}$ ).

<b>Kolona Chiralpak</b>	<b>IB</b>	<b>IC</b>	<b>IB</b>	<b>IC</b>	<b>IB</b>	<b>IC</b>
<b>Analyt</b>	$k_1$		$\alpha$		$R_{1/2}$	
<b>bendroflumetiazid</b>	3,98	1,66	1,00	1,05	0,00	0,95
<b>butizid</b>	2,28	1,23	1,07	1,07	1,44	1,55
<b>chlortalidon</b>	0,92	0,68	1,00	1,00	0,00	0,00
<b>mefrusid</b>	2,96	2,04	1,00	1,00	0,00	0,00

Z Tabulky 7 je patrné, že na rozdíl od předchozí MF s vodným roztokem HCOOH (pH 2,1) dochází k separaci (částečné, nebo na základní linii) pouze butizidu na obou kolonách. Bendroflumetiazid se částečně separuje jen na koloně Chiralpak IC. Další optimalizace separace se tedy prováděla při nižším obsahu ACN v MF (30 objemových procent), kde došlo i k částečné enantioseparaci bendroflumetiazidu na koloně Chiralpak IB – viz. Obrázek 8 a Tabulka 9. Po optimalizaci chromatografických podmínek došlo na koloně Chiralpak IC k separaci na základní linii u bendroflumetiazidu i butizidu. Na Obrázku 8 je graficky znázorněn vliv množství organického modifikátoru ACN na rozlišení enantiomerů těchto dvou látek na koloně Chiralpak IC.



**Obrázek 8.** Vliv množství organického modifikátoru v mobilní fázi na rozlišení enantiomerů bendroflumetiazidu a butizidu na koloně Chiralpak IC.

#### 4.2.3 Mobilní fáze se 100 mM roztokem KPF<sub>6</sub>

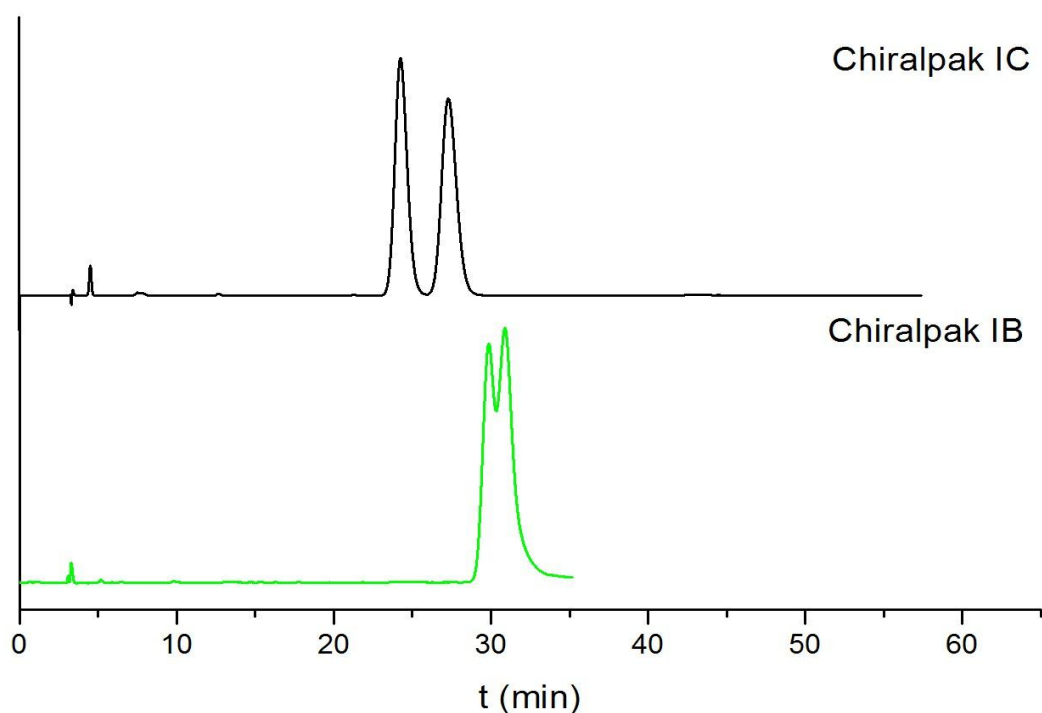
Další zkoušenou vodnou složkou v MF byl 100 mM roztok KPF<sub>6</sub>. Na koloně Chiralpak IB bylo zkoušeno složení MF ACN/100 mM KPF<sub>6</sub> 35/65 (v/v) až 20/80 (v/v), na koloně Chiralpak IC ACN/100 mM KPF<sub>6</sub> 40/60 (v/v) až 20/80 (v/v). Při použití MeOH v MF se na koloně Chiralpak IB měřilo při složení MeOH/100 mM KPF<sub>6</sub> 45/55 (v/v) až 40/60 (v/v) a pro kolonu Chiralpak IC MeOH/100 mM KPF<sub>6</sub> 55/45 (v/v) až 40/60 (v/v). Nejlepší získané výsledky na jednotlivých kolonách při různém složení mobilní fáze jsou shrnuty v Tabulce 8.

**Tabulka 8.** Chromatografické parametry separovaných analytů při různém složení mobilní fáze se 100 mM roztokem KPF<sub>6</sub>. Retenční faktor prvního elujícího enantiomeru ( $k_1$ ), faktor selektivity ( $\alpha$ ), rozlišení ( $R_{1/2}$ ).

Analyt	Chiralpak	$k_1$	$\alpha$	$R_{1/2}$	Složení MF (v/v)
bendroflumetiazid	IB	11,49	1,03	0,61	ACN/KPF <sub>6</sub> 30/70
	IB	26,24	1,12	0,84	MeOH/KPF <sub>6</sub> 40/60
	IC	9,15	1,13	1,87	ACN/KPF <sub>6</sub> 25/75

Analyt	Chiralpak	$k_1$	$\alpha$	$R_{1/2}$	Složení MF (v/v)
butizid	IB	3,11	1,09	1,56	ACN/KPF <sub>6</sub> 35/65
	IB	8,94	1,18	1,30	MeOH/KPF <sub>6</sub> 40/60
	IC	1,17	1,07	1,54	ACN/KPF <sub>6</sub> 40/60
	IC	1,92	1,23	0,56	MeOH/KPF <sub>6</sub> 55/45

Z výsledků v Tabulce 8 je opět vidět, že došlo na obou kolonách k separaci na základní linii pouze u enantiomerů butizidu v přítomnosti ACN. Na koloně Chiralpak IC došlo k separaci na základní linii i u enantiomerů bendroflumetiazidu (Obrázek 9).



**Obrázek 9.** Chromatogramy separace bendroflumetiazidu na kolonách Chiralpak IC (složení mobilní fáze ACN/KPF<sub>6</sub> 25/75(v/v)) a Chiralpak IB (složení mobilní fáze ACN/KPF<sub>6</sub> 30/70 (v/v)).

Použití MeOH jako organického modifikátoru mělo negativní vliv na separace oproti ACN. Tento efekt se projevil zejména při chirální separaci bendroflumetiazidu na koloně Chiralpak IC, kde nedošlo ani k částečné separaci.

Pro porovnání separace bifunkčních látek s odlišnými vodnými složkami v MF na obou kolonách bylo zvoleno složení MF ACN/vodná složka 30/70 (v/v), jelikož se ACN ukázal jako vhodnější organický modifikátor. Srovnání chromatografických parametrů získaných za těchto podmínek je shrnuto v Tabulce 9.

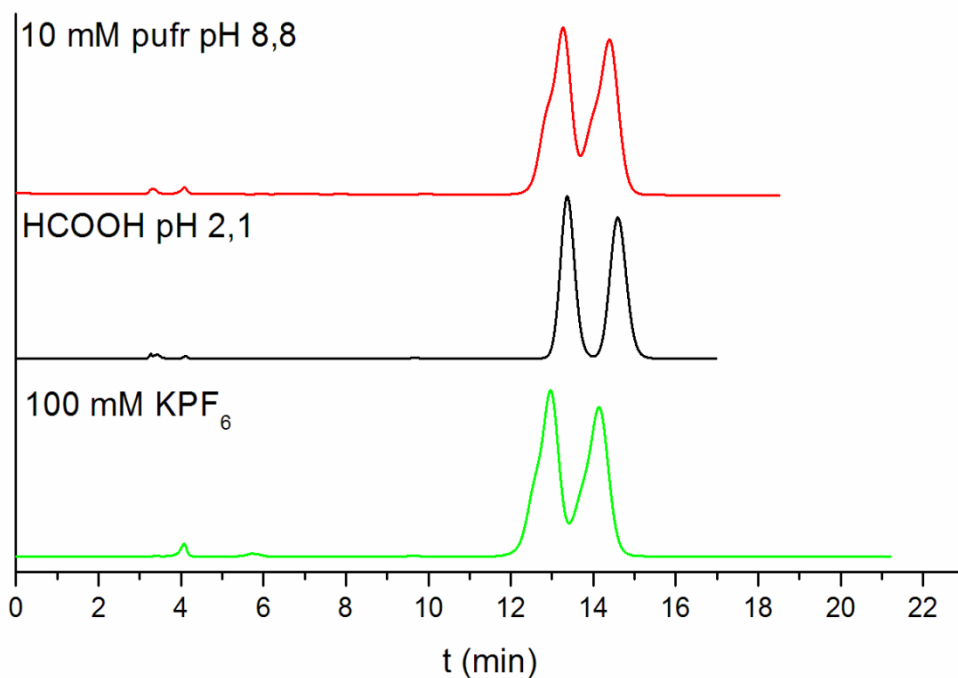
**Tabulka 9.** Chromatografické parametry separovaných analytů při složení mobilní fáze ACN/vodná složka v poměru 30/70 (v/v). Retenční faktor prvního eluujícího enantiomeru ( $k_1$ ), faktor selektivity ( $\alpha$ ), rozlišení ( $R_{1/2}$ ).

Analyt	Chiralpak	$k_1$	$\alpha$	$R_{1/2}$	Složení MF (v/v)
<b>bendroflumetiazid</b>	<b>IB</b>	14,62	1,04	1,04	ACN/HCOOH 30/70
	<b>IB</b>	12,14	1,03	0,70	ACN/PUFR 30/70
	<b>IB</b>	11,49	1,03	0,61	ACN/KPF <sub>6</sub> 30/70
	<b>IC</b>	4,59	1,09	1,71	ACN/HCOOH 30/70
	<b>IC</b>	4,55	1,08	1,02	ACN/PUFR 30/70
	<b>IC</b>	4,41	1,09	1,12	ACN/KPF <sub>6</sub> 30/70
<b>butizid</b>	<b>IB</b>	6,06	1,13	2,48	ACN/HCOOH 30/70
	<b>IB</b>	5,48	1,11	2,29	ACN/PUFR 30/70
	<b>IB</b>	4,89	1,11	2,00	ACN/KPF <sub>6</sub> 30/70
	<b>IC</b>	2,66	1,14	2,57	ACN/HCOOH 30/70
	<b>IC</b>	2,71	1,14	1,72	ACN/PUFR 30/70
	<b>IC</b>	2,61	1,14	1,77	ACN/KPF <sub>6</sub> 30/70

HCOOH=HCOOH (pH 2,1); PUFR=10 mM pufr (pH 8,8); KPF<sub>6</sub>=100 mM roztok KPF<sub>6</sub>

Z Tabulky 9 lze usoudit, že vyšší enantioselektivitu vykazuje kolona Chiralpak IC s dichlorofenylkarbamátovým substituentem na chirálním selektoru, jelikož bylo možné separovat butizid i bendroflumetiazid na základní linii, na rozdíl od kolony Chiralpak IB (dimethylfenylkarbamátový substituent). Ze sledování vlivu vodné složky na chirální

separace bifunkčních látek vyplývá, že pro obě kolony je nevhodnější vodný roztok kyseliny mravenčí z hlediska dosažených hodnot rozlišení enantiomerů a tvaru píků. U kolony Chiralpak IC je tento vliv výraznější (Obrázek 10).



**Obrázek 10.** Chromatogramy separace bendroflumetiazidu na koloně Chiralpak IC, složení mobilní fáze ACN/vodná složka 30/70 (v/v).

### 4.3 Chirální separace analytů bazické povahy

Většina z dalších třinácti chirálních látek, které byly zvoleny pro testování enantioselektivity chirálních polysacharidových stacionárních fází, patří do skupiny  $\beta$ -blokátorů. Čtyřmi dalšími látkami jsou BP 766, BP 34, thalidomid a tramadol. Pro tyto chirální látky bazické povahy byla použita mobilní fáze obsahující 10 mM pufr (pH 8,8) a nebo 100 mM roztok KPF<sub>6</sub>. Jako organický modifikátor byl použit ACN nebo MeOH.

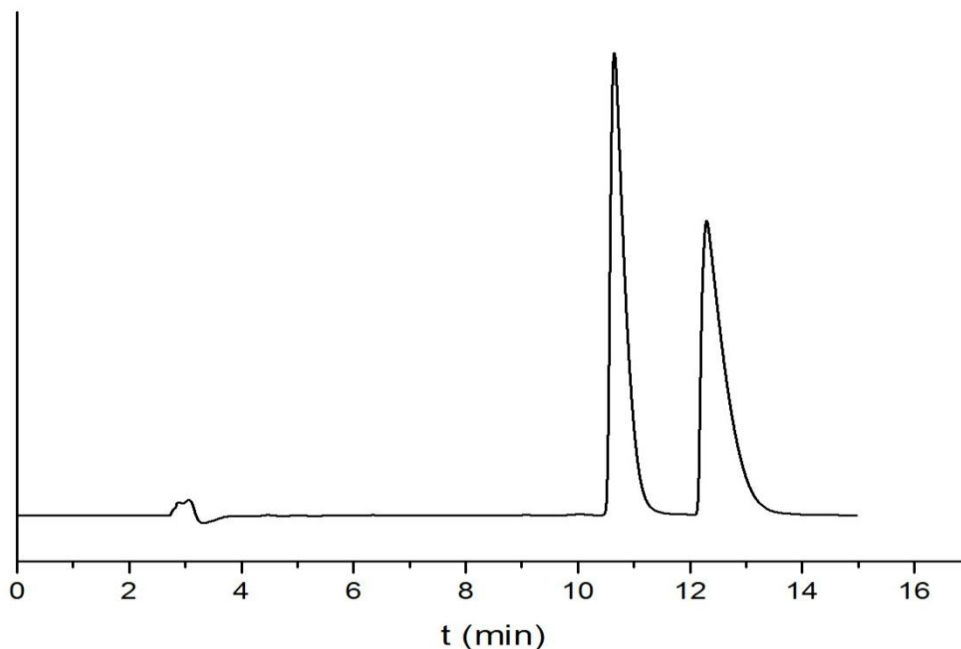
### 4.3.1 Mobilní fáze s 10 mM pufr (pH 8,8)

Pro počáteční screening látek bylo použito stejné složení MF jako v předchozích měřeních, tedy ACN/10 mM pufr (pH 8,8) 40/60 (v/v). Výsledky screeningu jsou uvedeny v Tabulce 10.

**Tabulka 10.** Chromatografické parametry separovaných analytů při složení mobilní fáze ACN/10 mM pufr (pH 8,8) 40/60 (v/v). Retenční faktor prvního eluujícího enantiomeru ( $k_1$ ), faktor selektivity ( $\alpha$ ), a rozlišení ( $R_{1/2}$ ).

Kolona Chiralpak	IB	IC	IB	IC	IB	IC
Analyt	$k_1$		$\alpha$		$R_{1/2}$	
acebutolol	3,05	1,62	1,00	1,00	0,00	0,00
alprenolol	6,16	3,04	1,00	1,00	0,00	0,00
atenolol	1,32	0,62	1,00	1,00	0,00	0,00
bopindolol	25,39	16,04	1,00	1,00	0,00	0,00
metipranolol	4,95	2,99	1,00	1,00	0,00	0,00
metoprolol	3,39	1,63	1,00	1,00	0,00	0,00
oxprenolol	4,71	1,90	1,00	1,00	0,00	0,00
pindolol	3,45	1,34	1,15	1,00	2,75	0,00
propranolol	9,03	3,66	1,02	1,00	0,25	0,00
BP 34	3,40	1,20	1,00	1,06	0,00	1,15
BP 766	3,86	1,64	1,00	1,00	0,00	0,00
thalidomid	1,56	2,19	1,00	1,00	0,00	0,00
tramadol	4,67	2,33	1,00	1,00	0,00	0,00

Při porovnání výsledků z Tabulky 10 je patrné, že se z celkového počtu třinácti analytů na koloně Chiralpak IB separoval pouze pindolol (Obrázek 11) a dále byl pozorován náznak separace u propranololu. Na rozdíl od kolony Chiralpak IC, u které došlo pouze k částečné separaci látky BP 34.



**Obrázek 11.** Chromatogram separace pindololu na koloně Chiralpak IB, složení mobilní fáze ACN/10 mM pufr (pH 8,8) 40/60 (v/v).

Při snížení obsahu ACN o deset objemových procent, tedy na 30 %, se začal u kolony Chiralpak IB částečně separovat oxprenolol a tramadol (oxprenolol  $k_I=16,21$ ,  $\alpha=1,03$ ,  $R_{I/2}=0,37$ ; tramadol  $k_I=15,21$ ,  $\alpha=1,04$ ,  $R_{I/2}=0,46$ ) a zvýšila se enantioseparace propranololu avšak na úkor značného prodloužení retence ( $k_I=37,76$ ,  $\alpha=1,05$ ,  $R_{I/2}=0,54$ ). Snížení obsahu ACN na třicet objemových procent nemělo žádný vliv na chirální separaci testovaných bazických analytů na koloně Chiralpak IC.

Byly testovány i MF obsahující jako organický modifikátor methanol, ale výsledky byly v porovnání s ACN výrazně horší, proto se dále MeOH nepoužíval. Výjimkou při měření s mobilní fází obsahující methanol byl thalidomid, který se při složení mobilní fáze MeOH/10 mM pufr (pH 8,8) 60/40 (v/v) separoval na koloně Chiralpak IC až na základní linii ( $k_I=12,02$ ,  $\alpha=1,18$ ,  $R_{I/2}=1,75$ ). Na koloně Chiralpak IB se tato látka neseperovala ani částečně.



### 4.3.2 Mobilní fáze se 100 mM roztokem KPF<sub>6</sub>

Z důvodu ne příliš pozitivních výsledků s MF obsahující pufr (pH 8,8) byla použita mobilní fáze se 100 mM roztokem KPF<sub>6</sub>, jelikož PF<sub>6</sub><sup>-</sup> v reverzním módu působí jako chaotropní činidlo (s bazickými látkami, které jsou kladně nabitě, vytváří tento aniont pár a sloučenina je tedy celkově neutrální) [41]. Jako organický modifikátor zde byl použit ACN i MeOH. Počáteční složení MF bylo zvoleno ACN/100 mM KPF<sub>6</sub> 40/60 (v/v) s výjimkou BP 34, BP 766, thalidomidu a tramadolu, které byly měřeny při složení MF ACN/100 mM KPF<sub>6</sub> 35/65 (v/v). Pro MF s MeOH se zvolilo složení MeOH/100 mM KPF<sub>6</sub> 55/45 (v/v). Výsledky počátečního měření jsou shrnuty v Tabulkách 11 a 12.

**Tabulka 11.** Chromatografické parametry separovaných analytů při složení mobilní fáze ACN/100 mM KPF<sub>6</sub> 40/60 (v/v). Retenční faktor prvního eluujícího enantiomeru ( $k_1$ ), faktor selektivity ( $\alpha$ ), rozlišení ( $R_{1/2}$ ).

Kolona Chiralpak	IB	IC	IB	IC	IB	IC
Analyt	$k_1$		$\alpha$		$R_{1/2}$	
acebutolol	1,22	0,84	1,00	1,00	0,00	0,00
alprenolol	2,50	1,23	1,00	1,00	0,00	0,00
atenolol	0,55	0,46	1,00	1,00	0,00	0,00
bopindolol	11,79	4,83	1,03	1,00	0,60	0,00
metipranolol	1,99	1,23	1,00	1,00	0,00	0,00
metoprolol	1,38	0,82	1,00	1,00	0,00	0,00
oxprenolol	2,05	1,01	1,00	1,00	0,00	0,00
pindolol	1,59	0,77	1,16	1,00	1,96	0,00
propranolol	3,34	1,44	1,06	1,00	1,06	0,00
BP 34	2,44 <sup>a</sup>	0,73	1,00	1,00	0,00	0,00
BP 766	5,41 <sup>a</sup>	1,46	1,00	1,00	0,00	0,00
thalidomid	1,99 <sup>a</sup>	2,16	1,00	1,00	0,00	0,00

Kolona Chiralpak	IB	IC	IB	IC	IB	IC
Analyt	$k_1$		$\alpha$		$R_{1/2}$	
tramadol	2,60 <sup>a</sup>	1,04	1,00	1,00	0,00	0,00

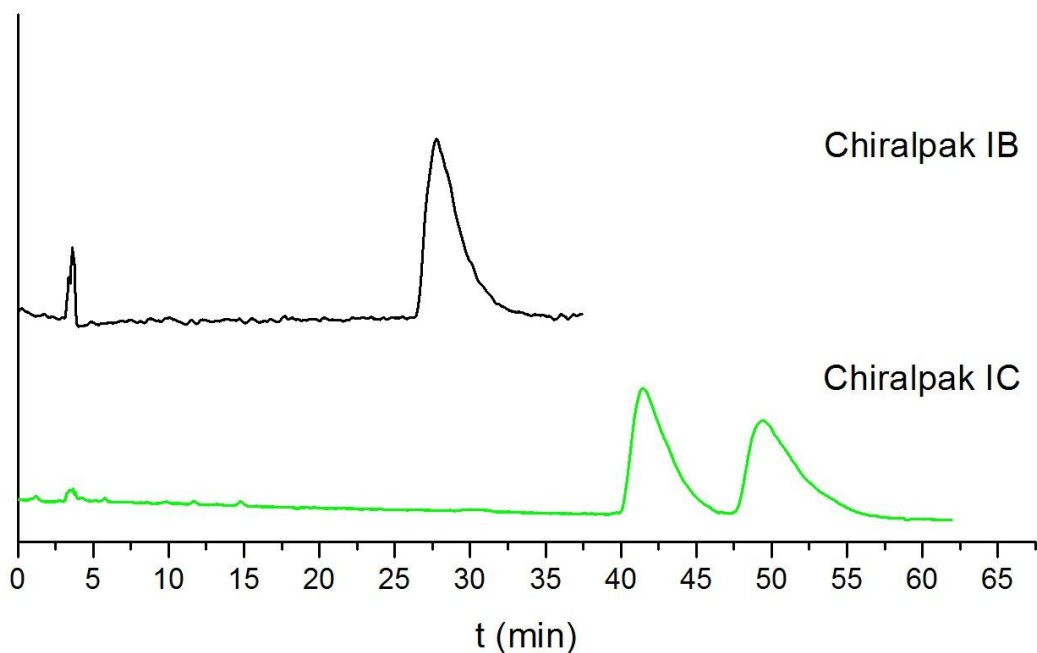
<sup>a</sup> měřeno s MF ACN/100 mM KPF<sub>6</sub> 35/65 (v/v)

**Tabulka 12.** Chromatografické parametry separovaných analytů při složení mobilní fáze MeOH/100 mM KPF<sub>6</sub> 55/45 (v/v). Retenční faktor prvního eluujícího enantiomeru ( $k_1$ ), faktor selektivity ( $\alpha$ ), rozlišení ( $R_{1/2}$ ).

Kolona Chiralpak	IB	IC	IB	IC	IB	IC
Analyt	$k_1$		$\alpha$		$R_{1/2}$	
acebutolol	1,09	1,53	1,00	1,00	0,00	0,00
alprenolol	1,70	1,43	1,00	1,00	0,00	0,00
atenolol	– <sup>a</sup>	0,45	– <sup>a</sup>	1,00	– <sup>a</sup>	0,00
bopindolol	14,26	12,93	1,13	1,00	0,73	0,00
metipranolol	1,46	2,36	1,00	1,00	0,00	0,00
metoprolol	1,06	1,32	1,00	1,00	0,00	0,00
oxprenolol	1,51	1,50	1,04	1,00	0,35	0,00
pindolol	1,57	0,88	1,29	1,00	2,38	0,00
propranolol	4,13	1,80	1,15	1,00	1,27	0,00
BP 34	2,24	0,64	1,00	1,00	0,00	0,00
BP 766	4,85	1,82	1,00	1,00	0,00	0,00
thalidomid	3,88	16,35	1,00	1,19	0,00	1,56
tramadol	1,24	1,24	1,05	1,00	0,46	0,00

<sup>a</sup> látka eluovala se systémovým píkem

Po porovnání výsledků v Tabulkách 11 a 12 je patrné, že MF obsahující MeOH byla vhodnější pro separaci bazických látek a to zejména u kolony Chiralpak IB, kde se (částečně, nebo na základní linii) separovalo pět látek, zatímco u kolony Chiralpak IC došlo pouze k separaci thalidomidu. Na Obrázku 12 je zobrazeno porovnání separací thalidomidu na koloně Chiralpak IC, kde se tato látka separuje až na základní linii na rozdíl od kolony Chiralpak IB, kde se tato látka neseparuje.

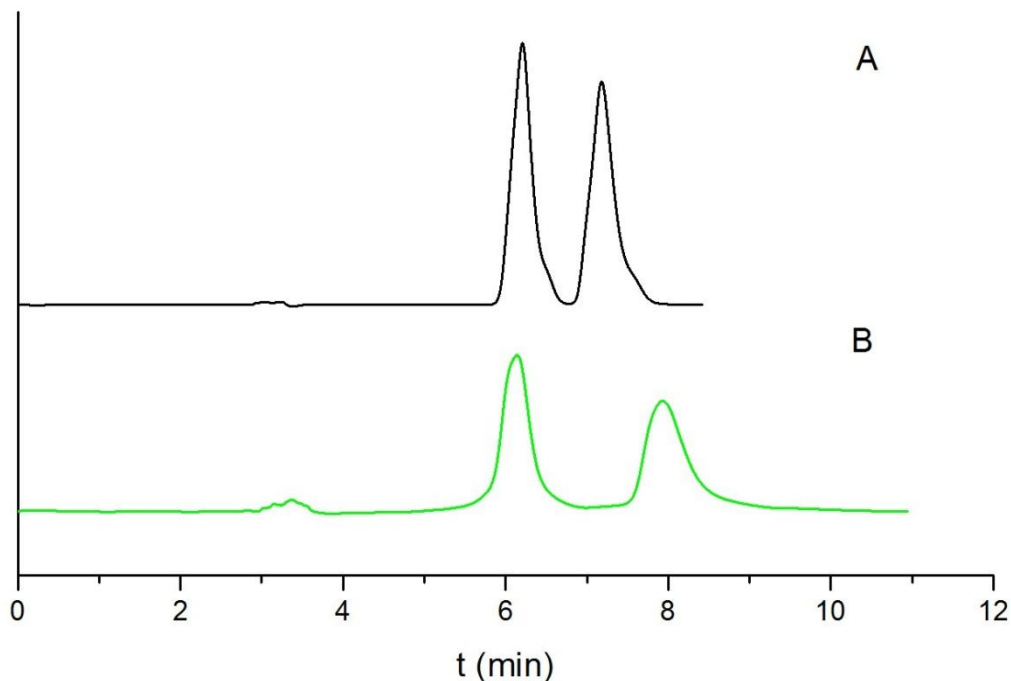


**Obrázek 12.** Chromatogramy separace thalidomidu na kolonách Chiralpak IB (složení mobilní fáze MeOH/100 mM KPF<sub>6</sub> 40/60 (v/v)) a Chiralpak IC (složení mobilní fáze MeOH/100 mM KPF<sub>6</sub> 55/45 (v/v)).

Při použití MF obsahující ACN jako organický modifikátor nedošlo na koloně Chiralpak IC k žádné separaci, na rozdíl od kolony Chiralpak IB, kde došlo k částečné separaci propranololu a bopindololu a k separaci pindololu na základní linii.

Jak je z výsledků patrné, tak mobilní fáze obsahující MeOH jako organický modifikátor, má pozitivní vliv na enantioseparaci na koloně Chiralpak IC pouze u thalidomidu. Naopak u kolony Chiralpak IB je vidět částečná separace dalších čtyř analytů v porovnání s MF obsahující ACN a opět separace pindololu na základní linii.

Konkrétně u separace pindololu je patrné lepší rozlišení a tvar píků při použití mobilní fáze s MeOH než s ACN při stejné době analýzy (Obrázek 13).



**Obrázek 13.** Chromatogramy separace pindololu na koloně Chiralpak IB, složení mobilní fáze A: ACN/100 mM KPF<sub>6</sub> 40/60 (v/v) a B: MeOH/100 mM KPF<sub>6</sub> 55/45 (v/v).

Vzhledem k dosaženým výsledkům za výše uvedených podmínek bylo dále optimalizováno složení mobilní fáze snížením obsahu organického modifikátoru. Pro MF obsahující acetonitril bylo měřeno při složení ACN/100 mM KPF<sub>6</sub> v rozmezí 30/70-15/85 (v/v). Pro MF obsahující methanol bylo zvoleno složení MeOH/100 mM KPF<sub>6</sub> 40/60 (v/v). Výsledky získané v různých mobilních fázích jsou shrnuty v Tabulce 13.

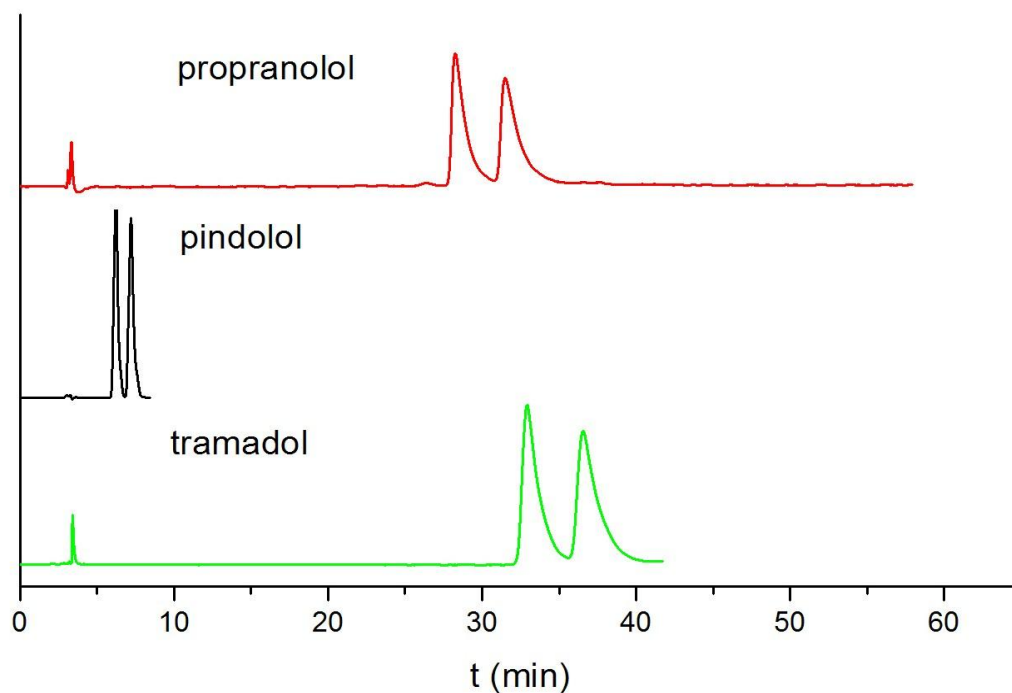
**Tabulka 13.** Chromatografické parametry separovaných analytů při různém složení mobilní fáze se 100 mM roztokem KPF<sub>6</sub>. Retenční faktor prvního eluujícího enantiomeru ( $k_1$ ), faktor selektivity ( $\alpha$ ), rozlišení ( $R_{1/2}$ ).

Analyt	Chiralpak	$k_1$	$\alpha$	$R_{1/2}$	Složení MF (v/v)
<b>alprenolol</b>	<b>IB</b>	27,80	1,04	0,79	ACN/KPF <sub>6</sub> 20/80
	<b>IB</b>	8,21	1,05	0,60	MeOH/KPF <sub>6</sub> 40/60
<b>bopindolol</b>	<b>IB</b>	26,30	1,05	0,81	ACN/KPF <sub>6</sub> 35/65
	<b>IB</b>	14,26	1,13	0,73	MeOH/KPF <sub>6</sub> 55/45
	<b>IC</b>	25,65	1,12	0,65	ACN/KPF <sub>6</sub> 30/70
<b>metoprolol</b>	<b>IB</b>	8,71	1,05	0,93	ACN/KPF <sub>6</sub> 20/80
	<b>IB</b>	3,52	1,04	0,48	MeOH/KPF <sub>6</sub> 40/60
<b>oxprenolol</b>	<b>IB</b>	18,77	1,08	1,39	ACN/KPF <sub>6</sub> 20/80
	<b>IB</b>	6,49	1,11	1,08	MeOH/KPF <sub>6</sub> 40/60
<b>pindolol</b>	<b>IB</b>	1,59	1,16	1,96	ACN/KPF <sub>6</sub> 40/60
	<b>IB</b>	1,57	1,29	2,38	MeOH/KPF <sub>6</sub> 55/45
<b>propranolol</b>	<b>IB</b>	10,81	1,11	1,97	ACN/KPF <sub>6</sub> 30/70
	<b>IB</b>	11,81	1,16	1,35	MeOH/KPF <sub>6</sub> 45/55
<b>thalidomid</b>	<b>IC</b>	16,35	1,19	1,56	MeOH/KPF <sub>6</sub> 55/45
<b>tramadol</b>	<b>IB</b>	12,77	1,11	1,87	ACN/KPF <sub>6</sub> 20/80
	<b>IB</b>	3,99	1,14	1,38	MeOH/KPF <sub>6</sub> 40/60

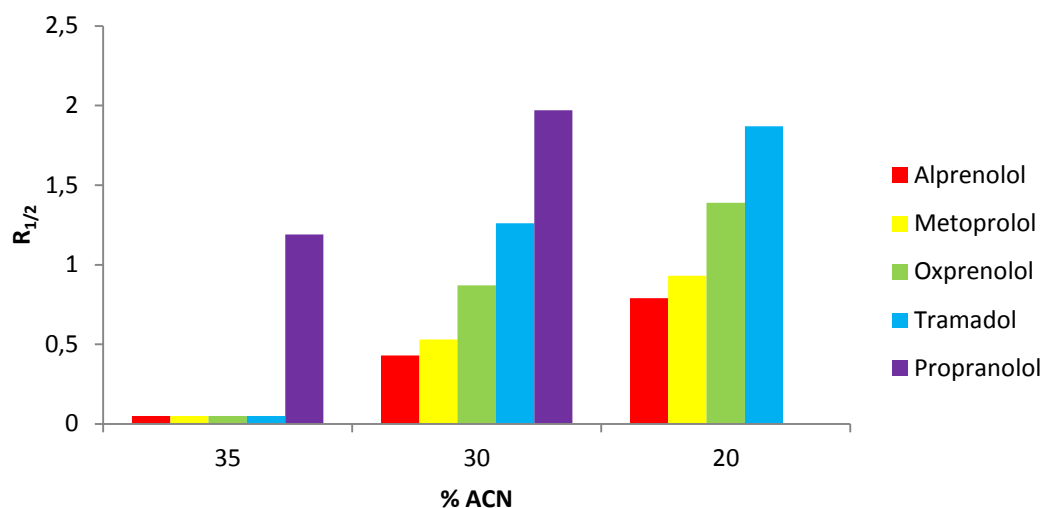
KPF<sub>6</sub>=100 mM roztok KPF<sub>6</sub>

Z Tabulky 13 je patrné, že na koloně Chiralpak IC se na základní linii separoval pouze thalidomid a k částečné separaci došlo pouze u bopindololu. Naopak kolona Chiralpak IB vykazovala vyšší enantioselektivitu pro zkoumané látky. Na základní linii se na této koloně obsahující dimethylfenylkarbamát separoval pindolol, propranolol a tramadol (Obrázek 14). U dalších čtyř látek došlo k částečné separaci (alprenolol,

bopindolol, metoprolol, oxprenolol). Vliv množství organického modifikátoru ACN na rozlišení těchto separovaných látek je zobrazen na Obrázku 15.



**Obrázek 14.** Chromatogramy separace pindololu (složení mobilní fáze ACN/100 mM  $\text{KPF}_6$  40/60 (v/v)), propranololu (složení mobilní fáze ACN/100 mM  $\text{KPF}_6$  30/70 (v/v)), tramadolu (složení mobilní fáze ACN/100 mM  $\text{KPF}_6$  20/80 (v/v)) na koloně Chiralpak IB.



**Obrázek 15.** Vliv organického modifikátoru na rozlišení separovaných látek (kolona Chiralpak IB), složení mobilní fáze ACN/100 mM  $KPF_6$  v různých objemových procentech.

Z předchozích výsledků je patrné, že se chaotropní efekt  $KPF_6$  uplatnil především u enantioseparací bazických analytů na koloně Chiralpak IB, na které se zvýšil enantioseparační potenciál v porovnání s chirální separací za přítomnosti 10 mM pufru (pH 8,8).

## 5 Závěr

Byla porovnána enantioselektivita dvou CSP na bázi derivatizované celulosy-tris(3,5dimethylfenylkarbamát) celulosy a tris(3,5dichlorofenylkarbamát) celulosy imobilizované na silikagelový nosič (kolony Chiralpak IB a Chiralpak IC) v reverzním módu HPLC. Schopnost enantioseparace jednotlivých kolon se lišila v závislosti na povaze analytů a použitých mobilních fází.

Pro látky kyselé povahy vykazovala o něco vyšší enantioselektivitu kolona Chiralpak IC s chirálním selektorem dichlorofenylkarbamátem celulosy a to především pro blokované aminokyseliny, které byly všechny separovány na základní linii společně se suprofenem a dalších pět látek bylo separováno částečně (fenoprofen, indoprofen, ibuprofen, ketoprofen, tiaprofenová kyselina). Na koloně Chiralpak IB došlo k částečné separaci u sedmi analytů (fenoprofen, flurbiprofen, ibuprofen, indoprofen a všech třech blokovaných aminokyselin) a k separaci na základní linii došlo u karprofenu. Jako vhodnější organický modifikátor se prokázal acetonitril v porovnání s methanolem na obou kolonách.

Pro látky bifunkční povahy byla opět vhodnější kolona Chiralpak IC, na které došlo k chirální separaci dvou látek (bendorflumetiazid a butizid), kdežto u kolony Chiralpak IB se bendroflumetiazid podařilo separovat pouze částečně. Ani jedna kolona nebyla vhodná k chirální separaci zbylých dvou diuretik (mefrusid a chlortalidon). Nejvhodnější vodnou složkou mobilní fáze byl vodný roztok kyseliny mravenčí (pH 2,1). Jako vhodnější organický modifikátor se opět prokázal acetonitril v porovnání s methanolem na obou kolonách.

Vyšší enantioselektivitu vykazovala kolona Chiralpak IB pro látky bazické povahy. Z celkového počtu třinácti analytů se na této koloně s chirálním selektorem dimethylfenylkarbamátem celulosy podařilo separovat na základní linii tři látky (pindolol, propranolol a tramadol) a další čtyři látky částečně (alprenolol, bopindolol, metoprolol a oxprenolol). Na koloně Chiralpak IC došlo k chirální separaci na základní linii pouze u thalidomidu a k částečné sepraci u dalších dvou látek (bopindolol a BP 34). V porovnání s použitými vodnými složkami se ukázal 100 mM roztok KPF<sub>6</sub> jako nejvhodnější pro chirální separace bazických látek. Při porovnání organických modifikátorů ACN a MeOH byl o něco vhodnější acetonitril pro obě polysacharidové kolony.



Na koloně Chiralpak IB bylo tedy z celkového počtu 28-mi chirálních analytů částečně separováno dvanáct a na základní linii pět chirálních látek a na koloně Chiralpak IC bylo sedm látek separováno částečně a sedm chirálních látek na základní linii.

Ze získaných výsledků je patrné, že kolony Chiralpak IB a Chiralpak IC jsou k sobě komplementární. Zatímco kolona Chiralpak IC je vhodnější pro chirální separace bifunkčních analytů a analytů kyselého povahy, kolona Chiralpak IB vykazuje vyšší enantioselektivitu pro analyty bazické povahy.

## 6 Použitá literatura

1. **Ikai T., Yamamoto Ch., Kamigaito M., Okamoto Y.:** Immobilized-type chiral packing materials for HPLC based on polysaccharide derivatives. *Journal of Chromatography B* **875**, 2-11 (2008).
2. **Chankvetadze B.:** Recent developments on polysaccharide-based chiral stationary phases for liquid-phase separation of enantiomers. *Journal of Chromatography A* **1269**, 26-51 (2012).
3. **Sobotníková J., Bosáková Z., Čabala R., Coufal P., Pacáková V., Štulík K.:** Historie, současnost a perspektivy analytických separačních metod na katedře Analytické chemie Přírodovědecké fakulty Univerzity Karlovy v Praze. *Chemické Listy* **104**, 1226-1231 (2010).
4. **Červinka O.:** Chiralita a pojmy s ní související. *Chemické Listy* **93**, 294-305 (1999).
5. **kolektiv autorů:** Analýza chirálních sloučenin. *Pražské analytické centrum inovací*, Praha (2007).
6. **Maier N. M., Franco P., Lindner W.:** Separation of enantiomers: needs, challenges, perspectives. *Journal of Chromatography A* **906**, 3-33 (2001).
7. **Rentsch M. K.:** The importance of stereoselective determination of drugs in the clinical laboratory. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* **54**, 1-9 (2002).
8. **Plotka J. M., Biziuk M., Morrison C., Namieśnik J.:** Pharmaceutical and forensic drug applications of chiral supercritical fluid chromatography. *Trends in Analytical Chemistry* **56**, 74-89 (2014).
9. **Coufal P.:** Separační metody. [Online] <http://web.natur.cuni.cz/~pcoufal/hplc.html> [Citace: 3. květen 2014].
10. **Cavazzini A., Pasti L., Massi A., Marchetti N., Dondi F.:** Recent applications in chiral high performance liquid chromatography: A review. *Analytica Chimica Acta* **706**, 205-222 (2011).
11. **Lämmerhofer M.:** Chiral recognition by enantioselective liquid chromatography: Mechanism and modern chiral stationary phases. *Journal of Chromatography A* **1217**, 814-856 (2010).
12. **Lämmerhofer M., Lindner W.:** Recent developments in liquid chromatographic enantioseparation. *Handbook of Analytical Separations vol.I* (2000).
13. **Ali I., Kumerer K., Aboul-Enein H. Y.:** Mechanistic Principles in Chiral Separations Using Liquid Chromatography and Capillary Electrophoresis. *Chromatographia* **63**, 295-307 (2006).

14. **Tang M., Zhang J., Zhuang S., Liu W.:** Development of chiral stationary phases for high-performance liquid chromatographic separation. *Trends in Analytical Chemistry* **39**, 180-194 (2012).
15. **Yashima E.:** Polysaccharide-based chiral stationary phases for high-performance liquid chromatographic enantioseparation. *Journal of Chromatography A* **906**, 105-125 (2001).
16. **Juvancz Z.:** The role of cyclodextrins in chiral selective chromatography. *Trends in Analytical Chemistry* **21**, 379-388 (2002).
17. **Sun P., Armstrong D. W.:** Effective enantiomeric separations of racemic primary amines by the isopropyl carbamate-cyclofructan6 chiral stationary phase. *Journal of Chromatography A* **1217**, 4904-4918 (2010).
18. **Haginaka J.:** Recent progresses in protein-based chiral stationary phases for enantioseparations in liquid chromatography. *Journal of Chromatography B* **875**, 12-19 (2008).
19. **Ward T. J., Farris A. B.:** Chiral separations using the macrocyclic antibiotics: A review. *Journal of Chromatography A* **906**, 73-89 (2001).
20. **Franco P., Zhang T.:** Common approaches for efficient method development with immobilised polysaccharide-derived chiral stationary phases. *Journal of Chromatography B* **875**, 48-56 (2008).
21. **Zhang T., Nguyen D., Franco P.:** Enantiomer resolution screening strategy using multiple immobilised polysaccharide-based chiral stationary phases. *Journal of Chromatography A* **1191**, 214-222 (2008).
22. **Chen X., Yamamoto Ch., Okamoto Y.:** Polysaccharide derivatives as useful chiral stationary phases in high-performance liquid chromatography. *Pure and Applied Chemistry* **79**, 1561-1573 (2007).
23. **Franco P., Senso A., Oliveros L., Minguillón C.:** Covalently bonded polysaccharide derivatives as chiral stationary phases in high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A* **906**, 155-170 (2001).
24. **Zhang T., Nguyen D., Franco P., Isobe Y., Michishita T., Murakami T.:** Cellulose tris(3,5-dichlorophenylcarbamate) immobilised on silica: A novel chiral stationary phase for resolution of enantiomers. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **46**, 882-891 (2008).
25. **Zhang T., Franco P., Nguyen D., Hamasaki R., Miyamoto S., Ohnishi A., Murakami T.:** Complementary enantiorecognition patterns and specific method optimization aspects on immobilized polysaccharide-derived chiral stationary phases. *Journal of Chromatography A* **1269**, 178-188 (2012).

26. **Younes A. A., Ates H., Mangelings D., Vander Heyden Y.:** A separation strategy combining three HPLC modes and polysaccharide-based chiral stationary phases. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **75**, 74-85 (2013).
27. **Kučerová G., Vozka J., Kalíková K., Geryk R., Plecítá D., Pajpanova T., Tesařová E.:** Enantioselective separation of unusual amino acids by high performance liquid chromatography. *Separation and Purification Technology* **119**, 123-128 (2013).
28. **Zhang T., Nguyen D., Franco P., Murakami T., Ohnishi A., Kurosawa H.:** Cellulose 3,5-dimethylphenylcarbamate immobilized on silica A new chiral stationary phase for the analysis of enantiomers. *Analytica Chimica Acta* **557**, 221-228 (2006).
29. **Matthijs N., Perrin C., Maftouh M., Massart D. L., Vander Heyden Y.:** Definition and system implementation of strategies for method development of chiral separations in normal- or reversed-phase liquid chromatography using polysaccharide-based stationary phases. *Journal of Chromatography A* **1041**, 119-133 (2004).
30. **Perrin C., Vu V. A., Matthijs N., Maftouh M., Massart D. L., Vander Heyden Y.:** Screening approach for chiral separation of pharmaceuticals Part I. Normal-phase liquid chromatography. *Journal of Chromatography A* **947**, 69-83 (2002).
31. **Tachibana K., Ohnishi A.:** Reversed-phase liquid chromatographic separation of enantiomers on polysaccharide type chiral stationary phases. *Journal of Chromatography A* **906**, 127-154 (2001).
32. **Perrin C., Matthijs N., Mangelings D., Granier-Loyaux C., Maftouh M., Massart D. L., Vander Heyden Y.:** Screening approach for chiral separation of pharmaceuticals Part II. Reversed-phase liquid chromatography. *Journal of Chromatography A* **966**, 119-134 (2002).
33. **Zhang T., Nguyen D., Franco P.:** Reversed-phase screening strategies for liquid chromatography on polysaccharide-derived chiral stationary phases. *Journal of Chromatography A* **1217**, 1048-1055 (2010).
34. **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. *Journal of Chromatography A* **1088**, 82-93 (2005).
35. **Tesařová E., Bosáková Z., Pacáková V.:** Comparison of enantioselective separation of N-tert.-butyloxycarbonyl amino acids and their non-blocked analogues on teicoplanin-based chiral stationary phase. *Journal of Chromatography A* **838**, 121-129 (1999).
36. **Ali I., Gaitonde V. D., Aboul-Enein H. Y., Hussain A.:** Chiral separation of  $\beta$ -adrenergic blockers on CelluCoat column by HPLC. *Talanta* **78**, 458-463 (2009).

37. The database and ontology of Chemical Entities of Biological Interest. [Online]  
<http://www.ebi.ac.uk/chebi/searchId.do?chebiId=CHEBI:75731>  
[Citace: 3. květen 2014]
38. Information for chemistry teachers. [Online]  
<http://www3.fed.cuhk.edu.hk/chemistry/files/chiraldrug.pdf> [Citace: 3. květen 2014]
39. **Sovak M., Seligson A. L., Kucerova R., Bienova M., Hajduch M., Bucek M.:** Fluridil, a Rationally Designed Topical Agent for Androgenetic Alopecia: First Clinical Experience. *Dermatologic Surgery* **28**, 678-685 (2002).
40. **Visegrády B., Konecsni T., Grobuschek N., Schmid M. G., Kilár F., Aboul-Enein H. Y., Gübitz G.:** Chiral separation of thiazide diuretics by HPLC on Chiralcel OD-RH, Chiralcel OJ-R and Chirobiotic-T phases. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* **53**, 15-24 (2002).
41. **Phechkrajang C. M.:** Chaotropic Effect in Reversed-phase HPLC:A Review. *Mahidol University Journal of Pharmaceutical Science* **37**, 1-7 (2010).