

Univerzita Karlova v Praze  
Přírodovědecká fakulta  
Katedra fyzikální a makromolekulární chemie  
Klinická a toxikologická analýza

**Studium retence a enantioseparace  
(±)-cloprostenolu  
na CSP na bázi teikoplanin aglykonu  
v HPLC**

Diplomová práce

Praha 2006

Miroslava Hradiská

## KLÍČOVÁ SLOVA

HPLC

makrocyclická antibiotika

teikoplanin aglykon

chirální separace

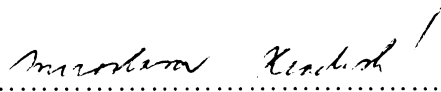
cloprostenol

## Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracovala samostatně, pod vedením školitelky Doc. RNDr. Evy Tesařové, CSc., a že jsem všechny použité prameny řádně citovala.

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.....5.5.2006.....

  
.....

podpis

Velmi ráda bych na tomto místě poděkovala především své školitelce Doc. RNDr. Evě Tesařové, CSc. za odborné vedení této práce a všestrannou pomoc při sestavování rukopisu. Dále bych chtěla velmi poděkovat Mgr. Květě Kalíkové za cenné rady a připomínky k předkládanému textu, její vstřícnost a pomoc kdykoliv bylo třeba.

# OBSAH

Seznam použitých zkratek	3
1. Úvod	4
2. Teoretická část	6
2.1. Základní pojmy spojené s chiralitou sloučenin	6
2.2. Odlišnost chování optických izomerů	7
2.3. Princip chirální separace	8
2.3.1. Chirální mobilní fáze	9
2.3.2. Chirální stacionární fáze	9
2.4. Makrocyclická antibiotika	10
2.4.1. Teikoplanin	11
2.4.2. Teikoplanin aglykon	12
2.5. Separační módy	14
2.5.1. Polárně-organický mód	14
2.5.2. Reverzní mód	14
2.5.3. Normální mód	15
2.6. Vliv teploty na separaci	15
2.7. Prostanoidy - syntetické prostaglandiny	15
2.7.1. Cloprostenol	16
3. Cíl práce	18
4. Experimentální část	19
4.1. Přístroje a pomůcky	19
4.2. Použité chemikálie	19
4.3. Příprava vzorků	20
4.4. Reverzní mód	20
4.4.1. Mobilní fáze pro reverzní mód	20
4.4.2. Podmínky separace v reverzním módu	20
4.5. Polárně-organický mód	21
4.5.1. Mobilní fáze pro polárně-organický mód	21
4.5.2. Podmínky separace v polárně-organickém módu	22
4.6. Normální mód	23

4.6.1. Mobilní fáze pro normální mód	23
4.6.2. Podmínky separace v normálním módu	23
5. Výsledky a diskuze	25
5.1. Enantioseparace cloprstenolu v reverzním separačním módu	25
5.1.1. Vliv methanolu v mobilní fázi na retenci a rozlišení	25
5.1.2. Enantioseparace cloprostenolu v mobilní fázi při změně pH použitého pufru	26
5.2. Enantioseparace cloprostenolu v polárně organickém módu	27
5.2.1. Retenční data při změně obsahu methanolu v mobilní fázi	27
5.2.2. Ovlivnění chirální separace cloprostenolu změnou koncentrace a poměru octové kyseliny a triethylaminu v mobilní fázi	30
5.2.3. Ovlivnění retence, rozlišení a selektivity změnou teploty	31
5.2.4. Vliv průtokové rychlosti mobilní fáze na retenci a rozlišení	33
5.2.5. Přídavek soli trifluoroctové kyseliny do mobilní fáze	34
5.2.6. Vliv účinnosti separačního systému na rozlišení enantiomerů	35
5.2.7. Eluční pořadí enantiomerů cloprostenolu v polárně-organickém módu	37
5.3. Enantioseparace v normálním módu	37
5.3.1. Vliv octové kyseliny v mobilní fázi	38
5.3.2. Vliv polárnějšího rozpouštědla v mobilní fázi	39
5.3.3. Vliv účinnosti kolony na rozlišení	41
5.3.4. Ovlivnění chirální separace cloprostenolu působením teploty	42
5.3.5. Ovlivnění enantioseparace cloprostenolu přídavkem octové kyseliny a triethylaminu	43
5.3.6. Eluční pořadí enantiomerů cloprostenolu v normálním módu	45
6. Závěr	47
7. Literatura	48

## SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

ACN: acetonitril

AMK: aminokyselina

CE: kapilární elektroforéza

CS: chirální selektor

CSP: chirální stacionární fáze

EP<sub>2</sub>: receptor selektivní pro PGE<sub>2</sub>

FP: receptor selektivní pro PGF<sub>2 $\alpha$</sub>

HAc: octová kyselina

HPLC: vysokoúčinná kapalinová chromatografie

*k*: retenční faktor

MA: makrocystická antibiotika

MeOH: methanol

*n*: počet teoretických pater

PGE<sub>2</sub>: prostaglandin E<sub>2</sub>

PGF<sub>2 $\alpha$</sub> : prostaglandin F<sub>2 $\alpha$</sub>

R A: ristocetin A

*R*: rozlišení

RP HPLC: reverzní mód vysokoúčinné kapalinové chromatografie

*t*: retenční čas

*T*: teplota

T: teikoplanin

TAG CSP: chirální stacionární fáze s navázaným teikoplanin aglykonem

TAG: teikoplanin aglykon

TEA: triethylamin

TEAA: triethylaminoctanový pufr

TLC: chromatografie na tenké vrstvě

*u*: průtoková rychlost mobilní fáze

V: vankomycin

$\alpha$ : faktor selektivity

## 1. ÚVOD

Přírodní látky často vykazují optickou aktivitu. Rovněž živý organizmus není výjimkou a představuje komplexní soustavu chirálních komponent. Proto mohou mít enantiomery rozdílné účinky na lidský organizmus<sup>1</sup>. S chiralitou se setkáváme u více než poloviny užívaných léčiv. Rozdílné interakce enantiomerů chirálních léčiv v chirálním prostředí organismů mohou mít za následek jejich odlišné farmaceutické vlastnosti. Tyto vlastnosti musí být rozpoznány před možným použitím farmaceutických přípravků. Více než 80% syntetických chirálních léčiv je vyráběno a předepisováno ve formě racemátů, tj. ekvimolárních směsí enantiomerů. Většinou pouze jeden z izomerů vykazuje žádoucí terapeutické účinky, a druhý musí být považován za tzv. izomerní balast<sup>2</sup>.

V polovině 80. let začali odborníci uvažovat nejednotný charakter chirálních léčiv a racemátu léčiva, který bývá nejčastějším případem chirálního léčiva, a pohlížet na něj jako na směs dvou látek, které se chovají v chirálním prostředí živých organismů rozdílně<sup>3,4</sup>. Počátkem 90. let byla formulována vědci a farmaceutickými výrobci stanoviska k problematice „enantiomer *versus* racemát“, orientovaná ve prospěch enantiomerně čistých léčiv. V současné době roste počet léčiv vyvinutých a vyráběných ve formě čistých enantiomerů. U těchto léčiv se nežádoucí enantiomery řadí mezi organické nečistoty léčiva. Přijatá mezinárodní směrnice požaduje, aby všechny nečistoty vyskytující se v množství nad 0,1% byly identifikovány, a aby byla ověřena jejich biologická bezpečnost v toxikologických studiích.

Se studiem farmakologických vlastností enantiomerů chirálních léčiv a vývojem enantiomerně čistých léčiv byl spojen i mohutný rozvoj syntetických postupů, izolace enantiomerů, a především stereoselektivní analytické metodologie<sup>2</sup>. Enantioselektivní separační metody jsou používány pro separace enantiomerů. Z této velké skupiny moderních metod se při separacích a stanoveních enantiomerů nejúspěšněji a nejhojněji uplatňují metody vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC) a kapilární elektroforézy (CE). Tyto metody jsou založeny buď na přímých separacích probíhajících v chirálním systému, nebo na nepřímých separacích, které probíhají v achirálním systému, ale vlastní separaci předchází derivatizace chirálním činidlem. Chirální kapalinová chromatografie je vhodná separační technika, která může být



použita během procesu vývoje léčiv stejně jako pro studium farmakologických vlastností každého enantiomeru. Nejčastěji je používána přímá separace na chirálních stacionárních fázích (CSP), jejichž výběr je velice rozmanitý a je stále obohacován vývojem nových CSP s novými či modifikovanými chirálními selektory.

## 2. TEORETICKÁ ČÁST

### 2.1. Základní pojmy spojené s chiralitou sloučenin

Konformační a konfigurační vzorce slouží ke znázornění stereochemických představ sloučenin. Nejznámější je Newmanova projekce u molekul s více atomy. U makrocyclických sloučenin se používá hlavně tzv. Wedge projekce<sup>5</sup> ke znázornění jejich chiralit.

Vzájemný vztah dvou předmětů, které nejsou ztotožnitelné, ale jsou svými zrcadlovými obrazy se označuje jako chirální. Chiralita je vyvolána např. asymetrickou substitucí uhlíkového atomu čtyřmi různými substituenty nebo může být způsobena celkovou asymetrií molekuly. Asymetrie je geometrická vlastnost, která vylučuje jakoukoliv symetrii, tj. molekula v dané konfiguraci nemá žádný prvek symetrie.

U sloučenin, ve kterých jsou ke stereogennímu atomu připojeny čtyři odlišné substituenty může docházet k uspořádání, kterému odpovídají dva různé prostorové modely. Mají k sobě vztah předmětu a jeho zrcadlového obrazu a jsou vzájemně neztotožnitelné, nemají rovinu, osu ani střed souměrnosti.

Rovinně polarizované světlo je takové světlo, jehož všechny paprsky kmitají v téže rovině. Získává se průchodem nepolarizovaného světla vhodným prostředím, např. hranolem islandského vápence – Nikolův hranol.

Optická izomerie je jedna z forem stereoizomerie. Znamená, že jednotlivé izomery vykazují optickou aktivitu, tj. schopnost stáčet rovinu polarizovaného světla, které prochází souborem jejich molekul.

Dvojice sloučenin, jejichž molekuly jsou ve vztahu předmětu a jeho zrcadlového obrazu a nejsou ztotožnitelné v rovině se nazývají enantiomery. Každý z enantiomerů je schopen samostatné existence. Vlastnosti takových dvojic sloučenin se neliší v achirálním prostředí, rozdíl je pouze ve směru stáčení roviny polarizovaného světla, doprava nebo doleva. Enantiomery se vzájemně liší absolutní konfigurací. Hodnoty velikostí jejich úhlu otočení jsou stejné a liší se pouze znaménkem. Písmenem *d*- nebo znaménkem (+) se označují sloučeniny pravotočivé, a písmenem *l*- nebo znaménkem (-) se označují levotočivé izomery. Vyrovnání rotace jednoho enantiomeru druhým lze

dosáhnout smíšením jejich ekvimolárních množství. Ekvimolární směs dvou enantiomerů se nazývá racemát.

Absolutní konfiguraci sloučenin vyjadřujeme různými typy předpon. Nejčastěji se pro znázornění geometrické vlastnosti molekuly používají předpony *cis-/trans-*, *E/Z*. Topografické vlastnosti vystihují stereodeskripty *R/S*<sup>6</sup>, které nemají vztah ke smyslu rotace. Jestliže má molekula více chirálních center, je v názvu sloučeniny označeno každé chirální centrum zvlášť. Enantiomery se pak odlišují předponami *R* a *S* umístěnými v závorkách, případně spolu s jejich lokanty před úplný název sloučeniny nebo patřičného substituentu, od kterých se oddělují rozdělovací pomlčkou.

Předpony *D-* a *L-*, dříve používané pro označení stereoizomerů, nemají jednoznačný vztah ke smyslu rotace. Jako *D*-sloučeniny označujeme ty, jež mají v projekčním vzorci na asymetrickém uhlíku hydroxylovou nebo jinou charakteristickou skupinu vpravo. *L*-sloučeniny mají pak takovouto skupinu vlevo. Pokud se v molekule nachází více asymetrických uhlíků, potom rozhoduje o označení *D-* nebo *L-* uspořádání *D-* nebo *L-* na asymetrickém uhlíku s nejvyšším pořadovým číslem<sup>7</sup>. Předpony *D-* a *L-* se v současnosti používají ještě u cukrů, aminokyselin a peptidů<sup>6</sup>. Pro obecnější označení jsou však nyní nahrazeny předponami *R-* a *S-*.

## 2.2. Odlišnost chování optických izomerů

Optické izomery mají shodné vlastnosti v achirálním prostředí, v prostředí chirálním se však jejich vlastnosti liší.

Některá léčiva, pesticidy, složky potravin a obecně přírodní látky vykazují optickou aktivitu, a protože živý organizmus je tvořen soustavou chirálních komponent, působí enantiomery na lidský organizmus různými účinky. Důvodem jsou rozdílné interakce jednotlivých enantiomerů.

Tyto interakce se mohou projevit u složek potravin, které mohou mít rozdílné chutě a vůně. Např. většina hydrofobních *D*-aminokyselin (*D*-AMK) chutná sladce, ale *L*-AMK mají hořkou chuť<sup>8</sup>, *L*-izomer limonenu má chuť citrónovou a *D*-izomer pomerančovou.

Podobně se mohou chovat enantiomery pesticidů a léčiv, které mají odlišné účinky na živý organizmus. Enantioselektivní účinek léčiv se může projevit v kterékoliv

fázi procesu absorpce, distribuce, metabolizace či vylučování<sup>9</sup>. Nejznámějším případem chirálního léčiva je thalidomid, který byl v minulosti podáván jako racemát. Jeho *R*-forma má sedativní účinek, ale *S*-forma působí v organismu jako teratogen<sup>9</sup>. Dnes je obecnou snahou používat pouze aktivní enantiomer léčiva, zatímco druhý enantiomer je vyloučen, protože může být neaktivní, s vedlejšími účinky nebo toxický. Jako příklady lze uvést některá léčiva např. vitamin C - *S*-forma je aktivní, ale *R*-forma neaktivní, dále *S*-izomer propranololu je  $\beta$ -blokátor a *R*-izomer je neaktivní. Z pesticidů má odlišné účinky např. metolachlor, jehož *S*-forma je herbicid a *R*-forma je fungicid, nebo glufosinát, kdy *S*-forma je herbicid a *R*-forma je neaktivní.

### 2.3. Princip chirální separace

Dělení enantiomerů se nejčastěji provádí ve formě vhodných diastereomerů. Čím odlišnější jsou jejich fyzikálně-chemické vlastnosti, tím snazší a dokonalejší je separace enantiomerů. Dnes se pro separaci enantiomerů používá převážně technika vysokoúčinné kapalinové chromatografie a kapilární elektroforézy.

Chirální separace se dělí podle způsobu provedení na přímé a nepřímé. Nepřímý způsob spočívá v derivatizaci dělených izomerů vhodným chirálním činidlem. Vzniklé stabilní diastereomery mohou být děleny v nechirálním chromatografickém systému.

Podmínky pro nepřímou separaci:

1. Každý enantiomer musí obsahovat skupinu (amino, karboxyl, hydroxy), která zreaguje s příslušným chirálním činidlem-selektorem (CS).
2. CS musí být dostupný v enantiomerně čisté formě.
3. Reakce mezi enantiomery a CS musí být reprodukovatelné a produkt reakce musí být stabilní alespoň několik minut<sup>10</sup>.

Přímý způsob chirální separace využívá tvorby přechodných diastereomerních komplexů mezi chirálním selektorem a chirálním solutem. Nejčastěji bývají chirální selektory vázány na pevný nosič a tvoří chirální stacionární fáze, ale používá se i přidavek chirálního selektoru do mobilní fáze.

### 2.3.1. Chirální mobilní fáze

Chirální selektor není navázaný na nosič, ale je součástí mobilní fáze. Vznikající diastereomerní komplexy mezi chirálním solutem a selektorem interagují s nechirální stacionární fází. Různá stabilita přechodných diastereomerních komplexů vede k separaci enantiomerů. Používá se pouze jeden izomer chirálního selektoru. Přítomnost enantiomerních nečistot má zásadní vliv na účinnost separace.

Pro tento typ separace je možné použít opticky čistou látku, která tvoří relativně stabilní diastereomerní komplexy se solutem a je rozpustná v dané mobilní fázi. Aminokyseliny a cykloextriny se často používají jako chirální aditiva<sup>11,12</sup>. Vzhledem k velké spotřebě chirálního činidla, někdy obtížné rozpustnosti v mobilní fázi a rušící absorpenci (snížení detekce analytů), příp. i reprodukovatelnosti se chirální mobilní fáze používají méně než CSP. Spíše jsou vhodné pro kapilární separační systémy.

### 2.3.2. Chirální stacionární fáze

Principem separace enantiomerů je jejich rozdílná interakce s chirálním povrchem stacionární fáze, přičemž vznikají přechodné diastereomery, které mají odlišnou konstantu stability, a tím je jeden izomer kolonou zadržován více než druhý.

Podle druhu CSP se na retenci analytů mohou podílet  $\pi$ - $\pi$  interakce, vodíkové vazby, hydrofobní, dipólové a sterické interakce, včetně inkluze chirálního solutu do trojrozměrné struktury chirálního selektoru<sup>9</sup>.

Nejčastěji používané chirální stacionární fáze jsou  $\pi$ -donorové a  $\pi$ -akceptorové (Pirklovy) CSP, proteinové a polysacharidové chirální fáze, CSP s kavitami mezi něž se řadí CSP cykloextrinové a CSP na bázi syntetických polymerů. Dalším typem jsou chirální stacionární fáze využívající tvorby komplexů aminokyselin s přechodnými kovy<sup>9</sup>. Novější skupinou chirálních selektorů je skupina makrocyclických antibiotik (MA).

## 2.4. Makrocyklická antibiotika

S představou využit makrocyklická antibiotika jako chirální stacionární fáze poprvé vystoupil Armstrong v roce 1994<sup>13</sup>. MA se řadí mezi glykopeptidy. Původně se používala jako antibiotika proti různým mikroorganismům, zejména jsou aktivní proti aerobním a anaerobním grampozitivním bakteriím. Vankomycin a teikoplanin se používají při infekcích způsobených bakterií *Staphylococcus aureus* rezistentní vůči methicilinu, teikoplanin je účinný i proti infekcím způsobeným vankomycin-rezistentními enterokoky<sup>14</sup>. Působí na jejich buněčnou stěnu. Teikoplanin se stereoselektivně váže na terminální acyl-*D*-alanyl-*D*-alanin bakteriální buněčné stěny, která je tvořena peptidoglykanem, a tím inhibuje její syntézu<sup>15</sup>. Mezi MA se řadí vedle vankomycinu (V) a teikoplaninu (T), také ristocetin A (R A) a avoparcin, dále sem patří deriváty těchto látek např. teikoplanin aglykon (TAG). Makrocyklická antibiotika jsou fermentační produkty mikroorganismů a jsou komerčně dostupné. Některé charakteristiky MA a jejich derivátů jsou shrnuty v tabulce 1.

Dnes jsou MA řazena k nejpoužívanějším a neúčinnějším chirálním selektorům v HPLC, tenkovrstvé kapalinové chromatografii (TLC) a kapilární elektroforéze. Pro účely chirálních stacionárních fází jsou makrocyklická antibiotika vázána kovalentní vazbou na silikagel, mají tak větší pokrytí, a tím i lepší separační účinnost. Díky velkému počtu funkčních skupin a chirálních center jsou řazena mezi multimodální CSP. Převládající interakce pak závisí na použitém separačním módu tj. reverzním, normálním nebo polárně-organickém módu.

MA se osvědčila k dělení aminokyselin (T), blokovaných aminokyselin (T)<sup>16, 17</sup>, hydroxykyselin, peptidů, fenolů a aromatů. MA jsou rovněž používána k enantioseparaci léčiv, přísadků do potravin<sup>18</sup>, reagensů a katalyzátorů, které musí být enantiomerně čisté<sup>19</sup>.

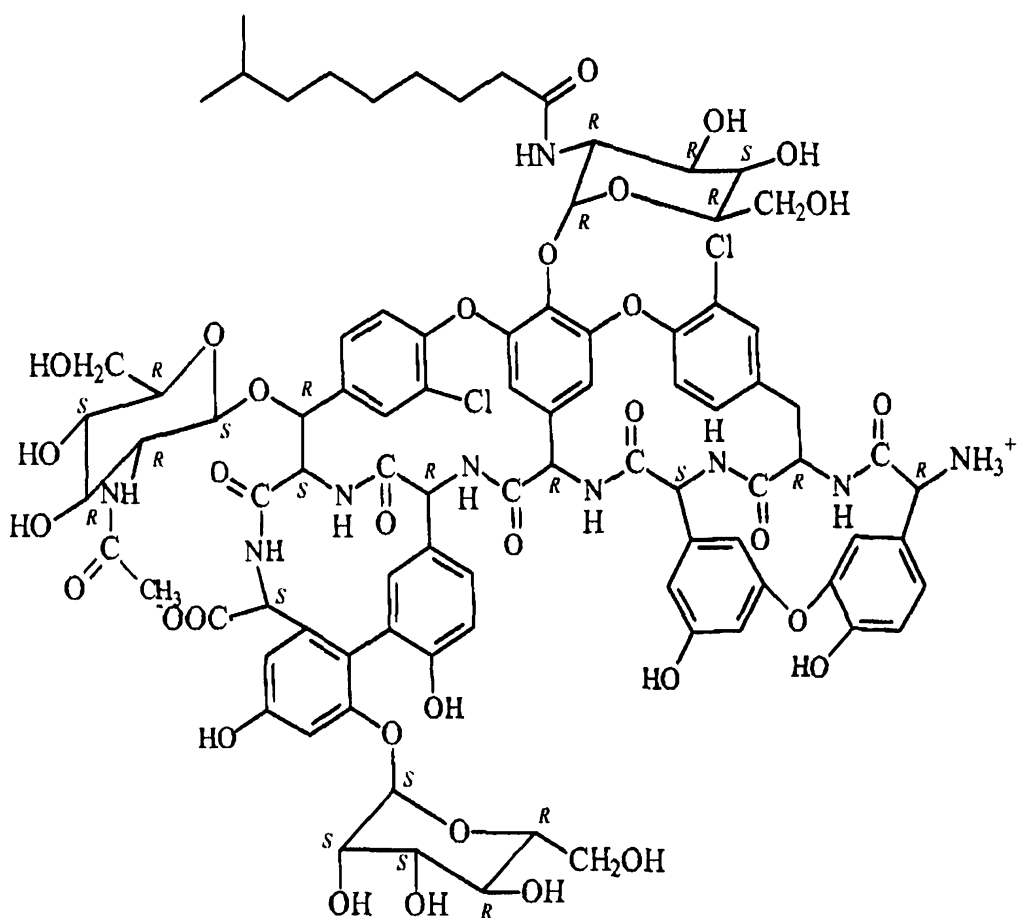
**Tab. 1:** Fyzikálně-chemické vlastnosti některých makrocyklických antibiotik a jejich derivátů; Ristocetin A (R A), Vankomycin (V), Teikoplanin (T), Teikoplanin aglykon (TAG).

Chirální selektor	Molekulová hmotnost	Počet chirálních center	Počet cukerných složek	Počet inkluzních kavit	Počet ionizovat. skupin
R A	2066	38	6	4	2
V	1448	18	2	3	3
T	1885	23	3	4	2
TAG	1197	8	0	4	2

### 2.4.1. Teikoplanin

Jednou z chirálních stacionárních fází využívajících makrocyklická antibiotika jako chirální selektor je teikoplanin navázaný na silikagelu velkým počtem kovalentních vazeb. Základem struktury teikoplaninu je peptidový řetězec bohatě substituovaný a vytvářející tak čtyři dutiny (cykly). Jak ukazuje obr.1, v molekule teikoplaninu je zabudováno sedm aromatických kruhů, a jsou tam zastoupeny polární i nepolární funkční skupiny. Teikoplanin obsahuje 10 hydroxylových skupin, 4 fenolické skupiny, jednu primární aminoskupinu a jednu volnou karboxylovou skupinu. Nepolární část molekuly tvoří rozvětvený alkylový řetězec. Peptidový řetězec s navázanými benzenovými jádry vytváří tzv. aglykonový koš<sup>20</sup>. Teikoplanin obsahuje 23 chirálních center<sup>21</sup>.

Teikoplanin je fermentačním produktem bakterie *Actinoplanes teichomyceticus* a poprvé byl izolován v roce 1978<sup>22</sup>.



**Obr. 1:** Strukturální chemický vzorec teikoplaninu, *R* a *S* označují chirální centra v molekule teikoplaninu.

Strukturální uspořádání teikoplaninu je vhodné pro řadu separací. Separují se jím aminokyseliny, hydroxylové kyseliny, fenoly, malé peptidy a malé neutrální aromatické sloučeniny. Cukerné jednotky teikoplaninu snižují retenci mnoha enantiomerů aminokyselin, avšak mohou v některých případech přispívat ke zlepšení rozlišení např. sekundárních aminokyselin<sup>23, 24</sup>.

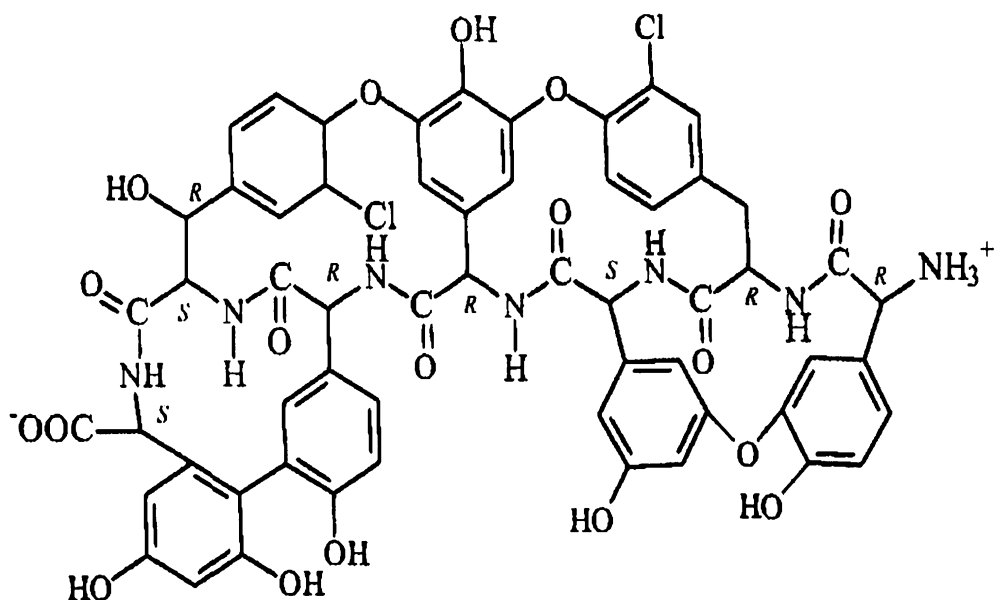
#### 2.4.2. Teikoplanin aglykon

Další sloučeninou, která se uplatnila pro přípravu CSP na bázi MA je analog teikoplaninu – teikoplanin aglykon. Stejně jako teikoplanin je vázaný na silikagel kovalentními vazbami.



Na rozdíl od teikoplaninu v molekule TAGu nejsou navázány cukry ( $\alpha$ -D-manosa,  $\beta$ -D-N-acetyl-glukosamin,  $\beta$ -D-N-acyl-glukosamin) (viz obr. 2). Molekula TAGu má opět peptidový základ, a dále obsahuje 7 polárních OH skupin, z nichž 6 je fenolických. Dále je v molekule TAGu zastoupena 1 amino- a 1 karboxylová skupina, 6 peptidových vazeb a 7 benzenových jader<sup>20,24</sup>. Vzhledem k nepřítomnosti cukerných struktur u teikoplanin aglykonu chybí rovněž hydrofobní řetězec, který je u teikoplaninu vázán přes glukosamidovou skupinu.

Molekulu teikoplanin aglykonu je možno připravit úpravou přírodního teikoplaninu nebo také organickou syntézou<sup>22</sup>.



**Obr. 2:** Strukturální chemický vzorec teikoplanin aglykonu, *R* a *S* označují chirální centra v molekule teikoplanin aglykonu.

Odstranění tří cukerných zbytků a hydrofobního alkylového řetězce dává větší prostor některým látkám ke snadnějším interakcím s chirálním selektorem, a tím k lepší enantioseparaci. Separace na teikoplanin aglykonu je vysoce selektivní pro analýzy aminokyselin, *N*-blokovaných aminokyselin, peptidů, neutrálních molekul, diazepinů, sulfoxidů, oxazolidinoidů, hydantoinů<sup>25</sup>.

Pro enantioseparaci na teikoplanin aglykonu jako CSP lze použít všech tří separačních módů: polárně-organického, reverzního nebo normálního módu<sup>26</sup>. Velmi dobré enantioseparace lze v některých případech dosáhnout jak v reverzním módu, tak v normálním módu<sup>27</sup>. Schopnost pracovat za jinak stejných podmínek ve dvou různých typech mobilních fází je výhodné pro optimalizaci metody, kdy může být rozpustnost analyzovaného vzorku klíčovým problémem.

## **2.5. Separační módy**

### **2.5.1. Polárně-organický mód<sup>28</sup>**

Mobilní fáze obsahují jako hlavní složku methanol (MeOH), případně acetonitril (ACN), ke kterému jsou přidávána velmi malá množství octové kyseliny (HAc) a triethylaminu (TEA). Poměr MeOH a ACN ovlivňuje především retenci, přídavky HAc a TEA spíše selektivitu.

Uplatňuje se při separaci molekul s nejméně jednou ionizovatelnou skupinou na chirálním centru nebo v jeho těsné blízkosti<sup>21</sup>. Díky polárním skupinám ve struktuře MA je možné přidáním octové kyseliny nebo triethylaminu do mobilní fáze v různých poměrech ovlivnit enantioseparaci.

V tomto separačním módu lze demonstrovat širokou variabilitu analyzovaných sloučenin, které lze dělit na teikoplanin aglykonové CSP.

### **2.5.2. Reverzní mód**

Mobilní fáze se nejčastěji skládají z methanolu a triethylaminooctanového pufru o různé hodnotě pH a koncentraci. Místo methanolu lze použít i přídavku jiných organických rozpouštědel, jejichž eluční síla stoupá v řadě – propan-2-ol < ethanol < methanol < acetonitril. Koncentrace vodných pufrů se pohybuje v rozmezí 0,05 – 1%, pH v oblasti stability chirální stacionární fáze, tj. v intervalu 3,0 – 6,8 v případě teikoplanin aglykonu.

V tomto pracovním módu dochází k upřednostnění inkluze analytu do nitra kavity chirálního selektoru oproti jiným interakcím. Reverzní mód se především uplatňuje u analytů, které obsahují pouze jednu funkční skupinu schopnou interakce<sup>21</sup>.

### 2.5.3. Normální mód

Typickými představiteli mobilních fází v normálním módu jsou směsi hexanu, ethanolu nebo propan-2-olu v různých poměrech. Vyšší koncentrace polárních solventů způsobují nižší retenci. Příkladově malého množství octové kyseliny, případně triethylaminu jako modifikátoru snižuje rozmývání píků. V tomto módu byla separována řada sulfoxidů v mobilní fázi tvořené hexanem a ethanollem v poměru 80/20 (v/v).

## 2.6. Vliv teploty na separaci

Teplota je dalším faktorem, který může významně měnit retenci a selektivitu, tedy ovlivňovat průběh enantioseparace. Snížením teploty dochází k prodloužení retenčních časů, často doprovázených zlepšením stereoselektivního rozlišení analytů<sup>21, 29</sup>. Snížení teploty je spojeno se zvýšením tlaku na kolonu. Zvýšení teploty má za následek snížení viskozity mobilní fáze, což vede ke snadnějšímu přenosu hmoty, a tak v řadě případů ke zvýšení účinnosti separace.

## 2.7. Prostanoidy – syntetické prostaglandiny

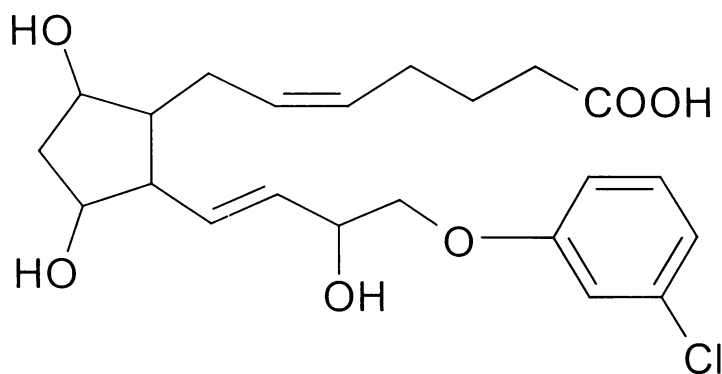
Prostanoidy jsou endogenní deriváty eikosanoidové kaskády, odpovědné za četné fyziologické a patologické procesy v mnoha zvířecích tkáních. Biologický efekt všech prostanoidů je zprostředkován pomocí G-proteinů na buňky s povrchovými receptory. Stimulací receptorů EP<sub>2</sub> a FP přirozeným agonistou prostaglandinem F<sub>2α</sub> (PGF<sub>2α</sub>) dochází k aktivaci fosfatidylinositolu, což umožňuje přechod Ca<sup>2+</sup> iontů mezi intracelulárním prostorem a extracelulární tekutinou.

PGF<sub>2α</sub> vyvolává luteolýzu u hospodářských zvířat a hraje hlavní roli v iniciaci a průběhu porodu. Spolu s PGE<sub>2</sub> způsobuje zrání děložního hrdla a kontrakci svalu. Z tohoto důvodu se často používá ve veterinární praxi. Podporuje stahy dělohy a používá se k léčbě zánětu dělohy.

Svalová odpověď na prostaglandiny závisí na přítomnosti různých PG receptorů v různých oblastech dělohy, které mohou podporovat relaxaci nebo kontrakci svalu. FP receptory (selektivní pro PGF<sub>2α</sub>) jsou v nadbytku ve fundu a jejich stimulace vede ke kontrakci svalu, zatímco EP<sub>2</sub> receptory (selektivní pro PGE<sub>2</sub>) se nacházejí v oblasti děložního hrdla a jsou odpovědné za relaxaci svalu a otevření děložního hrdla.

### 2.7.1. Cloprostenol

Cloprostenol [1α(Z),2β(1E,3R\*),3α,5α-(±)-7-2-4-(3-chlorfenoxy)-3-hydroxy-1-butenyl-3,5-dihydroxycyklopentyl-5-heptenová kyselina] (viz obr. 3) je syntetickým analogem PGF<sub>2α</sub>. Cloprostenol je nejčastěji používán ve formě sodné soli. Je to bílá hygroskopická látka, dobře rozpustná ve vodě a alkoholech, špatně rozpustná v acetonu a téměř nerozpustná v nepolárních organických rozpouštědlech. Látka taje neostře při teplotě nad 86°C.



**Obr. 3:** Strukturní chemický vzorec cloprostenolu.

Aktivní látka se používá pro přípravu lékových forem pro veterinární praxi k synchronizaci a indukci říje, k léčení reprodukčních poruch u hovězího dobytka, k indukci porodu u prasnic a k léčení některých chorob pohlavního ústrojí hospodářských zvířat<sup>30</sup>. Cloprostenol má také schopnost vyvolat luteolýzu a kontrakci dělohy.

Sloučenina má pět chirálních center, tj. odpovídalo by jí  $2^5$  enantiomerů. Běžně se vyskytuje ve dvou opticky aktivních formách (izomerech). Terapeuticky se používá racemát. Čisté enantiomery nejsou komerčně dostupné. Izomer označovaný jako (+)-cloprostenol má přibližně 3-4 krát vyšší biologickou aktivitu než (±)-cloprostenol (racemát). Při studování stereospecifické vazby cloprostenolu na  $\text{PGF}_{2\alpha}$  receptory u krav byly demonstrovány různé účinky enantiomerů. (+)-cloprostenol má afinitu k receptoru podobnou jako  $\text{PGF}_{2\alpha}$ , kdežto racemát vykazuje značně nižší afinitu ke stejnému receptoru<sup>31</sup>. Doporučená dávka  $\text{PGF}_{2\alpha}$  pro luteolýzu podaná intramuskulárně je mnohem vyšší než u (±)-cloprostenolu. Dávka (±)-cloprostenolu pro luteolýzu je naopak vyšší než u (+)-cloprostenolu. To utvrzuje fakt, že jen (+)-enantiomer podporuje luteolýzu<sup>32</sup>.

### 3. CÍL PRÁCE

Cílem této práce bylo studium retenčního chování a dělení enantiomerů cloprostenolu metodou vysokoučinné kapalinové chromatografie na chirální stacionární fázi na bázi makrocyclického antibiotika teikoplanin aglykonu (TAG). Úkolem bylo prozkoumat možnosti separace enantiomerů cloprostenolu za použití dané CSP ve třech separačních módech – reverzním, polárně-organickém a normálním módu.

V reverzním módu byl sledován vliv obsahu methanolu a vliv pH pufru v mobilní fázi.

V polárně-organickém módu byl studován vliv obsahu methanolu a acetonitrilu v mobilní fázi, koncentrace octové kyseliny (HAc) a triethylaminu (TEA). Také byla zaměřena pozornost na změnu teploty a průtoku mobilní fáze na retenci a enantioseparaci při konstantním složení mobilní fáze.

V normálním módu byly využity možnosti ovlivnění retence a enantioselektivního rozlišení pomocí změny poměru tří organických rozpouštědel v mobilní fázi. Zkoumán byl i vliv přídatku octové kyseliny a triethylaminu.

## 4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

### 4.1. Přístroje a pomůcky

#### **Kapalinový chromatograf:**

**Pumpa:** DeltaChrom™ SDS 030 WATREX®, Praha, ČR

**Detektor:** DeltaChrom™ UVD 200 WATREX®, Praha, ČR

**Dávkovací ventil:** RHEODYNE 7125 s dávkovací smyčkou 20 µl, Cotati, CA, USA

**Kovová kolona:** 250x4,6 mm, zrnění 5 µm, CHIROBIOTIC TAG – teikoplanin aglykon vázaný na silikagel, velikost pórů 8 nm, Astec, Whippany, NJ, USA

**Kolonový termostat:** Spark Mistral, Emmen, Holandsko

**Počítačový program:** Clarity™ 2.1., Data Apex, Praha, ČR

**Injekční stříkačka:** Microlyter Syringes 702, objem 25 µl (Hamilton, Bonaduz, Švýcarsko)

**Ultrazvuková lázeň:** Ultrasonic LC 30 (Elma, Německo)

**Váhy:** METTLER AE 240, Greifensee, Švýcarsko

### 4.2. Použité chemikálie

Methanol pro chromatografii, Chromasolv® Riedel-de Haën, Seelze, Německo

Acetonitril pro chromatografii, Chromasolv® Sigma–Aldrich, Steinheim, Německo

Hexan pro chromatografii, Chromasolv® Sigma–Aldrich, Steinheim, Německo

Propan-2-ol pro chromatografii, Sigma–Aldrich, Steinheim, Německo

Triethylamin (čistoty >99%), Sigma, St. Louis, MO, USA

Octová kyselina (99,5%), Sigma–Aldrich, Steinheim, Německo

Trifluoroctan amonný, Astec, Inc., Whippany, NJ, USA

Vzorky: (±)– cloprostenol, Nerapharm\*), Neratovice, ČR

(+) – cloprostenol, Nerapharm\*), Neratovice, ČR

\*) Vzorky byly laskavě poskytnuty Ing. I. Veselým.

### 4.3. Příprava vzorků

Roztok ( $\pm$ )-cloprostenolu byl připraven rozpuštěním 1 mg vzorku v 1 ml methanolu. Rozpuštěný vzorek byl přefiltrován přes filtr (0,45 $\mu$ m) nasazený na injekční stříkačku. Stejným způsobem byl připraven i vzorek (+)-cloprostenolu.

Pro zjištění, který ze dvou enantiomerů eluuje z kolony dříve, byl připraven další vzorek. V 1 ml methanolu byl rozpuštěn 1 mg ( $\pm$ )-cloprostenolu. Do tohoto roztoku bylo přidáno 300  $\mu$ l roztoku (+)-cloprostenolu.

### 4.4. Reverzní mód

#### 4.4.1. Mobilní fáze pro reverzní mód

Mobilní fáze pro reverzní mód (RP-mód) se skládaly z 1% triethylaminooctanového pufru (TEAA), pH pufru se pohybovalo v rozmezí od 4 do 6. Přesné složení všech použitých mobilních fází v tomto separačním módu je uvedeno v tabulce 2.

**Tab. 2:** Složení použitých mobilních fází v RP-módu.

MeOH %	/ 1% TEAA pufr, pH 5,9 (v/v)
20	80
40	60
60	40
MeOH %	/ 1% TEAA pufr, pH 5,0 (v/v)
40	60
MeOH %	/ 1% TEAA pufr, pH 4,2 (v/v)
40	60
ACN %	/ 1 % TEAA pufr, pH 5,9 (v/v)
10	90



#### **4.4.2. Podmínky separace v reverzním módu**

Separace probíhala při laboratorní teplotě. Použita byla detekční vlnová délka 276 nm. Rychlost průtoku mobilní fáze byla 0,6 ml/min.

Před použitím byla každá mobilní fáze odvzdušněna v ultrazvukové lázni po dobu nejméně 15 min. Špatně odvzdušněná mobilní fáze vede ke vzniku bublin a následnému snížení tlaku na kolonu a k chybnému určení retenčního času.

#### **4.5. Polárně-organický mód**

##### **4.5.1. Mobilní fáze pro polárně-organický mód**

Pro separaci byly použity dva typy mobilních fází. Základem obou mobilních fází byl acetonitril a methanol. Selektivita separace byla modifikována přidávkou triethylaminu a octové kyseliny v prvním případě, zatímco v druhém typu mobilní fáze byly HAc a TEA nahrazeny rozpuštěnou amonnou solí kyseliny trifluoroctové. Použité mobilní fáze v polárně-organickém módu jsou shrnuty v tabulce 3.

**Tab. 3:** Složení použitých mobilních fází v polárně-organickém módu.

ACN	/	MeOH	/	TEA	/	HAc (v/v/v/v)
90		10		0,05		0,05
90		10		0,1		0,1
90		10		0,2		0,2
90		10		0,3		0,3
90		10		0,4		0,4
90		10		0,1		0,2
90		10		0,2		0,4
90		10		0,2		0,1
90		10		0,4		0,2
80		20		0,2		0,2
85		15		0,2		0,2
95		5		0,2		0,2
80		20		0,6		0,2
70		30		0,1		0,1
ACN	/	MeOH (v/v)		% (w) CF <sub>3</sub> COONH <sub>4</sub>		
90		10		0,05		
90		10		0,1		

#### 4.5.2. Podmínky separace v polárně-organickém módu

Separace probíhala nejdříve při laboratorní teplotě. Při studiu vlivu teploty na retenci a enantioseparaci byly v kolonovém termostatu voleny teploty od 6°C do 25°C. Použita byla detekční vlnová délka 276 nm. Rychlost průtoku mobilní fáze se pohybovala od 0,4 ml/min do 1,2 ml/min. Pro další studium byla zvolena průtoková rychlost 0,6 ml/min. Tlak mobilní fáze na kolonu se při konstantní rychlosti průtoku měnil v závislosti na zvolené experimentální teplotě a na složení mobilní fáze.

## **4.6. Normální mód**

### **4.6.1. Mobilní fáze pro normální mód**

Mobilní fáze pro normální mód obsahovaly hexan, propan-2-ol a methanol. Účinnost separace byla zvyšována malým množstvím octové kyseliny. Do některých mobilních fází byl přidán ve velmi malém množství triethylamin místo octové kyseliny. Konkrétní složení mobilních fází je uvedeno v tabulce 4.

### **4.6.2. Podmínky separace v normálním módu**

Separace probíhala při laboratorní teplotě. Pro detekci byla zvolena vlnová délka 276 nm. Průtoková rychlost mobilní fáze byla 1 ml/min. Tlak mobilní fáze na kolonu se měnil v závislosti na jejím složení.

Před použitím byla každá mobilní fáze odvzdušněna v ultrazvukové lázni po dobu 15 min.

**Tab. 4:** Složení použitých mobilních fází v normálním módu.

propan-2-ol	hexan	MeOH	HAc	TEA (v/v/v/v/v)
20	80	0	0	0
50	50	0	0	0
50	50	0	0,5	0
50	50	0	0,1	0
50	50	0	0,05	0
45	50	5	0,1	0
40	50	10	0,1	0
15	80	5	0,1	0
10	80	10	0,1	0
5	80	15	0,1	0
5	80	15	0,05	0
10	80	10	0,05	0
5	85	10	0,1	0
15	70	15	0,05	0
15	70	15	0,1	0
20	70	10	0,05	0
25	70	5	0,05	0
10	70	20	0,05	0
5	70	25	0,05	0
10	80	10	0	0,05
10	70	20	0	0,05
10	70	20	0	0

## 5. VÝSLEDKY A DISKUZE

Pro enantioseparaci na CSP s navázanými makrocyclickými antibiotiky lze použít všechny tři typy separačních módů, tzn. polárně-organický, normální i reverzní mód. V této práci je pozornost zaměřena převážně na separace v polárně-organickém a normálním módu. Všechna měření byla prováděna na chirální stacionární fázi s navázaným teikoplanin aglykonem. V některých případech byly za sebe zapojeny dvě kolony s navázaným teikoplanin aglykonem.

### 5.1. Enantioseparace cloprostenolu v reverzním separačním módu

Reverzní mód byl použit pro předběžné sledování retence a enantioseparace cloprostenolu. Mobilní fáze v tomto módu obsahovaly 1% TEAA pufrů, jejichž hodnoty pH se pohybovaly v rozmezí od 4 do 6, a MeOH jako organický modifikátor. Složení mobilních fází použitých v tomto módu již byla uvedena v tab. 2.

#### 5.1.1. Vliv methanolu v mobilní fázi na retenci a rozlišení

Obsah methanolu v mobilní fázi výrazně ovlivnil retenci i rozlišení enantiomerů cloprostenolu (viz tab. 5). Z výsledků měření je patrné, že s vyšším obsahem methanolu se retence i rozlišení cloprostenolu snižuje. V žádném případě však nedošlo k uspokojivé enantioseparaci.

**Tab. 5:** Porovnání retenčního faktoru dříve eluujícího enantiomeru ( $k_f$ ) a rozlišení ( $R$ ) v závislosti na změně obsahu MeOH v mobilní fázi (při konstantní hodnotě pH pufru).

Složení mobilní fáze	$k_f$	$R$
MeOH/1% TEAA, pH 5,9 20/80 (v/v)	15,46	0,60
MeOH/1% TEAA, pH 5,9 40/60 (v/v)	2,52	0,57
MeOH/1% TEAA, pH 5,9 60/40 (v/v)	0,50	0,20

Dále byl vyzkoušen vliv záměny MeOH jako organického modifikátoru v mobilní fázi za acetonitril. Nahrazením methanolu acetonitrilem v kombinaci s 1% TEAA pufrům o pH 5,9, byl sledován vliv ACN na retenci a enantioseparaci. Měření bylo prováděno v mobilní fázi o složení ACN/1% TEAA, pH 5,9 10/90 (v/v). V této mobilní fázi došlo k malému rozlišení  $R=0,58$ , a retence byla příliš dlouhá ( $k_f=16,60$ ). Z tohoto důvodu nebyly zkoumány další mobilní fáze s přidavkem ACN.

### 5.1.2. Enantioseparace cloprostenolu v mobilní fázi při změně pH použitého pufru

V RP módu byl sledován i vliv pH pufrů, použitých v mobilních fázích. Z výsledků uvedených v tabulce 6, je patrné, že pH pufru ovlivňuje retenci. Čím bylo pH pufru vyšší, tím se snižoval retenční faktor cloprostenolu. Selektivita separace se s rostoucím pH pufru zvyšovala. Lepšího rozlišení bylo dosaženo rovněž při vyšších hodnotách pH. Tento trend nebyl však zcela jednoznačný.

**Tab. 6:** Porovnání retenčního faktoru ( $k_1$ ), rozlišení ( $R$ ) a selektivity ( $\alpha$ ) při změně pH 1% TEAA pufru.

Složení mobilní fáze	$k_1$	$R$	$\alpha$
MeOH/1%TEAA, pH 4,2 40/60 (v/v)	5,00	0,34	1,05
MeOH/1%TEAA, pH 5,0 40/60 (v/v)	4,02	0,58	1,11
MeOH/1%TEAA, pH 5,9 40/60 (v/v)	2,52	0,57	1,15

Z výsledků vyplývá, že RP mód je vhodné použít pro mobilní fáze, kde je pH pufru vyšší. Vzhledem k tomu, že žádný ze zkoumaných experimentálních faktorů nevedl k dosažení dobrého rozlišení, v dalších měřeních v RP módu se nepokračovalo a přešlo se do dalších separačních módů.

## 5.2. Enantioseparace cloprostenolu v polárně-organickém módu

### 5.2.1. Retenční data cloprostenolu při změně obsahu methanolu v mobilní fázi

Mobilní fáze v polárně-organickém módu se skládala z acetonitrilu a methanolu, s malými přísadkami octové kyseliny a triethylaminu. Obsah methanolu v mobilní fázi byl systematicky zvyšován (viz tab.7). Koncentrace octové kyseliny a triethylaminu byla ve všech mobilních fázích konstantní.

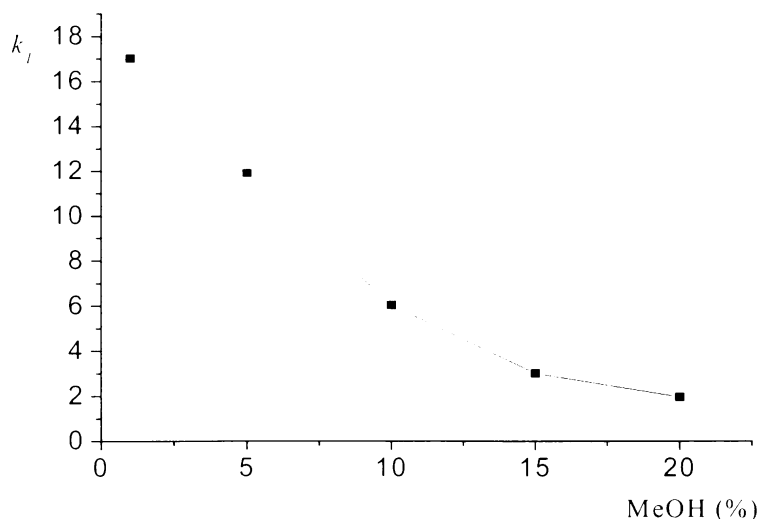
**Tab. 7:** Porovnání retenčních faktorů ( $k_f$ ), rozlišení ( $R$ ) a faktoru selektivity ( $\alpha$ ) na TAG CSP v závislosti na obsahu methanolu v mobilní fázi ACN/MeOH/HAc/TEA  $x/y/0,2/0,2$  (v/v/v/v) při teplotě 20°C.

MeOH %*	$k_f$	$R$	$\alpha$
1	17,03	0,69	1,11
5	11,91	0,96	1,14
10	6,03	1,13	1,15
15	3,01	1,09	1,13
20	1,96	0,97	1,14

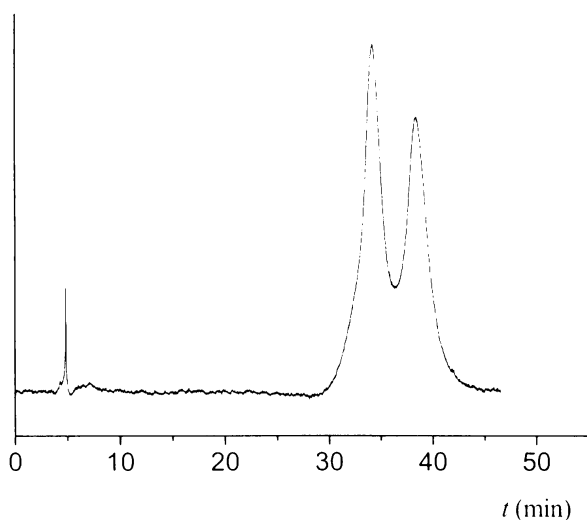
\* v tabulce jsou uvedena objemová procenta MeOH v ACN

Z tabulky je patrné, že vyšší obsah methanolu v mobilní fázi snižuje retenci cloprostenolu, též viz obr. 4. Nejvhodnější podmínky pro separaci byly nalezeny, když se mobilní fáze skládala z ACN/MeOH/HAc/TEA 90/10/0,2/0,2 (v/v/v/v), kdy bylo dosaženo rozlišení  $R=1,13$ . Separace je ukázána na obr. 5. Obsah methanolu v mobilní fázi měl minimální vliv na hodnoty faktoru selektivity. Rozlišení v mobilních fázích s nízkým obsahem MeOH bylo negativně ovlivněno rozmýváním píků. Jakým způsobem ovlivní přídavek octové kyseliny a triethylaminu retenci a rozlišení bude diskutováno dále.





**Obr. 4:** Závislost retenčního faktoru dříve elujícího enantiomeru cloprostenolu na obsahu MeOH v mobilní fázi; mobilní fáze ACN/MeOH/HAc/TEA  $x/y/0,2/0,2$  (v/v/v/v), TAG CSP, teplota 20°C.



**Obr. 5:** Chromatogram enantioseparace cloprostenolu za podmínek: CSP teikoplanin aglykon, mobilní fáze ACN/MeOH/HAc/TEA 90/10/0,1/0,1 (v/v/v/v).

### 5.2.2. Ovlivnění chirální separace cloprostenolu změnou koncentrace a poměru octové kyseliny a triethylaminu v mobilní fázi

Při zachování konstantního poměru ACN a MeOH v mobilní fázi, lze ovlivnit retenci a selektivitu separace změnou koncentrace octové kyseliny a triethylaminu (viz tab. 8). Při zachování poměru HAc a TEA 1:1 docházelo při vyšší koncentraci ke snižování retenčního faktoru. Vliv na rozlišení byl v měřené oblasti zanedbatelný. Změnou poměru kyseliny a báze na 2:1 (zvýšením obsahu kyseliny) došlo ke snížení retence i rozlišení. Při vyšší koncentraci TEA a nižší koncentraci octové kyseliny (1:2) se retence rovněž poněkud snížila, ale mnohem méně než při opačném poměru kyseliny a báze ve srovnání se zastoupením obou složek v poměru 1:1. Enantiomerní rozlišení bylo ovlivněno srovnatelným způsobem jako v mobilních fázích s nadbytkem HAc.

Z uvedených výsledků vyplývá, že poměr kyseliny k bázi větší než 1 (nadbytek kyselé složky) je pro enantioseparaci cloprostenolu výhodnější, neboť dochází ke zkrácení doby separace při srovnatelných hodnotách rozlišení. Nejlepšího dělení enantiomerů však bylo dosaženo při zachování poměru HAc/TEA 1:1.

**Tab. 8:** Porovnání retenčního faktoru ( $k_I$ ), rozlišení ( $R$ ) a selektivity ( $\alpha$ ) v závislosti na koncentraci a poměru octové kyseliny a triethylaminu v mobilní fázi při teplotě 20°C.

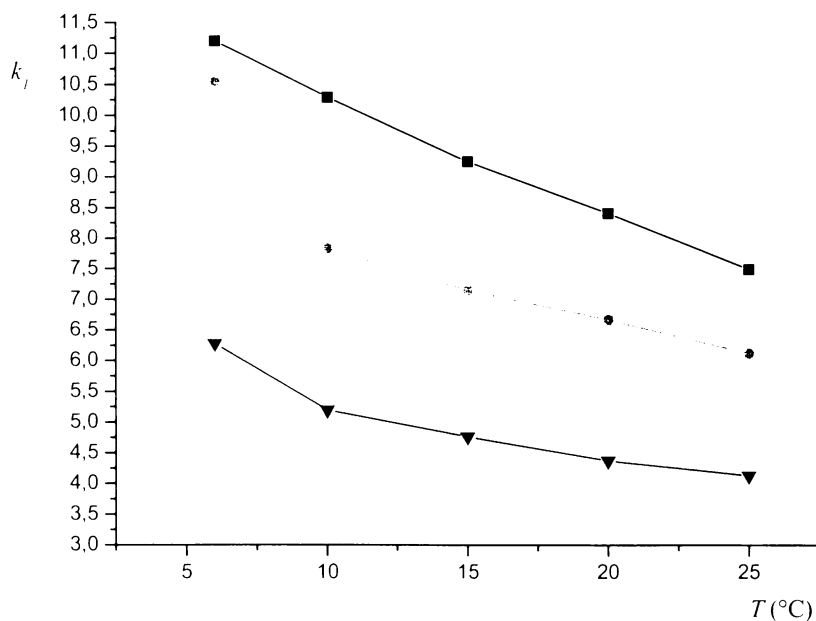
Složení mobilní fáze	$k_I$	$R$	$\alpha$
ACN/MeOH/HAc/TEA 90/10/0,1/0,1 (v/v/v/v)	6,67	1,14	1,15
ACN/MeOH/HAc/TEA 90/10/0,1/0,2 (v/v/v/v)	6,56	1,12	1,16
ACN/MeOH/HAc/TEA 90/10/0,2/0,2 (v/v/v/v)	6,10	1,13	1,15
ACN/MeOH/HAc/TEA 90/10/0,2/0,4 (v/v/v/v)	5,85	1,07	1,15
ACN/MeOH/HAc/TEA 90/10/0,2/0,1 (v/v/v/v)	3,33	1,05	1,12
ACN/MeOH/HAc/TEA 90/10/0,4/0,2 (v/v/v/v)	3,57	1,06	1,12

Další naměřené výsledky jsou patrné z obrázku 6, resp. z tabulky 9, kde je navíc zahrnut i vliv teploty.

### 5.2.3. Ovlivnění retence, rozlišení a selektivity změnou teploty

Byl studován vliv teploty na retenci, rozlišení a selektivitu separace cloprostenolu. Teplota byla zvolena v rozmezí od 6°C do 25°C. Z tabulky 9 a z obrázku

6 je patrné, že s klesající teplotou roste selektivita separace. Jednoznačný trend hodnot rozlišení se snižováním teploty však nelze určit, neboť se zde kombinují vlivy rostoucí retence, doprovázené rozmýváním píků, a vzrůstající selektivity. Retence při 6°C byla ovlivněna kolísavostí teploty v kolonovém termostatu v rozmezí od 5°C do 6,3°C. Vcelku dobrého rozlišení bylo dosaženo v mobilní fázi tvořené ACN/MeOH/HAc/TEA 90/10/0,1/0,1 (v/v/v/v) při teplotě 25°C, kdy hodnota rozlišení byla 1,16.



**Obr. 6:** Závislost retenčního faktoru prvního elujícího enantiomeru cloprostenolu na teplotě a koncentraci HAc a TEA v mobilní fázi ACN/MeOH/HAc/TEA 90/10/x/y (v/v/v/v); ■ x/y=0,05/0,05; ● x/y=0,1/0,1; ● x/y=0,2/0,2; ▼ x/y=0,3/0,3; x/y=0,4/0,4; TAG CSP.

**Tab. 6:** Porovnání retenčních faktorů a rozlišení na TAG CSP v závislosti na teplotě a koncentraci octové kyseliny a triethylaminu v mobilní fázi ACN/MeOH/HAc/TEA 90/10/x/y (v/v/v/v).

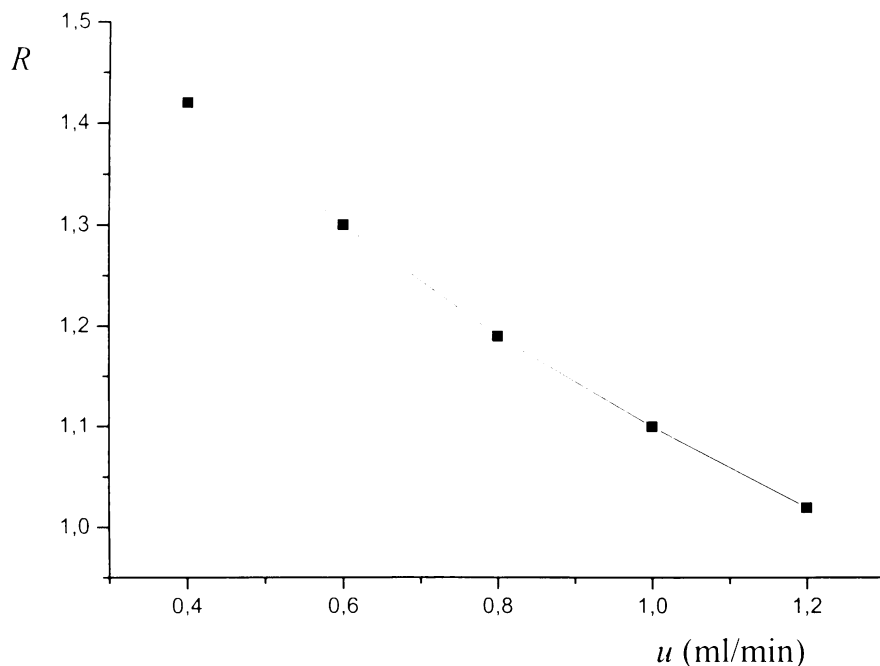
Teplota (°C)	HAc/TEA (v/v) 0,05/0,05			HAc/TEA (v/v) 0,10/0,10			HAc/TEA (v/v) 0,20/0,20			HAc/TEA (v/v) 0,30/0,30			HAc/TEA (v/v) 0,40/0,40		
	$k_l$	$R$	$\alpha$	$k_l$	$R$	$\alpha$	$k_l$	$R$	$\alpha$	$k_l$	$R$	$\alpha$	$k_l$	$R$	$\alpha$
6	11,20	1,04	1,18	10,54	1,12	1,18	8,03	1,13	1,17	6,28	1,07	1,17	4,61	0,96	1,15
10	10,29	1,10	1,18	7,83	1,12	1,16	7,41	1,15	1,17	5,19	0,92	1,15	4,31	0,95	1,14
15	9,25	1,10	1,16	7,15	1,11	1,15	6,72	1,14	1,15	4,76	0,98	1,15	3,93	0,92	1,13
20	8,41	0,97	1,13	6,67	1,14	1,15	6,03	1,13	1,15	4,37	0,97	1,14	3,53	0,88	1,12
25	7,49	1,07	1,12	6,12	1,16	1,14	5,53	1,11	1,14	4,13	1,00	1,13	3,30	0,86	1,12

#### 5.2.4. Vliv průtokové rychlosti mobilní fáze na retenci a rozlišení

Průtoková rychlost mobilní fáze kolonou ovlivňuje především retenci, ale má až překvapivý vliv i na rozlišení enantiomerů v průběhu separace viz tab.10 a obr. 7. Z tabulky 10 je patrné, že při poklesu průtokové rychlosti dochází ke zvýšení hodnot rozlišení. Selektivita separace zůstává při změně tohoto parametru přibližně konstantní. Pro další studium byla zvolena průtoková rychlost mobilní fáze 0,6 ml/min. Tato průtoková rychlost je vhodná z hlediska doby separace a dosažené hodnoty rozlišení. Při porovnání průtoku 0,6 ml/min a 0,4 ml/min je rozdíl v rozlišení enantiomerů minimální, ale retenční čas je podstatně delší při průtoku 0,4 ml/min.

**Tab. 10:** Vliv průtokové rychlosti mobilní fáze ( $u$ ) na retenci, rozlišení ( $R$ ) a selektivitu ( $\alpha$ ), mobilní fáze ACN/MeOH/HAc/TEA 90/10/0,2/0,2 (v/v/v/v), TAG CSP, při teplotě 20°C.

$u$ (ml/min)	$t_I$ (min)	$k_I$	$R$	$\alpha$
0,4	48,22	5,74	1,42	1,15
0,6	34,14	6,03	1,30	1,16
0,8	24,18	5,69	1,19	1,16
1,0	19,41	5,70	1,10	1,16
1,2	16,09	5,57	1,02	1,15



**Obr. 7:** Závislost rozlišení cloprostenolu na průtokové rychlosti mobilní fáze; mobilní fáze ACN/MeOH/HAc/TEA 90/10/0,1/0,1 (v/v/v/v), TAG CSP, teplota 20°C.

### 5.2.5. Přídavek soli trifluoroctové kyseliny v mobilní fázi

Octovou kyselinu a triethylamin je možné v mobilní fázi nahradit amonnou solí trifluoroctové kyseliny. Tato záměna vede v některých případech ke zlepšení enantioseparace<sup>33</sup>.  $\text{CF}_3\text{COONH}_4$  byl rozpuštěn v mobilní fázi, obsah se pohyboval v malých hmotnostních procentech 0,05% a 0,1%. Pro enantioseparaci byla použita mobilní fáze ACN/MeOH 90/10 (v/v) s 0,05% (w)  $\text{CF}_3\text{COONH}_4$  retenční faktor byl nízký ( $k_1=4,97$ ), ale rozlišení cloprostenolu dosahovalo pouze hodnoty  $R=0,41$ . Podobné hodnoty retence i rozlišení byly naměřeny i při vyšším obsahu (0,1% (w))  $\text{CF}_3\text{COONH}_4$ . Z tohoto důvodu se od dalších měření v mobilních fázích s přídavkem této soli upustilo.

### 5.2.6. Vliv účinnosti separačního systému na rozlišení enantiomerů

Na rozlišení enantiomerů se podílí retence, selektivita, ale i větší účinnost kolony. Ve snaze o zlepšení enantioseparace byly za sebe zapojeny dvě teikoplanin aglykonové kolony. Srovnání enantioseparace cloprostenolu při použití jedné a dvou stejných separačních kolon při daném složení mobilní fáze ukazuje tabulka 11. Větší počet teoretických pater umožnil zvýšení rozlišení, ale došlo i ke zvýšení retenčního faktoru.

**Tab. 11:** Porovnání retenčních dat a rozlišení v systémech s jednou a dvěma TAG CSP.

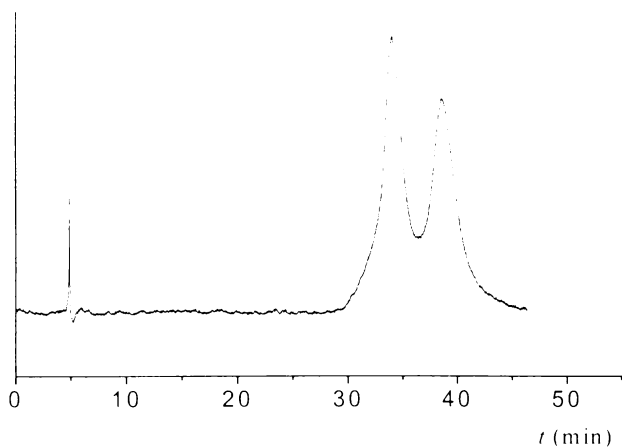
Složení mobilní fáze	CSP	$k_1$	$R$	$n_1^*)$	$n_2^{**})$	$\alpha$
ACN / MeOH / HAc / TEA	TAG CSP	5,99	1,22	1710	1341	1,16
90 / 10 / 0,1 / 0,1 (v/v/v/v)	2xTAG CSP	7,33	1,35	2302	1929	1,14

\*) počet teoretických pater prvního eluujícího píku

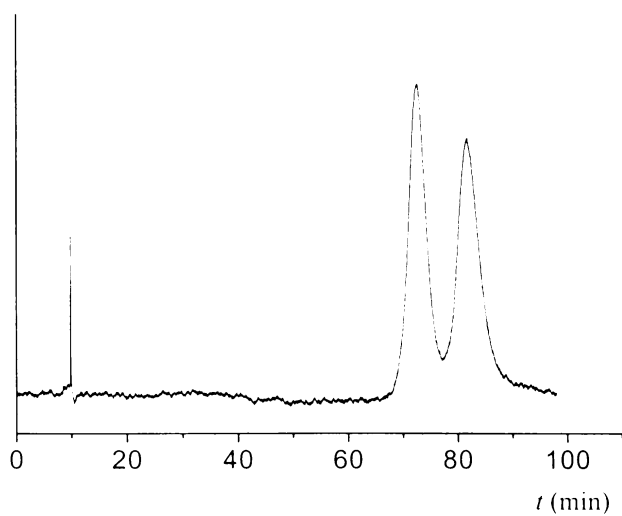
\*\*\*) počet teoretických pater druhého eluujícího píku

Jak je patrné z tabulky 11, při zapojení dvou teikoplanin aglykonových kolon došlo ke zlepšení rozlišení z hodnoty  $R=1,22$  na  $R=1,35$ . Doba retence v obou uspořádáních byla přijatelná, ale při zapojení dvou kolon do separačního systému došlo přibližně ke zdvojnásobení retenčního času. Ukázky chromatogramů lze vidět na obr. 8 a obr. 9.

Účinnost byla určena pomocí programu Clarity™ 2.1..



**Obr. 8:** Chromatogram enantioseparace cloprostenolu za podmínek: CSP teikoplanin aglykon, mobilní fáze ACN/MeOH/HAc/TEA 90/10/0,1/0,1 (v/v/v/v).

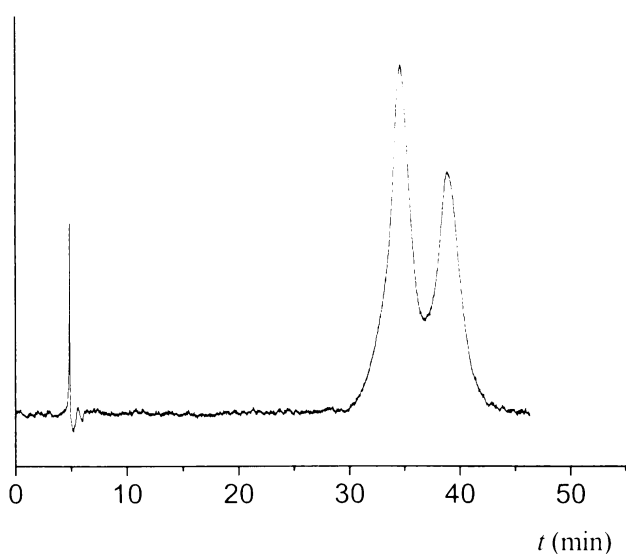


**Obr. 9:** Chromatogram enantioseparace cloprostenolu za podmínek: CSP teikoplanin aglykon (2 kolony), mobilní fáze ACN/MeOH/HAc/TEA 90/10/0,1/0,1 (v/v/v/v).



### 5.2.7. Eluční pořadí enantiomerů cloprostenolu v polárně-organickém módu

Pro zjištění, který enantiomer eluuje z kolony dříve, byl použit obohacený vzorek ( $\pm$ )-cloprostenolu o (+)-enantiomer. Z chromatogramu na obrázku 10 je patrné, že (+)-enantiomer cloprostenolu je méně zadržován na koloně, a tudíž eluuje z kolony dříve než (-)-enantiomer.



**Obr. 10:** Chromatogram enantioseparace cloprostenolu za podmínek: CSP teikoplanin aglykon, mobilní fáze ACN/MeOH/HAc/TEA 90/10/0,1/0,1 (v/v/v/v).

### 5.3. Enantioseparace cloprostenolu v normálním módu

Hlavními složkami mobilní fáze v normálním módu byly pro počáteční experimenty hexan a propan-2-ol (viz tab.12).

**Tab. 12:** Porovnání retenčního faktoru ( $k_1$ ) a rozlišení ( $R$ ) v závislosti na poměru hlavních složek hexanu a propan-2-olu v mobilní fázi.

Složení mobilní fáze	$k$	$R$
hexan/propan-2-ol 80/20 (v/v)	*	*
hexan/propan-2-ol 50/50 (v/v)	13,12	0,17

\* nedošlo k eluci do 190 minut

Při použití mobilní fáze s vyšším obsahem hexanu v mobilní fázi cloprostenol neeluoval z kolony do 190 minut. Proto se skokem přešlo do mobilní fáze, kdy zastoupení hlavních složek bylo v poměru 1:1. I v této mobilní fázi byl však retenční faktor příliš velký a rozlišení příliš malé. Z těchto dílčích výsledků bylo zřejmé, že pro zlepšení enantioseparace cloprostenolu a zkrácení doby analýzy je třeba zásadněji změnit složení mobilní fáze.

### 5.3.1. Vliv octové kyseliny v mobilní fázi

Přídavek octové kyseliny do mobilní fáze vedl v polárně-organickém módu ke snížení rozmývání píků. Proto byl tento způsob ovlivnění účinnosti separace a v důsledku toho i rozlišení zkoumán i v normálním módu. Tabulka 13 ukazuje vliv přídavku HAc do mobilní fáze tvořené hexanem s propan-2-olem 50/50 (v/v) na retenci a chirální rozlišení cloprostenolu.

**Tab. 13:** Porovnání retenčního faktoru ( $k_f$ ) a rozlišení ( $R$ ) v závislosti na přídatku HAc v mobilní fázi.

Složení mobilní fáze	$k_f$	$R$
hexan/propan-2-ol/HAc 50/50/0 (v/v/v)	13,12	0,17
hexan/propan-2-ol/HAc 50/50/0,05 (v/v/v)	6,67	0,29
hexan/propan-2-ol/HAc 50/50/0,1 (v/v/v)	5,99	0,39

Přidáním malého množství octové kyseliny do mobilní fáze došlo k výraznému snížení retence a mírnému zvýšení rozlišení. Docílená hodnota chirálního rozlišení však nebyla dostatečná.

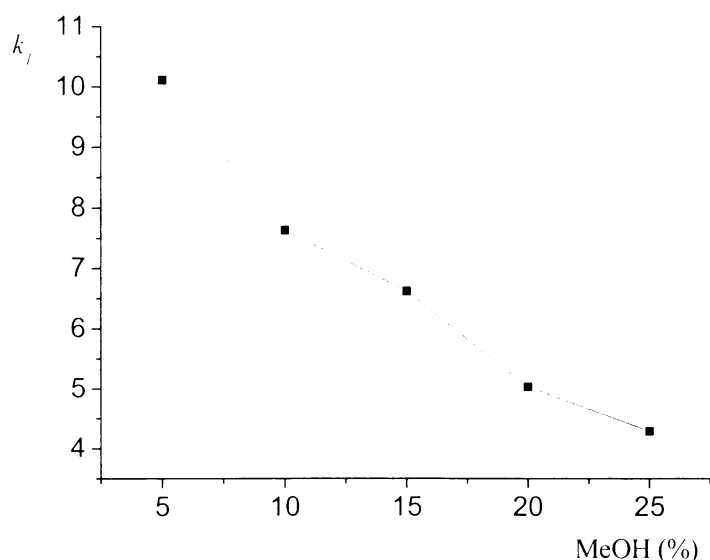
### 5.3.2. Vliv polárnějšího rozpouštědla v mobilní fázi

Jako další možnost optimalizace separace enantiomerů cloprostenolu v normálním módu se jevílo použití polárnějšího organického rozpouštědla s menší viskozitou. V tabulce 14 jsou uvedeny hodnoty retenčního faktoru prvního elujícího enantiomeru, rozlišení a faktoru selektivity při přídatku methanolu do mobilní fáze. Obsah hexanu a octové kyseliny byl konstantní, měnil se pouze poměr methanolu a propan-2-olu.

**Tab. 14:** Porovnání retenčního faktoru ( $k_I$ ), rozlišení ( $R$ ) a faktoru selektivity ( $\alpha$ ) v závislosti na obsahu propan-2-olu a methanolu v mobilní fázi.

Složení mobilní fáze	$k_I$	$R$	$\alpha$
propan-2-ol/hexan/MeOH/HAc 25/70/5/0,05 (v/v/v/v)	10,11	1,17	1,17
propan-2-ol/hexan/MeOH/HAc 20/70/10/0,05 (v/v/v/v)	7,63	1,17	1,12
propan-2-ol/hexan/MeOH/HAc 15/70/15/0,05 (v/v/v/v)	6,62	1,11	1,09
propan-2-ol/hexan/MeOH/HAc 10/70/20/0,05 (v/v/v/v)	5,03	0,82	1,07
propan-2-ol/hexan/MeOH/HAc 5/70/25/0,05 (v/v/v/v)	4,29	0,63	1,05

Z výsledků měření je patrné, že se zvyšujícím se obsahem MeOH v mobilní fázi se snižoval retenční faktor, ale i selektivita separace. Lepšího rozlišení bylo dosaženo při vyšším obsahu propan-2-olu, kdy byla vyšší retence i selektivita separace. Všechny hodnoty v tab. 14 pro všechny měřené veličiny tedy sledují stejný trend. Lze říci, že přídavek MeOH má pozitivní vliv na retenci, překvapivě však zřejmě pozitivně neovlivňuje účinnost separace (byl předpokládán lepší přenos hmoty v méně viskózním prostředí) ani selektivitu, a tím ani rozlišení.



**Obr. 11:** Vliv methanolu v mobilní fázi na retenční faktor dříve elujícího enantiomeru cloprostenolu.

### 5.3.3. Vliv účinnosti kolony na rozlišení

I v normálním módu byl vyzkoušen vliv zvýšení počtu teoretických pater použitím dvou kolon na rozlišení. Pro měření byly za sebe zapojeny obě chromatografické kolony s navázaným teikoplanin aglykonem. Toto měření bylo uskutečněno pouze v jedné mobilní fázi o složení: propan-2-ol/hexan/MeOH/HAc 10/80/10/0,05 (v/v/v/v). Při separaci na jedné koloně byla hodnota rozlišení 1,28. Při zapojení dvou kolon se hodnota rozlišení zvýšila na 1,34. Se zvýšením počtu teoretických pater došlo i ke zvýšení rozlišení, jak je patrné z tabulky 15.

**Tab. 15:** Porovnání retenčních dat a rozlišení v systémech s jednou a dvěma TAG CSP.

Složení mobilní fáze	CSP	$k_1$	$R$	$n_1^*$ )	$n_2^{**}$ )	$\alpha$
propan-2-ol/hexan/MeOH/HAc 10/80/10/0,05 (v/v/v/v)	TAG CSP	13,28	1,28	3883	3759	1,09
	2xTAG CSP	13,27	1,34	4391	4261	1,09

\*) počet teoretických pater prvního eluujícího píku

\*\*\*) počet teoretických pater druhého eluujícího píku

### 5.3.4. Ovlivnění chirální separace cloprostenolu působením teploty

Chirální separaci mohou ovlivnit nejen chemické vlivy, ale i fyzikální. Jedním z fyzikálních vlivů je teplota, jak bylo ukázáno už v kapitole 5.2.3. Teplota v termostatu, ve kterém byla uložena chromatografická kolona byla nastavena na 10°C. Při této teplotě byla provedena separace ve dvou mobilních fázích. Výsledky měření byly srovnány se separacemi, které probíhaly za laboratorní teploty (viz tab. 16)

**Tab. 16:** Porovnání retenčního faktoru prvního eluujícího enantiomeru cloprostenolu ( $k_1$ ) a rozlišení ( $R$ ) v závislosti na teplotě.

Složení mobilní fáze	Teplota	$k_1$	$R$
propan-2-ol/hexan/MeOH/HAc 10/80/10/0,05 (v/v/v/v)	10°C	15,36	1,34
	laboratorní	13,28	1,28
propan-2-ol/hexan/MeOH/HAc 20/70/10/0,05 (v/v/v/v)	10°C	8,76	1,19
	laboratorní	7,63	1,17

Z výsledků uvedených v tabulce je zřejmé, že snížení teploty ovlivnilo retenci a mělo určitý vliv i na rozlišení. Při laboratorní teplotě byla retence cloprostenolu nižší, stejně tak i rozlišení bylo nižší. Tento trend byl pozorován v obou mobilních fázích použitých pro studium vlivu teploty.

### 5.3.5. Ovlivnění enantioseparace cloprostenolu přidavkem octové kyseliny a triethylaminu

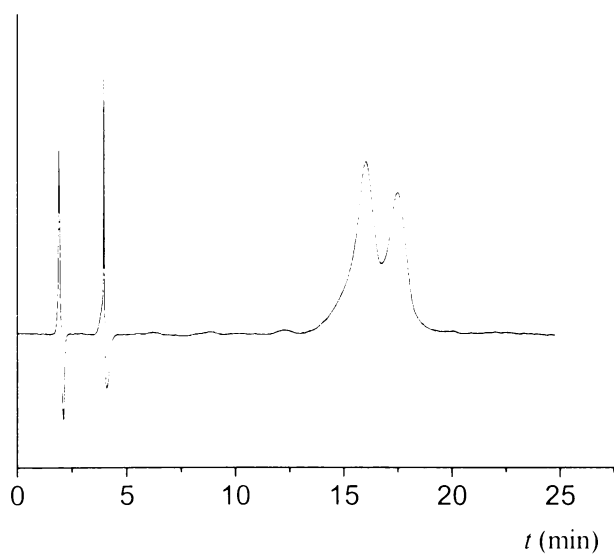
Jak bylo ukázáno výše, retenci analytu stejně jako rozlišení lze ovlivnit přidavkem octové kyseliny nebo methanolu. Vliv na retenci i rozlišení enantiomerů cloprostenolu však může mít i přidavek triethylaminu. Porovnání chromatografických dat změřených v mobilní fázi tvořené pouze směsí organických rozpouštědel, a pak s přidavkem octové kyseliny nebo naopak triethylaminu shrnuje tabulka 17. Příslušné chromatogramy jsou uvedeny na obrázcích 12-14.

**Tab. 17:** Porovnání retenčního faktoru a rozlišení v závislosti na složení mobilní fáze.

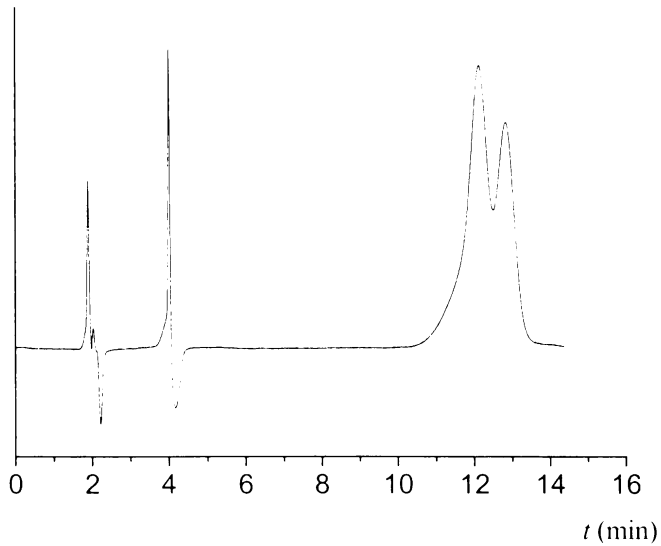
Složení mobilní fáze	$k_1$	$R$	$\alpha$
propan-2-ol/hexan/MeOH/HAc/TEA 10/70/20/0/0 (v/v/v/v/v)	7,43	0,99	1,10
propan-2-ol/hexan/MeOH/HAc/TEA 10/70/20/0,05/0 (v/v/v/v/v)	5,03	0,82	1,07
propan-2-ol/hexan/MeOH/HAc/TEA 10/70/20/0/0,05 (v/v/v/v/v)	27,08	1,82	1,26

Z tabulky je patrný vliv HAc v mobilní fázi na snížení retence, ale i zhoršení enantioseparace cloprostenolu. Naopak přidavek TEA do mobilní fáze má za následek výrazné zvýšení retence. Triethylamin má však také pozitivní vliv na rozlišení. V mobilní fázi tvořené směsí propan-2-ol/hexan/MeOH/TEA 10/70/20/0,05 (v/v/v/v) bylo dosaženo úplného rozlišení obou enantiomerů. Ukázka chromatogramu enantioseparace je na obr. 14.

Pro zkrácení retenčního času byla dále zvýšena průtoková rychlost mobilní fáze kolonou z 1 ml/min na 1,5 ml/min. Při vyšším průtoku se rozlišení snížilo, ale enantiomery zůstaly stále rozdělené, přitom retenční čas se zkrátil. Zvýšením průtokové rychlosti na 2 ml/min došlo opět ke zkrácení retence, ale cloprostenol už nebyl rozdělený až na základní linii.

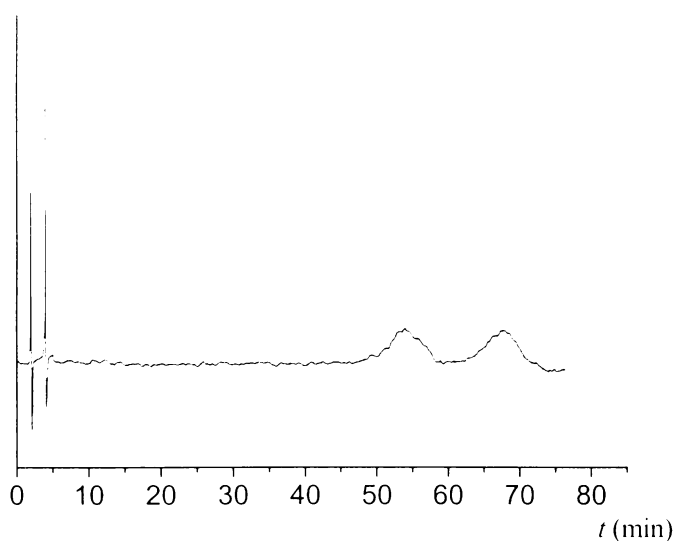


**Obr. 12:** Chromatogram enantioseparace cloprostenolu za podmínek: CSP teikoplanin aglykon, mobilní fáze propan-2-ol/hexan/MeOH 10/70/20 (v/v/v).



**Obr. 13:** Chromatogram enantioseparace cloprostenolu za podmínek: CSP teikoplanin aglykon, mobilní fáze propan-2-ol/hexan/MeOH/HAc 10/70/20/0,05 (v/v/v/v).

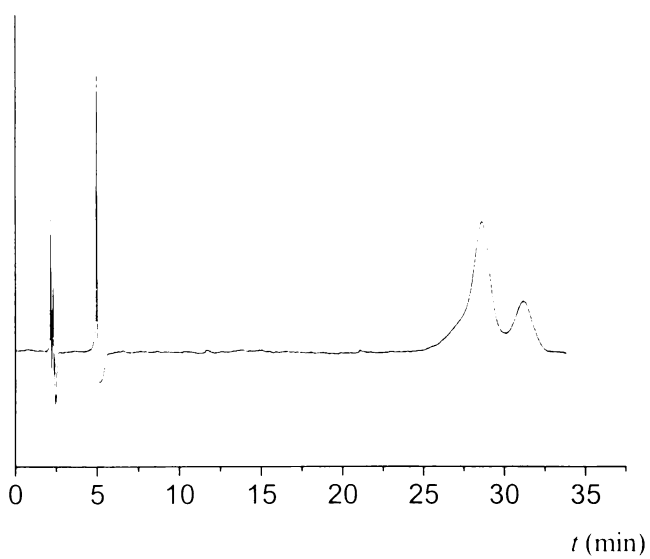




**Obr. 14:** Chromatogram enantioseparace cloprostenolu za podmínek: CSP teikoplanin aglykon, mobilní fáze propan-2-ol/hexan/MeOH/TEA 10/70/20/0,05 (v/v/v/v).

### 5.3.6. Eluční pořadí enantiomerů cloprostenolu v normálním módu

Pro zjištění, který enantiomer eluuje z kolony dříve byl opět použit vzorek obohacený o (+)-enantiomer. Z obrázku 15 je patrné, že se (-)-enantiomer zadržuje na koloně více a (+)-enantiomer eluuje z kolony první. Stejně eluční pořadí zjištěné v polárně-organickém módu a v normálním módu vypovídá o analogickém separačním mechanismu.



**Obr. 15:** Chromatogram enantioseparace cloprostenolu za podmínek: CSP teikoplanin aglykon, mobilní fáze propan-2-ol/hexan/MeOH/HAc 10/80/10/0,05 (v/v/v/v).

## 6. ZÁVĚR

Retence a enantiosektivní dělení cloprostenolu byly sledovány na TAG CSP ve třech separačních módech. Byl zkoumán vliv experimentálních podmínek - složení mobilní fáze, teploty na retenční chování, selektivitu a chirální rozlišení.

V reverzním módu došlo ve zkoumaných mobilních fázích pouze k částečnému dělení enantiomerů. Vhodnějšími byly mobilní fáze složené z 1% TEAA pufru s vyšším pH s přidavkem MeOH. Přesto v těchto mobilních fázích nebylo dosaženo dobrého rozlišení.

V polárně-organickém módu se prokázalo, že na retenci a enantioseparaci cloprostenolu mají vliv všechny sledované faktory, tj. poměr obou organických rozpouštědel – MeOH a ACN, vzájemný poměr i vlastní koncentrace HAc a TEA, a také teplota resp. průtoková rychlost mobilní fáze. V tomto separačním módu bylo dosaženo nejlepšího rozlišení v mobilní fázi ACN/MeOH/HAc/TEA 90/10/0,1/0,1 (v/v/v/v). Při zapojení dvou chromatografických kolon za sebou došlo k dalšímu zlepšení enantiosektivního dělení, které však bylo doprovázeno prodloužením doby separace. K úplnému oddělení obou enantiomerů v tomto separačním módu nedošlo.

V normálním separačním módu byla retence a separace enantiomerů cloprostenolu ovlivňována kombinací dvou resp. tří organických rozpouštědel (hexan, propan-2-ol a methanol), ale i přidavkem kyseliny nebo báze. Dále byl zkoumán vliv teploty a zapojení dvou stejných kolon za sebe. V tomto separačním módu se podařilo rozdělit enantiomery cloprostenolu na základní linii. Rozdělení bylo dosaženo v mobilní fázi propan-2-ol/hexan/MeOH/TEA 10/70/20/0,05 (v/v/v/v).

## 7. LITERATURA

1. F. M. Passuto: *J. Clin. Pharmacol.* 32 (1992) 917.
2. M. Doležalová, M. Tkaczyková: *Chem. Listy* 94 (2000) 994.
3. J. E. Ariens: *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 26 (1984) 663.
4. D. E. Drayer: *Clin. Pharmacol. Ther.* 40 (1986) 125.
5. P. G. Moos: *Pure Appl. Chem.* 68 (1996) 2193.
6. O. Červinka: *Chem. Listy* 93 (1999) 294.
7. J. Pacák: *Stručné základy organické chemie*, SNTL, Praha 1975.
8. Z. Deyl, I. Mikšik, F. Tagliaro, E. Tesařová: *Advanced Chromatographic and Electromigration Methods in BioSciences*, Elsevier 1998.
9. M. Gilar, E. Tesařová, V. Patzelová, Z. Deyl: *Chem. Listy* 88 (1994) 514.
10. M. F. Landoni, A. L. Soraci, P. Delatour, P. Lees: *J. vet. Pharmacol. Therap.* 20 (1997) 1.
11. C. Petterson, A. Karlsson, C. Gioelli: *J. Chromatogr.* 407 (1987) 217.
12. D. Sibilska, J. Zukowski, J. Bojarski: *J. Liq. Chromatogr.* 9 (1986) 591.
13. D. Haidocher, A. Vailaya, C. Horváth: *Proc. National Acad. Sci. USA* 93 (1996) 2290.
14. E. Ginzburg, N. Namias, M. Brown, S. Ball, S. M. Hameed, S. M. Cohn: *Internat. J. Antimicrob. Agents* 16 (2000) 39.
15. S. Somma, L. Gastaldo, A. Corti: *Antimicrob. Agents Chemother.* 26 (1984) 917.
16. A. Berthod, Y. Liu, D. W. Armstrong: *J. Chromatogr. A* 731 (1996) 123.
17. A. Péter, G. Török, D. W. Armstrong: *J. Chromatogr. A* 793 (1998) 283.
18. K. H. Ekborg-Ott, D. W. Armstrong: *Chiral Separation: Application and Technology*. American Chemical Society, Washington 1997.
19. K. H. Ekborg-Ott, Y. Liu, D. W. Armstrong: *Chirality* 10 (1998) 434.
20. A. Péter, A. Arki, D. Tourwé, E. Forró, F. Fülöp, D. W. Armstrong: *J. Chromatogr. A* 1031 (2004) 159.
21. *Chirobiotic Handbook*, 5 th. Ed., Advanced Separation Technology (Astec), Whippany, NJ, USA, 2004.
22. D. A. Evans, J. L. Katz, G. S. Peterson, T. Hintermann: *J. Am. Chem. Soc.* 123 (2001) 12411.

23. A. Berthod, T. Yu, J. P. Kullman, D. W. Armstrong, F. Gasparini, I. D'Acquarica, D. Misiti, A. Cantti: *J. Chromatogr. A* 897 (2000) 113.
24. A. Berthod, X. Chen, J. P. Kullman, D. W. Armstrong: *Anal. Chem.* 72 (2000) 1767.
25. A. Berthod, T. L. Xiao, Y. Liu, W. S. Zenks, D. W. Armstrong: *J. Chromatogr. A* 955 (2002) 53.
26. T. L. Xiao, R. V. Rozhkov, R. C. Larock, D. W. Armstrong: *Anal. Bioanal. Chem.* 377 (2003) 639.
27. H. Y. Aboul-Enein, I. Ali: *Farmaco* 55 (2002) 513.
28. G. Török, A. Péter, D. W. Armstrong: *Chirality* 13 (2001) 648.
29. L. R. Snyder: *Chromatogr.* 179 (1979) 167.
30. [www.nerapharm.cz](http://www.nerapharm.cz)
31. M. F. Landoni, A. L. Soraci, P. Delatour, P. Lees: *J. Vet. Pharmacol. Therap.* 20 (1997) 1.
32. C. Beretta, M. Cavali: *Theriogenology* 62 (2004) 837.
33. [www.astecusa.com](http://www.astecusa.com)