

**UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE**  
**FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ**



**Disertační práce**

Separace a stanovení farmaceuticky významných sloučenin chemického a  
přírodního původu s využitím kapilárních elektroforetických metod

Katedra analytické chemie

Studijní program: Farmacie

Obor: Kontrola chemických léčiv

**2007**

Mgr. Andrea Kavalírová

## Poděkování

*V první řadě bych chtěla vyjádřit poděkování mé školitelce Doc.RNDr. Marii Pospíšilové, CSc. za její cenné rady a komentáře, za poskytnutí potřebné inspirace a motivace během celého postgraduálního studia a při přípravě disertační práce.*

*Dále bych chtěla poděkovat Prof. RNDr. Rolfu Karlíčkovi, DrSc. za poskytnutí možnosti pracovat na aktuální problematice chirálních separací v rámci Centra pro výzkum struktury a mechanismu účinku potenciálních léčiv LN00B125.*

*Také děkuji za výraznou finanční podporu mých prací formou grantů, získanými Katedrou analytické chemie.*

*Velké poděkování patří všem ostatním kolegyním a spolupracovníkům z Katedry analytické chemie za pochopení, vstřícnost a poskytnutí cenných zkušeností a znalostí.*

*Děkuji svým rodičům a mému příteli za jejich podporu, porozumění a trpělivost po celou dobu mého doktorského studia.*

*Andrea Kavalírová*

## POUŽITÉ ZKRATKY:

BALA	$\beta$ -alanin
BGE	základní elektrolyt
CD	cyklodextrin
CE- $\beta$ -CD	karboxyethyl- $\beta$ -CD
CEC	kapilární elektrochromatografie
CEG	kapilární gelová elektroforéza
CEKC	kapilární elektrokinetická chromatografie
CMC	kritická micelární koncentrace
CM- $\beta$ -CD	karboxymethyl- $\beta$ -CD
CZE	kapilární zónová elektroforéza
DNS-AAAs	5-dimethylaminonaftylsulfonylové aminokyseliny
EACA	$\epsilon$ -aminokapronová kyselina
EMO	obrácení elučního pořadí
EOF	elektroosmotický tok
FITC	fluoroscein izothiokyanátu
GABA	$\gamma$ -aminomáselná kyselina
GC	plynová chromatografie
HDAS- $\beta$ -CD	heptakis-(2,3-diacetyl-6-sulfáto)- $\beta$ -CD
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
IEF	izoelektrická fokuzace
LE	vedoucí elektrolyt
LIF	laserem indukovaná fluorescence
LLE	extrakce z kapaliny do kapaliny
LOD	detekční limit
LOQ	kvantitativní limit
MEKC	micelární elektrokinetická chromatografie
PAA	polyakrylamid
PI	pindolol
SBE- $\beta$ -CD	sulfobutyl- $\beta$ -CD
SDS	dodecylsírán sodný
SEE- $\beta$ -CD	sulfoethyl- $\beta$ -CD

SFC	superkritická fluidní chromatografie
SPE	extrakce na pevnou fázi
Succ- $\beta$ -CD	succinyl- $\beta$ -CD
TE	koncový elektrolyt
TEA	triethylamin
TH	tamsulosin hydrochlorid
TLC	tenkovrstevná chromatografie

**OBSAH**

1. Úvod .....	- 4 -
2. Cíl práce .....	- 4 -
3. Základní elektroforetické techniky.....	- 7 -
3.1. Kapilární zónová elektroforéza (CZE).....	- 7 -
3.2. Kapilární izotachoforéza (ITP).....	- 11 -
3.3. Micelární elektrokinetická chromatografie (MEKC).....	- 12 -
4. On-line koncentrační techniky v kapilární elektroforézy.....	- 16 -
4.1. Proces zakoncentrování v jedné kapiláře .....	- 16 -
4.2. Proces zakoncentrování vzorku ve dvou kapilárách .....	- 20 -
5. Chiralita.....	- 22 -
5.1. Terminologie .....	- 22 -
5.2. Farmakologické aspekty.....	- 24 -
5.3. Racemáty a enantiomery .....	- 24 -
6. Chirální separace .....	- 26 -
6.1. Kapilární zónová elektroforéza .....	- 26 -
6.2. Chirální selektory používané pro přímé separace racemických směsí.....	- 30 -
6.3. Přímé separace ve dvoufázovém systému .....	- 36 -
6.4. Nevodná kapilární elektroforéza (non-aqueous CE, NACE).....	- 38 -
6.5. Využití izotachoforézy (ITP) a izoelektrické fokuzace (IE-F).....	- 39 -
7. Cyklodextriny – struktura a interakce .....	- 39 -
7.1. Interakce uplatňující se při tvorbě inkluzních komplexů.....	- 39 -
7.2. Uspořádání a stabilita inkluzních komplexů CD.....	- 41 -
8. Využití CZE pro chirální separaci.....	- 44 -

8.1. Chirální separace rivastigminu ve farmaceutických přípravcích pomocí cyklodextrinem modifikované kapilární zónové elektroforézy .....	- 44 -
8.2. Stanovení enantiomerní čistoty tamsulosinu pomocí kapilární zónové elektroforézy s přidavkem cyklodextrinu v kapiláře pokryté polyakrylamidem.....	- 47 -
8.3. Chirální separace sibutramínu pomocí kapilární zónové elektroforézy .....	- 49 -
9. Využití elktromigračních metod v analýze léčiv a látek přírodního původu .....	- 50 -
9.1. Stanovení pindololu v léčivých přípravcích metodou kapilární izotachoforézy .....	- 50 -
9.2. Stanovení acebutololu ve farmaceutických přípravcích pomocí kapilární izotachoforézy .....	- 52 -
9.3. Separace a stanovení klotrimazolu, methylparabenu a propylparabenu v léčivém přípravku micelární elektrokinetikou chromatografií.....	- 54 -
9.4. Stanovení polyolů v infuzních roztocích metodou kapilární zónové elektroforézy.....	- 56 -
10. Aplikace tzv. „stacking“ efektu v kapilární zónové elektroforéze.....	- 57 -
10.1. Vývoj stacking-CZE metody pro analýzu fenolických kyselin .....	- 57 -
11. Přílohy .....	- 66 -
12. Závěr.....	- 117 -
13. Summary .....	- 119 -
14. Literatura .....	- 121 -

## 1. ÚVOD

Kapilární elektroforéza je rychle se rozvíjející vysokoúčinná separační metoda uplatňující se v širokém záběru analytických úkolů. Při řešení převážné většiny separačních úloh však nevystačíme s rozdíly v mobilitách iontů v základním elektrolytu a je nutno zvýšit selektivitu přidávkem selektoru (aditiva), se kterým složky vzorku vstupují do interakcí.

Rychlý technický rozvoj instrumentálního vybavení vytvořil kromě klasické kapilární zónové elektroforézy a izotachoforézy také řadu modifikovaných a hybridních technik jako jsou micelární elektrokinetická chromatografie (MEKC), isoelektrická fokuzace (IEF), kapilární elektrochromatografie (CEC) a kapilární gelová elektroforéza (CGE). Díky přístupnosti těchto plně automatizovaných elektroforetických systémů lze separovat řadu látek jak polárních či nepolárních, tak i látek makromolekulárních či nízkomolekulárních. Kapilární zónová elektroforéza a metody od ní odvozené představují vhodný a užitečný doplněk k metodám chromatografickým. Volba, zda-li použít chromatografickou či elektroforetickou metodu pro analýzu dané látky, závisí dnes především na instrumentálních možnostech dané laboratoře.

## 2. CÍL PRÁCE

Cílem této práce bylo především navázat na předchozí studie v oblasti elektromigračních metod ve farmaceutické analýze a analýze látek přírodního původu prováděných na katedře analytické chemie se zřetelem na vypracování metodik umožňujících rutinní kontrolu obsahu a čistoty vybraných léčiv v hromadně vyráběných farmaceutických výrobcích. Zcela nově byla řešena problematika chirálních separací pomocí kapilární zónové elektroforézy s cílem kontroly enantiomerní čistoty chirálních léčiv. Snahou bylo také vytvořit separační systém, který by umožnil separovat, identifikovat a kvantifikovat dané látky v rostlinném extraktu dávkovaném přímo do systému bez jakékoli předchozí úpravy (jako je LLE nebo SPE).

V práci byly v rámci doktorandského studia řešeny tři konkrétní dílčí projekty. Prvním z projektů je chirální separace bazických léčiv pomocí kapilární zónové elektroforézy (1-3, II, IV-VI, VIII). Druhým je separace a stanovení účinných látek v léčivých přípravcích metodou kapilární izotachoforézy (4-5, XI), kapilární zónové elektroforézy s přímou detekcí (I, IX, XII) a nepřímou UV detekcí (VII) a pomocí micelární elektrokinetické chromatografie (6).

Posledním z těchto projektů je stanovení vybraných fenolických kyselin jako konstituentů methanolického extraktu z farmaceuticky významných rostlinných drog s využitím tzv. stacking-CZE (7).



## **TEORETICKÁ ČÁST**

### 3. ZÁKLADNÍ ELEKTROFORETICKÉ TECHNIKY

- Kapilární zónová elektroforéza (CZE)
- Kapilární gelová elektroforéza (CGE)
- Micelární elektrokinetická chromatografie (MEKC)
- Izotachoforéza (ITP)
- Izoelektrická fokuzace (IEF)
- Kapilární elektrochromatografie (CEC)

V teoretické části je uvedena pouze charakterizace metod, které byly využity při řešení problematiky disertační práce.

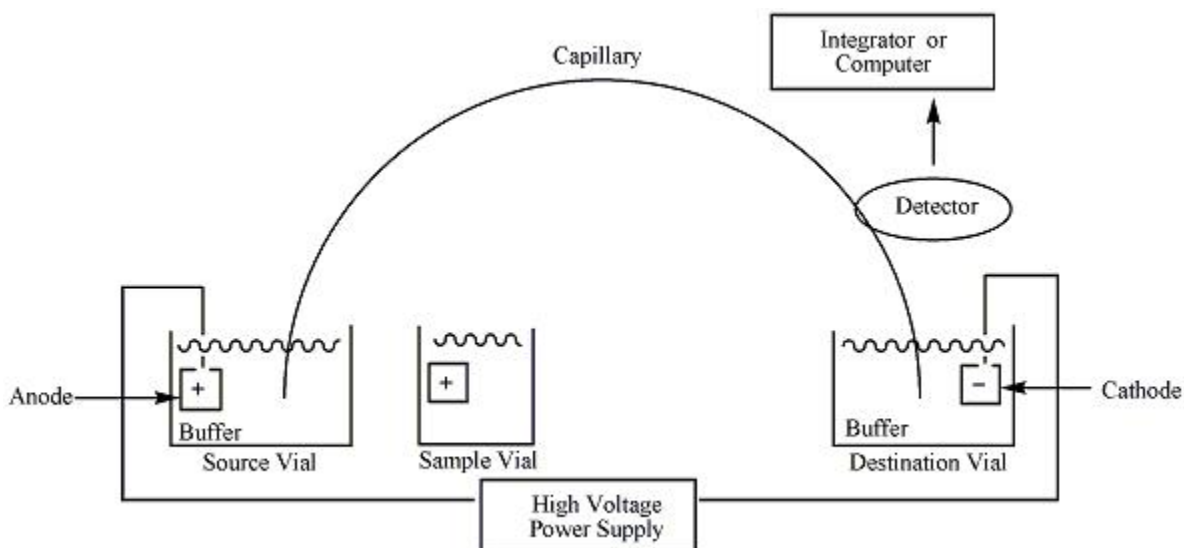
#### 3.1. Kapilární zónová elektroforéza (CZE)

Od chvíle, kdy Tiselius v roce 1937 poprvé použil elektroforézu jako analytickou metodu, byly elektromigrační metody, zejména elektroforéza a izoelektrická fokuzace po dlouhou dobu využívány v oblasti analýzy biopolymerů, zejména bílkovin, nukleových kyselin a jejich fragmentů a to ve formě separace v gelu. Prvním přístrojem v době, kdy začaly být dostupné křemenné kapiláry s vnitřním průměrem menším než 100  $\mu\text{m}$ , byla kapilární izotachoforéza a následně kapilární zónová elektroforéza. Jako v případě gelu, tak i v kapilárním uspořádání se jedná o stabilizaci prostředí, v němž se elektromigrační analýza uskutečňuje. Rozvoj kapilární elektroforézy byl ve svých začátcích zaměřen především na analýzu bílkovin. V této oblasti si udržela své místo, avšak postupně se rozšířila i na separace jiných typů látek, takže dnes představuje komplementární metodu k vysokoúčinné kapalinové chromatografii a její aplikace nacházejí uplatnění v rozličných oblastech zahrnující farmaceutickou analýzu, lékopisnou kontrolu léčiv, monitorování lékových hladin v biologických materiálech, analýzu životního prostředí a potravinářskou a biochemickou analýzu [1].

Instrumentální zázemí CZE sestává z křemenné kapiláry o vnitřním průměru 20-150  $\mu\text{m}$  a délce 20-60 cm, která je pro větší mechanickou pevnost zvenku pokryta polyamidovou ochrannou vrstvou. Konce kapiláry a elektrody jsou ponořené do nádobek s roztokem (puřem, BGE), kterým je také naplněna kapilára. V blízkosti katodového konce kapiláry je umístěn detektor, nejvíce cenově dostupný je typ spektrofotometrický nebo fluorescenční. Celu detektoru tvoří část

kapiláry (cca 1 cm), z níž byla odstraněna ochranná polyamidová vrstva buď naleptáním pomocí roztoku kyseliny sírové nebo opatrným opálením plamenem. U většiny přístrojů je kapilára s elektrodami zabudována v kazetě a vkládána do přístroje jako celek [2].

**Obr. 1: Schéma kapilární zónové elektroforézy.**



Vialky se vzorkem i pufrům jsou obvykle stejné, mají objem 1-2 ml, který lze pomocí vkládacích kónických zkumavek snížit na 50-100  $\mu\text{l}$  [3].

Přístroj je dále vybaven zdrojem vysokého napětí, kterým se na kapiláru vkládá napětí v rozmezí 5-30 kV. Intenzita proudu zpravidla nesmí být vyšší než 100  $\mu\text{A}$ , aby nebyla překročena kapacita termostatu, který se reguluje proudem generovaného tepla (Jouleovo teplo). Při překročení kapacity termostatu by došlo ke vzniku teplotního gradientu (rozdíl v teplotě uvnitř a na povrchu kapiláry) a tím i k lokálním změnám viskozity roztoku v kapiláře s následnou deformací separované zóny (laminární proudění). Vedle výkonného termostatu existuje několik dalších způsobů, kterými lze udržet Jouleovo teplo v přípustných mezích, např. snížením napětí, použitím kapiláry o menším vnitřním průměru nebo nižší koncentraci základního pufru, popř. volbou pufru s nižší iontovou pohyblivostí.

Výběr a složení pufru je zpravidla první alternativou při vývoji metody. Obvykle se používají roztoky elektrolytů o koncentraci 20-100 mmol/l. Čím vyšší je koncentrace pufru, tím pomalejší je elektroosmotický tok a tím delší doba analýzy. Běžné separace trvají 5-15 minut [4].

Pro nástřik vzorku do kapiláry (objem nástřikovaného vzorku se pohybuje v jednotkách nl) jsou nejvíce využívány dva způsoby: hydrodynamický a elektrokinetický. Při hydrodynamickém nástřiku se vzorek dávkuje buď pod tlakem vloženém na vstupní (anodický) konec kapiláry, ponořený do roztoku vzorku nebo pod vakuem, aplikovaným na výstupní (katodický) konec kapiláry, který je ponořen do roztoku pufru ve vialce. Elektrokinetický nebo elektromigrační nástřik spočívá ve vložení napětí na anodický konec kapiláry, ponořený do roztoku vzorku. Napětí se vkládá na dobu několika sekund a zpravidla bývá 3-5krát nižší než napětí pro separaci. Analyt se tak do kapiláry dostane především působením elektroosmotického toku a proto může snadno dojít k diskriminaci iontů; kationty, resp. pohyblivější ionty jsou totiž dávkovány větší měrou než anionty, resp. ionty méně pohyblivé. Předností elektromigračního dávkování je však nenáročnost na přístrojové doplňkové vybavení a použitelnost při dávkování viskózních vzorků nebo gelů, u nichž hydrodynamické dávkování selhává.

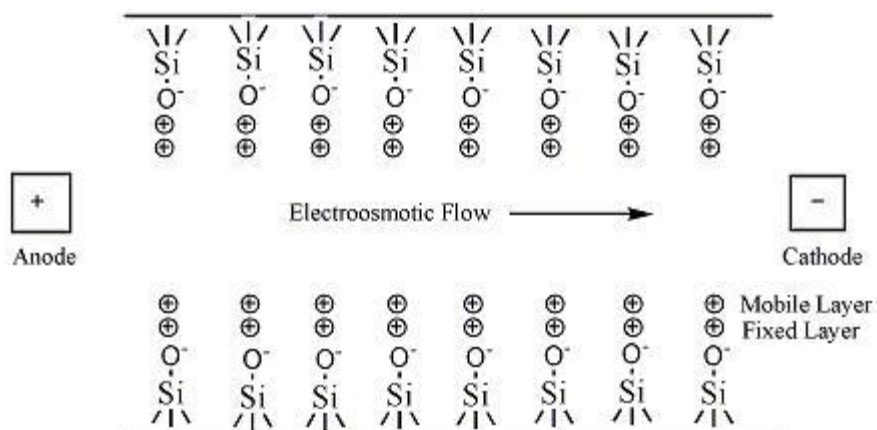
Komerční přístroje pro kapilární elektroforézu jsou bez výjimky řízeny počítačem, jehož prostřednictvím je programována nejen metoda, tj. podmínky separace a detekce, ale je určováno i pořadí vzorků a způsob promytí kapiláry po provedené analýze.

Detektory, nejčastěji UV-VIS, popř. jeho výhodnější varianta s diodovým polem (DAD, Diode Array Detector) nebo fluorimetrický detektor, jsou nedílnou součástí analyzátorů. Méně často jsou používány jiné detekční techniky, jako je např. konduktometrická, amperometrická nebo radiometrická detekce. V poslední době se začíná výrazně uplatňovat potentní hyphenální technika CZE-MS. Nepoužívají se kombinace CZE-NMR a CZE-IČ spektroskopie, protože požadavky těchto metod na množství vzorku nevyhovují podmínkám CZE separace. Citlivost i lineární rozsah optické detekce u CZE je limitován extrémně malým rozměrem detekční cely.

Pro zvýšení tloušťky absorpční vrstvy byly navrženy speciální tvary detekční části kapiláry, např. vyfouknutí do bubliny (bubble-cell) nebo zahnutí do tvaru písmene Z. Za použití Z-cely a LIF bylo možno při analýze dansylových derivátů cysteinu detekovat 300 molekul jedné aminokyseliny v nastříknutém vzorku. Prakticky dosahované citlivosti jsou značně menší. U

neznámé látky s UV detekcí se doporučuje pro orientační elektroforézu používat koncentrace 100-200  $\mu\text{g/ml}$  [5].

**Obr. 2: Vnitřní stěna kapiláry.**



Kapilární elektroforéza má proti plošné gelové elektroforéze s off-line detekcí výhodu v přesnější on-line detekci. Konkrétním problémem CZE je sorpce analytu na povrch kapiláry. Existuje několik způsobů, jak těmto sorpcím zabránit. Jeden ze způsobů spočívá v potlačení disociace volných aminoskupin použitím silně zásaditého pufru nebo potlačení disociace silanolových skupin na povrchu kapiláry separací v kyselém prostředí. Příčinou sorpce na vnitřní povrch kapiláry nebývají však jen interakce iontové, ale mohou se uplatňovat i jiné mechanismy. Proto je nutné hledat jiné, komplexnější řešení, např. separace za přebytku polyfunkčního aminu (kadaverin) [6]. Polyamin se na stěnu kapiláry naváže přednostně a obsadí tak místa, na něž by se jinak sorboval analyt. Pozitivní výsledky dává i separace v modifikovaných kapilárách. Pro úpravu vnitřního povrchu kapiláry byla vyzkoušena řada postupů, jako je např. silanizace nebo pokrytí kapiláry cukernými polymery. Nejvíce prospěšné se však ukázalo použití lineárního, nezesíťovaného polyakrylamidu. Tento polymer lze navázat na vnitřní povrch kapiláry před vlastní separací (in situ) nebo dynamicky, promýváním kapiláry jeho roztokem v základním elektrolytu. Obdobně jako u náplňových kolon plněných polyakrylamidem, polyvinylalkoholem nebo jinými síťovacími medii, je i při dynamické modifikaci kapiláry zachován síťovací efekt, spočívající v dělení makromolekulárních solutů podle jejich molekulových hmotností [7].

### 3.2. Kapilární izotachoforéza (ITP)

Separace pomocí ITP probíhá v separační koloně naplněné diskontinuálním elektrolytovým systémem, kde vzorek migruje mezi dvěma různými elektrolyty jako zřetelně oddělená zóna.

Hodnota intenzity elektrického pole v zóně vzorku je výhradně určována analyzovanou látkou a druhem protiontu vedoucího elektrolytu. Vzorek je nadávkován mezi vedoucí (LE) a koncový (TE) elektrolyt. Vedoucí elektrolyt obsahuje vedoucí ion a protion. Vedoucí ion má vždy větší efektivní pohyblivost než všechny analyzované složky vzorku. Koncový elektrolyt obsahuje koncový ion, který má nižší efektivní pohyblivost než všechny analyty. Během analýzy se ze směsné zóny vzorku obsahující látky A a B postupně vyděluje zóna látky A a zóna látky B. Ke konci analýzy veškerá látka A i B vymigruje ze směsné zóny, takže kapilárou migrují ustálenou konstantní rychlostí ostře ohraničené, těsně na sebe navazující zakoncentrované zóny látky A a B. K úplné separaci jednotlivých složek vzorku dojde teprve po projití dostatečně dlouhé dráhy. Protionty se pohybují směrem opačným než analyty a nenabitě částice se v systému nepohybují vůbec. V ustáleném stavu je rychlost pohybu všech iontů stejná [8].

Koncentrace separované látky v jejich diskrétních zónách je zcela nezávislá na jejich koncentraci v původním vzorku, neboť je upravována dle Kohlrauschovy regulační funkce podle koncentrace vedoucího elektrolytu:  $c_A = f[\omega]$ . Hodnoty základních fyzikálních veličin jako je odpor (R), intenzita elektrického pole (E), vodivost a pH charakterizující takový systém, stejně jako koncentrace analytů v diskrétních zónách, jsou nespojitě, resp. mění se skokem od zóny k zóně. Zatímco vodivost klesá od LE k TE, odpor a intenzita elektrického pole ve stejném směru vzrůstá. Zónová rozhraní zůstávají ostrá nezávisle na době migrace analytů v separační kapiláře díky samozaostřovacímu efektu, který je generován nespojitou hodnotou intenzity elektrického pole. Z této charakteristiky vyplývá jedinečná vlastnost ITP ve srovnání s ostatními separačními technikami jako je CZE a HPLC, která spočívá nejen ve schopnosti separace analytů, ale zejména jejich zakoncentrování (až 10 000krát) z velkého objemu původního vzorku do ostře ohraničených izotachoforetických zón. Nejčastěji používaná je vodivostní detekce, která registruje změny vodivosti, respektive odporu, na ostrých zónových rozhraních a představuje univerzální metodu. Odezva detektoru je zaznamenávána jako schodovitá izotachoforetická křivka – izotachoforeogram. Výhodné je použití UV detekce, zejména s ohledem na větší selektivitu a citlivost stanovení [9].

Instrumentace pro ITP je dobře propracována. K separaci dochází v kapilárách vyrobených z plastu (fluorované polymery), 20-60 cm dlouhé, průměru 0,2-0,8 mm. Konce kapiláry jsou propojeny k elektrodoým komůrkám, které obsahují LE, TE a platinové elektrody pro připojení zdroje vysokého napětí. Nežádoucím hydrodynamickému proudění elektrolytu se zabráňuje semipermeabilní membránou umístěnou obvykle v místě připojení kapiláry ke komůrce s vedoucím elektrolytem. Vzorek se dávákuje buď dávkovacím kohoutem nebo injekční stříkačkou. Dávkovaný objem 1-30  $\mu\text{l}$  [10].

Díky svému specifickému charakteru separačního procesu v systému dvou nespojitých elektrolytů a jedinečné schopnosti zakoncentrovávat analyty ze zředěných roztoků nachází ITP uplatnění v oblasti farmaceutických, medicínských, biologických analýz, s výhodou je také používána při monitorování kvality životního prostředí – zejména analýzy anorganických iontů, při kontrole jakosti potravin a při sledování fermentačních biotechnologických procesů. Univerzalita vodivostní detekce, snadnost kvalitativního i kvantitativního hodnocení výsledků, správnost a přesnost naměřených dat umožňuje využití ITP pro rutinní analýzu vzorků.

ITP je také velice užitečnou technikou využívanou pro kontrolu obsahu a čistoty HVLP, kde je hlavní pozornost zaměřena na kvantitativní hodnocení farmaceuticky účinných látek iontového charakteru přítomných většinou v neiontové matrici. Vzhledem k separačnímu charakteru ITP lze analyzovat multikomponentní přípravky, stejně tak jako současně hodnotit obsah léčiva i jeho degradačních produktů. Vypracování ITP metodiky pro hodnocení obsahu účinné látky v HVLP zahrnuje výběr optimálního elektrolytového systému, tedy vedoucího iontu, nastavení pH přidáním protiiontu s vhodným  $pK_a$  a v případě aniontové ITP analýzy přidavek aditiv jako jsou deriváty celulózy. Dále následuje výběr terminujícího iontu s vhodnou pohyblivostí a hodnotou  $pK_a$ . Optimalizace vybraného operačního systému spočívá ve zhodnocení vlivu změny pH LE, koncentrace L iontu, změny druhu aditiva u aniontové ITP, teploty a velikosti separačního a detekčního proudu na kvalitu separačního procesu [11].

### **3.3. Micelární elektrokinetická chromatografie (MEKC)**

Při micelární elektrokinetické chromatografii se separace provádí v elektrolytovém roztoku, který obsahuje surfaktant o koncentraci vyšší než kritická micelární koncentrace (CMC). Molekuly rozpuštěné látky jsou rozděleny podle jejího rozdělovacího koeficientu mezi vodný tlumivý roztok a pseudostacionární fázi tvořenou micelami. První publikace o MEKC, považované za

kombinaci elektroforézy a chromatografie, byly publikovány v letech 1984 a 1985 [12,13]. Pseudostacionární (=pomalu se pohybující) fáze v elektrokinetické chromatografii se skládá buď ze seskupených nebo jednotlivých molekul, které jsou rozpuštěny jako přísady v pracovním elektrolytu. Takto formulovaný systém obsahuje, na molekulové úrovni, heterogenní prostředí popř. „pseudofázi“ která soutěží s vodnou fází v interakcích s analytem. Řídící síly, které kontrolují rychlost objemu vodné fáze a heterogenní pseudofáze jsou elektroosmotické a elektroforetické migrační faktory. Micelární fáze se chová podobně jako stacionární fáze v HPLC s tím rozdílem, že se pohybuje svou vlastní rychlostí. Proto může být na MEKC nahlíženo jako na „hybrid“ HPLC a CZE [9]. Pro tvorbu pseudofáze lze použít širokou škálu aditiv. Surfactanty tvořící agregáty, označované jako micely, jsou nejvíce používaná aditiva. Mikroemulze [14] a lipozomy [15] představují další příklady agregujících molekul chovající se jako pseudofáze. Molekuly, které neagregují, lze také použít jako pseudofázi, např. cyklodextriny [16].

MEKC je metoda, která může být použita pro separaci jak neutrálních, tak nabitých látek při zachování účinnosti, rychlosti a instrumentální vhodnosti kapilární zónové elektroforézy. Separační mechanismus je následující. Při neutrálním a alkalickém pH se tvoří silný elektroosmotický tok, který unáší ionty i neutrální molekuly separačního tlumivého roztoku směrem ke katodě. Pokud je jako tenzid použit dodecylsírán sodný, má elektroforetická migrace aniontových micel opačný směr, tj. k anodě. Výsledkem je, že celková rychlost migrace micel je zpomalena ve srovnání s objemovým tokem elektrolytu. V případě neutrálních rozpuštěných látek, kdy se stanovovaná látka může rozdělit mezi micely a vodný tlumivý roztok a nemá elektroforetickou pohyblivost, bude migrační rychlost stanovované látky záviset pouze na rozdělovacím koeficientu mezi micelou a vodným tlumivým roztokem. Na elektroforeogramu jsou píky nenabitých látek vždy mezi indikátorem elektroosmotického toku a indikátorem micel. Čas ohraničený těmito dvěma píky se nazývá separační okno. Migrační rychlost elektricky nabitých látek závisí jak na jejich rozdělovacím koeficientu mezi micelami a vodným tlumivým roztokem, tak na jejich elektroforetické pohyblivosti v roztoku neobsahujícím micely.

Pseudostacionární fáze používané v MEKC lze rozdělit do dvou skupin. Hlavní skupinu představují micely a druhou tzv. polymerní fáze [17]:



### ➤ **Micely tvořené molekulami surfaktantů**

Surfaktanty jsou molekuly obsahující dlouhé hydrofobní řetězce a polární skupiny. Při rozpouštění surfaktantu v roztoku nedochází ihned ke tvorbě micel, ale začínají se tvořit až při koncentraci vyšší než je hodnota kritické micelární koncentrace. CMC je charakteristická pro každý surfaktant, stejně tak jako počet molekul surfaktantu, které se podílejí na tvorbě jedné micely (tzv. agregační číslo). Surfaktanty dělíme na základě jejich vlastností do následujících skupin [18]:

- **Kationaktivní surfaktanty**

Surfaktanty většinou interagují s negativně nabitými silanolovými skupinami na stěně separační kapiláry, což vede k obrácení elektroosmotického toku. Separace probíhá při reverzní polaritě – katoda na straně nástřiku (inletu). Nábojový zvrát se vyskytne již při koncentraci surfaktantu, která je nižší než CMC, ale bez charakteristické selektivity doprovázející MEKC. Změna velikosti alkylového řetězce neovlivňuje změnu EOF, modifikuje však mobilitu micel. Delší alkylové řetězce znamenají užší eluční okno [19]. Charakteristickými zástupci této skupiny jsou kvartérní amoniové sloučeniny viz Tab. 1.

- **Anionaktivní surfaktanty**

Délka řetězce surfaktantu ovlivňuje hydrofobicitu formujících se záporně nabitých micel, které migrují proti EOF k anodě. Surfaktanty s alkylovým řetězcem kratším než osm uhlíků nejsou příliš využívány, díky příliš vysoké CMC. Nicméně mohou být použity jako ion-párové reagenty pro změnu selektivity [20]. Surfaktanty s alkylovým řetězcem delším než 14 uhlíků vykazují omezenou rozpustnost [21]. Nejpoužívanějším surfaktantem v MEKC je SDS [22]. Jeho výhodou je vysoká rozpustnost ve vodě, nízká CMC, nízká UV absorpce a příznivá cena. Mezi anionaktivní surfaktanty patří dále soli žlučových kyselin, jako např. cholát, deoxycholát, taurocholát a další. Soli žlučových kyselin mají velmi rozdílné agregační vlastnosti a strukturu oproti SDS micelám. K jejich výhodám patří možnost použití relativně vyšší koncentrace organických modifikátorů (30 % organického rozpouštědla) bez porušení struktury. Další skupinou anionaktivních surfaktantů jsou borátové komplexní surfaktanty. Hustota náboje na micelách a tudíž velikost elučního okna může být ovlivněna úpravou pH a koncentrací borátu. Některé obsahují chirální funkční skupiny a mohou být použity pro chirální separace.

- Neionogenní a amfoterní surfaktanty

Tyto surfaktanty vytvářejí elektroforeticky nepohyblivé micely a z tohoto důvodu je nelze použít pro separaci neutrálních analytů [23]. V těchto případech se používají ve formě tzv. smíšených micel. Neionogenní surfaktanty a směsi neionogenních a anionaktivních surfaktantů vykazují odlišnou selektivitu a nižší hodnoty elektrického proudu během analýzy ve srovnání s anionaktivními surfaktanty. Charakteristickými zástupci neionogenních surfaktantů jsou uvedeny v Tab. 1.

**Tab. 1: Přehled surfaktantů využívaných v MEKC.**

Aniontové		CMC (mM)
	Dodecylsírán sodný (SDS)	8
	Decylsírán sodný (STS)	40
	Taurocholát sodný (STC)	10-15
	Cholát sodný (SC)	13-15
	Taurodeoxycholát sodný (STDC)	2-6
	Deoxycholát sodný	4-6
Kationtové		
	Chlorid decyl-3-methyl-amonný (DTAC)	61
	Bromid hexyl-3-methyl-amonný (HTAB)	140
	Bromid propyl-3-methyl-amonný (PTAB)	NA
	Bromid cetyltrimethylamonný (CTAB)	NA
	Bromid dodecyltrimethylamonný (DTAB)	NA
	Bromid tetradecyltrimethylamonný (TTAB)	NA
Neutrální		

	Triton X-100	24
	Oktyl- $\beta$ -D-glukopyranozid (OG)	19-25

### ➤ Polymerní pseudostacionární fáze

Tato skupina zahrnuje pseudostacionární fáze, které mají rozdílné strukturální vlastnosti. Mají společný rys - obsahují kovalentní vazby. Výhodou užití polymerních fází je jejich stabilita v přítomnosti vyšších koncentrací organických modifikátorů, které jsou nezbytné pro separaci vysoce hydrofobních solutů silně interagujících s micelami.

Migrace analytů v MEKC je definována dvěma extrémy. Analyty, které neinteragují s micelami ( $P_{mw} \sim 0$ ), stráví všechny svůj migrační čas v základní vodné fázi a migrují s elektroosmotickým tokem. Toto chování je typické pro nenabitě polární molekuly jako je methanol nebo acetonitril, které jsou proto elektroosmotickými markery a eluují při  $t_{eo}$ . Druhý případ je charakterizován elucí analytů, které interagují tak silně s micelami ( $P_{mw} \sim \infty$ ), že tráví všechny svůj migrační čas uvnitř micel. Tyto markery jsou typicky velmi hydrofobní sloučeniny, které jsou špatně rozpustné ve vodném prostředí – mezi takové látky patří např. Sudan III a dodekanofenon. Eluční časy pro tyto analyty se shodují s retenčním časem micel,  $t_{mc}$ . Všechny nenabitě soluty by měly být separovány mezi migračním časem nezadržovaného solutu,  $t_{eo}$ , a plně zadržovaného solutu,  $t_{mc}$ .

## 4. ON-LINE KONCENTRAČNÍ TECHNIKY V KAPILÁRNÍ ELEKTROFORÉZE

### 4.1. Proces zakoncentrování v jedné kapiláře

Krátká optická dráha detekčního paprsku a malý dávkovací objem v kapilární zónové elektroforéze jsou překážkou při použití přímé fotometrické detekce velmi ředěných vzorků [24].

Zlepšení citlivosti lze dosáhnout použitím jiného druhu detekce, např. laserem indukované fluorescenční detekce (LIF) nebo elektrochemickou detekcí. Nicméně tyto detekční systémy jsou použitelné pouze pro ty analyty, které mají vhodné vlastnosti pro detekci nebo po jejich derivatizaci [25].

Daný problém lze řešit on-line zakoncentrováním vzorku, které se děje na rozhraní mezi vzorkem s nízkou vodivostí a separační zónou s vysokou vodivostí [26].

#### 4.1.1. Zakoncentrování z velkého objemu vzorku se změnou polaritý (Large-volume sample stacking with polarity switching)

Tato technika je jednou z on-column zakoncentrovacích technik, která zvyšuje citlivost detekce. Metoda spočívá v nadávkování velkého objemu vzorku do kapiláry a vytlačení nevodivé matrice z kapiláry vlivem elektroosmotického toku [27]. Zakoncentrovací techniku lze použít jak v CZE, tak i v MEKC.

##### **Princip metody:**

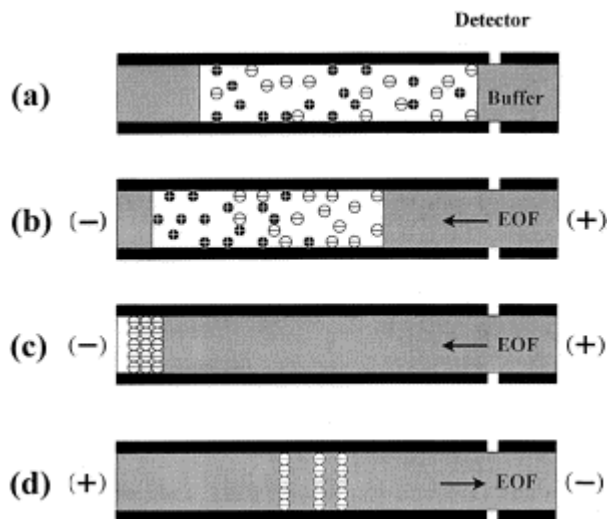
Prvním krokem je hydrodynamické dávkování velkého objemu vzorku rozpuštěného buď v pufru s nízkou vodivostí nebo pouze ve vodě [28]. Zóna vzorku může dosahovat až k detekčnímu oknu, což je dosažitelné maximum. Představuje 50 až 85 % celkového objemu kapiláry (za standardních podmínek při konvenční CZE činí množství vzorku do 1 % objemu kapiláry) [27, 29].

Druhým krokem je aplikace napětí s reverzní polaritou. Elektroda na dávkovacím konci kapiláry je nabita záporně a proto je směr elektroosmotického toku, nikoli směrem k detektoru, ale injekčnímu konci kapiláry [28]. Anionty migrují velmi rychle přes oblast s nízkou vodivostí a postupně dosahují injekčního konce kapiláry. Absolutní hodnota napětí s reverzní polaritou během zakoncentrování může být nižší [27] nebo stejná jako hodnota separačního napětí v modu konvenční CZE. Postupné zvyšování proudu ukazuje odstraňování matrice vzorku z kapiláry. Analyty migrují směrem k rozhraní vzorku a BGE. V tomto kroku je třeba pečlivě monitorovat proud. Dlouhý čas zakoncentrování může vést ke ztrátě analytů z kapiláry a neadekvátní fokuzaci a tím i špatným výsledkům. Polarita je obrácena v okamžiku, kdy proud dosáhne hodnoty blízké původní hodnotě (95-99 %) [28], která se zjistí předchozím měřením proudu v kapiláře naplněnou pouze základním elektrolytem v normálním modu CZE. V tomto okamžiku zóna analytů dosáhla začátku kapiláry.

Třetím krokem následuje po přepnutí polaritý, kde je kapilára kompletně naplněná základním elektrolytem a separace probíhá za normálních podmínek. Anionty migrují ke katodě elektroosmotickým tokem.

**Obr. 3: Schéma zakoncentrovacího procesu:** (a) hydrodynamické dávkování, (b) a (c) aplikace reverzní polarity, (d) klasický separační proces po přepnutí polarity.

Celkový migrační čas ( $t_c$ ) měřený na elektroforeogramu odpovídá času potřebnému pro



zakoncentrovací proces ( $t_z$ ), času přepnutí polarity ( $t_{+-}$ ) a migračnímu času analytu ( $t_m$ ) [29]:

$$t_c = t_m + t_z + t_{+-}$$

#### 4.1.2. Izotachofóreza-kapilární elektroforéza v jedné kapiláře (single capillary isotachopheresis - zone electrophoresis)

V uspořádání zónové elektroforézy s ITP zakoncentrováním vzorku v jedné kapiláře se vzorek vkládá mezi vedoucí elektrolyt, který má pohyblivost vyšší než vzorek, a koncový elektrolyt s pohyblivostí nižší. Tímto diskontinuálním systémem se liší od výše uvedeného. Všechny analyty s iontovou pohyblivostí mezi LE a TE jsou zakoncentrovány v úzké zóně a migrují izotachoforeticky. Po ITP fokusaci následuje separace pomocí CZE.

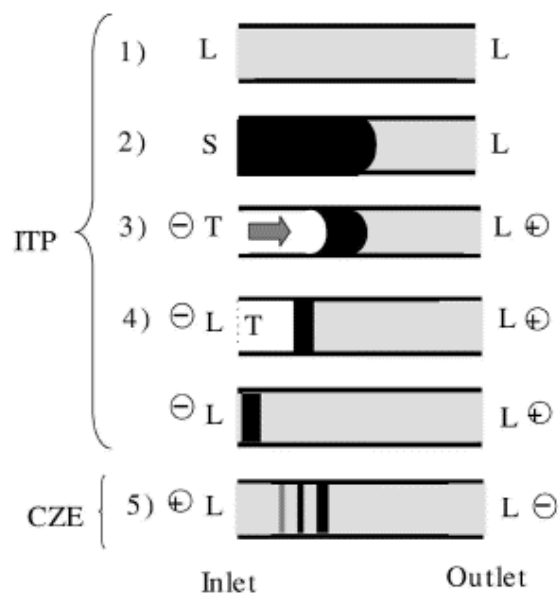
Tato technika je také použitelná, pokud vzorky (biologický materiál) nejsou rozpuštěny ve vodě, ale obsahují rovněž i vodivé ionty. K hlavním výhodám uspořádání v jedné kapiláře patří snadná automatizace a jednoduché přístrojové vybavení. Je publikována až 100-násobně vyšší citlivost oproti klasické CZE [25].

**Metoda se skládá z následujících kroků:**

Nejdříve je kapilára kompletně naplněna vedoucím elektrolytem (Krok 1). Druhým krokem (2) je hydrodynamické dávkování vzorku. Množství vzorku představuje maximálně 55 resp. 70 % celkového objemu kapiláry, aniž by došlo k rozšíření zón. Vyšší objem může způsobit asymetrii píků, přetížení kapiláry a neshodu v pohyblivosti mezi analyty a co-ionty. Za zónu vzorku se vpraví koncový elektrolyt v množství asi 1 % objemu kapiláry. V dalším kroku se vloží napětí s negativní polaritou ve spojení s pozitivním hydrodynamickým tlakem (3). Pozitivní tlak je směřován k detekčnímu konci kapiláry a brání migraci anionů ven z kapiláry elektroosmotickým tokem. Hydrodynamický tok nezpůsobí rozmývání zón díky samozaostřujícímu efektu ITP. Doba trvání fokusačního kroku roste s délkou zóny dávkovaného vzorku a závisí na jeho matici (4). Jakmile se vzorek přiblíží k dávkovacímu konci kapiláry, je zóna TE z kapiláry odstraněna. Vialka obsahující TE je vyměněna za vialku s LE a polarita je přepnuta (5). Okamžik přepnutí nastává v momentě, kdy proud dosáhne asi 95 % hodnoty proudu generovaného v kapiláře naplněné pouze LE. K určení času přepnutí polarity lze využít viditelný marker jako např. bromfenolová modř. Pokud je kapilára naplněna LE (=BGE) a vzorkem, začne separace CZE za normální polarity bez hydrodynamického tlaku.

Správné načasování okamžiku přepnutí modu ITP a CZE je velmi důležité. Jestliže ITP proces pokračuje dlouho, zóny vzorku migrují ven z kapiláry do vialky s TE. Pokud je polarita přepnuta příliš brzy, zóna TE ještě zůstane v kapiláře a naruší homogenitu elektrického pole, nezbytného pro CZE, čímž dojde k rozšíření píků [25,30,31].

**Obr. 4: Schéma ITP-CZE v jedné kapiláře:** 1) kapilára naplněná LE, 2) hydrodynamické dávkování vzorku, 3) zakoncentrovací krok s reverzní polaritou a pozitivním hydrodynamickým tokem, 4) postupné zkracování zóny TE a výměna TE za LE, 5) CZE separace s normální polaritou [32].



## 4.2. Proces zakoncentrování vzorku ve dvou kapilárách

### 4.2.1. On-line kombinace ITP-CZE realizovaná ve dvou kapilárách (column-coupling configuration)

On-line kombinace kapilární izotachoforézy a kapilární zónové elektroforézy ve dvou kapilárách umožňuje zlepšit separační účinnost a snížit limit detekce o tři řády [33]. Tato technika je zejména vhodná pro stanovení stopového množství analytu ve vzorku biologického původu nebo vzorků vztahujících se k životnímu prostředí, kde přítomnost ionogenních makrokomponent by neumožňovala CZE separaci.

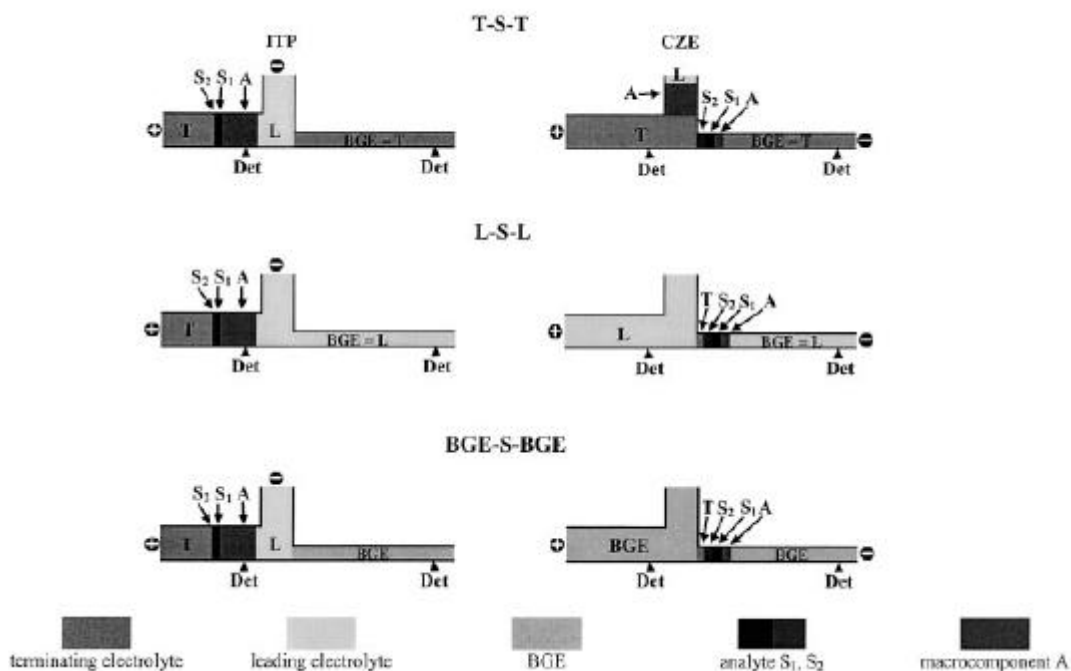
Výhoda techniky spočívá v zakoncentrovacím efektu ITP, která dovoluje dávkovat velký objem ředěného vzorku (10-100  $\mu\text{l}$ ). Interferující a nestanovované součásti vzorku mohou být odstraněny na konci ITP kapiláry nebo je jim zabráněno vstupu do CZE kapiláry vyplavením předseparační kapiláry základním CZE elektrolytem. V ideálním případě vstoupí do separační kapiláry pouze úzká zakoncentrovaná zóna analytu. Zde hraje klíčovou roli výběr vhodného

elektrolytového systému a nalezení optimálního času přepnutí proudu z předseparační do separační kapiláry.

V zásadě jsou tři způsoby k dosažení ITP-CZE separace. Ten nejjednodušší používá TE z ITP fáze jako BGE během CZE separace (T-S-T). Druhá varianta je založena na užití LE jako BGE (L-S-L). Třetí a nejkomplicovanější způsob označovaný jako (BGE-S-BGE) má zcela odlišný LE, TE a BGE.

Vnitřní průměr předseparační kapiláry je obvykle širší (0,8 mm). Kapilára musí být vybavena detektorem umožňující detekovat zóny makrokomponent a umožnit přesné načasování přechodu z ITP do CZE. Separační kapilára má průměr menší (0,3 mm) [33], je naplněna BGE, kde jednotlivé zóny migrují samostatně [34].

**Obr. 5: Schéma variant ITP-CZE ve dvou kapilárách.** Levá část zobrazuje ITP v ustáleném stavu, pravá část začátek separace CZE.





## 5. CHIRALITA

Posledních padesát let přineslo poznání, že chiralita je součástí materiální skutečnosti na všech jejích úrovních. Prohloubilo se povědomí o její nezbytné souvislosti se vznikem a trváním života a rozšířilo instrumentarium k jejímu studiu a využití.

### 5.1. Terminologie [35-39]

Stereoizomery jsou látky, které se liší v trojrozměrném uspořádání atomů a skupin. Enantiomery jsou stereoizomery, které jsou navzájem neztotožnitelnými obrazy a představují páry sloučenin, které jsou k sobě orientovány jako levá a pravá ruka. Neztotožnitelnost objektu s jeho zrcadlovým obrazem se nazývá **chiralita**, proto látky s touto vlastností označujeme jako chirální (řecky *chiros* = ruka, dlaň). Enantiomery mají v podstatě identické fyzikálně-chemické vlastnosti, proto je lze jen těžko separovat. Liší se však v interakcích s rovinou polarizovaného světla, přičemž platí, že světlo otáčejí o stejnou hodnotu, ale opačným směrem. Izomery otáčející světlo doprava se považují za pravotočivé, s (+) afixem před názvem. Izomery otáčející světlo doleva jsou levotočivé, s (-) afixem. Racemická směs, směs párů izomerů 1:1, s nulovou optickou otáčivostí se označuje s ( $\pm$ ) afixem. Toto označení poskytuje údaje o fyzikálních vlastnostech, neudává však informace o trojrozměrném uspořádání či absolutní konfiguraci molekuly. Optická otáčivost je výsledek „ohmatání“ chirální struktury pomocí úzkého výřezu elektromagnetických interakcí, tedy zkoumání velmi zjednodušené. Navíc, optická otáčivost není nulová jen pro ekvimolární směs, ale často i pro jistou vlnovou délku či délky použitého lineárně polarizovaného elektromagnetického záření.

Pokud struktura stereoizomeru již byla zjištěna, např. pomocí rentgenové strukturní analýzy, tak se pro vyjádření konfigurace používají dva systémy. R/S systém s použitím sekvenčního pravidla nebo starší D/L systém.

U sloučenin zajímavých z hlediska farmakologie je nejčastější příčinou chiralitity přítomnost čtyřvazného uhlíku v molekule, na který se váží čtyři různé substituenty. Z přítomnosti jednoho chirálního centra vyplývá existence jednoho párů enantiomerů (n různých chirálních center poskytuje 2<sup>n</sup> stereoizomerů a poloviční počet párů enantiomerů).

Izomery, které nejsou zrcadlovými obrazy, se nazývají diastereoizomery. Na rozdíl od páru enantiomerů, diastereoizomery se liší fyzikálně-chemickými vlastnostmi a teoreticky je možné je zcela separovat.

Enantiomery se mohou také lišit v rychlosti reakcí nebo interakcí s jinými chirálními molekulami, což má význam hlavně v biologickém systému. Na molekulové úrovni je živá hmota složená z vysoko chirálních biopolymerů, např. proteinů, glykolipidů, polynukleotidů a z monochirálních prekurzorů L-aminokyselin a D-cukrů. Většina procesů probíhající během působení léčiva vyžaduje interakce s chirálními biomolekulami. Enzymy a receptory také velmi často vykazují stereochemickou preferenci jednoho ze dvou enantiomerů. Již Lehman v roce 1982 opublikoval teorii, že stereoselektivita představovaná farmakologickými systémy je nejlepší důkaz toho, že receptory existují a že inkorporují molekulové jednotky do aktivních míst .

Různá biologická aktivita byla pozorována již v 19. století, kdy Piutti v roce 1886 izoloval enantiomery aminokyseliny asparaginu a zjistit, že (+)-enantiomer má sladkou chuť zatímco (-)-enantiomer je bez chuti. Různá farmakologická aktivita enantiomerů léčiva byla dokázána na začátku minulého století, kdy britský farmakolog Artur R. Cushny demonstroval rozdíly v aktivitách enantiomerů hyoscyaminu a epinefrinu. Za účelem vysvětlení rozdílů ve farmakologické aktivitě mezi enantiomery představili Easson a Stedman v roce 1933 trojrozměrný model mezi aktivnějším enantiomerem a jeho receptorem. Podle tohoto modelu účinnější enantiomer se váže na komplementární místo receptoru minimálně třemi intermolekulárními vazbami, zatímco méně účinný enantiomer může interagovat pouze na dvou místech.

Rozdíly ve farmakologické aktivitě enantiomerů daly podnět pro vznik dodatečné terminologie. Stereoizomer s vyšší aktivitou nebo afinitou k receptoru byl označen jako **eutomer** a stereoizomer s nižší aktivitou nebo afinitou je **distomer**. Poměr aktivit, **eudizmický poměr**, je mírou stereoselektivity uvažovaného systému .

Stereodiferenciace se vyskytuje také během farmakokinetických procesů [40] a je významná hlavně tam, kde léčivo interaguje s komplexem enzymů, např. metabolické systémy nebo systémy membránových transportů. Stereochemie má velký význam pro pasivní procesy, závislé na fyzikálně-chemických vlastnostech (pKa, rozpustnost lipidů, velikost molekuly). Takovým je např. difúze přes biologické membrány, představující nejčastější mechanismus

absorpce, distribuce a renální exkrece. S přihlédnutím na používané parametry je velikost rozdílů mezi enantiomery ve farmakokinetice menší než ve farmakodynamice.

## 5.2. Farmakologické aspekty

Existuje relativně málo takových léčiv, kde by farmakologická aktivita byla striktně vázána pouze na jeden enantiomer a aktivita druhého enantiomeru by byla nulová. Ve většině případů se enantiomery v rámci jejich aktivity od sebe liší buď kvantitativně nebo kvalitativně. Je známých jen málo sloučenin, kde se požadovaný účinek vztahuje pouze na jeden izomer a za účinek nežádoucí nebo toxický zodpovídá pouze druhý izomer.

V některých případech může být farmakologická aktivita párů enantiomerů natolik rozdílná, že se pro oba dva udává rozdílná terapeutická indikace. Např. dextropropoxyfen se používá jako analgetikum, zatímco jeho enantiomer levopropoxyfen se řadí mezi antitusika. Existují také dvojice enantiomerů, které mají opačný účinek a vykazují takové interakce, že pozorovaná aktivita neumožňuje jasné vysvětlení probíhajících dějů. Derivát fenylpiperidinu, racemický plicenadol, vykazuje analgetickou aktivitu a působí jako parciální agonista. Testování farmakologických účinků jednotlivých izomerů však dokázalo analgetickou aktivitu jen u (+)-enantiomeru; (-)-enantiomer je antagonist na tom samém receptoru [41,42].

Rozdíly v působení jednotlivých enantiomerů se mohou využít na získání látky s lepším terapeutickým profilem. Indakrinon je diuretikum vyvinuté na léčbu hypertenze a kongestivního selhání srdce. Podání racemátu člověku působí zvýšení sérové hladiny kyseliny močové. Analýza vlastností jednotlivých enantiomerů ukázala, že za diuretický efekt je zodpovědný R-enantiomer a za efekt urikozurický S-enantiomer. Po podání racemátu je biologický poločas (s)-indakrinonu a jeho urikozurická aktivita příliš krátká na to, aby zabránila pozorovanému zvýšení sérové hladiny kyseliny močové. Alternativou enantiomerního složení léčiva od poměru 1:1 zvýšením koncentrace S-enantiomeru v poměru S:R na 4:1 vzniká směs s urikozurickou aktivitou.

## 5.3. Racemáty a enantiomery [37]

Odhalení významu rozdílů farmakologických účinků enantiomerů vyústilo v diskusi na téma „racemáty versus enantiomery“. Na počátku tyto rozhovory probíhaly pouze na akademické úrovni. Někteří autoři zastávali názor, že racemáty jsou léčiva obsahující 50 % nečistot, další tvrdili, že použití racemátů je polyfarmacie a vlastnosti racemické směsi jsou udávány více chemickými než terapeutickými kritérii.

**Výhody spojené s použitím jednoho enantiomeru jsou:**

- Méně složitý, více selektivní farmakologický profil
- Pravděpodobnost zlepšení terapeutického profilu
- Méně komplikovaný farmakokinetický profil
- Minimalizace pravděpodobnosti komplexních interakcí léčiv
- Jednodušší vztah mezi koncentrací léčiva v plazmě a jeho účinkem

V současnosti jsou problémy spojené s chiralitou léčiv přehodnocovány, ale stále není vyžadován vývoj léčiva složeného z jediného enantiomeru a volba stereochemické formy musí být ověřena nejen chemicky, ale i preklinickým a klinickým testováním. Dále je pro nová léčiva požadována dostatečně účinná metoda pro kontrolu enantiomerní čistoty. Pouze zhruba 25 % léčiv je podáváno ve formě čistého enantiomeru.

**Výhody spojené s použitím racemické směsi:**

- Individuální enantiomery jsou stechiometricky nestálé se sklonem k racemizaci in vivo nebo in vitro
- Příprava léčiva jako samostatného enantiomeru je komerčně velmi nákladná
- Individuální enantiomery mají podobné farmakologické a toxikologické profily
- Pokud je jeden izomer známý svojí absolutní neúčinností, nebude dodatečně zatěžovat organismus a nemá vliv na farmakokinetické vlastnosti druhého izomeru
- Použití racemátů nebo neracemické směsi izomerů vyvolává v určitých případech větší terapeutický efekt než při použití jednoho enantiomeru

## 6. CHIRÁLNÍ SEPARACE

Směrnice pro vývoj nového léčiva jasně vyžadují analytickou metodu pro kontrolu enantiomerní čistoty. Pro enantiomerní separaci lze využít širokou škálu metod na základě chromatografických technik jako jsou vysokoučinná kapalinová chromatografie (HPLC), plynová chromatografie (GC), superkritická fluidní chromatografie (SFC) a tenkovrstevná chromatografie (TLC). Stejně tak kapilární elektroforéza (CE) a kapilární elektrochromatografie (CEC) jsou užitečné analytické metody vhodné pro enantiomerní separaci [43].

Ideální způsob získání čistých enantiomerů by mohla být enantioselektivní syntéza. Ta bohužel není vždy praktická a obvykle je značně komplikovaná a nákladná. Proto je raději požadována separace racemické směsi meziprojektu či finálního produktu. Kromě klasických metod jako jsou tvorba diastereomerního páru pomocí opakované rekrytalizace nebo využití stereoselektivních enzymů, chromatografické a elektroseparační techniky se stávají stále více žádoucími.

### 6.1. Kapilární zónová elektroforéza

CZE je často klasifikována jako instrumentální technika přizpůsobená potřebám biochemických a biologických analýz. Její využití pro chirální separace, orientované hlavně na sloučeniny významné ve farmacii, biologii a medicíně, je vysoce lákavé [44].

Systematický výzkum chirálních separací pomocí moderních elektroforetických metod, ITP a CZE, začal přibližně před 20 lety. Během této časové periody bylo mnoho sloučenin schopných chirálního rozlišení racemátů testováno, zároveň byl studován základ chirálního separačního procesu pomocí kapilárních elektroforetických metod a navržen jeho matematický popis. Rutinní využití CZE pro chirální separace je již možné po dobu několika let a počet publikací o praktickém využití chirálních separací výrazně vzrůstá během posledních let. Proto lze počáteční periodu výzkumu chirálních separací pomocí kapilárních elektroforetických metod považovat za ukončenou [45,46].

Výzkum přímých chirálních separací představuje testování vybraných vlastností chirálních selektorů a ověření komplexačních vlastností s rozdílnými sloučeninami. Mnoho sloučenin může reagovat s chirálními sloučeninami stereospecificky, a mnoho z nich také bylo testováno jako chirální selektory. Nicméně, pouze malá část z nich byla analyticky vhodná a přijata do

analytické praxe. Ideální chirální selektor by měl rozlišit enantiomerní pár s vysokou selektivitou. Rozlišovací proces by neměl zhoršit separační účinnost ani rychlost. Chirální selektor musí být stabilní v systému, bez vzájemných interakcí se stěnou kapiláry a složkami BGE a neměl by ovlivňovat migraci achirálních složek vzorku. Také by měl být cenově dostupný a nezatěžovat životní prostředí. Bohužel žádný z testovaných selektorů nesplňuje všechny výše uvedené požadavky, ale přibližně polovina splňuje většinu [47].

Chirální separace pomocí CZE lze provést jedním ze tří následujících způsobů [48]:

- tvorbou diastereoizomerů - přímá separace pomocí chirálních selektorů rozpuštěných v pracovním elektrolytu.
- tvorbou diastereoizomerů – přímá separace pomocí chirálních selektorů vázaných na stacionární fázi
- před kolonovou derivatizací – nepřímá separace v nechirálním prostředí diastereoizomerů vzniklých reakcí s opticky čistými derivatizačními činidly

V prvních dvou případech, dochází ke tvorbě přechodných diastereoizomerů, pomocí elektrostatických a /nebo hydrofóbních mechanismů. V případě nepřímých separací kovalentně vázané deriváty jsou separovány pomocí MEKC. Derivatize může představovat výhodu u látek špatně detekovatelných kdy problémy, chirální separace a nízká detekční odezva, jsou vyřešeny reakcí s vhodným derivatizačním činidlem.

Aplikace chirálních selektorů jako jsou cyklodextriny, soli žlučových kyselin, crown-ethery, makrocyclická antibiotika, proteiny, hepariny, dextriny, oligosacharidy a další karbohydráty jsou uvedeny v mnoha publikacích. Polymerizované surfaktanty a cyklodextriny jsou také používány, ale ne vždy jsou vhodné. Souhrn aplikací a složení pufrů je uveden v Tab. 2.

Jednoznačná nadřazenost CZE nad LC pro chirální separace je dána cenou, rychlostí a rozlišením.

**Tabulka 2: Souhrn aplikací chirálních selektorů.**

Analyt	BGE	Literatura
Aminokyseliny	30 mM fosfátový pufr, 10 mM kyselina boritá, pH= 7,0	[49]
Aminokyseliny, dinitrobenzoyl	25 mM borátový pufr, 50 mM fosfátový pufr, 10% methanol, pH = 7,0	[50]
Aminy, primární, aromatické	50 mM fosfátový pufr, pH = 2,2; 30 mM 18-crown-6	[51]
Adrenalin, noradrenalin, isoprenalin	50 mM fosfátový pufr, 30 mM 2-hydroxypropyl- $\beta$ -CD, 5 mM (2,6-di-o-methyl)- $\beta$ -CD, pH = 2,9	[53]
Biperiden	50 mM fosfátový pufr, 3% sulfatovaný $\beta$ -CD, pH = 3,5	[52]
Caridopa	25 mM fosfátový pufr, pH = 2,5; 20 mM HDAS- $\beta$ -CD	[54]
Kumarin	10 mM fosfátový pufr, pH = 7,2; 2,5 % Glucidex 2	[55]
Diltiazem	20 mM fosfátový – borátový pufr, pH = 7,0; 50 mM taurodeoxycholát	[56]
Uniconazol	100 mM borátový pufr, pH = 9; 100 mM SDS, 2 M	[57]

	močovina, 50 mM $\gamma$ -CD, 5% 2-methyl-2-propanol	
Epinefrin	10 mM Tris, 10 mM heptakis- (2,6-Di-O-methyl)- $\beta$ -CD	[58]
Ibuprofen	15 mM $\beta$ -CD, 200 mM MES, 0,2% HEC, pH = 4,5	[59]
Herbicity	6 mM vankomycin, 75 mM Britton-Robinson*, pH = 5	[60]
Kyselina mandlová	50 mM fosfátový pufr, pH = 7,0; 40 mM $\gamma$ -CD	[61]
Peptidy	5 mM 18 crown-6 tetrakarboxylát, 10 mM Tris- citrátový pufr, pH = 2,5	[62]
Propranolol	100 mM fosfátový pufr, pH = 3 upraveno TEA, 15 mM karboxymethyl- $\beta$ -CD	[63]
Salbutamol	1 M kyselina octová v acetonitrilu, 60 mM (+)-S- kapsulfonát	[64]
Serin, FITC	100 mM SDS, 60 mM $\beta$ -CD, 100 mM kyselina boritá, pH = 9,2	[65]
Verapamil	60 mM fosfátový pufr, pH = 2,5; 60 mM trimethyl- $\beta$ -CD	[66]
Warfarin	100 mM fosfátový pufr, pH =	[67]



	8,35; 8 mM methyl- $\beta$ -CD, 2% methanol	
--	--	--

## 6.2. Chirální selektory používané pro přímé separace racemických směsí

### 6.2.1. Cyklodextriny

Cyklodextriny jsou nejčastěji používané chirální selektory v CZE. První aplikace cyklodextrinů použitých pro chirální separace na principu ITM byla popsána Snopkem [68]. Guttman použil  $\beta$ -CD inkorporovaný do gelu [69] a Fanali publikoval první článek zabývající se využitím cyklodextrinů v CZE [70]. Současně několik set publikací se objevilo s popisem využití cyklodextrinů jako chirálních selektorů v CZE a zhruba 800 sloučenin bylo rozlišeno. Pomocí různých cyklodextrinů byly úspěšně provedeny chirální separace  $\beta$ -blokátorů, sympatomimetik, antipsychotik, antidepressiv, hypnotik, barbiturátů, lokálních anestetik, anti-epileptik, antihypertensiv atd.

Nejdůležitějším rozdílem mezi nabitým a neutrálním CD je vlastní pohyblivost nabitého CD. Tato vlastnost umožňuje použití nabitých cyklodextrinů v elektrokinetické chromatografii. Je nutné použít dva rozdílné termíny pro CZE používající neutrální a nabité cyklodextriny. CZE s neutrálními cyklodextriny je běžně nazývána CZE ve volném roztoku (FZCE=Free solution capillary zone electrophoresis). Toto označení není zcela správné. Mobility enantiomerů dané chirální sloučeniny jsou shodné ve volném roztoku, pracovním elektrolytu bez chirálních aditiv. Pokud je do roztoku přidán jakýkoli chirální selektor, nabitý i neutrální, nelze tento roztok dále nazývat volným. CZE s nabitými cyklodextriny byla správně pojmenována podle Terabiho jako kapilární elektrokinetická chromatografie [71].

Princip separace s nabitými cyklodextriny spočívá v rozdílné distribuci analytů mezi dvě pseudofáze s rozdílnými pohyblivostmi. Tento princip platí i pro CZE s neutrálními cyklodextriny, proto správný název pro oba módy CZE by měl být kapilární elektrokinetická chromatografie (CEKC).

Počet známých kationtových derivátů je mnohem vyšší než aniontových cyklodextrinových derivátů. Nicméně vysoký počet aniontových derivátů je komerčně dostupnější. Toto je možná jeden z důvodů, proč využití aniontových derivátů je mnohem širší než kationtových. Cyklodextrinové deriváty jsou syntetizovány náhodnou nebo selektivní substitucí primárních

nebo hydroxylových skupin s kationtovými nebo aniontovými, popř. oběma substituenty [72,73]. Nabitě cyklodextrinové deriváty jsou intenzivně syntetizovány od roku 1960 za účelem zvýšení rozpustnosti cyklodextrinů, hlavně  $\beta$ -CD ve vodných roztocích [74]. Syntézu iontových derivátů v letech 1982-83 shrnul ve výborném přehledu Croft a Bartsch [75].

Nabitě cyklodextrinové deriváty využívané jako chirální selektory pro CZE jsou komerčně dostupné od Cyclolab (Budapešť, Maďarsko), Wacker Chemie (Mnichov, Německo), Higuschi Bioscience (Lawrence, Kansas) a dalších společností. Většina komerčně dostupných derivátů je směsí náhodně substituovaných komponent s rozdílným stupněm substituce. Detailní charakterizace těchto derivátů je klíčová pro validaci, optimalizaci a standardizaci chirálních separací [76]. Bylo prokázáno, že chirální rozlišovací schopnosti cyklodextrinů s rozdílnými iontovými substituenty mohou být zcela opačné [77].

Nejdůležitější výhody nabitých cyklodextrinových derivátů aplikovaných jako chirální selektory v CZE jsou [78]:

- a) vykazují vlastní elektroforetickou pohyblivost, která umožňuje jejich využití v elektrokinetické chromatografii pro separaci neutrálních sloučenin.
- b) nabitě cyklodextriny mohou vázat opačně nabitě analyty silněji v důsledku silnějších elektrostatických interakcí, které mohou podpořit samotnou separaci.
- c) tok nabitých derivátů proti opačně nabitým analytům umožňuje chirální separaci s extrémně malým množstvím chirálního selektoru.
- d) zónová enantioseparace v protiproudovém toku, kdy zóny chirálního selektoru a analytu migrují v opačném směru, může být provedena pouze s nabitými cyklodextriny.

#### **6.2.1.1. Neutrální cyklodextrinové deriváty**

Široká skupina neutrálních derivátů cyklodextrinů zahrnuje cyklodextriny jako je heptakis-O-methyl CD (M-CD), heptakis (2,6-di-O-methyl CD (DM-CD), heptakis (2,3,6-tri-O-methyl) CD, hydroxyethyl-CD (HE-CD) a hydroxypropyl-CD (HP-CD). Tyto cyklodextriny byly syntetizovány a aplikovány na širokou škálu sloučenin [79].

Většina CD derivátů představuje směs rozdílných produktů vykazujících rozdílné substituční vzory, proto je velice často obtížné separace reprodukovat. Proto některé skupiny izolují

jednotlivé izomery nebo syntetizují selektivně substituované deriváty. Kyselá léčiva se silněji komplexují při nižší koncentraci CD než bazické analyty.

### 6.2.1.2. Negativně nabitě cyklodextriny

Aniontové cyklodextrinové deriváty jako jsou CM- $\beta$ -CD, CE-  $\beta$ -CD, Succ-  $\beta$ -CD, SBE-  $\beta$ -CD, SEE-  $\beta$ -CD [80,81], sulfátované a fosfátované deriváty cyklodextrinů jsou používány pro chirální separace kationtových, neutrálních a dokonce i aniontových sloučenin. Schmitt a Engelhardt studovali vliv aniontových cyklodextrinů na chirální separaci kationtových a neutrálních sloučenin pomocí povlečené kapiláry při rozdílných hodnotách pH. Při hodnotě pH nižší než 4, karboxylová skupina není nabitá a chová se jako pseudostacionární fáze. Zatímco při pH > 5 nabitý CD má svoji vlastní pohyblivost, migruje k anodě, čímž umožňuje separaci nenabitých analytů. Při nízké hodnotě pH cyklodextrinové deriváty nemají náboj a kationtové analyty migrují ke katodě. Změna nastane při pH > 5, karboxylová skupina bude negativně nabitá, dojde k tvorbě iontového páru s analytem a následně jeho migraci k anodě (obrácení migračního řádu enantiomerů). Změny migračního řádu enantiomerů lze také docílit obrácením EOF použitím kvarterních amonných bází buď jako aditiv do pufru nebo na stěnu kapiláry [81]. Jeden způsob jak obrátit eluční řád enantiomerů je změna nenabitého CD na silně negativně nabitý CD (SBE- $\beta$ -CD) s vyšší pohyblivostí než prokazuje analyt. Druhý způsob je přechod z nízké hodnoty pH na vyšší, což změní pohyblivost jak selektoru tak analytu. Třetí způsob zahrnuje změnu pH a obrácení polarity.

### 6.2.1.3. Pozitivně nabitě cyklodextriny

Kationtové cyklodextrinové deriváty se používají pro chirální separace kyselých a neutrálních sloučenin. Polykationtový cyklodextrinový derivát; heptakis-(6-hydroxyethylamino-6-deoxy)- $\beta$ -CD) vyvinul Keefe [82,83] a aplikoval na kyselá sloučeniny jako jsou např. DNS-AAAs. Chirální separaci těchto kyselin se také zabýval Terabe, který aplikoval pro dosažení úspěšné separace cyklodextrinový derivát mono(6- $\beta$ -aminoethylamino-6-deoxy)- $\beta$ -CD [85,86]. Cyklodextrinové deriváty obsahující kvartérní amoniovou skupinu mají určité výhody. Jejich elektroforetická mobilita není závislá na pH. Separace kyselých enantiomerů lze dosáhnout již při nízkých koncentracích selektoru díky tvorbě silných iontových interakcí. Využití kvartérní amonné soli  $\beta$ -CD pro separaci analogů kyseliny mandlové publikoval Chankvetadze v roce 1996 [84]. 6-methylamino- $\beta$ -CD a heptamethylamino-  $\beta$ -CD byly testovány jako vhodné chirální selektory pro

separaci derivátů hydroxykyselin a některých aniontových a kationtových léčiv [87]. Obrácení migračního řádu enantiomerů se podařilo u kyseliny fenylactové záměnou potažené kapiláry za nepotaženou [87].

### 6.2.2. Crown-ethery

Jedná se o syntetické makrocyclické polyethery [88]. Jejich cyklická struktura je tvořena ethylenovými skupinami vázanými na etherové můstky. Schopnost crown-etherů přijmout (hostit) ionty byla nalezena jak pro kovy alkalických zemin, alkalické kovy a amonné ionty, tak pro organické kationty odvozené z primárních aminů [89]. Crown-ether vytváří s analyty inkluzní komplexy pomocí dipól-dipólových interakcí a vodíkových vazeb mezi karboxylovými skupinami selektoru a polárními skupinami analytu. Silně komplexující draselné a amonné ionty proto nesmějí být obsaženy v BGE z důvodu jejich komplexace se separovanými analyty. Během první periody výzkumu crown-etherů [90], stanovení enantiomerní čistoty 5,6-dihydroxy-2-aminotetralinu [91] a chirální separace aminokyselin [92] pomocí crown-etherů byly popsány během posledních 10 let. Pouze jeden crown ether se používá v chirální CZE. Jde o 18-crown-6-tetrakarboxylovou kyselinu (18C6H4), která se využívá pro chirální separace aminokyselin.

### 6.2.3. Lineární polysacharidy

Lineární oligo- a polysacharidy se skládají z cyklických hexóz vzájemně propojených do lineárních řetězců. Pouze ve vodě rozpustné oligo- a polysacharidy jsou vhodné jako chirální selektory [93]. Chankvetadze ukázal, že ve vodě rozpustné, nativní polysacharidy jako je amyloza a také derivatizované polysacharidy (metylcelulóza, hydroxypropylcelulóza a karboxymethylamyloza) mohou být použity jako chirální selektory [94]. Jejich separační systémy vykazují vysokou separační účinnost. Schopnost selektorů rozlišit stérické rozdíly analytů vzrůstá s počtem hexózových jednotek v lineárním řetězci [95]. Lineární oligo- a polysacharidy začaly být testovány jako vhodné chirální selektory na konci 20. století a vzrůstající počet publikací svědčí o vzrůstajícím zájmu jejich aplikací [96].

Z rozsáhlé skupiny nenabitých ve vodě rozpustných sacharidů pouze maltodextriny byly prokázány jako účinné chirální selektory [97]. Maltodextriny jsou definovány jako sacharidové polymery skládající se z D-glukózových jednotek spojených  $\alpha$ -(1-4) vazbami. Komerčně dostupné jsou ve formě směsí připravených kyselou nebo enzymovou hydrolýzou kukuřičného

škrobu. Rozdílné interakce chirálních analytů se spirálovitými jednotkami maltodextrinů se zdají být základem jejich stereoselektivity [98]. Dextrin, dextran, laminarin a maltotrióza byly testovány jako selektory pro separaci deprivatizovaných monosacharidů (ribóza, xylóza, glukóza a manóza). Pouze dextrin s glykosidickými vazbami, charakteristickými pro CD, vykazovala enantioselektivitu.

Nabitě lineární polysacharidy jsou také účinné chirální selektory. Negativně nabitě polysacharidy (heparin, chondroitin, sulfatovaný dextran) se používají pro chirální separace bazí [99]. Např. heparin byl využit pro CZE separaci antihistaminik [100]. Pozitivně nabitě polysacharidy, jako diethylaminoethyl-dextran a aminoglykozidická antibiotika (sulfát streptomycinu, sulfát kanamycinu), našly uplatnění při separaci některých kyselých analytů [101].

Aminoglykosidy (kanamycin, fradiomycin a streptomycin) složené z pentóz a hexóz jsou pozitivně nabitě protonizovanými primárními aminoskupinami. Byly testovány jako chirální přísady pro separaci meziproduktů diltiazemu [102]. Tyto lineární bazické polysacharidy jsou klasifikovány jako antibiotika díky jejich farmaceutickým aktivitám. Nicméně je do této skupiny chirálních selektorů nelze zahrnout, liší se jak strukturou, tak i rozdílnou enantioselektivitou.

#### **6.2.4. Afinity chirální selektory**

Do této skupiny patří chirální selektory typu polypeptidů, proteinů, glykoproteinů a biopolymerů. Biochemicky představují vysoce heterogenní skupinu sloučenin. Enantioselektivita značně závisí na složitém prostorovém uspořádání biopolymerů - konformaci [103,104]. Chemické složení separačního systému (pH, teplota, napětí atd.) ovlivňuje konformaci selektoru a tím i selektivitu celého systému. Prostorová proměnlivost afinitních chirálních selektorů je zodpovědná za mnoho nekompatibilních a protichůdných výsledků, které jsou uvedeny jak v chromatografických, tak elektroforetických publikacích. Afinitní chirální selektory byly testovány hned od počátku rozvoje chirálních separací. Nicméně počet publikací je nízký. Ve většině z nich, publikovaných v 80. letech, je interpretována dobrá separační selektivita v kombinaci s nízkou separační účinností separačního systému. Během posledních let nedošlo ke zlepšení separační účinnosti systémů obsahujících afinitní chirální selektory [105,106].

### 6.2.5. Makrocyclická antibiotika

Žádný z již popsaných selektorů nesplňuje dva základní požadavky kladené na chirální selektory – vysokou selektivitu pro široké spektrum sloučenin a vysokou účinnost separačního systému. Ze všech sloučenin, testovaných jako chirální selektory pro CZE a HPLC, se antibiotika zdají být velice slibná [107]. Makrocyclická antibiotika jsou sloučeniny biologického původu, se střední molekulovou hmotností a poměrně komplikovanou strukturou obsahující makrocyclické kruhy a spoustu funkčních skupin. Makrocyclická antibiotika testovaná jako chirální selektory se dělí do dvou skupin. Jeden makrocyclický kruh je charakteristický pro rifamycin SV a rifamycin B, sloučeniny klasifikované jako ansamyciny. Specifický tvar tzv. ansa sloučenin je dán jejich vlastní m aromatickým chromofórovým systémem rozděleným alifatickým můstkem. Rifamycin B se dvěma ionizovatelnými skupinami (hodnota pKa je přibližně 2,8 a 6,7) dostatečně rozlišuje bazické sloučeniny [108,109]. Neutrální rifamycin separuje negativně nabitě enantiomery [109] a některé neutrální sloučeniny [109,110]. Přídavek 10-40 % organických modifikátorů (např. alkoholy s krátkým řetězcem) do BGE je nezbytný pro dosažení úspěšné separace. Díky velkému chromofórovému systému makrocyclická antibiotika jsou žlutá v pevném stavu a ve vodném roztoku absorbují do 500 nm [109]. Proto je nutné zvolit při separaci s makrocyclickými antibiotiky buď nepřímou detekci nebo detekci při vyšších vlnových délkách (nad 350 nm).

Další skupinou makrocyclických antibiotik jsou glykopeptidy. Skládají se z minimálně ze čtyř makrocyclických kruhů, tvořených spojenými amino kyselinami a substituovanými fenoly. Jsou na ně vázány rozličné sacharidové jednotky. Jejich pevná struktura s počtem chirálních uhlíků uvnitř, rozličnými makrocyclickými kruhy, hydrofóbními jednotkami a počtem rozličných funkčních skupin jsou oblíbené pro prostorové rozlišení vzájemně působících druhů. Díky různým kyselým a bazickým skupinám vlastní náboj v širokém rozmezí pH. Absorbance glykopeptidových antibiotik v UV oblasti silně klesá s vlnovou délkou na rozdíl od tzv. ansa sloučenin [111].

Glykopeptidová antibiotika jsou vysoce efektivní při chirálních separacích aniontových racemických směsí. Enantioselektivní schopnosti vankomycinu [111], ristocetinu A [112] a teikoplaninu [113] rozpuštěných ve 100 mM fosfátovém pufru a při pH v rozmezí 4-7 a jejich aplikace byly popsány pro více než 100 chirálních sloučenin. Na základě těchto studií je ristocetin A považován za selektor s nejširším polem použitelnosti v CZE. Teikoplanin se nejvíce

odlišuje od výše zmíněných selektorů díky své povrchové aktivitě a nízké rozpustnosti ve vodných roztocích [114]. Vankomycin je komerčně dostupný ve formě čisté sloučeniny [115]. Je schopen chirální separace aniontů bez přídavku organických aditiv do běžně používaných elektroforetických pufrů, které vykazují vyšší stabilitu v porovnání s pufrů obsahující cyklodextríny. Při využití MEKC s SDS vykazuje vankomycin dobrou rozlišovací schopnost pro rozdílná nenabitá hydrofobní léčiva a pesticidy. [116].

Makrocyclická antibiotika splňují požadavky vysoké separační selektivity a účinnosti v elektroforetickém systému. Nicméně testování analyticky důležitých vlastností jednotlivých makrocyclických antibiotik je nezbytné pro využití jejich aplikačního potenciálu [117].

### **6.3. Přímé separace ve dvoufázovém systému**

V předcházející části byla popisována separace pouze v roztoku. Separací proces ale může být i kombinován s distribucí analytu mezi dvě rozdílné fáze. Chirální separace ve dvoufázovém systému lze rozdělit na micelární systém obsahující chirální selektor jak v roztoku, tak v micelách. Dále chirální selektor buď může být vázán na stěnu kapiláry nebo v granulované formě může tvořit náplň kapilár.

#### **6.3.1. Micelární systém**

Micely jsou tvořeny nízkomolekulárními sloučeninami mající charakter detergentu. Ke tvorbě micel dochází při překročení jejich CMC (kritické micelární koncentrace). Chirálně efektivní micely mohou být tvořeny jednak samotnými chirálními sloučeninami (např. žlučovými kyselinami) nebo mohou vznikat rozpuštěním chirálních selektorů (např. cyklodextrínů) v micelách tvořenými achirálními detergenty. Pro micelární separace platí pravidlo používání nepovlečených křemenných kapilár. Nenabitý CD migruje stejnou rychlostí jako EOF, ale negativně nabitá micely migrují opačným směrem. Rozdělení hydrofobního analytu mezi roztok, CD a micely pak způsobí retenci a tím separaci analytu [118]. MEKC s vysokou separační účinností, která je charakterizována počtem teoretických pater v rozmezí 100 000 – 500 000, je vhodná pro chirální typ separací [119].

Žlučové kyseliny a jejich soli jsou nejvíce používané chirální detergenty v MEKC. Jejich micely separují dansylové aminokyseliny [120], bazické sloučeniny např. 1-naftylethylamin [121], bazická léčiva např. diltiazem [122], lokální anestetika [123] a různé aniontové a nenabitá látky [124]. Zlepšení separace diastereoizomerů bylo dosaženo přidáním  $\beta$ -CD k micelám tvořeným

taurodeoxycholátem [125]. Použitím taurodeoxycholátu sodného s hydroxypropyl-  $\beta$ -CD nebo přidáním sulfobutylether-  $\beta$ -cyklodextrinu k SDS micelám bylo dosaženo chirální separace 22 převážně bazických sloučenin [126]. Efekt přidavku organiky na rozlišení a eluční řád separací, kombinující SDS a cyklodextríny  $\beta$  a  $\gamma$ , byl testován u separací aminokyselin derivatizovaných s 2-(9-anthryl)ethyl chloroformátem [127].

Soutěživost SDS micel a analytů o cyklodextrínovou kavitou se děje proti interakcím mezi chirálním selektorem a analytem, tedy proti chirálnímu rozlišení [128]. Příznivý synergický efekt byl pozorován u polymerizovaných chirálních micel poly(podium-N-undecylen-D-vanilátu) současně použitých s  $\gamma$ -CD. Jeho příčinou byla neexistence inkluzí polymeru do  $\gamma$ -cyklodextrinové molekuly.

### 6.3.2. Elektrochromatografický systém

Elektrochromatografické separace jsou založené na spojení kapalinové chromatografie a kapilární zónové elektroforézy. Zatímco HPLC využívá ke generování toku rozdílu tlaku, v kapilární elektrochromatografii (CEC) je pohyb kapalně mobilní fáze zprostředkován elektrickým polem, které způsobuje EOF. CEC se při tom zachovává výhody obou metod: vyšší účinnost, jednoduchost instrumentace, vyšší selektivitu a kapacitu kolony. K separaci analytů dochází převážně dvojím mechanismem. Elektroneutrální a ionizované látky jsou stejně jako v chromatografii separovány na základě rozdílných interakcí se stacionární fází, respektive na základě síťového efektu v případě gelové permeační chromatografie. Látky ionizované se navíc pohybují v elektrickém poli rychlostí danou jejich efektivními mobilitami, což také přispívá k větší selektivitě vlastní separace [129].

Jak již bylo uvedeno, pohyb mobilní fáze je dán EOF. U kapilárních kolon pro CEC, plněných silikagelovými mikročásticemi, přispívá k EOF kromě náboje stěny kapiláry také povrchový náboj částic. U kolon polymerních a povrchově modifikovaných musí stacionární fáze pro tvorbu EOF ve své struktuře obsahovat ionogenní skupiny, neboť povrchový náboj kapiláry je eliminován. Díky tomu, že EOF je generován v celém objemu kapiláry, je jeho rychlostní profil téměř pístový, na rozdíl od toku působeného rozdílem tlaku. Rychlost EOF přitom téměř nezávisí na průměru kapiláry. Dochází tím k menšímu rozmývání zón analyzovaných látek, což přispívá k vyšší účinnosti separace [130]. Lineární rychlost elektroosmotického toku  $v_{EOF}$  lze vyjádřit Hunterovou rovnicí:

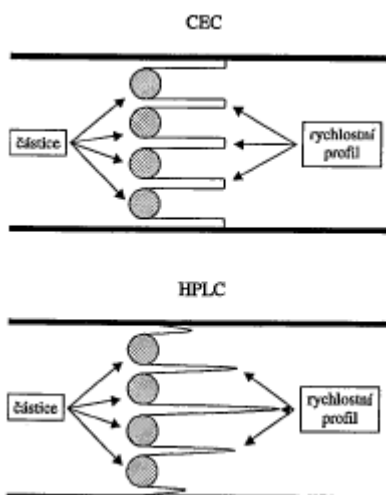


$$v_{EOF} = \frac{\sigma * [(\epsilon_0 \epsilon_r RT)/(2 c F^2)]^{1/2} * E}{\eta}$$

\*  $\epsilon_0$  je permitivita vakua;  $\epsilon_r$  permitivita;  $c$  koncentrace;  $\eta$  viskozita mobilní fáze a  $E$  intenzita elektrického pole;  $\sigma$  nábojová hustota na povrchu rozhraní;  $F$  faradayova konstanta;  $R$  univerzální plynová konstanta a  $T$  absolutní teplota.

EOF tedy závisí na mnoha faktorech, které mohou být využity pro optimalizaci vlastní separace jak v CZE, tak i v CEC.

### Obr. 6: Porovnání rychlostních profilů toku mobilní fáze u náplňových kolon pro CEC a HPLC.



#### 6.4. Nevodná kapilární elektroforéza (non-aqueous CE, NACE)

Nevodná rozpouštědla mají různé výhody s ohledem na rozpustnost chirálních selektorů nebo vzorků a redukuje interakce s kapilární stěnou. Často lze zvýšení selektivity získat použitím nevodných rozpouštědel. Rozdílné formy chemické rovnováhy ve vodném a nevodném systému mohou vést k rozdílné selektivitě. Slabé interakce, které se vodou přerušují, se mohou stát efektivní v nevodném systému. Vyšší hodnota napětí může být aplikována díky uvolňování menšího množství Joulova tepla a způsobí zkrácení retenčních časů. Nevodná rozpouštědla jsou také lépe kompatibilní s CE-MS spojením než vodné elektrolyty.

### 6.5. Využití izotachoforézy (ITP) a izoelektrické fokuzace (IE-F)

ITP byla první elektroseparační technikou použitou pro chirální separaci. Pouze minimum speciálních aplikací této techniky pro chirální separaci se objevilo během posledních let. Kaniansky a kol. [131] popsali ITP systém pro preparativní izolaci a purifikaci enantiomerů. Spojení ITP-CZE aplikováno na před-úpravu vzorku a následnou chirální separaci popsala Dankova a kol. [132].

## 7. CYKLODEXTRINY – STRUKTURA A INTERAKCE

V současnosti nacházejí cyklodextriny (CD) významné uplatnění v praxi. CD jsou nejpoužívanějšími chirálními selektory pro separace enantiomerů nízkomolekulových látek [133,134]. CD nacházejí využití v simulacích některých bioprocusů a používají se jako katalyzátory v organické syntéze [135]. Využívají se také jako součást léčiv, potravinářských a kosmetických přípravků [136]. Ve většině uvedených případech je důležitá jejich schopnost tvořit inkluzní komplexy.

Tvorbu inkluzních komplexů s hostujícími látkami umožňuje kavita CD, kterou u nejčastěji používaných CD tvoří šest ( $\alpha$ -CD), sedm ( $\beta$ -CD) nebo osm ( $\gamma$ -CD) jednotek D-glukózy navzájem spojených  $\alpha$ -1,4-glykosidickými vazbami [137]. Informace o tvorbě, struktuře a stabilitě CD komplexů vychází zejména z výsledků RTG analýz [138], spektrálních metod (především NMR), a termodynamických a kinetických metod [139]. Informace o čistotě a struktuře preparátů CD je možné získat také pomocí vysokoúčinných separačních metod [140].

### 7.1. Interakce uplatňující se při tvorbě inkluzních komplexů

Nekovalentní interakce, které přispívají k tvorbě inkluzních komplexů CD a které podmiňují jejich stechiometrii a stabilitu, se rozdělují do dvou skupin: přitažlivé van der Waalsovy a disperzní síly. Spolu s nimi se uplatňují při tvorbě komplexů i odpudivé síly a sterické efekty.

Van der Waalsovy síly mají původ v interakcích dipól-dipól, dipól indukovaný dipól, případně bodové coulombické interakce. Mezi nepolárními částmi interagujících molekul působí disperzní síly (Londonovy síly). Elektrostatické interakce pocházejí od elektricky nabitých funkčních skupin, které jsou lokalizovány hlavně na vnější straně kavity. V důsledku nerovnoměrného rozložení náboje v molekule CD (příspěvky primárních a sekundárních hydroxylových skupin a

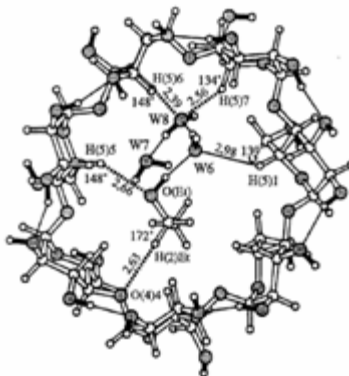
glykozidického kyslíku) je tato polarizace podél osy kavity [141]. V komplexu je dipól hosta antiparalelní k dipólu hostitele a díky tomu může molekula CD měnit tvar.

Stérické parametry a flexibilita  $\alpha$ -,  $\beta$ - a  $\gamma$ -CD úzce souvisí s pásem vodíkových vazeb podél okraje sekundárních hydroxylových skupin. Derivatizací těchto skupin je možné účinně ovlivnit stérické parametry CD [139]. Těsné stérické uspořádání inkluzního komplexu má obvykle nejvyšší stabilitu, protože takto se efektivně uplatňují také disperzní síly na krátkou vzdálenost nebo van der Waalsovy síly s kratším dosahem, které jsou lokalizované ve vnitřní straně kavity.

Význam příspěvku vodíkových vazeb k tvorbě komplexů CD souvisí s velkým počtem kyslíkových atomů uplatňujících se ve funkci Lewisových bází a velkým počtem vodíkových atomů hydroxylových skupin, které se chovají jako Lewisovy kyseliny (obr. 7). Vodíkové vazby zpravidla stabilizují komplexy host-hostitel. Vodíkové vazby hydroxylových skupin CD s molekulami rozpouštědla jsou konkurenční vůči vodíkovým vazbám v komplexech a obvykle stanovují rozpustnost CD a jejich komplexů. Na rozdíl od hydrofobních interakcí stabilita vodíkových vazeb v inkluzních komplexech s rostoucí teplotou klesá.

Hydrofobní interakce jsou zprostředkovány hydrofobní částí molekuly CD, což představuje její vnitřní povrch (C-H skupiny). Představují hnací sílu pro oddělení nepolární části molekuly hosta od molekuly vody a jsou považovány za klíčové v mechanismu inkluzních komplexů [138].

**Obr. 7: Interakce vodíkových vazeb typu O-D...O (tenké čáry) a C-H...O (bodové čáry) v deuterovaném  $\beta$ -CD, komplexotvorně vázaném s ethanolem (EtOH) a 8  $D_2O$ .**



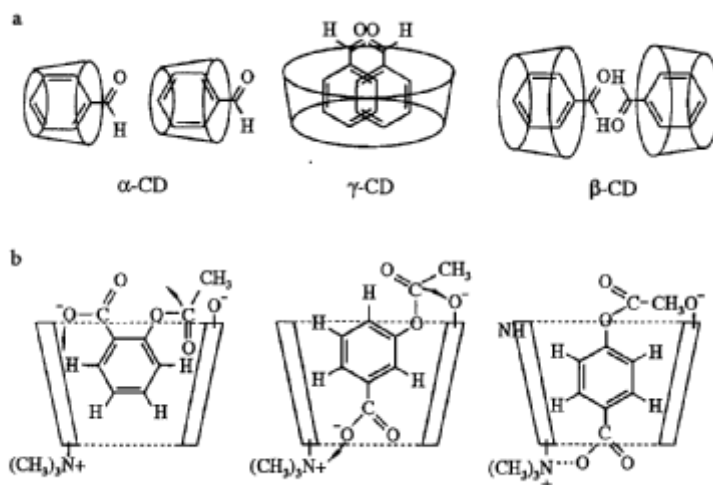
## 7.2. Uspořádání a stabilita inkluzních komplexů CD

Nejčastější stechiometrické poměry host-hostitel v CD komplexech jsou 1:1. Stechiometrické poměry 2:1, 1:2, 2:2 jako komplikovanější asociály, běžně doprovázejí převládající formu komplexu (obr. 8) Vyšší stechiometrické poměry upřednostňuje také dimerizace CD intermolekulovými vodíkovými vazbami.

Asociované molekuly hostitele a hosta jsou vzájemně orientovány tak, aby interakce mezi jejich funkčními skupinami byly komplementární. Komplexy se stechiometrií mohou být proto uspořádáné v konfiguracích „head-to-head“ nebo „head-to-tail“ (obr. 8)

Úloha funkčních skupin: nabitě a hydrofilní skupiny hosta (hydroxylová, amino a karboxylová skupina) zůstávají mimo CD kavitu i po penetraci jeho hydrofobní části do kavity a interagují s externě orientovanými skupinami CD nebo s molekulami vody (polárního rozpouštědla). Zvláště fenolické a v menší míře také hydroxylové skupiny nižších alifatických alkoholů mohou tvořit vodíkové vazby uvnitř CD kavity (obr. 7-9). Nitroskupina na aromatickém jádře se může podílet na indukovaných elektrostatických interakcích s CD. Hydrofobní vazbě se připisuje asociace alkylových řetězců aminokyselin s vnitřním povrchem CD. Orientace n-alkylových derivátů benzenu v CD závisí na délce řetězce. Vliv polohy substituentu aromatického jádra na penetraci hostující molekuly do CD kavity ilustruje obr. 9. Afinita hostujících molekul k CD závisí také na jejich konformaci. Cyklické nasycené uhlovodíky (i vyšší deriváty cykloalkylů jako C7) preferují  $\beta$ -CD, zatím co acyklické upřednostňují  $\alpha$ -CD.

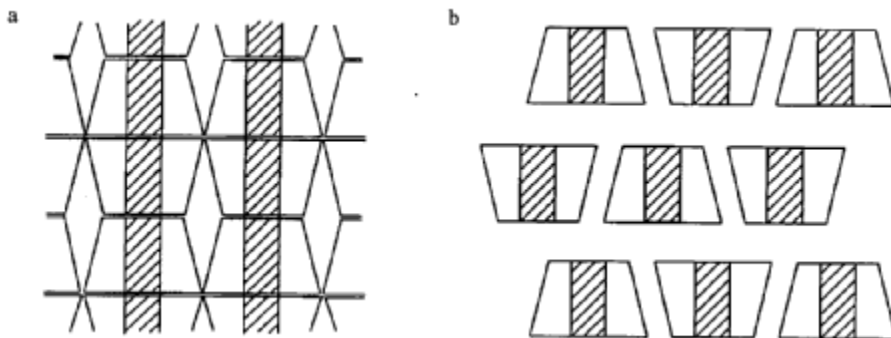
**Obr. 8: Závislost konfirmace hostitel-host od:** a- velikosti CD kavity, b- polohy substituentu na aromatickém jádře [geometrie komplexů o-, m- a p- izomerů kyseliny acetoxybenzoové s mono-(6-triamonium-6-deoxy)- $\beta$ -CD].



Enantioselektivní inkluzní komplepace: enantioselektivní rozlišení závisí na rozdílném umístění enantiomerů v CD kavitě, přičemž se při stabilizaci diastereomerních komplexů mohou uplatnit rozdílné interakce. Pro enantiomerní rozlišení je nevyhnutelné, aby hostitelská molekula byla v kontaktu s přinejmenším třemi vazebnými místy hostující molekuly. Derivatizací hostujících a hostitelských molekul se do komplexotvorného mechanismu vnášejí nové interakce, čímž se často dosahují pozitivní změny v enantioselektivitě. Zlepšení enantioselektivních vlastností derivatizovaných CD v porovnání s nativními může být interpretováno jako důsledek větších možností konfirmačních změn hostitelských molekul indukovaných inkluzí. Tyto změny závisí na flexibilitě hostitelské molekuly a v případě flexibilnějších molekul CD vedou k příznivějšímu uspořádání molekuly hosta a k příznivějším energetickým poměrům vznikajících komplexů.

Vliv prostředí: zvýšení iontové síly zpravidla zeslabuje interakce ión-ión a ión-dipól a posiluje hydrofobní interakce v komplexech host-hostitel. Opačný účinek na hydrofobní interakce mají organická rozpouštědla. Nutno však podotknout, že interakce molekul aromatického charakteru s CD mohou být organickým rozpouštědlem podpořeny [142]. Molekuly organických rozpouštědel mohou přispět k interakci hosta s CD jako spoluhostující molekuly, a to prostřednictvím vodíkových vazeb C-H...O (obr. 7). Tyto vazby navíc podmiňují orientaci hosta v kavitě.

**Obr. 9: Příklady prostorového uspořádání CD komplexů v tuhém stavu:** a- tvorba kanálků (channel type), b- tvorba klíček (cage type).



## **VÝSLEDKOVÁ ČÁST**

## 8. VYUŽITÍ CZE PRO CHIRÁLNÍ SEPARACI

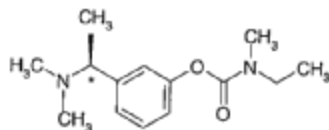
### 8.1. Chirální separace rivastigminu ve farmaceutických přípravcích pomocí cyklodextrinem modifikované kapilární zónové elektroforézy

Cílem této práce bylo vyvinout snadnou, cenově dostupnou a spolehlivou CZE metodu pro chirální separaci bazické sloučeniny rivastigminu (RIV). Optimalizovaná metoda byla aplikována pro kontrolu chirální čistoty komerčního léčiva. Během vývoje metody byly testovány neutrální a nabitě CD-deriváty a sledován efekt molekulární struktury RIV na jeho migrační chování. CZE s negativně nabitými cyklodextriny jako chirálními selektory se předpokládala být více efektivní při separaci racemické směsi než nativní  $\beta$ -CD.

Obvykle jeden z enantiomerů racemického léčiva vykazuje kýžený terapeutický efekt nebo jednotlivé enantiomery mohou vykazovat zcela odlišné farmakologické vlastnosti, popř. jeden může působit i toxicky. Na základě těchto poznatků došlo během vývoje nového léčiva ke zpřísnění pravidel, jehož součástí je výzkum stereoizomerního složení léčiv a jejich terapeutický a toxikologický efekt. Pouze vysoce biologicky aktivní enantiomery jsou používány pro výrobu nové generace léčiv. Bezpečnost chirálních léčiv je spojena s kontrolou jejich chirální čistoty. Analytické metody jsou požadovány pro stanovení nečistot u chirálních léčiv během jednotlivých kroků jejich výroby.

CZE se stává silnou technikou jako alternativa vůči chirálním chromatografickým technikám. CZE se svojí vysokou rozlišovací silou hraje důležitou roli při chirálních separacích léčiv a nabízí důležité výhody, jako krátká doba analýzy, flexibilita a nízká spotřeba vzorků a pufřů. Princip CZE je založen na rozdílné elektroforetické mobilitě analytů, která závisí na velikosti jejich náboje. Podobně jako u HPLC, se mohou pro chirální separaci využívat speciální aditiva do pracovního pufřu, jako jsou např. cyklodextriny. K chirálnímu rozlišení pomocí CD komplexů dochází na základě rozdílné elektroforetické mobility komplexů s analytem.

Rivastigmin je reversibilní a nekompetitivní acetylcholinesterázový inhibitor druhé generace. Struktura RIV je na obr. 10. Tato sloučenina také zvyšuje cholinacetátovou aktivitu, která stimuluje syntézu acetylcholinu. RIV jako karbamátový derivát phyostigminu prokázal úspěch v léčbě Alzheimerovy choroby. Původně byl syntetizován jako racemická směs, až při pozdějším vývoji byl označen více účinný S (-) enantiomer. Koncentrace R-enantiomeru nutná pro redukci acetylcholinesterázové aktivity je 10krát vyšší než S-enantiomeru.

**Obr. 10: Struktura rivastigminu.**

Separace bazických sloučenin může být provedena pomocí tří typů CD-modifikované CZE. Separace se nazývá „desionoselektivní“ pokud pouze nedisociovaný enantiomer se kompletuje selektivně s CD. Separace je ionoselektivní pokud ke komplexaci s CD dochází pouze u disociovaných enantiomerů. Duoselektivní separaci nazýváme v případě, kdy oba (disociovaný a nedisociovaný) enantiomer vytvářejí komplex. Vývoj metody pro chirální separaci bazických látek by měl být nejdříve založen na optimalizaci pH pracovního pufru, typu a koncentraci CD. Jakmile počáteční podmínky separace jsou stanoveny, další zlepšení separace (zkrácení doby analýzy) lze dosáhnout úpravou hodnoty aplikovaného elektrického pole, teploty a délkou popř. typem kapiláry.

Kapilární zónová elektroforéza P/ACE MDQ Beckman Coulter (USA) s detekčním systémem DAD byla použita pro vývoj chirální metody. Teplota zásobníku, ve kterém byla umístěna separační kolona, byla udržována na hodnotě  $16 \pm 0,1$  °C pomocí kapalinového chladicího systému. Separace byla detekována při 200 nm. Analyzátor byl ovládán pomocí P/ACE Station Softwarového vybavení 32 Karet™.

Během vývoje metody byly použity dva typy kapilár pro sledování změn migračního chování rivastigminu:

- křemenná kapilára o délce 60 cm × 50 μm i.d.
- PAA povlečená kapilára s celkovou délkou 30 cm × 50 μm i.d.

Detekční okno bylo vypáleno ve stejné vzdálenosti u obou kapilár, 10 cm od konce kapiláry (outletu). Předpoklad, že kvalita chirální separace může být zlepšena modifikací vnitřního povrchu kapiláry, se potvrdil. Použití povlečených kapilár minimalizuje absorpci analytu na stěnu kapiláry a redukuje elektroosmotický tok.



Byl sledován vliv typu a koncentrace CD na chirální rozlišení RIV. Pro chirální selektor existuje optimální koncentrace, při které enantiomerní pár dosahuje největšího rozlišení. Tato optimální koncentrace CD závisí na vazebné síle mezi CD a analytem, takže slabě poutaný analyt vyžaduje obvykle vyšší koncentraci chirálního selektoru. Díky slabé protonaci RIV v pracovním elektrolytu s kyselým pH, volná forma RIV bude migrovat ke katodě. Z tohoto důvodu je zřejmé, že migrační směrem k anodě bude zvyšovat interakce mezi RIV a S- $\beta$ -CD. Migrační čas je tedy indikátorem síly interakce.

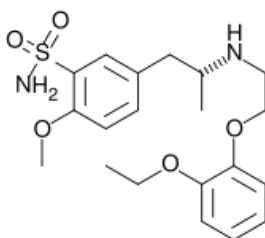
Chirální separace na základní linii probíhala v kapiláře pokryté PAA o celkové délce 30cm (efektivní délka 20 cm) a vnitřním průměru 50  $\mu$ m. Jako optimální BGE byl použit 100mM TRIS- fosfátový pufr s přidavkem 7 mM S- $\beta$ -CD jako chirální selektor, pH 2,5. Separace probíhala při teplotě 18 C a napětí 20 kV. Enantiomery byly detekovány při vlnové délce 200 nm. Celková doba analýzy nepřekročila 8 min. Optimalizovaná metoda byla validována. Linearita odezvy byla potvrzena proměřením závislosti plochy píku na koncentraci každého enantiomeru v kalibračním rozmezí 5,0-500,0  $\mu$ M a zhodnocena metodou lineární regrese ( $r=0,9994-0,9995$ ). Opakovatelnost byla vyjádřena jako relativní standardní odchylka  $R_S$  a byla vypočtena z hodnot ploch píků a migračních časů jednotlivých enantiomerů získaných během šesti opakovaných nástřiků. Detekční limity enantiomerů byly stanoveny jako koncentrace odpovídající trojnásobku poměru signálu k šumu. Při detekční vlnové délce 200 nm byl LOD 5  $\mu$ M pro oba enantiomery a LOQ 13  $\mu$ M.

Metoda byla aplikována pro stanovení S-RIV v léčivém přípravku Exelon (kapsle). Citlivost metody je dostačující pro stanovení limitovaného množství R-enantiomeru jako nežádoucí nečistoty ( $\geq 0,1\%$ ). Správnost metody byla ověřena technikou standardního přidavku. Hodnota recovery přidavku S-RIV (150,300  $\mu$ M) se pohybovala v rozmezí 96-103 %. Získané validační parametry prokázaly vhodnost vyvinuté metody pro stanovení S-RIV a kontrolu chirální čistoty v léčivém přípravku Exelon. Podrobný popis a výsledky jsou uvedeny v příloze 11.1.

## 8.2. Stanovení enantiomerní čistoty tamsulosinu pomocí kapilární zónové elektroforézy s přidavkem cyklodextrinu v kapiláře pokryté polyakrylamidem

Tamsulosin hydrochlorid (TH) se používá při léčbě benigní prostatické hyperplazie. TH je nový antagonist a alfa 1A adrenoceptorů, které zodpovídají za relaxaci hladkého svalstva. V porovnání s ostatními alfa antagonisty, TH má větší specifitu vůči alfa 1A receptorům a zároveň neovlivňuje alfa receptory krevního řečiště. Proto způsobí hypotensi s menší pravděpodobností než jeho analogy, jako je např. prazosin. Struktura TH enantiomerů je zobrazena na obr. 7. Pouze R-izomer vykazuje významný farmakologický efekt. Proto vývoj metody pro kontrolu čistoty hraje klíčovou roli při dosažení úspěšného vývoje tohoto léku.

**Obr. 11: Chemická struktura tamsulosinu.**



Cílem této studie bylo vyvinout relativně rychlou a dostatečně účinnou metodu pro chirální separaci racemické směsi TH za použití kombinace kapiláry pokryté PAA a nabitého CD jako chirálního selektoru. Metoda musí být dostatečně citlivá, aby bylo možné stanovit stopové množství nežádoucího enantiomeru.

Nejdůležitějším krokem při vývoji metody pro chirální separaci je volba vhodného typu chirálního selektoru a jeho koncentrace. Optimalizace ostatních experimentálních podmínek, jako je druh a koncentrace pufru, pH, obsah modifikátorů, teplota a separační napětí také přispívají k dosažení nejvyššího rozlišení.

Původně cyklodextriny, především  $\beta$ -CD, byly nejvíce používané selektory. Bohužel originální  $\beta$ -CD má omezenou rozpustnost ve vodných pufrch. Aplikace CD byly značně rozšířeny po zavedení jejich alkylovaných derivátů do analytické praxe. Některé z těchto derivátů vykazují lepší rozpustnost v různých pufrch a jsou selektivní pro větší počet analytů než originální CD. Neutrální CD se nemohou podílet na separaci neutrálních enantiomerů v bazickém prostředí.

Alespoň jeden z páru musí být nabitý. Nabitý CD může separovat stejně dobře jak nabitý tak neutrální analyt. Při použití opačně nabitého CD a analytu může i dokonce velmi malá selektivita způsobit rozlišení na základní linii. Směr migrace komplexovaného a volného analytu je opačný. Většina chirálních separací bazických enantiomerů využívá aniontových derivátů  $\beta$ -CD (sulfatovaný nebo fosfátovaný).

Chirální separace racemické směsi TH byla provedena v 100 mM fosfátovém pufru jehož pH bylo upraveno na hodnotu 2,5 pomocí TRIS. Jako chirální selektor byl použit sulfatovaný  $\beta$ -CD o koncentraci 1,7 mM. Při optimálních podmínkách (teplota 18 °C a napětí 20 kV) bylo dosaženo separace na základní linii během 12 minut. Zlepšení rozlišení a dosažení lepší opakovatelnosti metody bylo docíleno použitím kapiláry pokryté PAA.

Linearita metody byla ověřena proměřením kalibrační závislosti mezi koncentrací a odpovídající plochou píku každého enantiomeru v kalibračním rozmezí 50,0 – 500,0  $\mu$ M. Hodnoty korelačních koeficientů (0,9993-0,9996) potvrdily dobrou linearitu ve zvoleném rozsahu. Přesnost byla stanovena opakovaným nástřikem standardního roztoku (n=6) každého enantiomeru o koncentraci 250  $\mu$ M a vyjádřena jako  $R_S$  v % pro hodnotu plochy píku a retenčního času. Správnost metody byla ověřena technikou standardního přídávku R-TH a recovery se pohybovalo v rozmezí 99-102%. Výsledky prokázaly, že CZE metoda je snadná, rychlá a nenáročná pro stanovení obsahu R-TH v HVLP Omnic (tobolky). Navíc optimalizovaná metoda je vhodná pro rutinní kontrolu optické čistoty HVLP, pro stanovení 0,1% S-TH v kratší době analýzy v porovnání s publikovanými HPLC metodami. Podrobný popis a výsledky jsou uvedeny v příloze 11.2.

### 8.3. Chirální separace sibutramínu pomocí kapilární zónové elektroforézy

Sibutramin byl původně vyvíjen jako antidepresivum a až v průběhu klinických studií byla zachycena jeho schopnost snižovat tělesnou hmotnost. Prodává se v racemické formě pod obchodní značkou – Meridia®. Sibutramin v důsledku zpětného vychytávání serotoninu a noradrenalinu příznivě upravuje poměr mezi příjmem a výdejem energie. Na jedné straně navazuje pocit sytosti, čímž snižuje energetický příjem. Na druhé straně je sibutramin mírně termogenní, čímž zmírňuje pokles metabolismu obvyklý při snižování hmotnosti. Sibutramin neovlivňuje receptory pro serotonin a dopamin a nemá žádnou afinitu k cholinergním, H1-histaminovým a benzodiazepinovým receptorům. Na rozdíl od fenfluraminu nezvyšuje uvolňování serotoninu do synaptické štěrbiny.

Jako optimální pracovní elektrolyt byl zvolen fosfátový pufr, jehož pH bylo upraveno na hodnotu 2,5 pomocí TRIS. Byl pozorován výrazný vliv druhu a koncentrace chirálního selektoru na účinnost separace. Jako nejvhodnější dle charakteru analytu se prokázal sulfatovaný  $\beta$ -CD o koncentraci 1 mM. Tvorba inkluzních komplexů mezi enantiomery a CD je silně ovlivněna nejen hydrofobními interakcemi uvnitř kavity CD, ale také vazbou mezi hydroxylovými skupinami umístěnými na okraji CD a substituovanými skupinami na asymetrickém centru analytu. Z tohoto důvodu tvorba komplexu závisí na konformaci CD a na charakteru a velikosti hostující molekuly analytu.

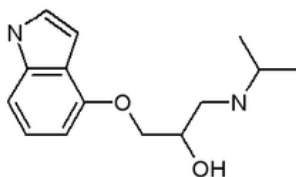
Kromě vlivu chirálního selektoru byl při optimalizaci separačních podmínek sledován také vliv koncentrace BGE, vloženého napětí a teploty na efektivitu separace. V elektrolytu optimálního složení (100 mM fosfátový pufr/TRIS; pH 2,5; 1mM sulfatovaný  $\beta$ -CD), při optimálním nastavení (15 kV, 18 °C) bylo dosaženo dokonalé separace racemické směsi sibutraminu. V tomto systému byly proměřeny základní validační charakteristiky jako linearita, selektivita, limit detekce a kvantifikace, přesnost a reprodukovatelnost a jejich hodnoty prokázaly vhodnost vyvinuté techniky pro rutinní kontrolu přípravku Meridia. Podrobný popis problematiky viz příloha 11.3.

## 9. VYUŽITÍ ELKTROMIGRAČNÍCH METOD V ANALÝZE LÉČIV A LÁTEK PŘÍRODNÍHO PŮVODU

### 9.1. Stanovení pindololu v léčivých přípravcích metodou kapilární izotachoforézy

Pindolol (PI) je neselektivní  $\beta$ -blokátor s význačnou vnitřní sympatomimetickou aktivitou (ISA), což znamená, že zejména při vyšším dávkování způsobí účinky jako epinefrin (zvýšení tepové frekvence, zvýšení krevního tlaku, bronchodilatace), ale tyto účinky jsou limitované. Pindolol také vykazuje účinky stabilizující membránu podobně jako quinidin. Působí na receptory serotoninu v mozku (5-HT<sub>1A</sub>), čímž dochází ke zvýšení postsynaptické koncentrace serotoninu. Z hlediska chemického se jedná o látku bazického charakteru, prakticky nerozpustnou ve vodě, těžce rozpustnou v methanolu a rozpustnou v minerálních kyselinách. Hodnota pK<sub>a</sub> pindololu je 8,8.

#### Obr. 12: Chemická struktura pindololu.



Cílem této práce bylo vypracování ITP metody umožňující stanovení pindololu v monokomponentním farmaceutickém přípravku Apo-Pindol tbl. Nedílnou součástí práce je i vyhodnocení základních validačních parametrů.

#### Během optimalizace metody byly testovány dva elektrolytové systémy:

- 10 mM octan draselný / 10 mM kyselina octová jako LE (pH=4,7), 20 mM kyselina mravenčí jako TE,
- 10 mM pikolinát draselný / 10 mM kyselina pikolinová jako LE (pH=5,1) a 10 mM kyselina mravenčí jako TE.

Z hlediska tvaru ITP zóny a délky analýzy byl vyhodnocen jako vhodnější systém pikolinátový. Vzhledem k nerozpustnosti pindololu ve vodě a methanolu bylo nutné pindolol převést na rozpustnou sůl přidávkem kyseliny chlorovodíkové. Množství přidávané kyseliny odpovídalo

maximálně 20% nadbytku vzhledem ke stechiometrickému množství. Přídavek většího množství kyseliny chlorovodíkové vedl k destrukci molekuly pindololu a vzniku rozkladných produktů, které byly patrné na izotachoforeogramu.

Ve zvoleném systému byl také testován časový a proudový režim analýzy. Jako optimální nastavení byl zvolen separační proud 50  $\mu\text{A}$  po dobu 800 s a detekční proud 20  $\mu\text{A}$ . Celková doba analýzy činila 18 min.

Linearita metody byla testována v kalibračním rozmezí 20-200 mg/l při 6 koncentračních hladinách, kde čas  $t$  (s) průchodu zóny pindololu přes detektor byl brán jako kvantitativní parametr. Závislost času na koncentraci pindololu byla zpracována metodou lineární regrese a vysoká hodnota korelačního koeficientu  $R=0,99979$  signalizuje lineární závislost v daném kalibračním rozmezí a analytickou stabilitu ITP zón.

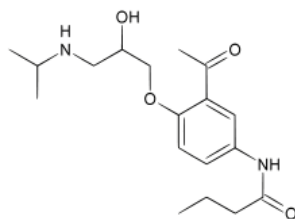
Přesnost byla určena proměřením ( $n = 6$ ) standardního roztoku pindololu o koncentraci 80mg l<sup>-1</sup>. Relativní směrodatná odchylka  $R_s = 0,51 \%$  odpovídá standardně dosahovaným hodnotám při ITP měření. Vzhledem k tomu, že oficiální lékopisná metoda je potenciometrická titrace s 0,1 M kyselinou chlorovodíkovou, což je značně neselektivní metoda stanovení a rovněž placebo nebylo k dispozici, byla správnost metody určena přidavkem známého množství standardu k léčivému přípravku a vyjádřena v % jako výtěžnost (recovery). Hodnoty výtěžnosti pro analyzované léčivo byly v rozmezí 97,3-98,6 %. Opakovatelnost metody byla provedena proměřením vzorků HVLP připravených samostatným postupem ( $n = 6$ ) a vyjádřena jako RSD [%]. Selektivita metody je vyhovující, pomocné látky obsažené v léčivém přípravku, vzhledem ke své vyšší pohyblivosti, nerušily stanovení účinné látky.

Detailní popis metody a výsledky jsou uvedeny v příloze 11.4.

## 9.2. Stanovení acebutololu ve farmaceutických přípravcích pomocí kapilární izotachoforézy

Cílem práce byla optimalizace a validace podmínek pro ITP hodnocení obsahu farmaceuticky významného  $\beta$ -blokátoru acebutololu v tabletách. Betablokátory představují širokou skupinu látek, které blokují účinek noradrenalinu a adrenalinu na betaadrenergních receptorech. Dle afinity k jednotlivým subtypům beta-receptorů, acebutolol patří mezi kardioselektivní  $\beta$ -blokátory se silným hypertenzním a antiaritmiickým efektem. Zmenšením spotřeby kyslíku poskytuje účinnou ochranu srdce při jeho nedostatečném prokrvení. Acebutolol má tzv. vnitřní sympatomometickou aktivitu (ISA) – je částečným agonistou beta-receptorů. Acebutolol je poměrně málo prozkoumaný betablokátor ve vztahu k podávání těhotným ženám, ale klinické studie potvrzují, že se jedná o bezpečný a účinný lék, který může být podáván gravidním ženám s arteriální hypertenzí.

### Obr. 13: Chemická struktura acebutololu.



Hodnota  $pK_a$  acebutololu 9,4, daná sekundární alifatickou aminoskupinou, určuje, že acebutolol ve vodném roztoku o hodnotě  $pH \leq 7,4$  bude kompletně ionizovaný. Acebutolol je přítomen ve farmaceutických přípravcích ve formě ionizovaného hydrochloridu, vhodného pro přímé ITP stanovení. Vliv koncentrace LE iontů ( $K^+$  nebo  $NH_4^+$ ), druh protonu (acetát,  $pK_a=4,76$ ; pikolinát,  $pK_a=5,39$  - vhodné pro ITP stanovení organických bází), druh TE iontů [tři aminokyseliny –  $\beta$ -alanin (BALA);  $\epsilon$ -aminokapronová kyselina (EACA);  $\gamma$ -aminomáselná kyselina (GABA)], stejně jako velikost separačního a detekčního proudu byl sledován s ohledem k účinnosti separace, tvaru detekované ITP zóny, citlivosti stanovení a celkové doby trvání analýzy.

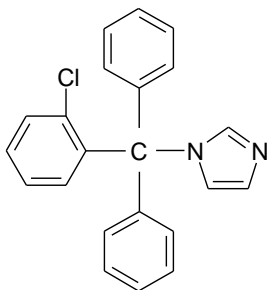
Z těchto hledisek se ukázal jako optimální elektrolytový systém obsahující 10 mM acetát draselný a 10 mM kyselina octová ( $pH 4,65$ ) [LE] a 10 mM BALA o  $pH \approx 4$  [TE].

Vzhledem k použití univerzální konduktometrické detekce byla délka ITP zóny v sekundách (s) brána jako kvantitativní parametr a kalibrační závislost vyjádřena jako funkce délky zóny na koncentraci analytu  $t=f [c (\text{analyt})]$ . Lineární rozsah pro stanovení acebutololu byl ověřen v rozmezí 0,46-4,6 mM ACE (šest standardních roztoků o různé koncentraci, každý měřen třikrát) s korelačním koeficientem 0,9995. Opakovanou analýzou (n=6) standardních roztoků (0,42 a 0,98 mg. ml<sup>-1</sup>) byly zjištěny RSD hodnoty 1,1 a 1,2 % což indikuje dobrou opakovatelnost ITP metody. Pro nedostupnost placebo a lékopisné metody byla správnost výsledků ITP stanovení acebutololu ověřena technikou standardního přídatku a vyjádřena v % jako výtěžnost (recovery). Hodnoty výtěžností byly v rozmezí 98,8-102,4% což ukazuje na vyhovující správnost optimalizované ITM metody.

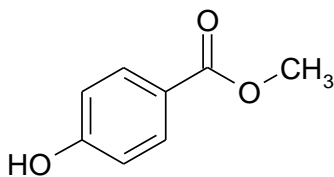
Tato práce je náplní publikace, která je uvedena v příloze 11.5.



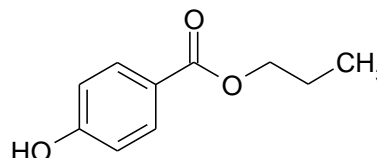
### 9.3. Separace a stanovení klotrimazolu, methylparabenu a propylparabenu v léčivém přípravku micelární elektrokinetikou chromatografií



Klotrimazol



Methylparaben



Propylparaben

Cílem této práce bylo vypracování MEKC metody pro analýzu klotrimazolu, methylparabenu a propylparabenu v léčivém přípravku Clotrimazol HBF.

Klotrimazol je širokospektré antimykotikum, jehož mechanismus účinku spočívá v inhibici syntézy ergosterolu. Klotrimazol je bílý nebo slabě žlutý krystalický prášek, je prakticky nerozpustný ve vodě, dobře rozpustný v lihu 96% a v dichlormethanu, těžce rozpustný v etheru. Klotrimazol je bazická látka s hodnotou pKa 6,12. Dle ČL 2005 se klotrimazol stanovuje nevodnou titrací kyselinou chloristou za vizuální indikace bodu ekvivalence.

Methylparaben a propylparaben se používají především jako konzervační látky. Methylparaben je ve formě bílého krystalického prášku nebo bezbarvých krystalů, propylparaben je bílý krystalický prášek. Oba parabeny jsou velmi těžce rozpustné ve vodě, snadno rozpustné v lihu 96% a v methanolu. Stanovují se acidobazickou titrací za potenciometrické indikace bodu ekvivalence. Methylparaben i propylparaben mají hodnoty pKa 8.30 (methylparaben) a 8.23 (propylparaben).

Vzhledem k acidobazickým vlastnostem analyzovaných látek bylo nutné použít pro jejich současné stanovení metodu MEKC. Separace probíhala v nepokryté křemenné kapiláře o celkové délce 60 cm (efektivní délka 50 cm) a vnitřním průměru 75  $\mu\text{m}$ . Jako optimální BGE byl použit 15 mm fosfátový pufr s přídavkem 15 mm anionaktivního surfaktantu SDS, pH 7.2. Měření probíhalo při teplotě 25  $^{\circ}\text{C}$  a napětí 25 kV. Analyty byly detekovány při vlnové délce 212 nm. Celková doba analýzy nepřekročila 12 min. Optimalizovaná metoda byla validována. Linearita odezvy detektoru byla potvrzena proměřením závislosti plochy píku na koncentraci analytů a zhodnocena lineární regresí; validační parametr přesnost proměřením ( $n = 6$ ) vzorků o

koncentraci  $60 \text{ mg.l}^{-1}$  (methylparaben),  $15 \text{ mg.l}^{-1}$  (propylparaben) a  $300 \text{ mg.l}^{-1}$  (klotrimazol). opakovatelnost ploch píků a migračních časů byla vyjádřena jako  $R_S[\%]$ . Detekční limity analytů byly stanoveny jako koncentrace analytu odpovídající trojnásobku poměru signálu k šumu. Správnost metody byla ověřena jednak analýzou vzorku s přidavkem standardní látky a vyjádřena jako recovery [%] statistickým srovnáním výsledků předložené metody s výsledky validované HPLC metody. získané validační parametry prokázaly vhodnost vyvinuté metody pro analýzu léčivého přípravku Clotrimazol HBF. Podrobný popis metody je uveden v příloze 11.6.

#### **9.4. Stanovení polyolů v infuzních roztocích metodou kapilární zónové elektroforézy**

V této práci byla využita komplexující schopnost borátu. Záporně nabitě komplexy s neutrálními polyoly vzniklé přímo v separačním médiu vykazovaly vlastní elektroforetickou pohyblivost a tedy je bylo možné separovat. S ohledem na nepřítomnost chromoforu v molekulách manitolu a sorbitolu, byly tyto polyoly separovány pomocí CZE s nepřímou detekcí. Základem nepřímé detekce je monitorování UV signálu absorbujícího spoluiontu základního elektrolytu. Při vstupu neabsorbujícího analytu do detekční cely nastane snížení monitorovaného signálu a zaznamenání negativního píku analytu. Pouze ionty s hodnotou mobility blízké mobilitě spoluiontu BGE jsou detekovány jako píky symetrické. Z tohoto důvodu je v praxi vhodné zvolit takový UV absorbující spoluion, jehož efektivní mobilita bude co možná nejbližší efektivní mobilitě separovaných polyolů, a který zároveň disponuje vysokým molárním absorpčním koeficientem při dané vlnové délce.

Nejlepší výsledky byly získány při použití 3-nitrobenzoátu jako spoluiontu v BGE. Optimální elektrolytový systém se skládal z 50 mM borátového pufru (pH=9,3 upraveno pomocí TEA) + 10 mM 3-nitrobenzoátu. Kalibrační závislost byla proměřena v rozsahu 0,2-2 mg/ml pro oba testované polyoly. Délka analýzy byla optimalizována na 13 minut a separované analyty byly detekovány při hodnotě vlnové délky 215 nm. Vypracovaná metoda byla aplikována na stanovení manitolu a sorbitolu v infuzních roztocích. Správnost metody byla ověřena paralelně provedenou lékopisnou metodou (jodometrická titrace) a výsledky obou metod byly statisticky porovnány metodou Studentova t-testu.

## 10. APLIKACE TZV. „STACKING“ EFEKTU V KAPILÁRNÍ ZÓNOVÉ ELEKTROFORÉZE

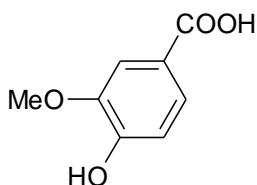
### 10.1. Vývoj stacking-CZE metody pro analýzu fenolických kyselin

Byla vypracována metody kapilární zónové elektroforézy s využitím stacking techniky (Large-volume sample stacking with polarity switching) k separaci a stanovení osmi fenolických kyselin v modelové směsi a extraktu z rostlinné drogy *Epilobium parviflorum*

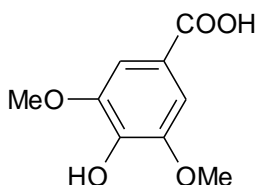
Fenolické kyseliny - aromatické rostlinné kyseliny jsou rozšířené sekundární metabolity rostlin a mají mnohé fyziologické vlastnosti. Kromě rozmanitých funkcí v rostlinné říši, mají některé kyseliny chemotaxonomický význam a farmakologické vlastnosti. Z těchto důvodů má analýza těchto látek značný význam. Většina aromatických kyselin existuje jako deriváty kyseliny benzoové nebo skořicové. Především jde o produkty rostlinných pletiv, které přispívají ke vzniku polymerních struktur taninu a ligninu. Mezi deriváty kyseliny benzoové patří kyselina syringová, vanilová, gentisová; deriváty kyseliny skořicové jsou kyselina chlorogenová, ferulová, kávová, p-kumarová a skořicová [143].

#### Deriváty kyseliny benzoové

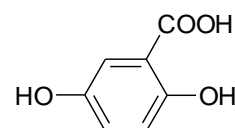
Kyselina vanilová (pKa = 4,45)



Kyselina syringová (pKa = 4,33)

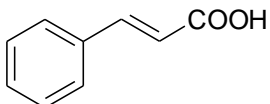


Kyselina gentisová (pKa = 3,01)

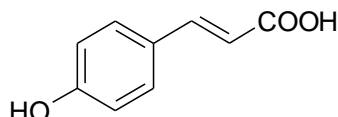


#### Deriváty kyseliny skořicové

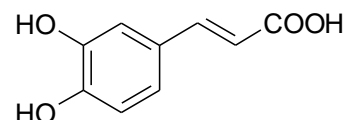
Kyselina skořicová (pKa = 4,43)



Kyselina p-kumarová (pKa = 4,10)

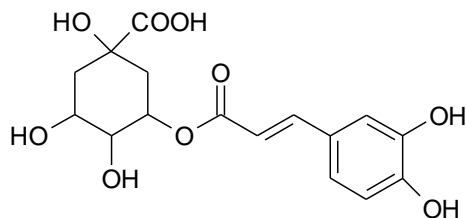
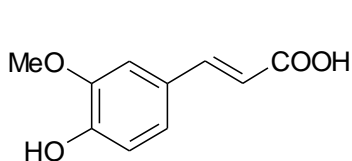


Kyselina kávová (pKa = 4,04)



Kyselina ferulová (pKa = 4,04)

Kyselina chlorogenová (pKa = 3,96)



Ve farmacii se používá nať vrbovky malokvěté *Epilobii herba*. Drogu tvoří sušená, řezaná kvetoucí nať vrbovky malokvěté, vrbovky horské, vrbovky chlumní a vrbovky růžové.

Studované analyty patří mezi urologika, antiflogistika a její terapeutické indikace jsou: obtíže při močení při benigní hyperplazii prostaty, zánětu prostaty, zánětlivá onemocnění ledvin a močových cest a dráždivý měchýř. Čaj je určen k adjuvantní léčbě, lze ho užívat i preventivně. Vrbovka malokvětá obsahuje komplex flavonoidů myricetinového (myricitrin), kemferolového a kvercetinového typu, proanthocyanidiny, třísloviny, steroly (zejména beta-sitosterol a jeho estery) a triterpenové kyseliny (kyselina oleanolová a ursolová). Z látek fenolické povahy byly dále identifikovány: kyselina protokatechová, chlorogenová, gentisová, ferulová, kávová, galová a skořicová.

Účinek vrbovky je připisován makrocyclickým tříslovinám (elagotanimům) onotherinu A a B, rozpustným ve vodě, které jsou schopny vyvolávat inhibici 5-alfa-reduktázy. Výrazně se podílejí na konverzi testosteronu na aktivnější DH-testosteron, jehož komplex s receptorem se váže na DNA, aktivuje syntézu bílkovin a zvětšování objemu prostaty. Droga obsahuje pravděpodobně i další látky s antiandrogenním a antiestrogenním účinkem. Flavony (myricitrin, myricetin-3-O-beta glukuronid) mají antiflogistický a antiedematózní účinek, inhibují syntézu prostaglandinů PG D2, PG E2 a PG I1. Antiedematózní účinek myricitrinu a myricetinu jsou srovnatelné s indometacinem. Nálev z drogy má i mírně antimikrobiální účinky. Droga má samostatný článek v Českém farmaceutickém kodexu, je obsažena v léčivých přípravcích např. EPILOBIN PLANTA por. spc. dos., Leros s.r.o., Praha; ČR. VRBOVKOVÁ NAŤ por. spc., Megafyt-R s.r.o., Vrané nad Vltavou, ČR [144].

**Obr.14. *Epilobium parviflorum* ([www.avicena.cz](http://www.avicena.cz))**

Předmětem této práce bylo vypracování metody kapilární zónové elektroforézy s využitím stacking techniky k separaci a stanovení osmi fenolických kyselin v modelové směsi a extraktu z rostlinné drogy *Epilobium parviflorum*.

#### **Optimalizace CZE v klasickém modu**

Nejdříve bylo nutné nalézt vhodný elektrolytový systém pro analýzu kyseliny skořicové, kumarové, ferulové, syringové, kávové, gentisové, vanilové a chlorogenové, ve kterém by došlo k jejich úplné separaci se symetrickými píky a co největší plochou. Dále bylo nutné optimalizovat proces zakoncentrování velmi ředěných roztoků směsi kyselin za použití stacking procedury s přepnutím polarity. Cílem bylo zvýšit citlivost analýzy a stanovit obsah kyselin v rostlinném materiálu.

Pro separaci byl zvolen alkalický elektrolytový systém na základě borátového pufru pro dosažení ionizace karboxylových a fenolických skupin separovaných kyselin a možnosti zlepšení separace tvorbou komplexů borátu s hydroxylovými popř. fenolickými skupinami. Efekt koncentrace borátu,  $\alpha$ -CD a methanolu byl testován a jako nejvhodnější BGE se ukázal systém 50 mM borát + 2%  $\alpha$ -cyklodextrinu, pH = 9.0. V tomto elektrolytovém systému byly píky symetrické, rozdělené na základní linii s přijatelnou délkou analýzy a především umožňovaly zakoncentrovávat matici

vzorku s nízkými koncentracemi analytu v modu zakoncentrování z velkého objemu vzorku s přepnutím polariry.

### **Optimalizace CZE analýzy s využitím tzv. „stacking“ techniky**

Cílem bylo nalézt vhodný tlak, dobu nástřiku a čas přepnutí polariry za účelem získat co nejvyšší hodnotu odezvy detektoru a tím zvýšit citlivost stanovení. Jedná se o optimalizaci dávkování objemu zředěného roztoku vzorku a „fokuzálního kroku“. Princip techniky je uveden v kap. 4.1., Obr. 3.

Jako modelová látka byla zvolena kyselina skořicová s nejkratším migračním časem. Pro zvýšení citlivosti metody byly optimalizovány doba a tlak nástřiku a doba pro změnu polariry (polariry switching). Čas přepnutí polariry je v okamžiku, kdy proud dosáhne cca 95 % původní hodnoty, která byla naměřena při separaci pomocí klasické CZE.

Běžný hydrodynamický nástřik u klasické CZE je obvykle 6 sec při tlaku 50 mBar. Pro zakoncentrovací techniku bylo nutno dávkování zvýšit. Software přístroje umožňoval délku nástřiku maximálně 99 sec., tato hodnota byla brána jako konstantní. Závislost změny plochy píků na hodnotě tlaku byla sledována v rozmezí 50-200 mBar.

Se zvyšujícím tlakem nástřiku se prodloužil čas přepnutí polariry. Při hodnotě 200 mBar byl průběh proudu nekonstantní, plocha píku nebyla odečtena. Nejlepší výsledky byly získány při aplikaci 100mBar což odpovídá objemu nástřiku zaujímajícího 70 % objemu kapiláry. K přepnutí polariry došlo v 1,8 minutě.

Kalibrační závislost byla získána proměřením pěti standardních roztoků každé stanovované kyseliny v koncentračním rozmezí 0,1-2,0  $\mu\text{g/ml}$  za použití optimalizované metody. Jako kvantitativní parametr byla zvolena plocha píků. Plocha píků byla vyhodnocena automaticky počítačovým programem. Pro každou koncentraci byly provedeny tři měření a pro výpočet hodnoty korelačních koeficientů pomocí lineární regrese byl použit aritmetický průměr. Hodnoty korelačních koeficientů (0,9982 – 0,9995) vykazují lineární závislost plochy píků na koncentraci ve zvoleném rozmezí.

Detekční limit byl určen analýzou látek příslušné koncentrace odpovídající poměru signálu k šumu s hodnotou 3. Nejnižší limit vykazuje kyselina skořicová, p-kumarová, ferulová,

gentisová a syringová (0,01 µg/ml). Vyšší detekční limit má kyselina kávová a vanilová (0,02 µg/ml), nejvyšší kyselina chlorogenová (0,025 µg/ml).

Dostupné práce používající pro konvenční CZE křemennou kapiláru uvádějí pro kyselinu p-kumarovou detekční limit 0,10 mg/ml [145]; 0,1 µg/ml (kapilára s průměrem 75µm I.D.) [146], ferulovou 0,16 mg/ml; 0,040 µg/ml, kávovou 0,13 mg/ml ; vanilovou 0,030 µg/ml a syringovou 0,2 mg/ml. Uvedené detekční limity jsou vyšší než limity zjištěné optimalizovanou metodou CZE s využitím stacking techniky. Vyšší citlivost má metoda i v porovnání s HPLC, kde dosažené detekční limity jsou rozmezí 0,029 - 0,416µg/ml [147].

Pro ověření opakovatelnosti ploch píků a migračních časů bylo provedeno šest měření pro danou koncentraci. Hodnoty směrodatných odchylek migračních časů nepřekročily 2 % zatímco směrodatné odchylky pro plochy píků dosahovaly hodnot nižších než 5 % s výjimkou kyseliny syringové ( $s_r = 5,69 \%$ ).

Porovnáním korigovaných ploch píků (plocha píků/migrační čas) jednotlivých kyselin u klasické CZE a CZE s využitím stacking techniky bylo docíleno v průměru 40-ti násobného zvýšení ploch píků. V pracích ostatních autorů je možno naleznout údaje až o 100- násobném zakoncentrování [148], většinou však literatura uvádí 40-75- násobné zvýšení citlivosti [147].

Podrobný popis a výsledky jsou uvedeny v příloze 11.7.

Zvalidovaná metoda byla aplikována na identifikaci a kvantifikaci výše uvedených fenolických kyselin v metabolickém extraktu vrbové nati. V extraktu byly prokázány kyseliny skořicová, chlorogenová, kávová a vanilová. Výsledky byly porovnány s publikovanou prací A. Hiermana a spol., kteří v extraktu z *Epilobium angustifolium* identifikovali kromě již uvedených látek také kyselinu ferulovou a gentisovou. Extrakty uvedených kyselin však byly získány mnohem náročnější procedurou. Kvantitativní srovnání chybí, jelikož se autoři věnovali pouze kvalitativní analýze [143].

Kvalitativní srovnání je možné s výsledky získanými na katedře analytické chemie, Farmaceutické fakulty v Hradci Králové, která se věnovala analýze vrbové natě pomocí on-line kombinaci ITP-CZE, jak je uvedeno v Tab. 3.



**Tab. 3: Porovnání výsledků získaných metodou stacking-CZE a ITP-CZE [149].**

Kyselina	Obsah (mg/g drogy)	
	CZE	ITP-CZE
Skořicová	0,13	0,06
Chlorogenová	0,34	NA
Kávová	0,27	0,65 (vyjádřeno jako kávová+gentisová)
Vanilová	0,29	NA
Kumarová		0,28
Ferulová		0,13

Závěrem lze konstatovat, že metoda CZE se zakoncentrováním s využitím přepnutí polarity je dostatečně citlivá a umožňuje analyzovat vybrané obsahové látky rostlinného materiálu bez předchozí izolace. Ve srovnání s metodou ITP-CZE ve dvoukolonovém uspořádání je opakovatelnost výsledků předložené CZE metody srovnatelná. Výhodou CZE metody je doba separace (do 20 min). Délka ITP-CZE analýzy ve dvoukolonovém uspořádání trvá z pochopitelných důvodů déle (cca 40min). Ve srovnání s mobilní fází HPLC nejsou součástí základního elektrolytu CZE organická rozpouštědla (methanol, acetonitril) [147, 150] čímž se metoda CZE stává ekonomicky a environmentálně přijatelnou.

**SEZNAM ORIGINÁLNÍCH PUBLIKACÍ**

Výsledky disertační práce byly publikovány v následujících 7 článcích (1-7) a presentovány formou 11 posterových sdělení a 1 ústního sdělení na vědeckých tuzemských i zahraničních konferencích (I-XII).

- 1) A. Kavalírová, M. Pospíšilová, R. Karlíček: Enantiomeric analysis of rivastigmine in pharmaceuticals by cyclodextrin-modified capillary zone electrophoresis. *Anal. Chim. Acta* 525 (2004) 43-51. Impact factor: 2,588.
- 2) A. Kavalírová, M. Pospíšilová, R. Karlíček: Enantiomeric purity determination of tamsulosin by capillary electrophoresis using cyclodextrin and a polyacrylamide-coated capillary. *IL Farmaco* 60 (2005) 834-839. Impact factor: 0,539.
- 3) A. Kavalírová, M. Pospíšilová, R. Karlíček: A validated chiral CZE method for the enantiomeric separation of Sibutramine, the anti-obesity agent. *J. Pharm. Biomed. Anal.* (Přijato k recenzi).
- 4) A. Kavalírová, M. Pospíšilová, R. Hamoudová: Stanovení pindololu v léčivých přípravcích metodou kapilární izotachoforézy. *Česká a Slov. Farm* 53 (2004) 328-331.
- 5) M. Pospíšilová, A. Kavalírová, M. Polášek: Assay of acebutolol in pharmaceuticals by analytical capillary isotachophoresis. *J. Chromatogr. A* 1081 (2005) 72-76. Impact factor: 3,359.
- 6) R. Hamoudová, M. Pospíšilová, A. Kavalírová, P. Solich, J. Šícha: Separation and determination of clotrimazole, methylparaben and propylparaben in pharmaceutical preparation by micellar electrokinetic chromatography. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 40 (2006) 215-219. Impact factor: 1,889.
- 7) J. Šafra, M. Pospíšilová, A. Kavalírová: Development of a stacking-CZE method for the analysis of phenolic acids. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 41 (2006) 1022-1024. Impact factor: 1,889.

**PŘÍSPĚVKY NA KONFERENCÍCH (přednáška a postery uvedené ve sbornících)**

- I. A. Kavalírová, M. Pospíšilová, J. Bureš: Separace a stanovení alkoholů ve vybraných extraktech a tinkturách pomocí kapilární zónové elektroforézy. Chiranal **2002**, Olomouc, ČR. (Poster, Sborník str. 67).
- II. A. Kavalírová, R. Karlíček, M. Pospíšilová: Chirální separace tamsulosinu metodou CZE. Odborná konference VÚFB Praha **2002**. (Sborník str. 35).
- III. A. Kavalírová, M. Pospíšilová, R. Hamoudová: Stanovení pindololu v léčivých přípravcích metodou kapilární izotachoforézy. 32. konference „Syntéza a analýza léčiv“ **2003**, Velké Karlovice, ČR. (Poster P21, Sborník str. 58).
- IV. A. Kavalírová, R. Karlíček, M. Pospíšilová: Chirální CZE analýza tamsulosinu s použitím sulfatovaného alfa CD. Studentská vědecká konference PGS FaF UK Hradec Králové **2003**. (Přednáška)
- V. A. Kavalírová, R. Karlíček, M.G. Schmid, M. Pospíšilová: Chiral separation of basic drugs by capillary electrophoresis with sulfated-cyclodextrins. 27<sup>th</sup> Symposium on High Performance Liquid Phase Separations and Related Techniques. 15-19 June **2003**, Nice-France. (Abstracts. Posters-Chiral separation 12, p. 89).
- VI. A. Kavalírová, M. Pospíšilová, P. Solich: Chirální separace pomocí kapilární zónové elektroforézy. IX. Sjezd České Farmaceutické Společnosti **2004**. Zlín, ČR. (Poster, Sborník str. 45)
- VII. A. Kavalírová, M. Pospíšilová, I. Prokelová, M. Polášek: CZE with indirect photometric detection for analysis of some polyols in infusion solutions. Jahrestagung - Joint Meeting, October 6-9, **2004**. Regensburg. (Program and Book of Abstracts. P C68, p. 113).
- VIII. A. Kavalírová, M. Pospíšilová, R. Karlíček: Use capillary zone electrophoresis for enantioseparation of drugs including chiral purity control of pharmaceutical preparations. 14<sup>th</sup> Internal Symposium on Capillary Electro-separation Techniques. Rome, September 12-15, **2004**. (Abstracts Book and Final Programme P 46).
- IX. M. Pospíšilová, M. Polášek, A. Kavalírová: Determination of cloroxine in pharmaceuticals by capillary zone electrophoresis. The 13th International Symposium on Capillary

- Electro separation Techniques ITP 2002, September 1-4, **2002** Helsinki, Finland. (Book of Abstracts p. 76).
- X. M. Pospíšilová, A. Kavalírová, M. Polášek: Assay of acebutolol in pharmaceuticals by analytical capillary isotachopheresis. 14<sup>th</sup> Internal Symposium on Capillary Electro separation Techniques. Rome, September 12-15, **2004**. (Abstracts Book and Final Programme p. 79).
- XI. R. Hamoudová, M. Pospíšilová, J. Bureš, A. Kavalírová: Stanovení diltiazemu v léčivých přípravcích pomocí kapilární elektroforézy. 32. konference „Syntéza a analýza léčiv“ **2003**, Velké Karlovice, ČR. (Poster B5, Sborník str. 32).
- XII. J. Šafra, M. Pospíšilová, J. Hašek, A. Kavalírová: Development of Stacking-CZE method for analysis of phenolic acids in Plant extracts of *Epilobium parviflorum*. 11th Meeting on Recent Development in Pharmaceutical Analysis, Rimini, Italy, September 25-28, **2005**. (Final Program & Abstrakt Book NP-P5, p. 187).

## 11. PŘÍLOHY

## 12. ZÁVĚR

Disertační práce představuje výsledky aplikací elektroforetických metod v analýze farmaceuticky významných látek syntetického původu, v matrici léčivého přípravku nebo rostlinného původu v methanolických extraktech z léčivých rostlin. Z elektromigračních metod byly v práci využity kapilární zónová elektroforéza, kapilární izotachoforéza a micelární elektrokinetická chromatografie.

V teoretické části je největší prostor věnován problematice chirálních separací v souladu s tím, že těžiště řešené problematiky disertační práce spočívalo v této oblasti. Zejména CZE realizována na vysoce sofistikované instrumentaci představuje hlavní alternativu k stávajícím HPLC metodám v oblasti separace chirálních léčiv, neboť možnost implementovat chirální selektor do pracovního elektrolytu umožňuje dynamičtěji a rychleji optimalizovat podmínky pro získání dostatečného rozlišení enantiomerů a výrazně snižuje cenu analýz.

Ve výsledkové části první tři experimentální práce (příloha 11.1.-11.3.) ukazují na možnost použití kapilární zónové elektroforézy ve farmaceutické analýze ke kontrole obsahu a enantiomerní čistoty léčivé látky. Úspěšné separace racemických směsí rivastigminu, tamsulosinu a sibutraminu, jejich stanovení v HVLP a kontrola čistoty ukazují, že vyvinuté, optimalizované a validované CZE metody poskytují přesné a správné výsledky. Relativně krátké časy analýz, použití vodných pufrů a komerčně dostupných chirálních selektorů, jednoduchá a rychlá příprava vzorků a nízká spotřeba jak vzorků tak pufrů představují hlavní přednosti CZE techniky jako alternativní metody pro oblast chirálních analýz k dominujícím HPLC technikám.

Simultánní stanovení léčivé látky klotrimazolu a konzervancí methylparabenu a propylparabenu v léčivém přípravku Clotrimazol HBF (příloha 11.6.) ukázalo možnost aplikace MEKC s aniontovým surfaktantem SDS pro separaci látek s vlastnostmi báze (klotrimazol) a slabé kyseliny (parabeny). Správnost získaných výsledků byla stejně jako u CZE metodik hodnocena zjištěním parametru výtěžnosti (recovery).

Další část práce představující dvě publikace (příloha 11. 4.-11.5.), které se zabývají vývojem a validací podmínek pro ITP hodnocení obsahu významných  $\beta$ -blokátorů se sympatomimetickou aktivitou. Stanovení pindololu v HVLP Apo-pindol a hodnocení acebutololu ve čtyřech farmaceutických přípravcích ukazují, že vyvinuté a optimalizované ITP elektrolytové systémy spolu s optimální procedurou přípravy vzorku k analýze poskytují přesné a správné

výsledky i v delším časovém horizontu. Relativně krátké časy analýz, použití vodných pufrů, jednoduchá a rychlá příprava vzorků, univerzální vodivostní detekce, levná a komerčně dostupná instrumentace kapilární izotachografie představují hlavní přednosti této separační techniky jako alternativní metody pro HPLC stanovení ve farmaceutické analýze.

Poslední část disertační práce byla zaměřena na vývoj a aplikaci CZE stacking metodiky pro separaci a hodnocení fenolických kyselin v modelové směsi a v extraktu z rostlinné drogy *Epilobium parviflorum*. Vzorky byly dávkovány přímo do separačního systému bez jakékoli předchozí úpravy. Jako první bylo nutné nalézt vhodný elektrolytový systém pro separaci modelové směsi kyseliny skořicové, kumarové, ferulové, syringové, kávové, gentisové, vanilové a chlorogenové a poté optimalizovat proces zakoncentrování analytů do úzké zóny s dávkováním velkého objemu zředěného roztoku vzorků a s přepnutím polarity. Tato modifikovaná CZE metoda umožnila selektivní separaci analytů od balastních komponent matrice a zvýšení citlivosti CZE metody. Zvláštní pozornost byla věnována volbě tlaku, době nástřiku a času přepnutí polarity. Výsledkem bylo nalezení elektrolytového systému na základě borátového pufru s výrazným potenciálem pro selektivní a efektivní separaci rostlinných fenolických kyselin na základě ionizace kyselých funkčních skupin separovaných kyselin a tvorbou borátových komplexů u o-dihydroxyderivátů kyselin. Uvedená zakoncentrovávací CZE technika umožňuje analyzovat vybrané obsahové látky rostlinného materiálu bez předchozí izolace, s dostatečnou citlivostí v porovnání s HPLC a kratší dobou analýzy ve srovnání s ITP-CZE, provedenou v konfiguraci dvou kapilár.

### 13. SUMMARY

This thesis deals with the results of applications of electrophoretic methods in the separation and determination of pharmaceutical important compounds of synthetic or herbal origin. In the theoretic part, the classification of the capillary electrophoretic methods is presented. Capillary zone electrophoresis, capillary isotachopheresis and micellar elektrokinetic chromatography were used in this work. These electro-migration methods represent extremely potent separation techniques.

The most of the theoretic part is devoted to the popular topic of chiral separations. Especially CZE presents a competition to the HPLC methods in the area of chiral separations.

Implementation of a chiral selector into a background electrolyte enables more dynamic and faster optimizing conditions used for chiral separation. That means better discrimination and lower price of analysis.

In the result section the first three experimental works describe the application of CZE in pharmaceutical analysis to control the content and optical purity of pharmaceutical active compounds. Successful discriminations of racemic mixture of rivastigmine, tamsulosine and sibutramine, their determination in HVLP and optical purity control, show that the developed, optimized and validated CZE methods offer accurate and correct results. The main benefits of CZE methods are high separation efficiency, short time of analysis, use of the aqueous buffers and commercial available chiral selectors, easy and fast sample preparation and low consumption of buffers and samples. According to the mentioned advantages, the CZE methods are good alternative to the dominative HPLC techniques in the area of chiral separations.

MEKC allows separation of neutral, hydrophobic or water insoluble analytes. The technique was used for the simultaneous determination of clotrimazol, methylparabene and propylparabene in preparation Clotrimazol HBF with respect to the acid base properties of analytes.

Another part of this dissertation presents two issues dealing with the development of ITP techniques as control-analytical methods for the selective determination of pharmaceutically important compounds of chemical origin suitable for the quality control of bulk substances as well as mass-produced dosage form. The determination of  $\beta$ -blockers pindolol and acebutolol in



pharmaceuticals by ITP provided reliable results. The main advantages of ITP technique are relatively short time of analysis, the use of aqueous buffers and low running costs.

The last part of this work was focused on the application of a stacking-CZE method used for the separation and determination of phenolic acids in extract of *Epilobium parviflorum*. The samples were injected directly into the separation system without any pre-treatment. The model mixture contained cinnamic, gentisic, coumaric, ferulic, vanillic, syringic and caffeic acids. The electrophoretic separation was optimized by large volume sample stacking with polarity switching mode. This modified CZE method proved to be a powerful tool for sensitivity enhancement in CZE analysis of selected aromatic acids. A 40-fold sensitivity enhancement has attained for the quantitative analysis of extremely diluted analytes in low conductivity matrices. The proposed method is intended for the identification and assay of the selected phenolic acids in the methanolic extract of *Herba epilobi*.

**14. LITERATURA**

- [1] Vesterberg,O.: J. Chromatogr. A 480 (1989) 3-19.
- [2] Jorgenson,J.W., Lukas,K.D.: Clin. Chem. 27 (1981) 1551-1559.
- [3] Kralova,B., Rauch,P.: Bioanalytické metody, Skriptum VŠCHT, Karolinum Praha 1995.
- [4] Altria,K.D.: Capillary Electrophoresis Guidebook, Humana Press, Totowa (NJ) 1996.
- [5] Deyl,Z., Uhrova,M.: Chromatografické a elektromigrační metody pro analýzu biologických vzorků, Skriptum Univerzita Pardubice 1996.
- [6] Marina,M.L., Torre,M.: Talanta 41 (1994) 1411-1433.
- [7] Heger,N., Herold,M., Grimm,R.: Application of the HP Capillary Electrophoresis system, Hewlett Packard GmbH, Waldbronn, Germany 1994.
- [8] Foret,F., Szko,E., Karger,B.L.: J. Chromatogr. A 608 (1992) 3-12.
- [9] Foret,F., Křivánková,L., Boček,P.: Capillary Zone Electrophoresis, VCH, Weinheim, 1993.
- [10] Dolník,V.: Úvod do kapilární elektroforézy, Ústav analytické chemie ČSAV, Brno, 1994.
- [11] Khaledi,M.G.: High Performance Capillary Electrophoresis, J. Wiley & Sons, New York, 1998.
- [12] Terabe,S., Otsuka,K., Ichikawa,K., Tsuchiya,A., Ando,T.: Anal. Chem. 56 (1984) 111-117.
- [13] Terabe,S., Otsuka,K., Ando,T.: Anal. Chem. 57 (1985) 834-839.

- [14] Terabe,S., Matsubara,N., Ishihama,Y., Okada,Y.: J. Chromatogr. A 608 (1992) 23-29.
- [15] Zhang,Y., Zhang,R., Hjertén,S.: Electrophoresis 16 (1995) 1519-1525.
- [16] Terabe,S., Ozaki,H., Otsuka,K., Ando.T.: J. Chromatogr. A 332 (1985) 211-217.
- [17] Lunte,S.M., Radzik,D.M.: Pharmaceutical and Biomedical Application of Capillary Electrophoresis, Pergamon, Oxford, 1996.
- [18] Weinberger,R.: Practical Capillary Electrophoresis, Academic Press, New York, 2000.
- [19] Prosby,D., El Rassi,Z.: J. Liq. Chromatogr. 16 (1993) 2161- 2168.
- [20] Sciacchitano,C.J., Mopper,B., Specchio,J.J.: J. Chromatogr. B 657 (1994) 395-404.
- [21] Buton,D.E., Sepaniak,M.J., Maskarinec,M.P.: J. Chromatogr. Sci. 25 (1987) 514-519.
- [22] Gozel,P., Gassman,E., Michelsen,H., Zare,R.N.: Anal. Chem. 59 (1987) 44-51.
- [23] Matsubara,N., Koezuka,K., Terabe,S.: Electrophoresis 16 (1995) 580-589.
- [24] Quirino,J.P., Terabe,S.: J. Chromatogr. A 850 (1999) 339 – 344.
- [25] Reinhoud,N.J., Tjaden,U.,R., van der Greef,J.: J. Chromatogr.A 653 (1993) 303 – 312.
- [26] Berzas Nevado,J.J., Rodríguez Flores,J., Castañeda Peñalvo,G., Fariñas,G.: J. Chromatogr. A 953 (2002) 279-286.
- [27] Deng,Y., Fan,X., Delgado,A., Nolan,Ch., Furton,K., Zuo,Y., Jones,R.,D.: J.

- Chromatogr. A 817 (1998) 145 – 152.
- [28] Wang-Hsien,D., Chi-Hung,L.: J. Chromatogr. A 929 (2001) 143-150.
- [29] Albert,M., Debusschere,L., Demesmay,C., Rocca,J.,L.: J. Chromatogr. A 757 (1997) 281 – 289.
- [30] Toussaint,B., Hubert,Ph., Tjaden,R., Crommen,J.: J. Chromatogr. A 871 (2000) 173 – 180.
- [31] Reinhoud,N.J., Tjaden,R., van der Greef,J.: J. Chromatogr. A 641 (1993) 155-162.
- [32] Hernández,M., Aguilar,C., Borrull,F., Calull,M.: J. Chromatogr. B 772 (2002) 163-172.
- [33] Urbánek,M., Pospíšilová,M., Poláček,M.: Electrophoresis 23 (2002) 1045-1052.
- [34] Urbánek,M., Křivánková,L., Boček,P.: Electrophoresis 24 (2003) 466-485.
- [35] Wren,S.: Chromatographia 54 (2001) S7-S91.
- [36] Chankvetadze,B., Fanali,S.: Electrophoresis 15 (2003) 2409-2703.
- [37] Slováková,A., Hutt,A.J.: Česká a Slov. Farm. 3 (1999) 107-112.
- [38] Lehman,P.A.F.: Trends Pharmacol.Sci 3 (1982) 103-108.
- [39] Hartl,J., Palát,K.: Farmaceutická chemie I, Karolinum, 1999.
- [40] Levy,R.H., Boddy,A.V.: Pharmaceut.Res. 8 (1991) 551.
- [41] Powell,J.R., Ambre,J.J., Ruo,T.I.: Drug Stereochemistry. Analytical Methods and Pharmacology, Wagner, New York 1988.
- [42] Eichelbaum,M., Gross,A.S.: Adv. Drug Res. 28 (1996) 1-64.

- [43] Gübitz,G., Schmidt,M.G.: *Biopharm. Drug Dispo.* 22 (2001) 291-336.
- [44] Vespalec,R., Boček,P.: *Electrophoresis* 20 (1999) 2579-2591.
- [45] Vespalec,R., Boček,P.: *Electrophoresis* 15 (1994) 755-762.
- [46] Vespalec,R., Boček,P.: *Electrophoresis* 18 (1997) 843-852.
- [47] Fanali,S.: *Capillary Electrophoresis Technology*, Marcel Dekker, New York, 1993.
- [48] Tanaka,Y., Terabe,S.: *J. Chromatogr. A* 781 (1997) 151-160.
- [49] Okafo,N., Camilleri,P.: *J. Microcolumn Sep.* 5 (1993) 149-154.
- [50] Dobashi,A., Ono,T., Hara,S., Yamaguchi,J.: *Anal. Chem.* 61 (1989) 1984-1992.
- [51] Walbroehl,Y., Wagner,J.: *J. Chromatogr. A* 680 (1994) 253-257.
- [52] Mandrioli,R., Musenga,A., Lasaponara,S.S., Sarcino,M.A., Fanali,S., Maggi,M.A.: *Anal. Chim. Acta* 560 (2006) 57-63.
- [53] Wei,S., Song,G., Lin,J.M.: *J. Chromatogr. A* 1098 (2005) 166-171.
- [54] Vincent,J., Vigh,G.: *J. Chromatogr. A* 817 (1998) 105-112.
- [55] D'Hulst,A., Verbeke,N.: *J. Chromatogr.* 608 (1992) 275-281.
- [56] Nishi,H., Fukuyama,T., Matsuo,M., Terabe,S.: *J. Microcolumn Sep.* 1 (1989) 234-238.
- [57] Furuta,R., Doi,T.: *J. Chromatogr. A* 676 (1994) 431-435.
- [58] Peterson,T.E., Trowbridge,D.: *J. Chromatogr. A* 603 (1992) 298-301.
- [59] Fanali,S., Flieger,M., Steinerova,N., Nardi,A.: *Electrophoresis* 13 (1992) 39-

- 45.
- [60] Desiderio,C., Polcaro,C.M., Fanali,S.: J. Chromatogr. A 781 (1997) 503-509.
- [61] Valko,I.E., Billiet,H.A.H., Frank,J., Luyben,K.C.A.: Chromatographia 38 (1994) 730-735.
- [62] Kun,R., Riester,D., Fleckenstein,B., Wiesmuller,K.H.: J. Chromatogr. A 716 (1995) 371-378.
- [63] Fillet,M., Bechet,I., Chlap,P., Hubert,P., Crommen,J.: J. Chromatogr. A 717 (1995) 203- 209.
- [64] Bjornsdottir,I., Hansan,S.H., Terabe,S.: J. Chromatogr. A 745 (1996) 37-45.
- [65] Nouadje,G., Nertz.M., Courderc,F.: J. Chromatogr. A 716 (1995) 331-339.
- [66] Dethy,J.M., De Broux,S., Lesne,M., Longstreth,J., Gilbert,P.: J. Chromatogr. B 654 (1994) 121-129.
- [67] Gareil,P., Gramond,J.P., Buton,F.: J. Chromatogr. A 615 (1993) 317-324.
- [68] Snopek,J.; Jelinek,I.; Smolkova-Keulemansova: J. Chromatogr. 438 (1988) 211-218.
- [69] Guttman,A., Paulus,A., Cohen,A., Grinberg,N., Karger,B.: J. Chromatogr. A 448 (1988) 41-53.
- [70] Fanali,S.: J. Chromatogr. A 474 (1989) 441-446.
- [71] Terabe,S., Ozaki,H., Otsuka,K., Ando,T.: J. Chromatogr. A 332 (1985) 211-217.
- [72] Hanessian,S., Benalil,A., Laferriere,C.: J. Org. Chem. 60 (1995) 4785-4797.
- [73] Brown,S.E., Coates,J.H., Easton,C.J., Lincoln,S.F., May,B.L., Stile,M.A.,

- Whalland,C.B., Williams,M.L.: J. Chem. Soc. Commun. 47 (1994).
- [74] Parmeter,S.M., Allen,E.E., Hull,G.A.: US Pat., 3 453 257; Chem. Abstr. 71 (1969) 9182.
- [75] Croft,A.P., Bartsch,R.A.: Tetrahedron 39 (1983) 1417-1474.
- [76] Chankvetadze,B., Endresz,G., Blaschke,G., Juza,M., Jakubetz,H., Schuring,V.: Carbohydr. Res. 287 (1996) 139-155.
- [77] Chankvetadze,B., Schulte,G., Blaschke,G.: J. Chromatogr. A 732 (1996) 183-187.
- [78] Schmitt,T., Engelhardt,H.: Chromatographia 37 (1993) 475-489.
- [79] Koppenhoefer,B., Zhu,X., Jakob,A., Wuerthner,S., Lin,B.: J. Chromatogr. A 875 (2000) 135-161.
- [80] Fanali,S.: J. Chromatogr. A 875 (2000) 89-122.
- [81] Verleysen,K., Sandra,P.: Electrophoresis 19 (1998) 2798-2833.
- [82] O'Keefe,F., Shamsi,S., Darcy,R., Schwinte,P.: Warner IM.: Anal. Chem. 69 (1997) 4773-4782.
- [83] Tanaka,Y., Terabe,S.: J. Chromatogr. A 781 (1997) 151-160.
- [84] Chankvetadze,B., Schulte,G., Blaschke,G.: J. Chromatogr. A 732 (1996) 183-187.
- [85] Terabe,S.: Trends Anal. Chem. 8 (1989) 129-133.
- [86] Terabe,S., Otsuka,H., Ando,T.: J. Chromatogr. 332 (1985) 211-217.
- [87] Fanali,S., Kamera,E.: Chromatographia 43 (1996) 247-253.
- [88] Pedersen,C.: J. Am. Chem. Soc. 89 (1967) 2495-2496.

- [89] Stover,F.: J. Chromatogr. 298 (1984) 203-210.
- [90] Fanali,S., Cristalli,M., Vespalec,R., Bocek,P.: Adv. Electrophor. 7 (1994) 1-88.
- [91] Castelnovo,P., Albanesi,C.: J. Chromatogr. A 715 (1995) 143-149.
- [92] Walbroehl, Y., Wagner,J.: J. Chromatogr. A 685 (1995) 321-329.
- [93] Sutton,R.M.C., Sutton,K.L., Stalcup,A.M.: Electrophoresis 18 (1997) 2297-2304.
- [94] Chankvetadze,B., Saito,M., Yashima,E., Okamoto,Y.: Chirality 10 (1998) 134-139.
- [95] Kano,K., Minami,K., Horiguchi,K., Ishimura,T., Kodera,M.: J. Chromatogr. A 694 (1995) 307-313.
- [96] Sutton,R.M., Sutton,K.L., Stalcup,A.M., Electrophoresis 18 (1997) 2297-2304.
- [97] D'Hulst,A., Verbeke,N.: J. Chromatogr. A 608 (1992) 275-287.
- [98] Soini,H., Stefansson,M., Riekkola,M.J., Novotny,M.V.: Anal. Chem. 66 (1994) 3477-3484.
- [99] Nishi,H.: J. Chromatogr. A 792 (1997) 327-347.
- [100] Stalcup,A.M., Agyei,N.M.: Anal. Chem. 66 (1994) 3054-3059.
- [101] Nishi,H., Nakamura,K., Nakai,H., Sato,T.: Chromatographia 43 (1996) 426-430.
- [102] Nishi,H., Nakanuta,K., Nakai,H., Stao,T.: Chromatographia 43 (1996) 426-430.
- [103] Vespalec,R., Sustacek,V., Bocek,P.: J. Chromatogr. A 638 (1993) 255-261.



- [104] Simek,Z., Vespalec,R.: J. Chromatogr. A 629 (1993) 153-160.
- [105] Lloyd,D.K., Aubry,A.F., De Lorenzi,E.: J. Chromatogr. A 792 (1997) 349-369.
- [106] Lloyd,D.K., Ahmed,A., Pastore,F.: Electrophoresis 18 (1997) 958-964.
- [107] Ward,TJ.: LC GC Sep. Sci. 14 (1996) 886-894.
- [108] Armstrong, D.W., Rundlett,K.L., Reid,G.L.: Anal. Chem. 66 (1994) 1690-1695.
- [109] Ward,J.D., Dann,C., Blaylock,A.: J. Chromatogr. A 715 (1995) 337-344.
- [110] Armstrong,D.W., Nair,U.B.: Electrophoresis 18 (1997) 2331-2342.
- [111] Armstrong,D.W., Rundlett,K.L., Chen,J.R.: Chirality 6 (1994) 496-509.
- [112] Armstrong,D., Gasper,M.P., Tudlety,K.L.: J. Chromatogr. A 689 (1995) 285-304.
- [113] Rudlett,K.L., Gasper,M.P., Zhou,E.Y.: Chirality 8 (1996) 88-107.
- [114] Gasper,M.P., Berthold,A., Nair,U.B., Armstrong,D.W.: Anal. Chem. 68 (1996) 2501-2514.
- [115] Armstrong,D.W., Nair,U.B.: Electrophoresis 18 (1997) 2331-2342.
- [116] Armstong,D.W., Rundlett,K.L.: J. Liq. Chromatogr. 18 (1995) 3659-3674.
- [117] Rudlett,K.L., Armstrong,D.W.: Anal. Chem. 67 (1995) 2088-2095.
- [118] Terabe,S., Miyashita,Y., Shibata,O.: J. Chromatogr. A 516 (1990) 23-31.
- [119] Terabe,S., Chen,N., Otsuka,K.: Adv. Electrophor. 7 (1994) 87-153.
- [120] Terabe,S., Shibata,M., Miyashita,Y.: J. Chromatogr. 480 (1989) 403-411.

- [121] Nishi,H., Fukuyama,T., Matsuo,M., Terabe,S.: J. Microcol. Sep. 1 (1989) 234-241.
- [122] Nishi,H., Fukuyama,T., Matsuo,M., Terabe,S.: Anal. Chim. Acta 236 (1990) 281-286.
- [123] Amini,A., Ingegerd,I., Pettersson,C., Westerlund,D.: J. Chromatogr. A 737 (1996) 301-313.
- [124] Cole,R.O., Sepaniak,M.J., Hinze,W.L.: J. High. Res. Chromatogr. 13 (1990) 579-582.
- [125] Okafo,G.N., Rana,K.K., Camillieri,P.: Chromatographia 39 (1994) 627-630.
- [126] Aumantel,A., Wells,R.: J. Chromatogr. A 688 (1994) 329-337.
- [127] Wan,H., Engstrom,A., Blomberg,L.G.: J. Chromatogr. A 731 (1996) 283-292.
- [128] Pedersen,C.: J. Am. Chem. Soc. 89 (1967) 2495-2496.
- [129] Colon,L.A., Reynolds,K.J., Alice-Molnado,R., Fermier,A.M.: Electrophoresis 18 (1997) 2162-2174.
- [130] Euerby,M.R., Johnson,C.M.,Bartle,K.D.: LC-GC Int. 11 (1998) 39-44.
- [131] Kaniansky,D., Simunicova,E., Ferancova,A.: Electrophoresis 20 (1990) 2786-2793.
- [132] Dankova,M., Kaniansky,D., Fanali,S.: J. Chromatogr. A 838 (1999) 31-43.
- [133] Fanali,S.: J. Chromatogr. A 792 (1997) 227-267.
- [134] Gübitz,G., Schmidt,M.G.: J. Chromatogr. A 792 (1997) 179-225.
- [135] Takahashi,K.: Chem.Rev. (Washington D.C.) 98 (1998) 2013-2017.

- [136] Uekama,K., Hieayama,F., Tetsumi,I.: Chem.Rev. (Washington D.C.) 98 (1998) 2045-2049.
- [137] Krýsl,S.; Smolková,E.: Chem. Listy 79 (1985) 919-925.
- [138] Harata,K.: Chem.Rev. (Washington D.C.) 98 (1998) 1803-1807.
- [139] Schneider,H., Hacket,F., Rudiger,V., Ikeda,H.: Chem.Rev. (Washington D.C.) 98 (1998) 1755-1759.
- [140] Mikuš,P.; Kaniansky,D.; Šebesta,R.; Sališová,M.: Enantiomer 4 (1999) 279-285.
- [141] Samuraj,M., Kitagawa,M., Hoshi,H., Inoue,Y.: Chem Lett. (1988) 895-901.
- [142] Namor,A.F., Traboulssi,R., Lewis,D.F.: J. Am. Chem. Soc. 112 (1990) 8442-8448.
- [143] Hiermann,A., Radl,B.: J. Chromatogr.A, 803 (1998) 311 – 314.
- [144] Mikro-verze AISLP – ČR 2007.1 pro MS Windows
- [145] Vlček,J., Klejdus,B., Kubáň,V.: Chem. Listy 96 (2002) 39-44.
- [146] Jen-Fon,J., Yean-Hwa,H., Maw-Rong,L.: J. Chromatogr. A 734 (1996) 375 – 380.
- [147] Zhorka,G., Gowniak,K.: J. Pharm Biomed. Anal. 26 (2001) 79-87.
- [148] Wang-Hsien,D., Chi-Hung,L.: J. Chromatogr. A\_929 (2001) 143-150.
- [149] Šafra J., Pospíšilová M., Spilková J.: Chromatographia 64 (2006) 37-43.
- [150] Simonovska,B., Vovka,I., Andrenka,S., Valentová,K., Ulrichová,J.: J.Chromatogr. A, 1016 (2003) 89-98.

