

Univerzita Karlova v Praze
Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

DISERTAČNÍ PRÁCE

**Zirkoniové a chirální stacionární fáze
ve farmaceutické analýze**

Vědní obor: Kontrola chemických léčiv

Školitel:

Doc.RNDr. Jaroslav Sochor, CSc.

Hradec Králové 2001-2006

Mgr. Radim Kučera

Na tomto místě bych rád poděkoval všem, kteří přispěli ke vzniku mé disertační práce:

Doc.RNDr. Jaroslavu Sochorovi, CSc., mému školiteli, za jeho odborné vedení, cenné rady, připomínky, podporu a věnovaný čas,

Doc.RNDr. Jiřímu Klimešovi, CSc. za jeho vstřícný přístup, všestrannou podporu a konzultace během celého postgraduálního studia,

ing. Jiřímu Dohnalovi, CSc. ze společnosti Zentiva, a.s., za příležitost absolvovat několik krátkodobých stáží a seznámení s provozem ve farmaceutické společnosti,

PD Dr. rer. nat. Thomasi Jirovi z Institut für Pharmazie der Ernst-Moritz-Arndt-Universität in Greifswald (SRN) za vřelé přijetí, přátelský přístup a odborné vedení během studijního pobytu v jeho pracovní skupině,

spoluautorům za jejich podíl na konečné podobě publikovaných prací,

RNDr. Veronice Opletalové, Ph.D. za pomoc při úpravě anglických textů,

všem pracovníkům z Katedry farmaceutické chemie a kontroly léčiv za vytvoření příjemného pracovního prostředí,

své rodině a přátelům za podporu během celého postgraduálního studia,

a na závěr své přítelkyni Martě za bezbřehou trpělivost a pochopení.

OBSAH

Seznam zkratek	7
1 Úvod	9
2 Cíl práce	13
3 Teoretická část	17
3.1 Vysokoučinná kapalinová chromatografie - HPLC	19
3.1.1 Využití HPLC ve farmaceutické praxi	19
3.1.2 Stručný přehled současné HPLC instrumentace	20
3.2 Chromatografické kolony v HPLC	26
3.2.1 Stacionární fáze na bázi silikagelu	27
3.2.1.1 Nevýhody silikagelu	29
3.2.1.2 Typy silikagelů	31
3.2.1.3 Příprava RP fází	32
3.2.1.4 Endkapování a elektrostatické stínění	34
3.2.1.5 Stabilita silikagelových stacionárních fází a možnosti jejího zvýšení	35
3.2.2 Kolony s porézní polymerní náplní	38
3.2.3 Monolitické stacionární fáze	39
3.2.4 Nederivatizovaný grafitizovaný uhlík	39
3.2.5 Stacionární fáze na bázi jiných oxidů než SiO ₂	39
3.2.5.1 Stacionární fáze na bázi Al ₂ O ₃	40
3.2.5.2 Stacionární fáze na bázi TiO ₂	40
3.2.5.3 Stacionární fáze na bázi ZrO ₂	41
3.3 ZrO ₂ – perspektivní alternativa silikagelu	42
3.3.1 Přehled mechanismů uplatňujících se při retenci analytu	43
3.3.1.1 Iontová výměna	43
3.3.1.2 Výměna ligand	44
3.3.2 Přehled modifikací ZrO ₂ pro separační účely	49
3.3.2.1 Dynamická modifikace	50
3.3.2.2 Modifikace kovalentní vazbou	50
3.3.2.3 Stacionární fáze modifikované polymerem	51
3.3.3 Separace za zvýšené teploty	58
3.3.4 Chirální stacionární fáze na bázi ZrO ₂	60
3.3.4.1 Zirkoniová CSP na bázi tris(3,5-dimethylfenyl)karbamátu celulosy	60
3.3.4.2 Zirkoniová CSP na bázi BSA a karboxymethyl-β-cyklodextrinu	61
3.3.4.3 Komerčně dostupné CSP na bázi ZrO ₂	61
3.4 Chirální stacionární fáze v HPLC	63
3.4.1 Proteinové CSP	66
3.4.2 Polysacharidové CSP	71
3.4.3 Donor-akceptorové (Pirklovy) CSP	75
3.4.4 Cyklodextriny	77
3.4.5 Makrocyclická antibiotika jako CSP	80

3.4.6	Ostatní typy CSP	83
3.4.7	Techniky pro preparativní účely	84
3.4.8	Současné trendy v oblasti chirálních separací.....	85
4	Přehled publikovaných prací.....	87
4.1	Práce publikované ve vědeckých časopisech.....	89
4.2	Komentář a diskuse k publikovaným pracím.....	116
4.3	Práce publikované formou posteru na konferencích a formou abstraktů v odborných časopisech	127
5	Souhrn	129
6	Summary	135
7	Použitá literatura	141

Seznam zkratk

ACN	acetonitril
AGP	kyselý α_1 -glykoprotein
ATB	antibiotikum
AVI	avidin
B	benfluron
Bopa	2-(4-isobutyrylphenyl)propionová kyselina
Bppa	2-(4- <i>n</i> -butylphenyl)propionová kyselina
BSA	bovinní sérový albumin
CBH	celobiohydrolasa
CD	cirkulární dichroismus
CE	kapilární elektroforéza
CSP	chirální stacionární fáze
CyD	cyklodextrin(y)
C-ZrO ₂	zirkoniová stacionární fáze modifikovaná uhlíkem
D	dimefluron
DNBPG	3,5-dinitrobenzoylphenylglycin
EDTA	<i>N,N</i> -ethylendiamintetraoctová kyselina
EDTPA	<i>N,N</i> -ethylendiamintetramethylfosfonová kyselina
ELSD	evaporative light scattering detector
EtOH	ethanol
HETP	výškový ekvivalent teoretického patra
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
HSA	lidský sérový albumin
Ibap	4-isobutylacetofenon
Ibu	ibuprofen
ICH	International Conference on Harmonisation
ICR	iontová cyklotronová rezonance
IPA	propan-2-ol
IT	iontová past
LC	kapalinová chromatografie
LC-MS	kapalinová chromatografie s hmotnostní detekcí
LLSD	liquid light scattering detector
LSER	linear solvation energy relationship
M	mol
MALDI	ionizace laserem za účasti matrice
MCT	mikrokrytalický triacetát celulosy
MeOH	methanol
MeP	methylparaben
μ -TAS	micro total analysis systems
MTPA-Cl	α -methoxy- α -(trifluormethyl)fenylacetylchlorid
NMR	nukleární magnetická rezonance

NPLC	kapalinová chromatografie v klasickém uspořádání
ODS	silikagelová C18 stacionární fáze
OVI	ovomukoid
PBD	polybutadien
PBD-ZrO ₂	zirkoniová stacionární fáze modifikovaná polybutadienem
PhBa	4-hydroxybenzoová kyselina
pH _{pzc}	pH, při kterém má látka celkový nulový náboj
pI	isoelektrický bod
PrP	propylparaben
PS	polystyren
PS-ZrO ₂	zirkoniová stacionární fáze modifikovaná polystyrenem
Q	kvadrupolový analyzátor
QqQ	trojitý kvadrupol
red-B	redukovaný benfluron
red-D	redukovaný dimefluron
RP	reverzní fáze
RPLC	kapalinová chromatografie v reverzním uspořádání
SAX	silný anex
SLP	správná laboratorní praxe
SVP	správná výrobní praxe
T ³ C	termaly tuned tandem column concept
TES	triethoxysilan
THF	tetrahydrofuran
TOF	analyzátor doby letu
VCD	cirkulární dichroismus přechodně vibračních stavů molekuly
WAX	slabý anex
ZrCarbonC18	zirkoniová stacionární fáze s navázaným C18 řetězcem
⇒	z toho plyne, z toho vyplývá

1 ÚVOD

Chromatografické metody jsou vysokoúčinné separační metody sloužící k vzájemnému oddělení analyzovaných složek ve směsi a zároveň k jejich kvalitativní i kvantitativní analýze. S využitím chromatografie se můžeme setkat již ve starověku, kdy nacházíme zmínky o čištění mořské vody překapáním přes určité jílovité horniny. Za základ moderních chromatografických metod je považována práce ruského botanika M. S. Cvěta, kterou přednesl 21.3.1903 na zasedání biologické sekce varšavské přírodovědecké společnosti. Ve své práci popsal výsledky experimentů při separaci listových barviv pomocí sloupcové adsorpční chromatografie na stovce různých sorbentů. Mimořádný význam tohoto objevu byl ale doceněn až s odstupem doby. Mohutný rozvoj chromatografie se datuje až od roku 1931, kdy Kuhn se svými spolupracovníky aplikoval Cvětovu metodu na separaci polyenových barviv.

Chromatografie zásadním způsobem přispěla k rozvoji chemických disciplín (obzvláště analytické chemie a biochemie), ale stala se také nepostradatelnou metodou v biologických a lékařských vědách, při kontrole životního prostředí, průmyslových procesů a výrobků. Nelze si bez ní představit moderní analytickou, klinickou či toxikologickou laboratoř. Z hlediska vývoje se dostáváme od adsorpční sloupcové chromatografie, vyvinuté Cvětem, přes chromatografii rozdělovací (Martin a Synge Nobelova cena 1952), papírovou, tenkovrstvou, plynovou či vysokoúčinnou kapalinovou až k moderním kapilárním a elektrochromatografickým technikám. Nesmírný rozmach různých detekčních principů dnes umožňuje analyzovat femto- až attomolové koncentrace látek. V současné době patří chromatografické techniky bezesporu k nejúčinnějším a nejcitlivějším analytickým metodám. Výroba chromatografické instrumentace představuje rozsáhlé a výnosné průmyslové odvětví a totéž platí o výrobě chromatografických kolon. Moderní, počítačem řízená a uživatelsky přívětivá chromatografická instrumentace umožňuje provádět denně desítky analýz na jednom přístroji a můžeme bez nadsázky říci, že další rozvoj lidského vědění je bez moderních chromatografických metod nemyslitelný.

2 CÍL PRÁCE

Z chromatografických metod má HPLC ve farmaceutické analýze dominantní postavení. Tato disertační práce se z obsáhlé problematiky HPLC soustředí na dvě významná témata, která jsou náplní experimentální práce.

- 1) problematika týkající se stacionárních fází v HPLC
- 2) problematika enantiomerních separací se zaměřením na nejčastěji používané chirální stacionární fáze pro HPLC

ad 1) Většina separací je dnes realizována na reverzních silikagelových stacionárních fázích. Chemické procesy uplatňující se při chromatografii na silikagelových stacionárních fázích a při modifikaci jeho povrchu, jsou dnes již velmi dobře prostudovány. Stejně tak jsou známy i nevýhody tohoto materiálu. Za hlavní nevýhodou vázaných silikagelových stacionárních fází je možno považovat jejich nedostatečnou chemickou a tepelnou stabilitu. Ačkoliv zavedením nových výrobních postupů je dnes možné získat chemicky i tepelně odolnější silikagelové sorbenty než dříve, stále jsou vyvíjeny nové typy HPLC stacionárních fází. Výzkum mapující možnosti uplatnění jiných než silikagelových stacionárních fází probíhá již řadu let. Pozornost je věnována mimo jiné i kolonám na bázi oxidu zirkoničitého, který se zdá být vhodnou alternativou silikagelu. Sorbenty na bázi ZrO_2 mají výbornou chemickou a tepelnou stabilitu a liší se od silikagelových v retenci i selektivitě. Tyto rozdíly, vyplývající z odlišných chemických vlastností obou materiálů, se mohou výrazně uplatnit při separačním procesu.

ad 2) Chiralita živých organismů se zásadně podepisuje na interakcích s biologicky aktivními látkami. V důsledku toho mohou být pro jednotlivé enantiomery rozdíly v biologické dostupnosti, distribuci, působení na receptory, metabolismu a eliminaci. Během posledních deseti let se zvýšila důležitost chiralitě z důvodů vědeckých i ekonomických. Mezi oblasti, kde se chiralitě věnuje zvýšená pozornost, patří především sledování enantioselektivního účinku léčiv a také studium odlišného působení enantiomerů pesticidů a složek potravin. Optické izomery lze oddělit libovolnou technikou pokud se vytvoří stereoselektivní prostředí. Separace enantiomerů na chirálních stacionárních fázích pomocí kapalinové chromatografie se staly nezbytným nástrojem v mnoha oblastech moderního výzkumu.

Cílem disertační práce bylo:

ad 1) vyzkoušet na konkrétním příkladu možnosti využití odlišných vlastností zirkoniových stacionárních fází v kontrole léčiv.

ad 2) vypracovat vhodnou chirální HPLC metodu pro srovnání redukčního metabolismu karbonylové skupiny u potenciálního antineoplastika dimefluronu a jeho strukturního předchůdce benfluronu a doplnit již dříve získané poznatky o metabolismu těchto látek.

Výsledky experimentální práce jsou shrnuty ve třech pracích publikovaných v zahraničních impaktovaných časopisech.

3 TEORETICKÁ ČÁST

3.1 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie - HPLC

Při všech chromatografických metodách dochází k mnohonásobnému ustavování dynamické rovnováhy analytu mezi dvě vzájemně nemísitelné fáze. Stacionární fáze má schopnost různou měrou zadržovat jednotlivé složky analyzované směsi. Mobilní fáze, jako hybná síla separačního procesu, eluuje jednotlivé látky ze stacionární fáze a unáší je ve směru vlastního toku. Rychlost postupu látky kolonou je dána sorpční rovnováhou, tzn. čím více je látka zadržována stacionární fází, tím pomaleji postupuje v daném chromatografickém systému. Chromatografické metody lze rozdělit dle více různých kritérií [1,2]:

- a) povahy separačního procesu – fyzikální adsorpce, fyzikální rozpouštění ve fázi, chemická reakce v objemu nebo na povrchu fáze (acidobazická rovnováha, tvorba koordinačních komplexů, asociace iontových párů, výměna iontů), sterické efekty, bioafinitní asociace;
- b) instrumentálního uspořádání – chromatografie v koloně nebo v plošném uspořádání;
- c) způsobu vyvíjení – chromatografie eluční, vytěšňovací, frontální;
- d) skupenství mobilní a stacionární fáze – chromatografie v systému kapalina-tuhá látka, kapalina-kapalina, plyn-kapalina, plyn-tuhá látka;
- e) skupenství mobilní fáze – chromatografie plynová, kapalinová, superkritická fluidní.

Na základě výše uvedených parametrů je možné nalézt selektivní a účinný chromatografický systém pro dělení prakticky všech organických látek rozpustných ve vodě (zředěných kyselinách či bazích) nebo v organických rozpouštědlech.

3.1.1 Využití HPLC ve farmaceutické praxi

Vysokoúčinná kapalinová chromatografie HPLC doznala za dobu své existence velkého rozmachu a je široce využívána i ve farmaceutické analýze, kde je v mnoha případech metodou volby. Při vhodné kombinaci chromatografické kolony, mobilní fáze a detekční techniky lze dostatečně separovat jednotlivé složky směsi v krátkém čase a s vysokou citlivostí pro jednotlivé analyty. Pomocí HPLC lze analyzovat velmi široké spektrum látek od silně nepolárních po polární a od nízkomolekulárních až po látky s vysokou molekulovou hmotností [2,3]. Konverze analytické informace do znalosti o cílové struktuře, léčivé substanci či léčivém přípravku, má obrovský význam, protože vede ke kvalitnímu, účinnému a bezpečnému léku. Obecně lze shrnout uplatnění HPLC ve farmacii v následujících bodech:

- hledání nových léčiv – uplatňuje se především v kombinaci s moderními detekčními technikami jako je hmotnostní spektrometrie (LC-MS) nebo nukleární magnetická rezonance (LC-NMR). Především spojení LC-MS patří

ke standardnímu vybavení každé laboratoře, která se zabývá strukturální analýzou (dentifikace látek z přírodních materiálů, sledování mechanismů reakcí při syntéze léčiv, objasňování degradačních procesů, atd.)[4,5,6];

- izolace látek – získávání přírodních látek, purifikace finálních produktů, separace vedlejších produktů syntetických reakcí či degradačních procesů za účelem identifikace a kvantifikace nebo určení analytických parametrů (odezvoový faktor). Dále pak se jedná se o izolaci jednotlivých složek směsi pro biologické testování např. účinku, toxicity, atd.;
- totožnost a kvantita – k zabezpečení maximální kvality léčiva nebo léčivého přípravku je nutno prokázat, že obsahuje deklarovanou aktivní látku v odpovídající kvalitě a udaném množství. Zde se HPLC uplatňuje jako rutinní analytická metoda nejčastěji v kombinaci s UV nebo DAD detektory. K ověření totožnosti se nejčastěji využívá shoda retenčního času dané látky s příslušným standardem a často bývá tento údaj doplněn i shodou UV spekter. Pro kvantifikaci látek se nejčastěji používají následující postupy – metoda vnějšího nebo vnitřního standardu, kalibrační metoda nebo metoda normalizace [7,8,9];
- vývoj nových nebo inovovaných lékových forem – sledování farmaceutické dostupnosti, stability, interakcí atd.;
- analýza látek v biologickém materiálu – studium farmakokinetických parametrů, studium metabolismu, stanovení plazmatických koncentrací aktivních látek či jejich metabolitů, zjišťování biologické dostupnosti u nových látek nebo v bioekvivalentních studiích [1,2,3]. Velký význam má v této oblasti chirální analýza, vzhledem ke skutečnosti, že jednotlivé farmakokinetické i farmakodynamické parametry enantiomerů se mohou výrazně lišit [10,11]. Významně se HPLC uplatňuje i v dalších oblastech jako je toxikologie, forenzní medicína nebo dopingový screening.

3.1.2 Stručný přehled současné HPLC instrumentace

Moderní kapalinové chromatografy bývají koncipovány jako víceúčelové systémy, aby je bylo možno použít i pro analýzy, které byly dříve určeny přístrojům se speciálním určením [1]. Výrobci je nabízí buď ve stavebnicovém provedení, které lze sestavit tzv. na míru pro požadovaný účel, nebo jako kompaktní jednotku, která je dále částečně modifikovatelná pomocí různých vestavěných modulů. Nároky na HPLC instrumentaci v sobě zahrnují - zhotovení jednotlivých součástí z kvalitních materiálů, které jsou odolné vůči složkám mobilní fáze, minimalizaci všech mimokolonových objemů (díky používání stále menších rozměrů částic v kolonách) [2], zajištění stabilního reprodukovatelného bezpulzního průtoku v širokém tlakovém rozmezí a citlivou detekci. Zároveň jsou kladeny vysoké požadavky na chromatografický software, který danou sestavu řídí. Měl by být relativně

jednoduchý a splňovat i náročné požadavky regulačních autorit ve smyslu správné laboratorní (SLP) nebo správné výrobní (SVP) praxe. Hlavní trendy v současné instrumentaci jsou automatizace, miniaturizace, aplikace nových typů detektorů a nových typů stacionárních fází [1].

Následující text je stručně věnován jednotlivými součástem kapalinového chromatografu.

Zásobníky mobilní fáze – v současnosti je možno mít až čtyři zásobníky na složky mobilní fáze. Jedná se o skleněné nádoby, které lze uzavírat, aby nedocházelo k odpařování mobilní fáze do okolí.

Degassery – k odplynění mobilní fáze dochází při jejím průtoku tenkými trubicemi z porézního plastického materiálu, které jsou umístěny v evakuovaném prostoru. Díky tomu malé molekuly plynů rozpuštěné v mobilní fázi prochází stěnami trubic do vnějšího prostoru [1].

Čerpadla mobilní fáze – zůstávají i nadále přes všechna elektronická vylepšení základním instrumentálním prvkem kapalinového chromatografu. Na čerpadla jsou kladeny vysoké nároky ve smyslu udržení konstantního bezpulzního průtoku, protože jeho kolísání významně ovlivňuje reprodukovatelnost retenčních časů i ploch jednotlivých piků. Čerpadla jsou konstruována z odolných materiálů - nerezová ocel, titan nebo speciální keramické materiály. Těsnění pístů bývají z teflonu, kuličky a sedélka pístů jsou nejčastěji safírová. Žádoucí je co nejmenší vnitřní objem čerpadel, aby bylo dosaženo rychlé výměny mobilní fáze a efektivní tvorby gradientu. Dnes se používají výhradně pístová čerpadla a dle množství mobilní fáze, které jsou schopna pumpovat, je lze dále dělit na mikročerpadla (do $500 \mu\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$), analytická čerpadla ($0,1\text{--}10 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$) a preparativní čerpadla ($>10 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$). Pohyb pístů v čerpadlech je elektronicky řízen tak, aby se co nejvíce vyhladilo kolísání průtoku způsobené střídáním sací a výtlačné fáze. Ještě jemnější doladění se pak docílí v průtokovém tlumiči pulsů o velmi malém vnitřním objemu [1,12].

Autosamplery – současné modely autosamplerů umožňují nastříkovat od desetin až po stovky mikrolitrů a dosahují vynikající přesnosti a správnosti díky zdokonalenému oplachu dávkovacího zařízení a minimální kontaminaci dalšího vzorku předchozím. Autosamplery je možno také naprogramovat a využít je jako roboty pro přesné ředění vzorků, přidávání reakčních činidel, zahřívání nebo chlazení [12].

Kolony – dle typu sorbentu lze zvolit vhodnou kolonu pro separaci cílových sloučenin. Chromatografickým kolonám jsou věnovány kapitoly 3.2, 3.3 a 3.4.

Přepínače kolon – lze využít k optimalizaci využití strojového času, ale také k zapojení další pomocné nebo analytické kolony do daného systému. Jedná se o tzv. vícedimenzionální chromatografii. Tento přístup se využívá převážně při analýze

komplikovaných směsí - purifikace vzorku nebo obtížné separace jednotlivých složek směsi. Vícedimenzionální chromatografie se uplatňuje převážně v proteomické analýze.

Kolonové termostaty – většina analýz bývá realizována za laboratorní teploty. Nicméně pro dobrou reprodukovatelnost dosažených výsledků je třeba kolonový prostor temperovat. Obzvláště u chirálních separací může být schopnost sorbentu separovat optické antipody výrazněji ovlivněna teplotou.

Detektory – používané v HPLC lze rozdělit na selektivní, kdy je signál úměrný koncentraci detekované látky (např. UV-VIS, fluorimetrické, elektrochemické), na univerzální, kdy je jejich odezva úměrná celkové vlastnosti eluátu (např. refraktometrické, vodivostní) a na speciální (např. MS, NMR, ELSD) [1].

- a) UV-VIS detektory (citlivost 10^{-9} – 10^{-10} g·ml⁻¹) - pokud látky dostatečně absorbují v UV nebo viditelné oblasti spektra používá se výhradně tento typ detekce. Cela detektoru bývá konstruována tak, aby nedocházelo k rozmývání elučních zón a současně bylo dosaženo vysokého poměru signálu k šumu. Často bývají cely temperovány, aby nebyla odezva detektoru ovlivněna měnící se teplotou okolí (stopová analýza). UV-VIS detektory mají zdroj polychromatického záření a podle konstrukce umožňují měřit absorbanci záření vzorkem při jedné nebo dvou vlnových délkách. Snímání absorpce záření v celém spektru je umožněno při použití detektoru s diodovým polem (DAD). Signál je měřen velkým počtem plošných fotodiod. Každá fotodioda je spojena s kondenzátorem, který je nabit na určitou hodnotu. Fotoelektrický proud, který vzniká při dopadu záření na fotodiodu, vybije kondenzátor úměrně velikosti intenzity zářivého toku. V následující fázi se kondenzátory dobíjí a měří se proud, který je na jejich dobití potřeba [1,2,3].
- b) Fluorimetrické detektory (citlivost 10^{-9} – 10^{-12} g·ml⁻¹) – jsou vysoce selektivní a citlivé, proto nacházejí uplatnění hlavně při stopové analýze. Jejich selektivita je dána faktem, že fluoreskuje jen relativně malá skupina látek obsahující ve své molekule tzv. fluorofor. Díky nim je molekula po absorpci budícího záření schopna emitovat luminiscenční záření o nižší energii než mělo záření excitační. Intenzita emitovaného záření je zesílena fotonásobičem, který je umístěn kolmo na směr excitačního záření. U látek, které nevykazují přirozenou fluorescenci je možno provést derivatizaci s fluorescenčním činidlem např. dansylchloridem [2,3].
- c) Elektrochemické detektory (citlivost 10^{-9} – 10^{-12} g·ml⁻¹) – jsou vhodné pro látky schopné elektrochemické reakce. Mají dobrou citlivost, ale nelze je použít při gradientové eluci. Schopnost oxidace nebo redukce léčiv využívá ampérometrický nebo polarografický detektor (měří proud vyvolaný

průchodem oxidovatelné nebo redukovatelné látky). Coulometrický detektor měří náboj potřebný k oxidaci či redukci veškerého analytu při jeho průchodu měrnou celou, což umožňuje dosáhnout vyšší citlivosti detekce. Případně lze využít potenciometrické detekce separovaných aniontů nebo kationtů za použití iontově selektivních elektrod. Elektrochemické detektory vyžadují velmi čisté chemikálie a dokonale odplyněnou mobilní fázi, má-li být dosaženo stabilní základní linie a reprodukovatelnosti výsledků. Mobilní fáze musí být vodivá, a proto tento typ detektorů nelze použít v systému normálních fází. Ani vysoké procento organické složky v systému obrácených fází není příliš vhodné. Některé typy detektorů umožňují v průběhu eluce získat tzv. voltamogram, který slouží k lepší identifikaci látek, podobně jako absorpčního spektra z DAD [1,2,3].

- d) Vodivostní detektor – (citlivost 10^{-8} g·ml⁻¹) je vhodný pro detekci látek iontového charakteru. Měří se vodivost eluátu mezi dvěma elektrodami (většinou platinovými), na něž je vloženo střídavé napětí, aby se zabránilo jejich polarizaci. Mobilní fáze by měla být pokud možno nevodivá tzn. voda nebo vodné roztoky organických látek [1,2].
- e) Refraktometrické detektory (citlivost 10^{-6} g·ml⁻¹) – jsou universální, ale v hodnocení léčiv se používají ojedinelé. Citlivost detekce je úměrná rozdílu indexu lomu mezi čistou mobilní fází a eluátem obsahující analyt. Citlivost refraktometrického detektoru je ale nižší než u selektivních detektorů. Další nevýhodou je výrazná teplotní závislost odezvy a nevhodnost pro gradientovou eluci [3].
- f) Speciální detektory
- MS detektory – spojení HPLC s hmotnostním spektrometrem je vysoce citlivé a selektivní. Kombinace LC-MS se užívá k identifikaci a strukturní analýze ionizovatelných látek a to od nízkomolekulárních až po látky s molekulovou hmotností cca 1000 kDa [13]. Hmotnostní spektrometr se skládá ze tří základních součástí [14]:

Iontový zdroj – ve spojení HPLC-MS jsou v současné době používány nejčastěji tzv. měkké ionizační techniky - elektrosprej (ESI), chemická ionizace za atmosférického tlaku (APCI) popř. fotoionizace za atmosférického tlaku (APPI).

Analyzátor – kvadrupol (Q), iontová past (IT), trojitý kvadrupol (QqQ), sektorový analyzátor, analyzátor doby letu (TOF), lineární iontová past, iontová cyklotronová rezonance (ICR) a jejich kombinace (IT-TOF, TOF-TOF, q-TOF).

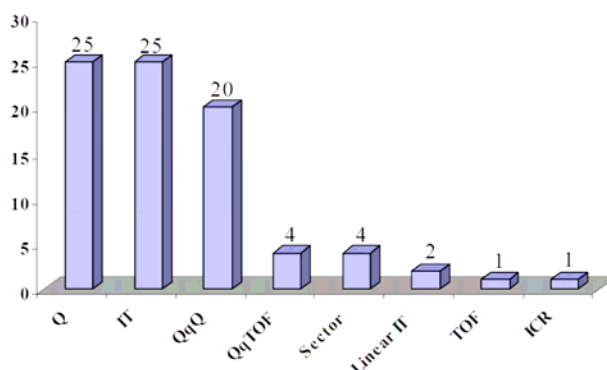
Detektor – k detekci iontů se v současné době nejčastěji používá elektronový násobič nebo fotonásobič. Pro přesná izotopická měření se využívá Faradayova klec [14].

V iontovém zdroji dochází k ionizaci analytu a pomocí iontové optiky jsou ionty fokusovány do velmi úzkého paprsku a vstupují do analyzátoru. Zde dochází k jejich rozdělení na základě poměru m/z a pak dopadají na detektor. Aby byla zajištěna dostatečná životnost vzniklých iontů a tím jejich dostatečně dlouhá střední volná dráha, je nutno mít systém v evakuovaném prostoru (pracovní tlaky se pohybují od 10^{-3} – 10^{-9} Pa). Na základě registrovaných hmot a jejich intenzity lze pomocí interpretačních pravidel získat strukturní informace o daném analytu. Pro studium struktury jsou nejvhodnější analyzátory, které dovolují provedení alespoň MS-MS experimentu. V srpnu 2005 bylo v ČR nainstalováno celkem 82 LC-MS systémů. Zastoupení jednotlivých typů je znázorněno na obr. 1 (stav srpen 2005) [15].

Obr. 1

Přehled HPLC/MS systémů v ČR

(podle typu analyzátoru)

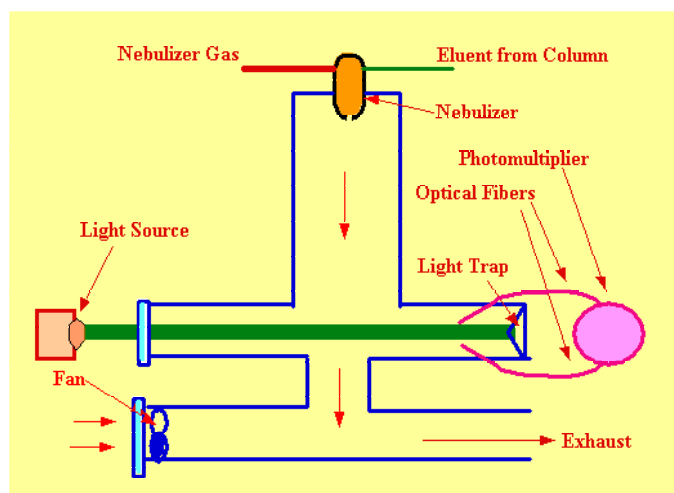


- NMR – první spojení kapalinové chromatografie s NMR bylo realizováno umístěním nerezové analytické kolony s připojenou průtočnou celou přímo mezi póly magnetu NMR [1]. Citlivost byla poměrně malá. V současné době, lze toto spojení použít k on-line určování struktury látek v koncentraci přibližně $10 \mu\text{g/pík}$ [16].
- Polarimetrický detektor – je založen na schopnosti látky s asymetrickým centrem stáčet rovinu polarizovaného světla. Každý enantiomer stáčí rovinu polarizovaného světla o stejný úhel ale v opačném směru (+/-).
- CD detektor - polarizované záření je tvořeno dvěma složkami – pravotočivě a levotočivě cirkulárně polarizovaným zářením. Opticky aktivní látky mají tu vlastnost, že absorbují různou měrou pravotočivě a levotočivě cirkulárně

polarizované záření. Tento jev se nazývá cirkulární dichroismus (CD). CD detektory měří rozdíl mezi absorpcí pravotočivě a levotočivě cirkulárně polarizovaného záření. Tento detektor se využívá např. při konformačních studiích makromolekulárních látek např. bílkovin, nukleových kyselin atd. [17,18].

- Evaporative light scattering detector (ELSD) obr. 2 – využívá se k detekci látek o vyšší molekulové hmotnosti, které neobsahují chromofor, fluorofor či elektrofor. Tento detektor lze použít v případě, když má analyt menší těkavost než mobilní fáze. Na vstupu do ELSD je mobilní fáze vypařena, zatímco analyt postupuje dále do detektoru a je analyzován na základě rozptylu světla. Částice vzorku procházejí celou, kterou prochází světelný paprsek. Množství rozptýleného světla, které dopadne na detektor (leží mimo směr původního paprsku), odpovídá množství látky ve vzorku [19]. Tento detektor je vhodný i pro gradientovou eluci. V současné době je k dispozici i varianta, u které není třeba odpařit mobilní fázi tzv. Liquid light scattering detector (LLSD). Tento detektor je používán pro polymerní látky nebo jiné makromolekulární sloučeniny [20].

Obr. 2 Schéma ELSD.



Vyhodnocovací zařízení – celý HPLC systém je dnes již plně automatický a je řízen počítačem prostřednictvím příslušného softwaru. Chromatografický software se liší v jednotlivostech v závislosti na výrobci, nicméně všechny firmy reflektují požadavky regulačních autorit na chromatografická data ve smyslu správných praxí.

Další zařízení – jednotlivé moduly chromatografu jsou spojeny kapilárami z nerezové oceli nebo tzv. PEEKu o vnitřním průměru 0,1-0,25 mm. Kvalita spojení jednoznačně ovlivňuje kvalitu chromatografické separace. Dále mohou být k HPLC sestavě připojena další zařízení např. na recyklaci mobilní fáze, sběrač frakcí, on-line disoluční zařízení atd.

3.2 Chromatografické kolony v HPLC

Separční kolona je nejdůležitější součástí chromatografického systému. Dostupnost stabilních, vysokoúčinných chromatografických kolon je nezbytným předpokladem pro vývoj robustních HPLC metod. Komerčně dostupné kolony se stejnou stacionární fází se mohou navzájem výrazně lišit ve svých vlastnostech v závislosti na způsobu výroby [2,21]. V některých případech mohou být zaznamenány rozdíly v chromatografických vlastnostech i mezi jednotlivými šaržemi od stejného výrobce [2,22]. Tento jev je z hlediska vývoje a použitelnosti HPLC metodik nežádoucí, protože vyžaduje dodatečné zásahy do již vyvinuté metodiky. Renomovaní výrobci chromatografických kolon garantují shodu mezi jednotlivými šaržemi pomocí vybraných parametrů, mezi které patří počet teoretických pater (N), selektivita (α), hodnota relativní retence (k') pro testovací analyty a často je uveden i údaj o hodnotě zpětného tlaku na koloně za definovaných podmínek [2].

Ideální stacionární fáze by měla splňovat následující parametry:

- dlouhodobá chemická stabilita vůči agresivním mobilním fázím v nízké i vysoké oblasti pH;
- mechanická stabilita – odolnost vůči vysokým pracovním tlakům;
- jednotlivé částice by měly mít velký povrch a měly by být co nejvíce uniformní – distribuční funkce rozložení jejich velikosti by měla být co nejužší; moderní částice by měly být sférické, aby byl minimalizován zpětný tlak;
- velikost pórů by měla odpovídat velikosti analytu;
- materiál by měl být termálně odolný;
- materiál by měl mít povrch, který je energeticky homogenní a měl by být chemicky modifikovatelný;
- minimální bobtnavost v případě polymerních fází nebo při potažení nosiče polymerní vrstvou [22].

Pro HPLC je možno využít různých druhů částic, jak je znázorněno na obr. 3.

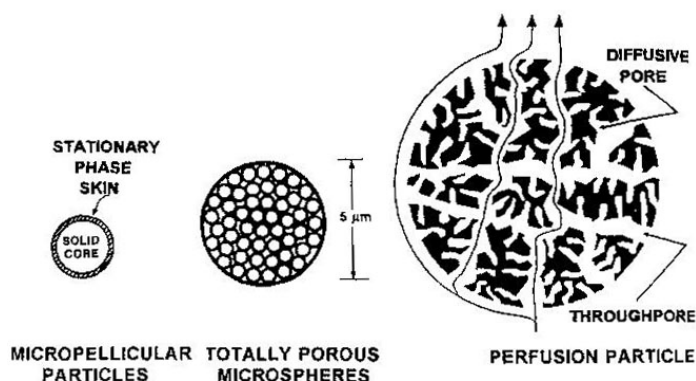
Porézní mikročástice – jsou nejběžněji používané vzhledem ke svým vlastnostem, které jsou dobrým kompromisem mezi účinností, možností zatížení vzorkem, stálostí, životností a dostupností. Jsou dostupné v různých průměrech částic s různou velikostech pórů.

Mikropelikulární částice – tyto částice mají pevné jádro (tvořené silikagelem nebo polymerem) obalené velmi tenkou blankou, která je tvořena stacionární fází. Jejich velikost se pohybuje v rozmezí od 1,5-2,5 μm a vykazují výbornou účinnost pro makromolekuly, díky rychlému přenosu hmoty. Kolony s těmito částicemi poskytují velmi úzké píky zejména pro časně se eluující látky tzv. low volume peaks. Aby se

zabránilo mimokolonovým efektům, které se projevují rozšířením píků zejména u časně se eluujících látek je žádoucí zredukovat mrtvý objem mezi kolonou a detektorem [2]. Nevýhodou těchto částic je jejich malá kapacita (malý povrch připadající na 1g sorbentu), nižší tlaková odolnost, možnost bobtnání polymerní vrstvy při gradientové eluci. Na druhé straně enkapsulace silikagelu je vhodným způsobem jak zabránit interakcím mezi silanolovými skupinami a bazickým analytem popř. se touto cestou dá zvýšit jeho stabilita ve vyšších oblastech pH [21].

Perfúzní částice – obsahují velké prostupující póry celou částicí (4000–8000 Å) a zároveň síť menších pórů (300–1000 Å). Při vysokých průtocích analyt střídavě vstupuje a vystupuje do a z této porézní sítě díky kombinaci dvou faktorů - průtoku mobilní fáze a difúze [23]. Tento efekt minimalizuje rozšiřování zón a porézní částice dosahují obdobné efektivity jako menší částice za daleko menšího zpětného tlaku. Studie ukazují, že kolony s těmito částicemi jsou vhodné pro preparativní účely makromolekulárních látek – obzvláště proteinů [2].

Obr. 3 Typy částic využitelných v HPLC, převzato z ref. 2.



3.2.1 Stacionární fáze na bázi silikagelu

Většina separačních kolon, které se dnes využívají v HPLC jsou na bázi silikagelu [2,21,22,24,25,26]. Tento fenomén je dán jeho mnoha pozitivními vlastnostmi:

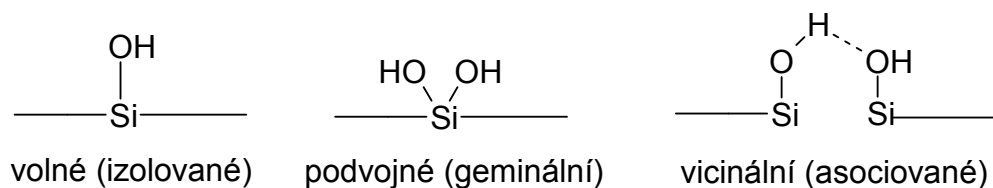
- možnost výroby různě velkých částic, s různou velikostí pórů tzn. využitelnost pro analýzu velkých i malých molekul a vhodnost pro separační i preparativní účely;
- velká mechanická odolnost \Rightarrow dlouhodobá stabilita za vysokých pracovních tlaků;
- díky přítomnosti silanolových skupin je jeho povrch velmi snadno modifikovatelný, z čehož plyne možnost přípravy velkého množství stacionárních fází, které se navzájem liší svým charakterem a selektivitou;

- silikagelové náplně jsou kompatibilní s vodou i organickými rozpouštědly. Změnou složení mobilní fáze nedochází k prostorovým změnám jako např. u polymerních stacionárních fází [2,22].

Silikagel je možno získat dvojím způsobem - hydrolyzou anorganických silikátů, což vede k nepravidelným částicím, které obsahují stopová množství kovů jako nečistot (především se jedná o Al a Fe); nebo hydrolyzou alkoxyasilikátů – tento způsob zaručuje daleko menší znečištění kovy a také je možno získat pravidelné částice [21]. Čím více je silikagel sférický, tím je lepší reprodukovatelnost přípravy efektivních chromatografických kolon. Kolony s nepravidelnými částicemi mohou mít zpočátku podobnou efektivitu jako kolony se sférickými částicemi, ale během používání vykazují daleko vyšší zpětný tlak. Větší nepravidelné částice se používají pro preparativní účely díky své nižší ceně [2].

Povrch silikagelu je tvořen silanoly a siloxany. Silanoly se vyskytují jako volné, geminální a vicinální, viz obr. 4. Silanoly jsou hydrofilní, zatímco siloxany jsou hydrofobní. Hydrofobicita siloxanů je zdrojem retence hydrofobních látek při použití mobilních fází s vysokým procentem vody [21,27].

Obr. 4 Typy silanolových skupin, převzato z ref. 2.



Zahřáním silikagelu nad 800°C ztrácí většinu SiOH skupin a stává se tak pro HPLC bezcenným. Silikagely vhodné pro HPLC by měly být plně hydratované, což znamená, že obsahují cca 8 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}$ silanolových skupin, které vytvářejí povrchovou vrstvu. Plně hydroxylovaný silikagel je nezbytný pro přípravu stabilní vázané fáze, protože má:

- lepší mechanickou stabilitu
- lepší hydrolytickou stabilitu vázaných ligand
- vyšší povrchové pH
- větší počet asociovaných silanolů (silikagel s menším obsahem silanolů obsahuje relativně více izolovaných silanolových skupin)
- nižší tendenci adsorbovat bazické látky

Hydratovaný povrch obsahuje všechny tři typy silanolů. Jejich existence byla potvrzena pomocí NMR i IR [2,21].

- Volné (izolované) silanoly se obecně vyskytují v malých koncentracích, ale mají velmi kyselý charakter, což je zdrojem silných interakcí s bazickými

látkami, a proto silikagel obsahující větší počet volných silanolů vykazuje i vyšší retenci bazických látek (píky bývají širší i chvostující).

- Podvojně (geminální) silanoly jsou zastoupeny z 25-30 % a jsou méně kyselé než volné silanoly a tudíž neinteragují tak silně s bazickými látkami jako volné silanoly.
- Vicinální (asociované) silanoly jsou nejméně kyselé a procentuálně zaujímají největší část z celkového počtu všech silanolů. Pro analýzu bazických látek jsou nejvhodnější. Počet vicinálních silanolů je možno zvýšit tzv. rehydroxylací silikagelu [2].

Rehydroxylace silikagelu - cílem rehydroxylace je omezit množství volných silanolů, které jsou pokládány za nositele iontově výměnných interakcí. Dle Köhlera et al. [28,29] plně hydroxylovaný povrch obsahuje více H-vázaných silanolů a je pro chromatografické účely vhodnější. Cox a Stout [30] prokázali, že rehydroxylovaný silikagel má menší iontově-výměnnou schopnost než silikagel, který nebyl rehydroxylován. K podobným závěrům dospěla i Kirklandova skupina, tzn. že rehydroxylace může zásadně zvýšit počet vázaných silanolů a současně snižuje adsorpční schopnosti, za které volné silanoly zodpovídají [28,29]. Rehydroxylace rovněž zbavuje silikagel stopových množství kovů [21].

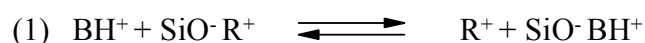
Silikagel, který je zahříván, ztrácí nejprve fyzikálně vázanou vodu (200°C) a potom i silanoly. Nejdříve dochází k dehydroxylaci vázaných silanolů (200-400°C) a nad 400°C klesá i počet izolovaných silanolových skupin. Zpětná rehydroxylace počet vázaných silanolů zvyšuje [21]. K rehydroxylaci se často přistupuje před navázáním vlastní reverzní fáze na povrch silikagelu. Dle Köhlera [28] je možno k efektivní rehydroxylaci použít kyseliny nebo baze. Použití bazí vede obecně k dobře rehydroxylovanému silikagelu avšak také k heterogennímu povrchu z hlediska SiOH skupin. Dostatečné rehydroxylace bylo dosaženo při použití kvarterních amoniových bazí a některých aminů. Nejlepší přijatelné výsledky byly dosaženy pomocí fluorovodíkové kyseliny.

3.2.1.1 Nevýhody silikagelu

Chemické procesy uplatňující se při chromatografii na silikagelových stacionárních fázích a při modifikaci jeho povrchu, jsou dnes již velmi dobře prostudovány. Stejně tak jsou známy i nevýhody tohoto materiálu [2,21,22,31,32]. Běžně užívané stacionární fáze jsou chemicky stabilní v oblasti pH 3-9. Dle McCalleyho je dlouhodobá stabilita limitována na oblast pH 3-7 [33]. Při snížení pH pod 4 začíná se projevovat kyselé katalyzovaná hydrolýza siloxanové vazby. Toto vede ke kontinuálnímu ztrácení vázané fáze a s tím související ztrátě chromatografické účinnosti. V mobilních fázích, které mají vyšší pH než 9 se začíná silikagel rozpouštět, protože není kompletně chráněn vázanou fází [2,21,34,35]. Tato nevýhoda je patrná převážně u tzv. sil-gelových (xerogelových) typů, které vznikají

precipitací rozpustných silikátů. Tyto fáze by neměly být používány při $\text{pH} > 8$. Kolony částicového charakteru vzniklé agregací silikagelových solů, tzv. sol-gelový typ, jsou odolnější vůči rozpouštění a dovolují pracovat při pH alespoň 9 (některé typy sol-gelových kolon mohou být za určitých podmínek použity až do pH 11) [2,34]. Rozpouštění podloží vede také logicky ke ztrátě chromatografické účinnosti. Vytváří se prázdné prostory v koloně a nárůstá zpětný tlak, který není již akceptovatelný. Kontinuální vystavení vyššímu pH než je 9 vede ke kolapsu kolony [21,22,24].

Další nevýhodou silikagelu je jeho kyselý povrch, což způsobuje komplikace při separaci hlavně bazických látek. Interakce bazických látek s volnými silanoly, viz výše, může vést k nárůstu retenčního času, k rozšíření zóny analytu a také k menší reprodukovatelnosti přenosu analýzy z kolony na kolonu. Interakce mezi silanoly a analytem jsou zprostředkovány iontově výměnnými interakcemi, viz rovnice (1). Protonizovaná báze nahradí příslušný kation (Na^+ , K^+), který je vázán ionizovaným silanolem. Kapacita kolony vázat organické báze je dle této rovnice velmi mála ($< 1 \mu\text{g}$) a běžný nástřik tuto kapacitu značně převyšuje, toto přesytení se projeví chvostováním píků.



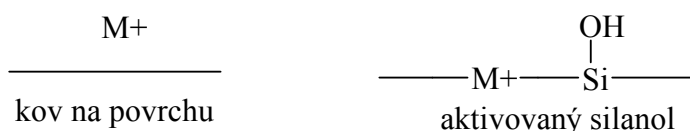
Vhodným výběrem experimentálních podmínek je možno tyto interakce minimalizovat [2]:

- dynamickou modifikací povrchu stacionární fáze pomocí alkytrimethylammoniových solí s dlouhým alkylem;
- pokud je to možné, zvolit pracovní pH v kyselé oblasti, kde nedochází k procesu iontové výměny;
- použitím vyšší koncentrace pufru ($> 10 \text{ mM}$) s kationtem, který má silnou afinitu k silanolovým skupinám. Afinita roste v pořadí Na^+ , K^+ , NH_4^+ , $(\text{C}_2\text{H}_5)_3\text{NH}^+$, $(\text{CH}_3)_2\text{C}_8\text{H}_{17}\text{NH}^+$;
- využitím kolony určené pro analýzu bazických látek tzn. endkapované, využívající elektrostatického stínění nebo takové, kde je povrch odstíněn pomocí objemných substituentů, viz níže;
- využitím polymerních stacionárních fází, pokud nebude na závadu menší efektivita separačního procesu;
- použitím stacionárních fází na bázi oxidů kovů, kde je možno pracovat i za extrémních pH a separovat bazické látky v jejich neionizované formě.

Také čistota silikagelu má velký význam pro separaci mnoha polárních látek. Některé silikagely mohou být kontaminovány kovy např. Al, Fe, Ni, Zn, atd. Tyto kovové nečistoty mohou interagovat s chelatujícími látkami, což se projeví chvostujícími asymetrickými píky, popř. látka je zadržena na koloně úplně [2,21]. Dále kovy (zvláště Al) přítomné v silikagelové struktuře viz obr. 5, aktivují

povrchové silanoly, které jsou pak silně kyselé. Na druhé straně bylo také pozorováno, že v oblasti $\text{pH} > 8$ jsou stabilnější silikagelové kolony, které jsou vyrobeny z méně čistého silikagelu [2,21,34]. Čištění silikagely se rozpouští rychleji než starší typy obsahující více kovu jako nečistoty [21]. Bylo prokázáno, že silikagel obsahující Al^{3+} může být používán při $\text{pH} 10$ cca 10 000 objemů kolony, podobný efekt byl sledován u silikagelu s příměsí ZrO_2 [36].

Obr. 5 Znečištění silikagelu kovem a aktivace silanolových skupin.



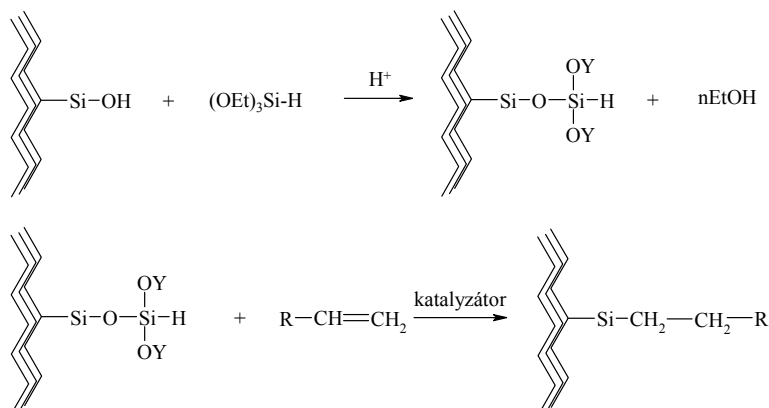
3.2.1.2 Typy silikagelů

Silikagel typ A (starší typ) – obsahuje více volných silanolů a je více znečištěn kovy. Obecně je vhodný pro separace neutrálních nebo neionizovaných látek, kde odpadají případné nežádoucí interakce kolony s analytem.

Silikagel typ B (novější typ) – vysoce čištěný, má mnohem méně volných silanolů. Obecně se dosahuje lepší separace než u typu A a je vhodný pro separaci látek iontových i ionizovatelných [2,21].

Silikagel typ C – vychází z typu B, ale díky patentovanému postupu výroby (firma MicroSolv, (Eatontown, USA)), není jeho povrch zakončen silanolovými skupinami, ale vazbou Si-H. Tato vazba je značně stabilní a velmi nepolární. Výrobní proces se skládá ze dvou kroků, viz obr. 6. V prvním kroku reagují silanolové skupiny s triethoxysilanem (TES) a za přesně definovaných podmínek dojde k vytvoření Si-H vrstvy (více jak 90% silanolových skupin je nahrazeno). V dalším kroku je na tento povrch navázána vhodná funkční skupina. Tímto způsobem, vzniká vazba Si-C, která je hydrolyticky stabilnější než vazba Si-O-Si-C vznikající běžným postupem, viz níže [37,38,39].

Obr. 6 Silikagel typ C; schematické znázornění vzniku vazby Si-H a následné modifikace povrchu vázanou skupinou, převzato z ref. 38.



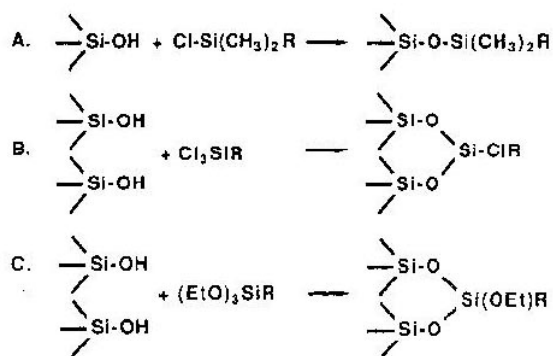
Takto modifikovaný silikagel si zachovává vlastnosti původního materiálu (mechanickou odolnost, sférické částice, vysokou čistotu, chemickou modifikovatelnost atd.). Současně jsou překonány některé nedostatky původního materiálu, jako je kyselost povrchu a malá hydrofobicita. Byla vylepšena i stabilita při vyšších hodnotách pH. Dále je možno pomocí těchto fází separovat látky v reverzním módu s vysokým obsahem vody a pracovat v normálním módu bez vázané fáze [40]. Separace na tomto typu stacionární fáze publikovala skupina J. J. Peseka a přehled dosavadních aplikací lze dohledat na webových stránkách fy MicroSolv [41].

Stacionární fáze obsahující jako vázanou fázi cholesterol je schopna separovat strukturně podobné látky, i když má daleko menší hydrofobicitu než běžné C8 a C18 stacionární fáze. Zároveň byla pozorována chirální separace binaftolu, klenbuterolu, homatropinu, naftyethylaminu a dalších látek. Ačkoliv mechanismus chirální separace není zatím znám, předpokládá se, že podobně jako u cyklodextrinů dochází ke vzniku inkluzního komplexu mezi analytem a cholesterolem [38].

3.2.1.3 Příprava RP fází

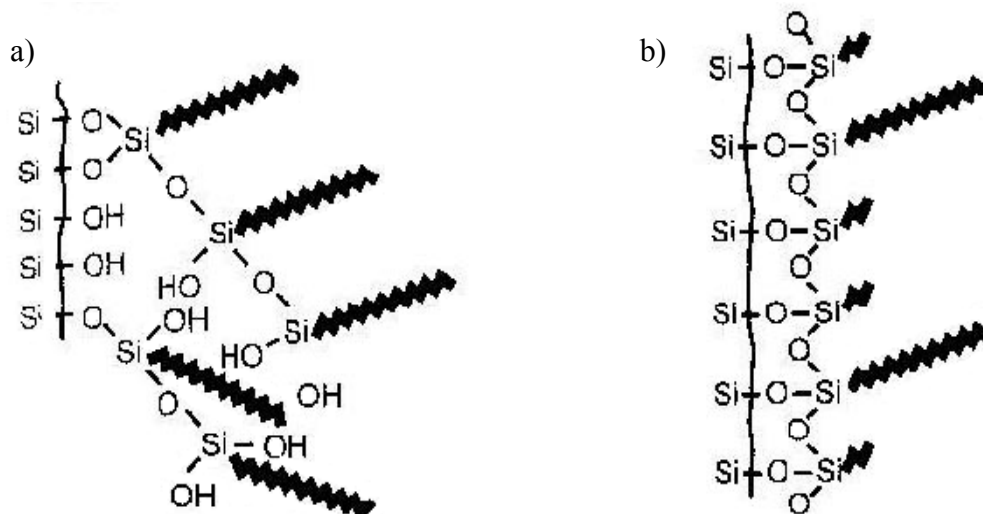
Nejvíce využívané reverzní silikagelové stacionární fáze jsou organosilanolové, protože je při jejich výrobě dosaženo vysoké reprodukovatelnosti a mají nejlepší vlastnosti, co se týká přenosu hmoty mezi analytem a stacionární fází [22]. Silikagelové RP fáze jsou vyráběny navázáním organosilikonu na silikagel nebo jeho potažením vrstvou organického polymeru. Reakce používané ve výrobě vázaných fází jsou shrnuty na obr. 7. Mnoho stacionárních fází je vyráběno dle prvního reakčního schématu (A), kde reaguje monofunkční reaktant se silanolem. Výhodou tohoto postupu je, že je reprodukovatelný a stacionární fáze vyrobené touto cestou vykazují nejvyšší účinnost (rychlá difúze do a vně tenké stacionární fáze). Při reakci silikagelu s bi- nebo trifunkčními reaktanty vzniká polymerní vrstva (B, C). V případě, že navazovaný zbytek obsahuje funkční skupinu, která by mohla reagovat s chlorsilanem (-NH₂, -OH) využívá se k navázání takového zbytku na povrch postup znázorněný na schématu C [2]. Na následujícím obrázku (obr. 8) jsou znázorněny různé typy vázaných fází na povrchu silikagelu.

Obr. 7 Schéma chemických reakcí při modifikaci silikagelu, převzato z ref. 2.

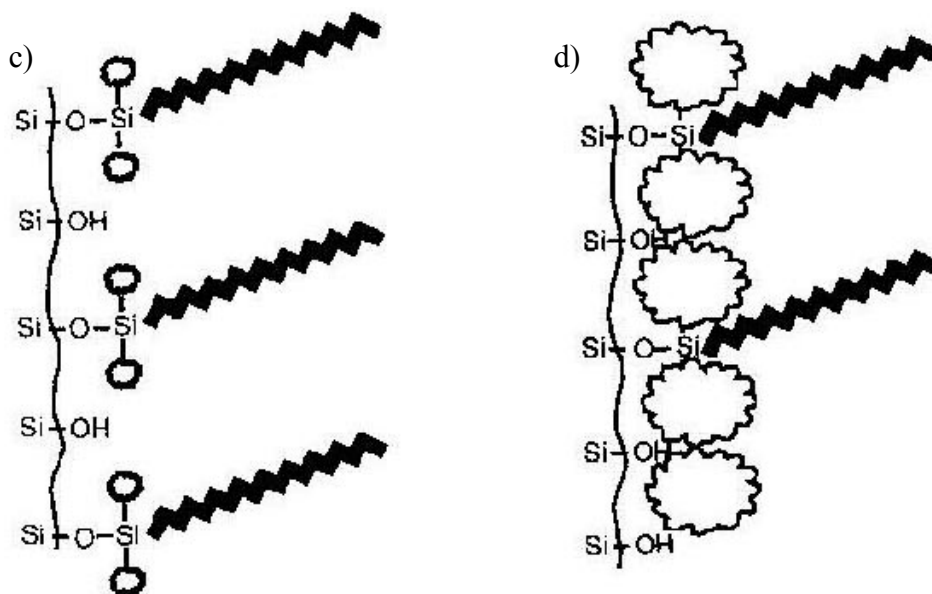


Obr. 8 Typy vázaných fází na povrchu silikagelu, převzato z ref. 2.

- a) vertikálně polymerizovaná fáze
b) horizontálně polymerizovaná fáze



- c) monomerně vázaná fáze – stericky nechráněný povrch
d) monomerně vázaná fáze – stericky chráněný povrch objemným substituentem



Vertikálně polymerizovaná stacionární fáze - vzniká reakcí silikagelu a bi- nebo tri-funkčních silanů. Tato fáze je stabilnější v nižších oblastech pH než klasické monomerně vázané fáze. Avšak stacionární fáze připravené tímto způsobem mohou vykazovat větší variabilitu, pokud jde o retenci a selektivitu, viz níže.

Horizontálně polymerizovaná fáze – viz obr. 8. Horizontálně polymerizované silany vytvářejí výbornou prostorovou bariéru, která redukuje výměnu protonu mezi

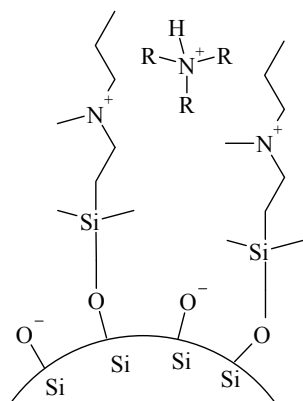
silanoly a mobilní fázi [21]. Wirth a Fairbank [42,43,44] syntetizovali smíšené fáze C18/C1 a C18/C3. U těchto fází dochází za definovaných podmínek k samovolnému vytvoření polymerní monovrstvy, která je chemicky vázána k povrchu silikagelu. Stacionární fáze, připravené tímto postupem, mají vysokou hustotu vázaných řetězců, téměř $8 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}$, což prakticky odpovídá koncentraci silanolových skupin na povrchu silikagelu [2,21,22,45]. Pro porovnání - hustota vázané fáze při použití dimethyloktadecylsilanů dosahuje pouze $2,5\text{-}3,5 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}$. Tyto fáze jsou stabilnější v nízkém i vyšším pH [42,43,44,45,46].

3.2.1.4 Endkapování a elektrostatické stínění

Díky sterickému bránění již navázaných řetězců při modifikaci povrchu silikagelu nedochází k reakci na všech silanolech. Tyto silanoly jsou cloněny již navázanými alkylovými řetězci, ale jsou schopny podílet se na elektrostatických interakcích s odpovídajícím analytem. Tyto interakce jsou většinou nežádoucí – zvláště u bazických látek zodpovídají za široké a chvostující píky. K minimalizaci těchto interakcí se používá technika zvaná endkapping a elektrostatické stínění [2,21]. Endkapování je velmi často užívaná technika, která zlepšuje kvalitu chemicky vázané fáze. Po navázání stacionární fáze je v následném kroku stacionární fáze podrobena reakci a malými silany (trimethylchlorsilan, dimethyldichlorsilan). Tento postup snižuje výskyt volných silanolů \Rightarrow minimalizace nežádoucích interakcí s analytem. Endkapující skupiny vytvářejí také hydrofobní bariéru, která zabraňuje rozpouštění silikagelu. Nevýhodou tohoto postupu je, že malé endkapující molekuly snadno hydrolyzují v mobilních fázích s nízkým pH [22,47].

Elektrostatické stínění - základní myšlenka tohoto procesu je znázorněna na obr. 9. Vázaný silan obsahuje v řetězci aminoskupinu, která nese náboj v kyselém nebo neutrálním pH podobně jako bazický analyt. Pokud je kladně nabitá skupina v blízkosti povrchu, tak bude odpuzovat pozitivně nabitý analyt. Odpudivá síla chrání analyt před interakcí s negativně nabitým povrchem. Tento koncept uplatnila např. firma Supelco ve své fázi Suplex pK_b-100 a LC-ABZ⁺ [21].

Obr. 9 Princip elektrostatického stínění zbytkových silanolů, převzato z ref. 21.



3.2.1.5 Stabilita silikagelových stacionárních fází a možnosti jejího zvýšení

Stabilita vázaných fází je obzvláště důležitá pro vývoj a následné používání HPLC metody. Kolona si musí zachovávat původní vlastnosti po co nejdelší dobu, což minimalizuje opětovnou potřebu optimalizace vyvinutých podmínek či častou výměnu kolony. Stabilita v nízkém pH byla důkladně studována Kirklandovou skupinou. Stabilita a životnost silikagelových kolon je přímo úměrná typu SiO_2 a vázané fázi a dále je závislá na složení a pH používané mobilní fáze.

Ztráta vázané fáze je důsledkem hydrolyzy vazby Si-O-Si, která zprostředkovává vazbu stacionární fáze. Degradace je urychlena při vyšších teplotách, nižším pH a při použití mobilní fáze s vysokým procentem vodné složky [22]. Stabilní vázané fáze v nízkém pH mají uplatnění v separaci peptidů a proteinů, kdy je zabráněno nežádoucím iontově-výměnným interakcím [21].

3.2.1.5.1 Zvýšení stability v oblasti nízkého pH

Zvýšení stability v oblasti nízkého pH je dosaženo prodloužením vázaného řetězce tzn. zvýšením hydrofobicity organosilanu. Ve studii [47] bylo prokázáno, že C18 kolony jsou více stabilní než C1, C4, popř. C8. Zvýšení stability je dáno lepším „pokrytím“ siloxanové vazby delším, hydrofobnějším řetězcem. Proto také trimethylsilylendkapující skupiny jsou nestabilní a kolony určené pro použití v nízké oblasti pH nejsou endkapované.

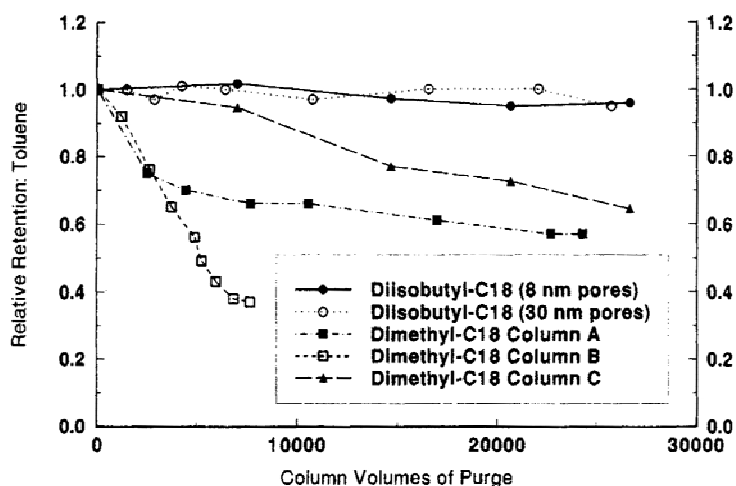
Zvýšení počtu kovalentních vazeb, existence silné fyzikální interakce mezi organosilany a silikagelem nebo zvýšení pojivosti oligomerního silanového polymeru k povrchu také zvyšuje stabilitu v nízké oblasti pH. Zvýšením počtu kovalentních vazeb mezi organosilanolem a povrchem se vytvoří tzv. „zoubkovitá“ fáze. Tento typ fáze je odolnější proti kyselé hydrolyze díky tomu, že musí být současně hydrolyzováno více vazeb [22]. K navázání stacionární fáze na silikagel byly použity jak bifunkční (CH_3RSiX_2) tak i trifunkční (RSiX_3) organosilanolů [2,23]. V roztoku dochází pravděpodobně ke vzniku polymeru, který je následovně navázán k povrchu. Ačkoliv tento proces zvyšuje stabilitu v nízkých oblastech pH je na rozdíl od použití monofunkčního organosiloxanu méně reprodukovatelný [2]. Obecně se dá říci, že i kinetika přenosu hmoty je horší než u fáze vázané monomerně [23], i když dnes je efektivita s monomerními fázemi v zásadě srovnatelná [48]. Je však třeba podotknout, že moderní vázané fáze založené na silikagelu typu B jsou výhradně monomerní [49].

Kirklandova skupina vyvinula odlišný typ stacionární fáze, který je odolný v nízkém i vysokém pH. Jedná se o tzv. C18/C18 stacionární fázi, která je daleko více rezistentní vůči kyselé hydrolyze vázaných řetězců a rozpouštění silikagelu při vyšším pH než běžná C18 fáze. Zvýšená stabilita těchto fází je dána přítomností ethylenových můstků mezi Si atomy oktadecylsiloxanů. Na rozdíl od polymerních

fázi, viz výše, je navázání alkylových řetězců vysoce reprodukovatelné a přenos hmoty je podobný jako na běžné C18 fázi [48].

Modifikace povrchu stericky chráněnými silany je v současné době nejúspěšnějším syntetickým přístupem ke zvýšení odolnosti silikagelových stacionárních fází v nízkém pH. Tento postup byl vyvinut a patentován Glajchem a spolupracovníky [50,51]. Stericky chráněné silany jsou tvořeny alkylem (C3, C8, C18) nebo aromatickou jednotkou, dvěma objemnými substituenty (isopropyl nebo isobutyl) a reaktivní částí (chlor vázaný na atom křemíku). Stericky chráněné fáze jsou velmi stabilní i v agresivním prostředí 0,1% TFA, pH 0,9 a $t=90^{\circ}\text{C}$ [47,50,51]. Testy prokázaly, že isopropylové nebo isobutylové jednotky jsou v zamezení kyselě katalyzované hydrolyzy siloxanové vazby nejefektivnější [47,52,53], viz obr. 10.

Obr. 10 Vliv objemného substituentu na stabilitu silikagelové stacionární fáze, převzato z ref. 53.



Díky přítomnosti objemných chránících skupin obsahují kolony vyrobené tímto způsobem menší % C, a proto mají menší retenční schopnost ve srovnání s dimethylsubstituovanými vázanými fázemi [2,53].

3.2.1.5.2 Zvýšení stability v oblasti vyššího pH

Stabilita ve vyšších oblastech pH je žádoucí pro separace bazí v jejich neionizované formě, protože se tak zabrání nežádoucím interakcím se zbytkovými silanoly na povrchu silikagelu [22]. Studie, které sledovali stabilitu stacionární fáze navázané na silikagel prostřednictvím vazby Si-O-Si ve vyšších oblastech pH, prokázali, že tato vazba je jen nepatrně (pokud vůbec) atakována [34,35,53]. Ztráta efektivity kolon v této oblasti je způsobena rozpouštěním silikagelu. Předpokládá se, že degradace kolon za vyššího pH je silně závislá na typu silikagelu a na vlastnostech stacionární fáze [35].

Snahy o zvýšení stability ve vyšších oblastech pH se zaměřily primárně na zvýšení pokrytí nebo stínění silikagelu. Protože díky sterickému bránění je možno

dosáhnout povrchové hustoty vázané fáze cca $2-4 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}$, tak je nejméně 50 % silanolových skupin na povrchu nezreagovaných a povrch je nedostatečně chráněn. Pouhé prodloužení řetězce vázané fáze vede ke zvýšení pH stability, protože se více projeví stínící efekt. Za stejných podmínek jsou kolony s delšími řetězci (C8, C18) stabilnější než kolony s krátkými řetězci (NH_2 , CN) [47]. Nicméně tento postup sám o sobě je pro celkové zvýšení stability ve vyšších oblastech pH nedostatečný, protože část povrchu silikagelu zůstává stále nechráněna.

Ke zvýšení stability ve vyšších oblastech přispívá také endkapování. Malá velikost endkapujících skupin umožňuje reakci s volnými silanoly, které jsou pro delší řetězce díky sterickému bránění nedostupné. Endkapování snižuje aktivitu volných silanolů a zároveň podstatně zlepšuje pH stabilitu ve vyšších oblastech pH.

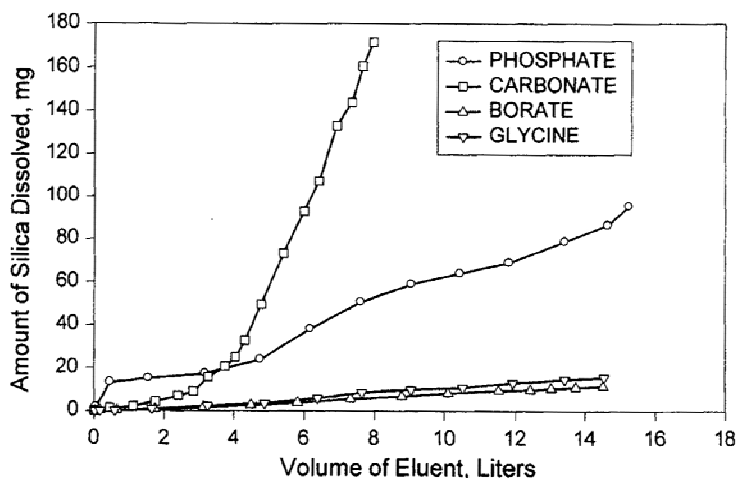
Silikagel sol-gelového typu je stabilní při použití určitých mobilních fází do pH 9. Silikagel sil-gelového typu díky způsobu přípravy degraduje za těchto podmínek velmi rychle [35]. Endkapování dále zvyšuje stabilitu sol-gelového typu (při použití určitých pufrů a teploty do 40°C) cca do pH 11 [2,33,35,54,55]. Další zvýšení stability bylo dosaženo tzv. double endkapováním [34,35,48,56,57].

Zvýší stabilitu je také možno využitím hybridních anorganicko/organických částic, které vznikají reakcí anorganického a organického alkoksysilanu [58]. Organická část je přítomná uvnitř struktury i na povrchu částice. Přítomnost organických skupin na povrchu snižuje množství nederivatizovaných a nechráněných silanolových skupin a tím je snížena míra jeho disoluce. Tyto částice mají cca 66 % silanolových skupin, a proto lze využít tradičních metod pro navázání alkylového zbytku. V literatuře je prezentováno, že tento typ fáze je stabilnější v pH 10 více než běžná C18 fáze [58].

Maximální životnosti silikagelové stacionární fáze v oblastech vyššího pH lze docílit pokud:

- stacionární fáze je připravena z méně rozpustného typu silikagelu tzn. sol-gelový typ (Hypersil, Kromasil, Spherisorb, Zorbax);
- kolony jsou endkapované, s hustě vázanými delšími řetězci [2];
- pro přípravu mobilní fáze použijeme spíše organické popř. borátové pufr [2,56]. Fosfáty a uhličitany jsou více agresivní, viz obr. 11;
- koncentrace pufru se pohybuje rozmezí 0,01–0,05 M. Více koncentrované pufr rozpouštějí rychleji silikagel. Pro stabilitu kolony je vhodné zvolit kation pufru v následujícím pořadí $\text{Li}^+ > \text{Na}^+ > \text{K}^+ > \text{NH}_4^+$ [2,54].
- pro separace při $\text{pH} > 9$ je použit acetonitril. ACN je vhodnější složkou mobilní fáze než methanol, protože zabraňuje rozpouštění silikagelu [34].
- teplota na koloně je $\leq 40^\circ\text{C}$ [2, 22].

Obr. 11 Efekt anorganických a organických pufrů mobilní fáze na stabilitu silikagelu, převzato z ref. 35.



3.2.2 Kolony s porézní polymerní náplní

V analytické praxi se také uplatňují kolony s polymerními stacionárními fázemi. Některé polymery (např. polystyren) jsou dostatečně hydrofobní, aby mohly být bez další úpravy použity jako stacionární fáze pro RPLC [2,22]. Většina polymerních stacionárních fází je tvořena polystyren-divinylbenzen kopolymerem. Daleko méně se uplatňují např. substituované metakryláty a polyvinylalkoholy.

Z polymerů je možno vyrobit jak sférické porézní tak pelikulární částice. Hlavní výhodou porézních polymerů je jejich stabilita v pH oblasti 1-13. Díky této stabilitě je možné analyzovat bazické látky v neionizované formě, což představuje alternativu k iontově-párové chromatografii. Vzhledem ke své hydrofobicitě srovnatelné se silikagelovou C18 fází je možné dosáhnout dostatečné retence i pro silně hydrofilní látky. Částice s velkými póry jsou vhodné i pro separace proteinů. Nevýhodou polymerních stacionárních fází je jejich menší efektivita ve srovnání se silikagelovou stacionární fází při zachování stejného rozměru částic. Dále je nutné podotknout, že u polymerů dochází v přítomnosti organických rozpouštědel k objemovým změnám. Tento efekt je patrný zejména při gradientové eluci a může přispět ke snížení účinnosti separace, protože dochází ke změnám v náplni kolony [2,59,60].

Selektivitu polymerních fází je také možno modifikovat navázáním funkčních skupin např. C18, NH₂, CN. Modifikované polymerní stacionární fáze s ionizovatelnými funkčními skupinami (COOH, SO₃H, NH₂, NR₄⁺) nacházejí využití jako iontoměniče. Tyto kolony jsou hojně využívány pro separace nebo izolace analytů z biologického materiálu. Výhodou je delší životnost ve vyšších oblastech pH než mají klasické fáze na bázi silikagelu, i když efektivita a rychlost separace je ve srovnání s nimi nižší.

3.2.3 Monolitické stacionární fáze

Monolitické kolony nemají částicový charakter, ale jsou vysoce porézní (mikro- a mezopóry). Jejich příprava probíhá *in situ* v plášti budoucího monolitu polymerací nebo konsolidační technologií. Takto vzniklé fáze je možno dále chemicky modifikovat. Monolitické stacionární fáze se v posledních letech staly velmi oblíbené, zejména pro své výhodné hydrodynamické vlastnosti, kdy díky své struktuře mají i při vyšším průtoku mobilní fáze nízký tlakový odpor. Jsou známy monolitické kolony jak na bázi anorganických, tak na bázi polymerních materiálů. Firma Merck nabízí silikagelové monolity pod značkou Chromolith a firma Phenomenex pod označením Onyx. Mimo oblast HPLC nacházejí monolitické kolony své využití v kapilární elektrochromatografii [61].

3.2.4 Nederivatizovaný grafitizovaný uhlík

Tento materiál je pro účely HPLC připravován synteticky ve tvaru porézních kulovitých částic o různé velikosti. Separace na tomto typu sorbentu se poněkud liší od separací na silikagelových kolonách s vázanými C8, C18 fázemi. Pro účely RPLC není nutno povrch nijak upravovat vzhledem k faktu, že jeho hydrofobicita je vyšší než u vázaných alkylových či polymerních fází. Bylo prokázáno, že tento povrch je schopen separovat i strukturně velmi podobné látky jako jsou geometrické izomery. Je rovněž vhodný pro separace silně hydrofilních látek, které jsou nedostatečně zadržovány na běžných C18 fázích. Výhodou je rovněž teplotní a pH stabilita (1-14). Nevýhodou je pak menší efektivita a křehkost. Dále vyžaduje práce s tímto typem kolon vysoce čisté mobilní fáze, protože nečistoty se mohou silně vázat na sorbent a postupným vymýváním zvyšovat šum pozadí, v krajním případě mohou ireverzibilně změnit účinnost kolony. Z tohoto důvodu je kladen i velký důraz na úpravu vzorku před vlastní analýzou [2,62].

3.2.5 Stacionární fáze na bázi jiných oxidů než SiO_2

Pro přípravu stabilnějších stacionárních fází byly testovány oxidy kovů a to Al_2O_3 , ZrO_2 a TiO_2 [2,22,25,26,63,64], menší míře pak ThO_2 a CeO_2 [65,66].

Cíl tohoto výzkumu je zaměřen především na:

- stabilnější náplň kolony \Rightarrow delší životnost a menší náklady na analýzu;
- možnosti využít širšího rozmezí pH a teplot \Rightarrow větší flexibilita při vývoji chromatografických metod;
- spojení s detekční technikou LC-MS – u stabilnějších kolon je menší tzv. bleeding stacionární fáze;

- možnost použití agresivních podmínek při čištění chromatografických kolon bez nebezpečí jejich zničení [22].

3.2.5.1 Stacionární fáze na bázi Al_2O_3

Pro HPLC jsou dostupné částice o různých rozměrech s malými i velkými póry, i když ne v takové škále jako je tomu u silikagelových částic. Nemodifikovaný Al_2O_3 je možno použít pro separace slabě polárních analytů v normálním módu [2]. Pro separace v systému obrácených fází lze Al_2O_3 chemicky modifikovat různými způsoby. Podobně jako u silikagelu byla zkoušena organosilanizace, ale ukázalo se, že vazba Al-O-Si je v kyselém prostředí nestabilní.

Další testovanou metodou byl dvoustupňový proces, kdy je nejprve proběhne chlorace povrchu pomocí chloridu thionylu a následně reakce s organolitnou sloučeninou. Tento postup se ale nepodařilo převést do komerčního měřítka, protože je potřeba zachovat přísně bezvodé prostředí [26].

Nadějnou metodou pro navázání příslušné stacionární fáze na povrch Al_2O_3 je stejný postup jako při modifikaci silikagelu, viz obr. 6. V prvním kroku dojde ke vzniku hydridu a následně je navázána vhodná funkční skupina.

V současné době jsou nejvíce prostudované a komerčně dostupné stacionární fáze vzniklé potažením Al_2O_3 polymerní vrstvou (např. polybutadienem) [2,26].

Výhodou kolon na bázi Al_2O_3 je jejich použitelnost do pH 12, tedy i na těchto fázích je možno separovat bazické látky v neionizované podobě. Al_2O_3 kolony nejsou vhodné pro analýzu látek s karboxylovou nebo sulfátovou skupinou [2,22], protože dochází k ireverzibilní vazbě mezi analytem a oxidem hlinitým. Vzhledem k tomu, že kromě oblasti pH > 10 mají aluminiové kolony podobnou aplikační šíři jako silikagelové kolony bez žádných výraznějších výhod, není tento typ kolon tak široce rozšířen [2,26].

3.2.5.2 Stacionární fáze na bázi TiO_2

TiO_2 je studován jako materiál pro HPLC cca 10 let. V současné době je komerčně dostupný ve formě sférických částic pro HPLC [25,67] a probíhá intenzivní výzkum zaměřený na jeho využití jako materiálu pro výrobu chromatografických kolon. Předpokládá se, že jeho chemické vlastnosti jsou podobné ZrO_2 [63]. Zatím je nedostatek komerčně dostupných stacionárních fází. Pro NPLC dodává nemodifikovaný TiO_2 německá firma Sachtleben. Možnosti využití těchto chromatografických kolon pro analýzu bazických látek publikovali Winkler a Marmé [25]. Grün et al. [68] porovnávají TiO_2 jako sorbent pro NPLC s dalšími oxidy (ZrO_2 , Al_2O_3 a SiO_2).

Nově je možno komerčně získat kolonu s modifikovaným TiO_2 polyethylenem pro RPLC. Tato stacionární fáze stejně jako zirkoniové stacionární fáze vykazuje stabilitu jak v obou extrémech pH (1-12), tak i za zvýšené teploty (100°C) [64].

3.2.5.3 Stacionární fáze na bázi ZrO₂

Nejintenzivněji studovaným oxidem, který přichází v úvahu jako alternativní materiál pro výrobu chromatografických kolon, je bezesporu ZrO₂. Během posledních patnácti let bylo publikováno na toto téma velké množství odborných článků především skupinou P. W. Carra. Tomuto typu stacionárních fází je věnována následující samostatná kapitola.

3.3 ZrO₂ – perspektivní alternativa silikagelu

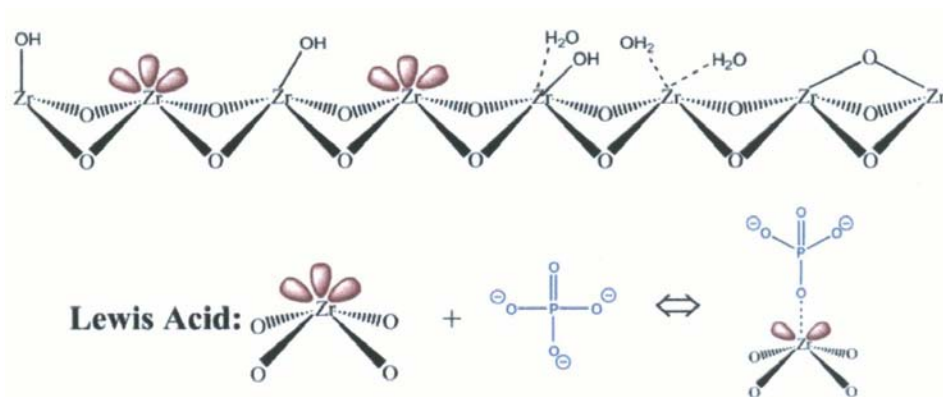
Výzkum mapující možnosti uplatnění non-silikagelových stacionárních fází probíhá již řadu let. Pozornost je věnována mimo jiné i oxidům kovů ZrO₂, TiO₂ a Al₂O₃. Z této skupiny jeví oxid zirkoničitý zatím nejlepší vlastnosti. TiO₂ není doposud tak důkladně prostudován. Chromatografické kolony na bázi ZrO₂ se liší od klasických silikagelových kolon v retenci a selektivitě. Tyto rozdíly, vyplývající z odlišných chemických vlastností obou materiálů, se mohou výrazně uplatnit při separačním procesu. Efektivita zirkoniových kolon je v současnosti srovnatelná s SiO₂ kolonami (>100 000 pater/m), a to je výrazně více než dosahují polymerní stacionární fáze. Navíc fáze na bázi ZrO₂ mají na rozdíl od silikagelových kolon značnou chemickou a tepelnou stabilitu. Silikagel je stabilní cca do 200°C. Při vyšších teplotách dochází ke kondenzování povrchových silanolů a mění se jeho vlastnosti, do 400°C jsou změny relativně snadno reverzibilní [21,22]. Termální stabilita ZrO₂ je velmi vysoká (b. t. 2750°C) a je výhodná vzhledem k možnosti práce za vysokých teplot, což umožňuje dosáhnout vyšších průtoků za nižšího pracovního tlaku a tím zkrátit analýzu [22,24,69,70,71,72]. Dále pak je možno také dosáhnout potřebné selektivity kolony vzájemnou kombinací změny teploty a složení mobilní fáze [2,73].

Vysoká chemická stabilita zirkoniových kolon vychází ze struktury ZrO₂. Síla vazby mezi atomem zirkonia a kyslíkem je srovnatelná jako síla vazby mezi atomem křemíku a kyslíku. Ale v krystalové mřížce je každý atom zirkonia vázán současně se sedmi kyslíkovými atomy. Oproti tomu u SiO₂ je každý atom křemíku vázán jen na čtyři atomy kyslíku [24]. Chemická stabilita ZrO₂ za extrémních podmínek byla experimentálně prokázána ve dvou studiích a porovnána se silikagelem [74] i Al₂O₃ [75]. Za zvolených experimentálních podmínek nedošlo k rozpuštění ZrO₂, což bylo potvrzeno atomovou emisní spektroskopií. Z hlediska chemické stability ZrO₂ jasně převyšuje oba zmíněné oxidy. Pro úplnost je však třeba dodat, že ZrO₂ se rozpouští v kyselině fluorovodíkové, koncentrované H₂SO₄ a horké koncentrované H₃PO₄. Dále je možno rozpustit ZrO₂ v koncentrované HNO₃, ale proces je značně pomalý a probíhá řádově ve dnech až desítkách dnů [24].

Chemické procesy, které se uplatňují při chromatografii na ZrO₂ jsou podstatně odlišné od mechanismů na běžných silikagelových fázích. Díky nízké hodnotě pH_{pzc} (pH, při kterém má povrch celkový nulový náboj) připadá na silikagelu do úvahy pouze výměna kationtů, zatímco ZrO₂ se chová jako amfoterní iontoměnič. Zda se uplatní jako anex nebo katex, je závislé na hodnotě pH prostředí [24,76,77,78]. Další rozdíl, který se uplatňuje při chromatografickém procesu je existence skupin typu Lewisových kyselin na povrchu ZrO₂. Tyto skupiny jsou zodpovědné za schopnost ZrO₂ působit jako měnič ligandů. V RPLC se používá modifikovaný ZrO₂ [22,63]. Přitom touto modifikací (viz níže) není možno zablokovat úplně všechny skupiny

typu Lewisových kyselin, viz obr. 12, a díky tomu se na retenci látek podílí více efektů, hovoříme o tzv. „smíšeném“ retenčním módu. Který efekt se bude dominantně uplatňovat závisí na typu analytu, pH mobilní fáze, typu použitého pufru, jeho iontové síle i organické složce mobilní fáze [76,77,78].

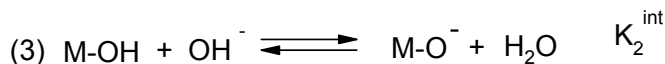
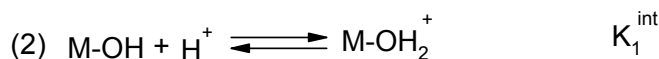
Obr. 12 Povrch ZrO₂ částic a interakce Lewisova kyselina-Lewisova base, převzato z ref. 64,95.



3.3.1 Přehled mechanismů uplatňujících se při retenci analytu

3.3.1.1 Iontová výměna

Iontovými aktivita je založena na schopnosti povrchových hydroxylů ZrO₂ chovat se v závislosti na prostředí jako base - přijmout proton (2) nebo jako kyselina, tzn. odevzdat proton (3) [24].



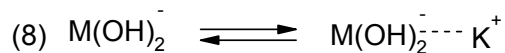
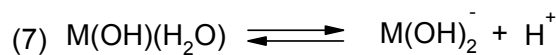
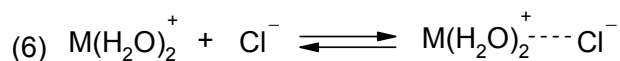
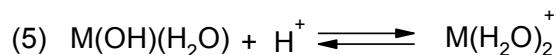
K_1^{int} a K_2^{int} jsou ionizační konstanty a H^+ a OH^- jsou potenciální určující ionty. V případě rovnosti počtu kladně nabitých skupin (M-OH_2^+) s počtem záporně nabitých skupin (M-O^-) má povrch celkový povrchový náboj roven nule. Hodnota pH, kdy je nulový povrch celkový náboj se označuje pH_{pzc} a závisí na ionizačních konstantách dle rovnice (4):

$$(4) \text{pH}_{\text{pzc}} = 0,5(\text{p}K_1^{\text{int}} + \text{p}K_2^{\text{int}})$$

Z toho vyplývá, že pokud bude pH menší než $\text{p}K_1^{\text{int}}$, oxid kovu se bude chovat jako anex, zatímco při pH větším než $\text{p}K_2^{\text{int}}$ se bude chovat jako katex.

Pomocí rovnic (5) a (6) lze vysvětlit existenci skupin schopných zadržovat anionty. S rostoucím pH dochází k posunu rovnováhy v rovnici (5) na levou stranu a tudíž klesá i kapacita pro retenci aniontů. Naopak rovnice (7) a (8) vysvětlují schopnost ZrO₂ zadržovat kationty při vyšších hodnotách pH. Na základě retenčních dat se

ZrO₂ mění z anexu na katex v intervalu pH 6-7, což je v souladu s publikovanými hodnotami izoelektrického bodu ZrO₂ [22,24].



M reprezentuje Zr^{IV}.

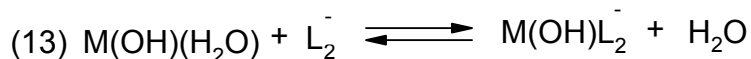
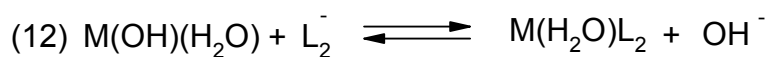
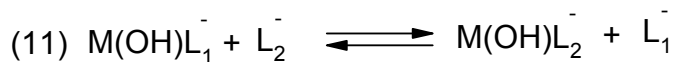
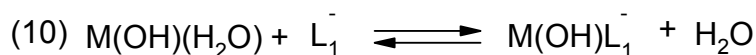
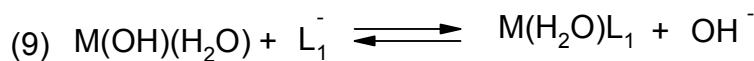
Protože silikagel má nízkou hodnotu pH_{pzc} silanoly disociují za neutrálního pH a povrch má negativní náboj a díky tomu existují problémy při chromatografii bazických látek, kdy dochází k vzájemné interakci mezi analytem a silanolovými skupinami. V podstatě se negativnímu působení silanolů nevyhneme ani při pH 2 [22]. K zamezení těchto interakcí je možno:

- snížit pH, aby se potlačila disociace silanolů (pod pH 3 je většina stacionárních fází dlouhodobě nestabilních);
- zvýšit pH, tak aby byl analyt v deprotonovaném stavu (při pH>8 dochází k rozpouštění silikagelu);
- přidat do mobilní fáze látku, která blokuje silanoly nebo přidat iontově párové činidlo, které vytváří iontový pár a tímto způsobem zamezit nežádoucím coulombickým interakcím s povrchem.

Oxidy kovů mají vyšší hodnotu pH_{pzc} a tedy v neutrálním prostředí není povrch negativně nabitý a k interakcím s pozitivně nabitými bazemi nedochází. Díky stabilitě při vyšších pH je možno separovat baze jako nedisociované molekuly.

3.3.1.2 Výměna ligand

Díky přítomnosti skupin typu Lewisových kyselin na povrchu ZrO₂ je výměna ligand významná pro retenci analytů typu Lewisových bází. Tento proces může probíhat i na modifikovaných oxidech, protože potažením povrchu oxidu polymerem nebo uhlíkem se nevytváří jednodílná neprostupná vrstva, která by zablokovala přístup k povrchu vlastního oxidu. Ve výměně ligand hrají klíčovou roli koordinačně vázané molekuly vody [22,24]. Tyto molekuly mohou být vyměněny za jinou Lewisovu bazi. Čím je baze silnější, tím je výměna snazší. Následující chemické rovnováhy popisují procesy, které mohou nastat při interakcích různých skupin s ZrO₂, ale i s jinými oxidy kovů [24,79]:



M reprezentuje kov v oxidu, L₁ Lewisovu bazi mobilní fáze a L₂ analyt typu Lewisovy baze. Rovnice (9) a (10) popisují modifikaci povrchu ZrO₂, pokud je součástí mobilní fáze látka typu Lewisovy baze. Rovnice (11)-(13) popisují výměnu ligandu mobilní fáze L₁ za ligand L₂ (analyt). Příspěvky H₂O a OH⁻ k výměně ligandů jsou silně závislé na pH mobilní fáze. V nižších pH se uplatňují procesy (10)-(13). Za vysokého pH jsou pravděpodobně příspěvky procesů (9) a (13) k celkové výměně ligand minimální, protože ion OH⁻ je velmi silná Lewisova baze. OH⁻ je na ZrO₂ nejsilnější monovalentní baze a je schopna vytěsnit z povrchu ZrO₂ ostatní monovalentní baze. Přítomnost koordinačně vázané vody je pro výměnu ligandů velmi důležitá [24]. Silikagel nemá takto vázanou vodu, a proto výměna ligandů zde neprobíhá. Síla interakce mezi Lewisovou bází a Lewisovou kyselinou je závislá na elektronové hustotě a polarizovatelnosti baze. Malá polarizovatelnost a velká elektronová hustota má za následek silnější interakce. Síla interakcí klesá v řadě:

fosfát > fluorid > citrát > sulfát > acetát > formiát > nitrát > chlorid [24,80]. Tato eluotropická řada byla vytvořena na základě schopnosti vytěšňovat anion kyseliny benzoové. Dále byla experimentálně prokázána závislost mezi log k' a pKa derivátů benzoové kyseliny [81,82]. Sklon přímky vyjadřující tuto závislost se měnil s pH mobilní fáze. Tato korelace však nebyla nalezena na silném silikagelovém anexu. Toto zjištění potvrzuje teorii, že závislost mezi log k' a pKa u derivátů benzoové kyseliny souvisí s kyselostí (Lewis) ZrO₂ a je následkem výměny ligandů a ne výměny anionů.

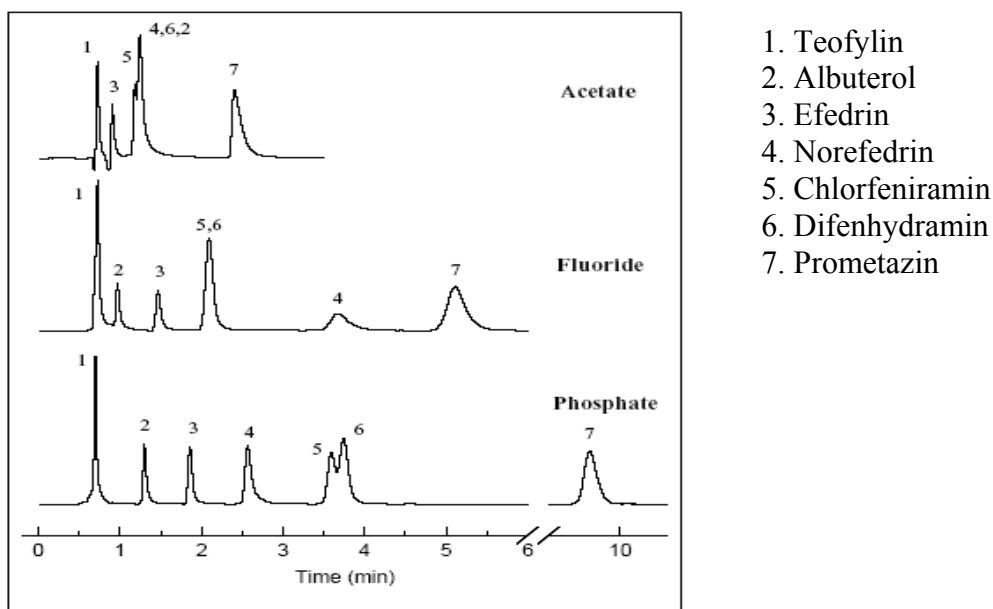
ZrO₂ silně interaguje s Lewisovými bazemi (fluoridy, hydroxidy, karboxyláty) [81]. Maximum adsorpce se pravděpodobně vyskytuje, když je pH = pKa [24]. Pokud je analyt silná Lewisova baze, tak se dá očekávat, velmi malá chromatografická účinnost, pokud není v mobilní fázi přítomna silnější Lewisova baze (fosfát, acetát). V nízkém pH nelze použít fluorid, protože se vytváří HF, a ta ZrO₂ rozpouští [24,79,81,83].

Jak již bylo řečeno výše, je i na modifikovaném povrchu k dispozici dostatek skupin typu Lewisových kyselin, a proto dochází při chromatografii proteinů k silným interakcím s jejich karboxylovými kyselinami, z toho důvodu je nutný

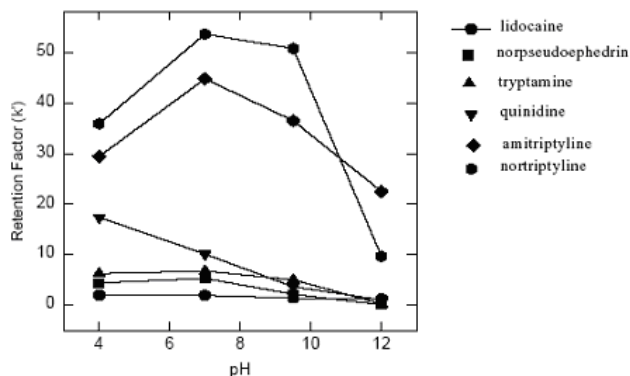
přídavek silnější Lewisovy base do mobilní fáze. Např. náhradou 0,1% trifluoroctové kyseliny za kyselinu citronovou nebo fosforečnou se podařilo eluovat proteiny i z nemodifikovaného ZrO₂ [84].

Retence na ZrO₂ je ovlivněna kombinací dvou efektů – výměny ligandů a výměny iontů. Díky tomu je možno ovlivnit eluci prostřednictvím koncentrace Lewisovy base a iontovou silou [22]. Na obr. 13 je příklad separace několika antihistaminik a ovlivnění jejich retence pomocí změny Lewisovy base v mobilní fázi. Nejkratší retenční časy mají látky v acetátovém pufru, protože octan je slabší Lewisova base než fluorid a fosfát. Ačkoliv fluoridy a fosfáty blokují Lewisovy kyseliny daleko efektivněji než acetát, zavádějí na povrch PBD-ZrO₂ (polybutadienem modifikovaný oxid zirkoničitý) větší negativní náboj a povrch tímto dostává charakter silnějšího katexu. Výměna kationtů se stává dominantním mechanismem retence a to má za následek i prodloužení retenčních časů. Výběr pufru a jeho koncentrace, iontová síla, pH a charakter protiiontu pufru mohou ovlivnit interakce analytu s povrchem. Další proměnná k ovlivnění retence (pokud je hlavním retenčním mechanismem výměna iontů) je hodnota pH. Amitriptylin a nortriptylin jsou silně zadržováni na koloně díky přítomnosti iontové výměny. Zvýšení pH na 12 snižuje příspěvek iontové výměny na celkovou retenci a dominantní se stává reverzní mechanismus, to vede ke změně retence obou látek, viz obr. 14 [22,76].

Obr. 13 Vliv charakteru Lewisovy base na retenci bazických analytů na PBD-ZrO₂, převzato z ref. 22.

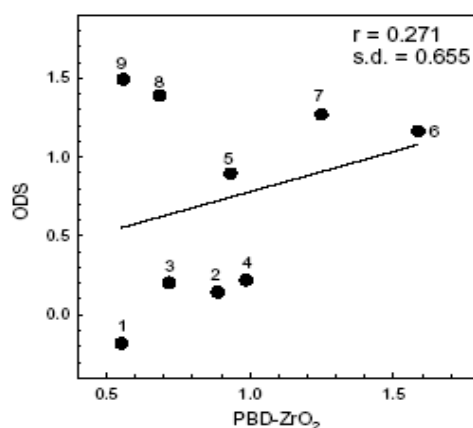


Obr. 14 Vliv pH mobilní fáze na retence bazických analytů na PBD-ZrO₂, převzato z ref. 76.



Srovnáme-li chování analytů na PBD-ZrO₂ a běžné reverzí fázi ODS fázi, tak se výrazně liší jen pro ionizovatelné látky. Na základě výše řečeného je jasné, že pokud mobilní fáze obsahuje silnou Lewisovu bazi, bude separace kationických látek (velká část léčiv) výrazně ovlivněna adsorpcí této Lewisovy baze na povrch ZrO₂. Ačkoliv má PBD-ZrO₂ ve srovnání s ODS menší podíl stacionární fáze, tak při použití stejné mobilní fáze jsou stejné nepolární látky méně zadržovány na PBD-ZrO₂ než na ODS, ale retence bazických látek je silnější na PBD-ZrO₂ než na ODS. Dále jsou zde patrné rozdíly v pořadí jednotlivých látek a v selektivitě. Na základě srovnání retenčních dat na obou fázích bylo prokázáno, že neexistuje téměř žádná korelace mezi retencí na obou fázích, ačkoliv jsou obě fáze reverzní, viz obr. 15 [85].

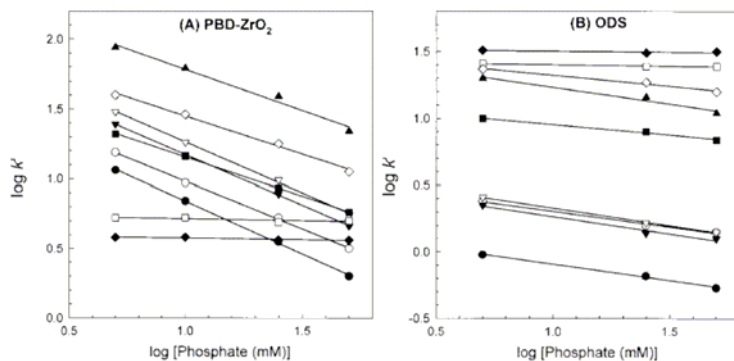
Obr. 15 Závislost log k' na ODS a log k' na PBD-ZrO₂ pro vybraná antihistaminika, převzato z ref. 85.



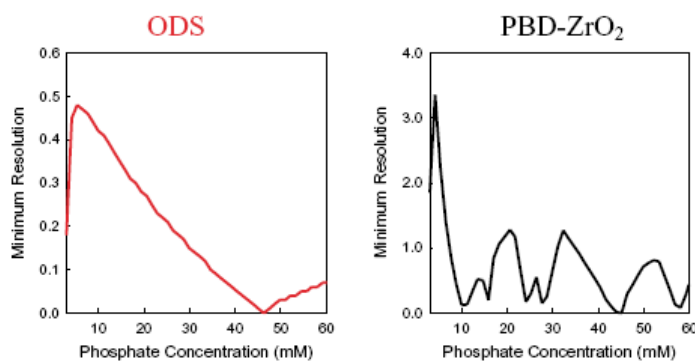
Základní rozdíl v retenci mezi oběma kolonami je patrný i z obr. 16. Závislost retenčního faktoru na logaritmu koncentrace fosfátu je méně strmá na ODS fázi než je tomu u PBD-ZrO₂. To znamená, že příspěvek iontově výměnných interakcí na retenci pozitivně nabitých molekul je větší než u ODS a retence bazických látek je silnější. Změnou koncentrace pufru, viz obr. 17, je možné dosáhnout daleko lepší separace na PBD-ZrO₂ než na ODS (je vícero koncentrací fosfátu, kdy lze dosáhnout

větší rozlišení než jedna). Adsorpce fosfátu popř. jiné Lewisovy baze na povrch ZrO₂ může tedy sloužit k doladění separace. Na ODS je tento efekt výrazně menší.

Obr. 16 Vliv koncentrace pufru na retenci pro vybraná antihistaminika na ODS PBD-ZrO₂, převzato z ref. 85.

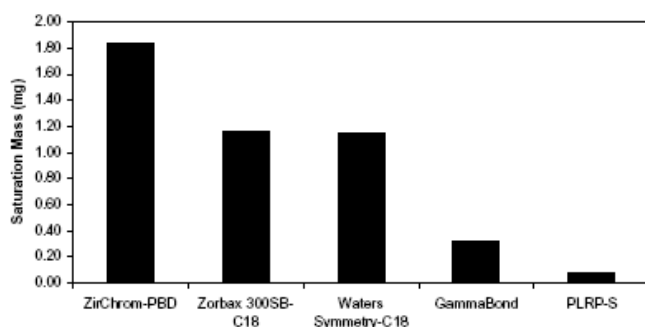


Obr. 17 Efekt koncentrace pufru na minimální rozlišení pro ODS a PBD-ZrO₂, převzato z ref. 22.



Obě stacionární fáze se dále liší v své kapacitě. Kapacita pro zatížení vzorkem je u PBD-ZrO₂ větší než u ODS, i když celková plocha stacionární fáze je u PBD-ZrO₂ podstatně menší. Tento jev se vysvětluje na základě následující úvahy – k přesycení na obou fázích dojde v případě, že bazický analyt vysytí podstatnou část negativně nabitých skupin na povrch stacionární fáze. Díky adsorpci pufrů typu Lewisových bází jsou na zirkoniových stacionárních fázích negativně nabitě částice daleko početnější než jsou zbytkové disociované silanoly na fázi ODS, viz obr. 18 [22].

Obr. 18 Srovnání vybraných stacionárních fází z hlediska možnosti zatížení bazickou látkou (nortriptylin), převzato z ref. 22.



Výběr chromatografických podmínek pro určitý analyt by se tedy na základě výše řečeného měl řídit podle jeho charakteru.

Kyseliny – nezbytnou složkou mobilní fáze je fosfát ($c > 20$ mM). V případě separací v nízké oblasti pH se obvykle používá kyselina fosforečná. Přídavek fluoridu do mobilní fáze (pokud je pH větší než 4) může separaci zlepšit. Avšak přídavkem fosfátu nebo fluoridu se vytvoří na povrchu ZrO₂ silný negativní náboj, což značným způsobem zesílí interakce s kationty. Pokud chceme tomuto efektu předejít, je možno nahradit fosfát nebo fluorid acetátem.

Bazické látky – lze využít možnosti práce v oblasti pH až do 13-14 (dle typu stacionární fáze). V oblasti $\text{pH} < 10$ může být retence optimalizována přídavkem vhodného aniontu typu Lewisovy baze (fosfát, fluorid). Iontová síla a pH mají výrazný efekt na rozlišení. Pokud chceme co nejvíce zvýraznit rozdíl v selektivitě ve srovnání s ODS fází, tak je nutno udržovat koncentraci pufru < 10 mM. Narozdíl od ODS fáze klesá retence na zirkoniové fázi, pokud je pH mobilní fáze vyšší než je pK_a příslušného analytu [23,86].

3.3.2 Přehled modifikací ZrO₂ pro separační účely

Vhodné vlastnosti daného chromatografického materiálu jsou dosaženy modifikací povrchu. Většina HPLC separací je v současné době prováděna v reverzním módu, proto je velká pozornost věnována možnosti modifikace povrchu ZrO₂ i dalších potencionálních oxidů – Al₂O₃, TiO₂. RPLC stacionární fáze se připraví vhodnou imobilizací látky s nízkou polaritou např. polybutadienu, polystyrenu nebo uhlíku [22,63].

K modifikaci povrchu ZrO₂ lze využít následující postupy [24]:

1. dynamická modifikace – přídavkem silně interagující látky do mobilní fáze;
2. kovalentní chemická modifikace;
3. fyzikální modifikace – potažení vrstvou polymeru nebo uhlíku.

Účelem modifikace povrchu u ZrO₂ je získat stacionární fázi, která má podobnou hydrofobicitu a chemickou selektivitu jako běžně užívané stacionární fáze na bázi silikagelu. Přitom není možno zablokovat úplně všechny skupiny typu Lewisových kyselin a díky tomu se na retenci látek podílí více efektů. U látek neelektrolytového charakteru se uplatňuje při retenci pouze reverzní mechanismus. Avšak jaký efekt (výměna ligand, výměna iontů, reverzní mechanismus) se bude uplatňovat dominantně u látek ionizovatelných závisí na pH, typu použitého pufru, iontové síle, použitím organickém modifikátoru. Kombinace všech těchto mechanismů může být využita pro obtížné separace i vzhledem k chemické a termální stabilitě ZrO₂ [22,24,63,85].

3.3.2.1 Dynamická modifikace

Dynamická modifikace povrchu se používá v případech, kdy je třeba odblokovat nežádoucí interakce analytu s povrchem kolony nebo zavést dočasně vázanou fázi na kolonu. Dynamická modifikace se využívá již řadu let u silikagelových stacionárních fází k minimalizaci interakcí silanolových skupin s bazickými látkami [2,21]. U zirkoniových stacionárních fází se používá dynamická modifikace k odblokování nežádoucích interakcí analytu s Lewisovými kyselinami. Používají se silné Lewisovy báze (anorganické fosfáty, fluoridy, karboxylové kyseliny nebo silně komplexující látky jako je např. EDTA) [79,80,81,83,84]. Na základě těchto studií byl určen také vliv jednotlivých Lewisových bazí na retenci analytů.

3.3.2.2 Modifikace kovalentní vazbou

Práce na formulaci reverzní fáze na bázi kovových oxidů stále pokračují. Pokud by se podařilo připravit permanentní reverzní fázi, která by úplně odstranila působení Lewisových kyselin, tak by tento typ stacionárních fází pravděpodobně nahradil kolony na bázi silikagelu [63].

3.3.2.2.1 Silanizace

Přestože již v roce 1976 bylo prokázáno, že hydrolytická stabilita silikonové vazby klesá v pořadí Si-O-Si-R >> Zr-O-Si-R >> Ti-O-Si-R >> Al-O-Si-R, bylo mnoho pokusů modifikovat oxidy kovů právě silanizací. Tato technika je dobře zvládnutá po teoretické i praktické stránce [2,21,32]. Pro permanentní modifikaci povrchu ZrO₂ jednoduchou silanizací je limitujícím faktorem nejen nestabilita vazby Zr-O-Si-R, ale také struktura a bazicita hydroxylů na jeho povrchu. Většina hydroxylů ZrO₂ je v tzv. „bridged“ formě, a ta je pro silanizaci nevhodná (tento typ se na silikagelu nenachází) [21,24]. Ačkoliv pokusy s modifikací oxidů kovů silanizací započaly již v sedmdesátých letech minulého století a bylo publikováno mnoho prací na toto téma, nebyla zatím doložena příprava stabilně modifikovaného ZrO₂. Komerčně dostupné zirkoniové (i aluminiové) reverzní fáze nejsou připravovány silanizací jejich povrchových OH skupin [63].

3.3.2.2.2 ZrO₂ modifikovaný fosfátem

Silné interakce fosfátů s povrchem ZrO₂ mohou být využity ke zlepšení chromatografické účinnosti. Buď se použijí jako přídavek do mobilní fáze a nebo se využijí k modifikaci povrchu, tzn. že ZrO₂ je vystaven agresivnímu prostředí fosforečné kyseliny a vytvoří se vrstva fosfátu zirkonia [87]. V závislosti na podmínkách (pH, koncentrace, teplota, čas) může být kontrolován stupeň modifikace. Refluxováním částic ve zředěné kyselině fosforečné vznikne několik vrstev fosforečnanu zirkoničitého (za příliš agresivních podmínek však dochází

k úplné konverzi ZrO₂ na fosforečnan, který má sice vrstevnatou strukturu, ale je mechanicky slabý a pro HPLC nevhodný). Takto modifikovaný ZrO₂ má charakter katexu a byl použit pro separaci kationických proteinů, imunoglobulinů i aminokyselin [63,88].

3.3.2.2.3 ZrO₂ modifikovaný fluoridem

ZrO₂ modifikovaný fluoridem jevíl zpočátku podobné vlastnosti jako fosfátovaná ZrO₂ fáze, ale jeho chování je odlišné. Pro přípravu stacionární fáze postačí pouze promytí kolony roztokem fluoridu [79]. Tato fáze je výborná pro separaci proteinů a má jedinečnou selektivitu ve srovnání s ostatními iontoměničiči na bázi ZrO₂. Protože má tento materiál obzvláště vysokou kapacitu pro proteiny byl zkoumán jako vhodný materiál pro jejich preparativní čištění [89]. Regenerovat kolonu je možné promytím opět roztokem fluoridu. Na takto upraveném ZrO₂ nelze pracovat při nízkém pH, protože dochází ke tvorbě kyseliny fluorovodíkové, která ZrO₂ rozpouští, nehledě k nepříznivému vlivu na detektor a celý HPLC systém [63].

3.3.2.2.4 ZrO₂ modifikovaný fosfonátovým analogem EDTA

Na základě výsledků s fosfáty a fluoridy byly hledány další silné Lewisovy baze, které by mohly poskytnout odlišnou selektivitu sorbentu. Refluxováním ZrO₂ částic analogem EDTA – EDTPA (ethylendiamin-*N,N*-tetramethylfosfonová kyselina) byla získána fáze s kation-výměnnými vlastnostmi, která má zajímavou selektivitu a byla schopna separovat vysoce bazické proteiny. Proteiny s pI (isoelektrický bod) menší než 6,8 nejsou touto fází zadržovány. Komerčně dostupná je tato fáze pod označením Zirchrom-PEZ [64]. Díky přítomnosti alifatické části v EDTPA je možno na této stacionární fázi separovat proteiny a další analyty, které nejsou separovány na fosfátem modifikovaném ZrO₂. Tato fáze byla použita k získání vysoce čistých monoklonálních protilátek z buněčných kultur [90,91,92].

Také PBD-ZrO₂ byl úspěšně modifikovaný EDTPA a je komerčně dostupná pod označením Zirchrom-EZ. Tato stacionární fáze je alternativou k běžným zirkoniovým reverzním fázím u aplikací, kde je třeba použít těžká aditiva mobilní fáze. Deaktivací Lewisových kyselin je možno separovat i Lewisovy baze typu karboxylových kyselin, sulfátů, fosfátů za použití těžkých aditiv jako jsou acetáty nebo mravenčany, které jsou kompatibilní s MS detekcí [64].

3.3.2.3 Stacionární fáze modifikované polymerem

Tyto kombinované materiály mají velký potenciál - jsou mechanicky i chemicky stabilní, mají minimální nespecifickou adsorpci a je možno velmi flexibilně modifikovat jejich chromatografickou selektivitu [63]. Potažení polymerem se používá k napodobení různých silikagelových vázaných fází. Polymerní vrstva slouží zároveň k odstínění skupin typu Lewisovy kyselin. Např. polybutadien se podobá

oktylové nebo oktadecylové skupině, zatímco polystyren má podobné vlastnosti jako fenylové zbytky. Tyto dva polymery jsou nejvíce využívány k modifikaci nejen ZrO₂, ale i dalších oxidů [63]. Mnoho studií ukazuje, že kovové oxidy modifikované polymerem mají vysokou účinnost, pH stabilitu, životnost a chromatografickou selektivitu. Většina kovových oxidů modifikovaných polymerem má, na rozdíl od polymerních kolon, účinnost srovnatelnou se silikagelovými vázanými fázemi [93,94].

3.3.2.3.1 ZrO₂ modifikovaný polybutadienem - PBD-ZrO₂

ZrO₂ modifikovaný polybutadienem má excelentní chemickou i tepelnou stabilitu [63,86,95]. PBD-ZrO₂ má také výjimečnou stabilitu za bazického pH. Degradáční proces nebyl pozorován ani po vystavení dlouhodobému vlivu 1M NaOH nebo vysoké teploty [96,97,98]. Díky teplotní stabilitě je možno tyto stacionární fáze využít i za mnohem vyšších teplot než je v HPLC běžné. Výhodou je vyšší účinnost kolony díky zvýšené difúzi ve stacionární fázi. Protože vyšší teplota snižuje C-člen v Knoxově rovnici (vyjadřuje odpor proti přenosu hmoty mezi fázemi) je možno díky tomuto efektu využít i vyšší průtoky mobilní fáze a zkrátit tak čas analýzy. Za vyšších teplot se také může měnit selektivita PBD-ZrO₂ [98,99].

Chromatografické vlastnosti PBD-ZrO₂

Vlastnosti PBD-ZrO₂ jako stacionární fáze pro RPLC byly systematicky studovány a srovnány s běžnými silikagelovými RPLC C18 a C8 stacionárními fázemi [94,99,100,101,102]. Pro jednoduché látky neelektrolytové povahy, kdy analyt znatelně neinteraguje s povrchem ZrO₂, jsou retence a selektivita podobné reverzním silikagelovým fázím. Míra interakcí těchto analytů s Lewisovými kyselinami byla studována na souboru 26 rozdílných látek za použití mobilní fáze s přídatkem a bez přídatku Lewisovy base (fluorid). Interakce se skupinami typu Lewisových kyselin byly pozorovány pouze u *p*-chlorphenolu [102]. Podobných výsledků bylo dosaženo i na vzorku 22 látek a tří typů stacionárních fází – silikagelové, polymerní a PBD-ZrO₂ [63].

Retence ionizovatelných nebo nabitých látek je výrazně rozdílná na PBD-ZrO₂ a běžných reverzních fázích, jak je možno vidět na příkladu antihistaminik [85], viz obr. 19.

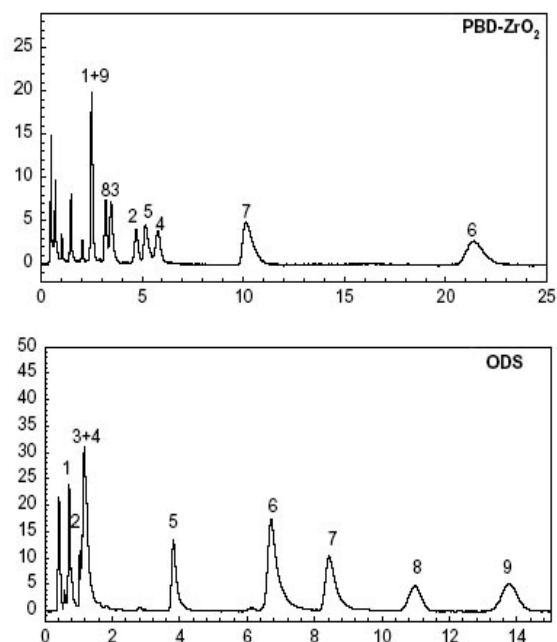
Vliv počtu methylenových jednotek n_{CH_2} na $\ln k'$

V RPLC je retence ($\ln k'$) v homologických řadách přímo úměrná počtu methylenových skupin. K popsání chování PBD-ZrO₂ v reverzním módu, byly studovány série alkybenzenů na stacionárních fázích s různým obsahem uhlíku a za použití ACN i MeOH v mobilní fázi [103]. Byla prokázána lineární závislost mezi $\ln k'$ a počtem methylenových skupin pro každou mobilní fázi i pro kolony s různým obsahem uhlíku. Sklon přímek lineárního proložení byl téměř shodný a není tedy

závislý na obsahu uhlíku ve stacionární fázi. Tímto bylo prokázáno reverzní chování PBD-ZrO₂. Ve srovnání se silikagelovou C18 fází má PBD-ZrO₂ jen menší hydrofobicitu.

Obr. 19 Srovnání selektivity PBD-ZrO₂ a ODS stacionární fáze, převzato z ref. 85.

- (1) feniramin; (2) chlorfeniramin;
 (3) thenyldiamin; (4) bromfeniramin;
 (5) cyklizin; (6) pyrrobutamin;
 (7) chlorcyklizin; (8) thonzylamin;
 (9) meklizin.



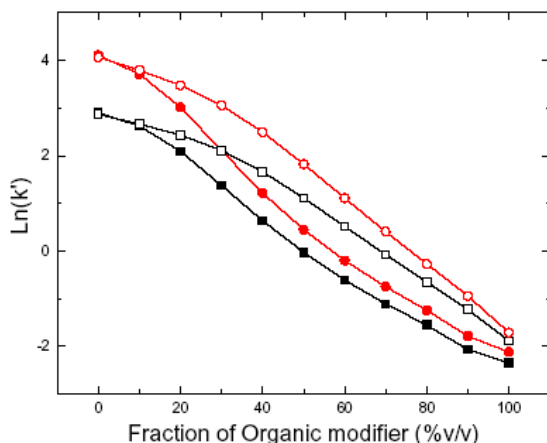
Vliv koncentrace ACN a MeOH v mobilní fázi na ln k'

Dalším významným aspektem využití PBD-ZrO₂ v RPLC je efekt složení mobilní fáze na retenci, protože změna v jejím složení je základním prvkem v optimalizaci HPLC separace [103]. Na běžných stacionárních fázích klesá retence neionogenních látek se zvyšujícím se % organické složky mobilní fáze. Na obr. 20 je závislost ln k' na % organické složky mobilní fáze pro benzen a toluen. V mobilní fázi obsahující methanol je závislost lineární cca v intervalu 35-100%. Snížení obsahu MeOH pod 35 % již nemá na retenci analytu tak výrazný efekt. Závislost ln k' na % ACN není lineární v tak širokém intervalu jako u MeOH. Linearita byla pozorována v rozmezí 20-50 % a 50-90 %.

Vliv imobilizovaného PBD na k' a na HETP

Množství PBD, který se použije k modifikaci povrchu ZrO₂ výrazně ovlivňuje počet dosažených teoretických pater [101]. Dle teoretického předpokladu je účinnost kolony závislá na relativní retenci k', což bylo ověřeno na běžných ODS fázích. Nejvýraznější rozdíl mezi PBD-ZrO₂ a běžnou stacionární fází je závislost C členu Knoxovy rovnice na množství PBD použitého k modifikaci ZrO₂. Bylo zjištěno, že při vyšším procentu ukotveného polymeru dochází k nárůstu C členu v Knoxově rovnici, což odráží relativně větší odpor k přenosu hmoty. Retence benzenu rostla lineárně s rostoucím množstvím PBD cca do 4%. Pokud bylo na ZrO₂ imobilizováno více PBD, retence výrazně vzrostla, což se vysvětluje formováním polymerních klastrů uvnitř částic a omezením jejich průchodnosti polymerem [103].

Obr. 20 Závislost $\ln k'$ pro toluen a benzen na % organické složky v mobilní fázi; stacionární fáze PBD-ZrO₂. Čtverce odpovídají benzenu, kroužky toluenu; prázdné symboly odpovídají mobilní fázi MeOH-voda, plné symboly odpovídají mobilní fázi ACN-voda, převzato z ref. 103.

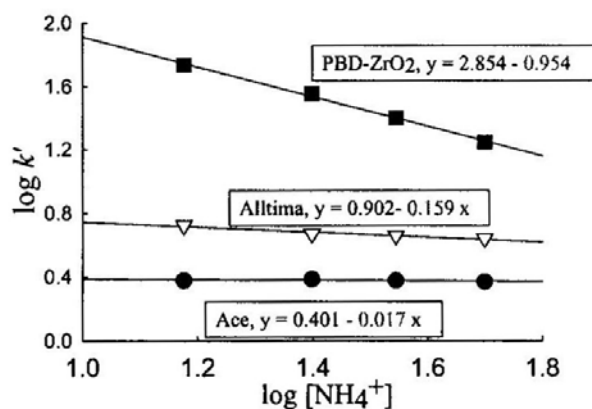


Srovnání retenčních mechanismů na PBD-ZrO₂ a stacionárních fází s navázaným alkylem pro organické baze

Jak už bylo uvedeno dříve, tak se ZrO₂ chová jako silná Lewisova kyselina a může adsorbovat velmi pevně silné Lewisovy baze (analyt nebo složka mobilní fáze). Část povrchu ZrO₂ zůstává i po potažení polymerní vrstvou přístupná těmto interakcím. Adsorpční izoterma anorganického fosfátu, běžného pufru v RPLC, je saturována při koncentraci 1,5 – 1,7 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}$ [63]. Z toho plyne, že povrch má silný negativní náboj v široké škále pH. Negativní náboj se zachovává i v pH 2 a při retenci analytu se uplatňuje jak reverzní fáze, tak kation-výměnný efekt - „mixed“ mód. Situace je podobná jako u kolon na bázi SiO₂, kde díky ionizaci silanolových skupin dostává povrch také negativní náboj – ovšem až při vyšším pH. Avšak mezi oběma fázemi existuje mnoho kvalitativních i kvantitativních rozdílů v retenčním procesu [76,77,78,85,104]:

- organické baze mají obvykle vyšší hodnotu k' na ZrO₂ kolonách modifikovaných polymerem než na SiO₂ fázích s vázaným alkylem, přestože u SiO₂ kolon je daleko větší povrch sorbentu;
- podstatné rozdíly v selektivitě jsou běžně patrné při srovnání zirkoniových a silikagelových kolon;
- použitý pufr má u PBD-ZrO₂ obvykle významný vliv na retenci organických bazí; také vliv koncentrace použitého pufru je mnohem výraznější než u silikagelových stacionárních fází, viz obr. 21;
- retence organických bazí na PBD-ZrO₂ daleko citlivější na stupeň substituce nabitého dusíkového atomu.

Obr. 21 Porovnání závislost retence *p*-butylbenzenaminu na koncentraci NH₄⁺ na dvou silikagelových reverzních fázích a PBD-ZrO₂; podmínky MeOH-fosforečnan amonný (pH 7), (55:45, v/v); teplota 35°C, převzato z ref. 77.



Všechna výše uvedená fakta nasvědčují, že kation-výměnný mechanismus má výrazný vliv na retenci organických bází na ZrO₂ reverzních fázích ve srovnání silikagelovými materiály s navázaným alkylem. Tato hypotéza byla potvrzena ve studii, kde byla zkoumána závislost retence u *p*-alkylbenzylaminů na koncentraci amoniových iontů v eluentu [104]. Bylo prokázáno, že mnohdy méně jak z 20-ti % je organická база zadržována na PBD-ZrO₂ čistě reverzními interakcemi, zatímco na silikagelových stacionárních fázích se reverzní mechanismus podílel na retenci více jak z 90-ti %.

Výsledky studií zabývající se studiem retenčního mechanismu na PBD-ZrO₂ je možno shrnout do následujících bodů:

- PBD-ZrO₂ je chemicky a tepelně stabilní;
- PBD-ZrO₂ se chová jako reverzní fáze s podobnou selektivitou jako u ODS fází pro neionizovatelné látky;
- výměna ligandů způsobuje nízkou efektivitu separačního procesu pro kyseliny, pokud není v mobilní fázi přítomna silná Lewisova база;
- vzájemná kombinace hydrofobních interakcí a iontově výměnných interakcí, které byly pozorovány pro bazické látky, mají zásadní vliv na retenci a selektivitu ve srovnání s reverzními fázemi na bázi SiO₂.

3.3.2.3.2 ZrO₂ modifikovaný polystyrenem - PS-ZrO₂

Tento typ stacionární fáze byl prvně popsán Sharyginem již v roce 1991. Nový typ modifikovaného ZrO₂ polystyrenem byl vyvinut skupinou P. W. Carra [63], [105], [106], [107] jako alternativní stacionární fáze pro analyty, které se nedostatečně separují na PBD-ZrO₂. Díky přítomnosti styrenových jednotek je dosaženo unikátní selektivity pro látky aromatického charakteru.

Zhao a Carr studovali vlastnosti PS-ZrO₂ a porovnávali dosažené výsledky s PBD-ZrO₂ [106]. U obou fází je vrstva polymeru vázána k povrchu prostřednictvím fyzikálních sil. Avšak vzhledem k odlišnosti v procesu potažení ZrO₂, byly u obou fází pozorovány rozdíly ve struktuře pórů. Výrobní proces PS-ZrO₂ vycházel z jednotlivých monomerů, zatímco k modifikaci povrchu ZrO₂ polybutadienem byl použit již hotový polymer. Hlavním rozdílem mezi oběma fázemi je v oblasti malých pórů (<100 Å). U PS-ZrO₂ byl pozorován vznik mikropórů (<20 Å), které vznikají pravděpodobně díky vyššímu stupni zesílení polymeru než u PBD-ZrO₂. Mikropóry jsou ve většině případů nežádoucí, protože molekulární difúze a přenos hmoty v nich je pomalý. Avšak studium závislosti HETP (výškový ekvivalent teoretického patra) na průtokové rychlosti u PS-ZrO₂ prokázala minimální odpor k přenosu hmoty [106]. C člen v Knoxově rovnici byl pouze 0,003. Navíc rozšíření píku vlivem pomalého transferu hmoty mezi stacionární a mobilní fází byl výraznější u PBD-ZrO₂ (C člen Knoxovy rovnice 0,07). To naznačuje, že při potažení PS dochází ke vzniku tenčí a více uniformní vrstvy polymeru než u PBD nebo dochází k menší obstrukci pórů vlastním polymerem.

Stabilitu i výborné separační vlastnosti PS-ZrO₂ při nízkém i vysokém pH dokumentoval Kurganov et al. [100]. Zhao a Carr [106] testovali stabilitu PS-ZrO₂ v oblasti pH 1-13 a za vysoké teploty. Degradace polymerní vrstvy však nebyla pozorována ani po promytí tisíci objemy kolony agresivní mobilní fází (0,1M HNO₃, 0,1M NaOH).

Na základě tzv. LSER (linear solvation energy relationship) studií i na základě separací různých skupin látek byla prokázána odlišnost PS-ZrO₂ od PBD-ZrO₂ a dalších RPLC fází včetně fenylových fází na bázi silikagelu [105,107]. PS-ZrO₂ a PBD-ZrO₂ jsou si podobné téměř ve všech LSER parametrech mimo poměru „ r/v “, který je podstatně větší pro PS-ZrO₂. Tento poměr je měřítkem příspěvku polarizovatelnosti molekuly k retenci. Daleko větší hodnota poměru r/v u PS-ZrO₂ ukazuje zapojení π -elektronů do separačního procesu. Rozdíly ve vlastnostech obou stacionárních fází se výrazně projeví v separační schopnosti alkybenzenů a polyaromatických uhlovodíků. Retence alkybenzenů je na PS-ZrO₂ slabší než retence polyaromatických uhlovodíků, zatímco na PBD-ZrO₂ je tomu naopak [107]. Dále např. PS-ZrO₂ má daleko větší selektivitu pro polohové izomery, které se liší v pozici fenylové skupiny. PS-ZrO₂ byla srovnána i s fenylovou stacionární fází na bázi silikagelu a dále pak s polymerní stacionární fází na bázi polystyren-divinylbenzenové pryskyřice [105,107]. Byla nalezena podobnost u kolony se stacionární fází na bázi polystyren-divinylbenzenové pryskyřice ve smyslu vlivu polarizovatelnosti na retenci. Výhodou PS-ZrO₂ je však odlišná selektivita a výrazně redukovaný čas analýzy. Zajímavé bylo zjištění, že na studované skupině izomerů se neprojeví výhody fenylové fáze nad C18 fází. Závěrem lze říci, že PS-ZrO₂ je

vhodným kandidátem pro obtížné separace, když není dosaženo potřebné separace na PBD-ZrO₂ nebo konvenční silikagelové stacionární fázi [107].

3.3.2.3.3 ZrO₂ modifikovaný polyethyleniminem

Iontově výměnná LC je technika vhodná pro separaci malých anorganických i organických nabitých molekul. Stejně tak se hodí pro separace biomolekul jako jsou peptidy, proteiny, nukleové kyseliny atd. [2,63]. Polyethylenimin je polymer hojně používaný pro modifikaci různých materiálů včetně silikagelu, Al₂O₃, ZrO₂, TiO₂ [63]. Cílem modifikace je získat chromatografický materiál s iontově-výměnnými vlastnostmi. Hlavním problémem silikagelových materiálů je jejich malá chemická stabilita převážně v bazickém prostředí [2,22,24]. U polymerních materiálů je tento nedostatek odstraněn, ale jsou méně mechanicky odolné kvůli objemovým změnám v organické fázi, v extrémních pH nebo při změně iontové síly mobilní fáze [2]. Díky chemické a tepelné odolnosti ZrO₂ je možno jeho modifikací získat stabilnější iontoměnič [63].

WAX - slabý anex (weak anion exchanger)

Hydrofobicita stacionární fáze, její chemická a termální stabilita je ovlivněna druhem tzv. cross-linkeru. Při použití 1,4 butandioldiglycidyletheru vznikl slabý anex, stabilní jen v rozmezí pH 3-9. Eluční pořadí některých anorganických aniontů bylo na tomto iontoměniči shodné jako u materiálu na bázi silikagelu [108]. Tuto stacionární fázi lze použít pro separaci biomolekul (proteiny, nukleotidy), ale je nestabilní ve vyšším pH [109].

SAX silný anex (strong anion exchanger)

Pomocí dvou cross-linkerů 1,10-dijoddekanu a 1,2-bis-(2-jodethoxy)ethanu se podařilo připravit chemicky a tepelně odolné SAX. Obě fáze se liší ve své hydrofobicitě (prvně jmenovaná je více hydrofobní). Na SAX (cross-linker 1,10-dijoddekan) se podařilo separovat oligonukleotidy, které se lišily v délce jen o jeden nukleotid [109]. Tato fáze je také tepelně (do 100°C) a chemicky stabilní (pH 1-13). Hydrofobicita je obdobná jako u běžné ODS fáze [110]. Na retenci se podílejí převážně interakce elektrostatické, hydrofobní a interakce mezi Lewisovou kyselinou a bazí. Druhý typ SAX se díky své nižší hydrofobicitě uplatňuje při separaci velkých biomolekul, jako jsou např. proteiny. Tento materiál byl s úspěchem použit při purifikaci inzulinu od lipopolysacharidů *E.coli* [111]. Kontaminace byla snížena z původní hodnoty 5·10⁶ endotoxinových jednotek na mililitr na méně než 5 endotoxinových jednotek na mililitr.

3.3.2.3.4 ZrO₂ modifikovaný uhlíkem - C-ZrO₂

Porézní grafitizovaný uhlík je pro účely HPLC připravován synteticky ve tvaru porézních kulovitých částic o různé velikosti. Separace na tomto typu sorbentu se

poněkud liší od separací na silikagelových kolonách s vázanými C8, C18 fázemi. Obecně lze říci, že retence není závislá jen na hydrofobicitě látek. Bylo prokázáno, že u aromatických látek je retence ovlivněna i elektrostatickými interakcemi mezi aromatickým kruhem a hexagonální mřížkou grafitizovaného uhlíku. Tyto interakce mohou výrazně ovlivnit selektivitu [2,62]. Idea spojení obou materiálů vychází z následujících vlastností:

- chemická rezistence vůči bazím, kyselinám i organickým rozpouštědlům
- mechanická stabilita
- odlišná chromatografická selektivita

ZrO₂ je ideálním materiálem pro tento typ modifikace, protože může být zahříván až do teploty 700°C, aniž by se změnila struktura jeho pórů a navíc atomy Zr^{IV} katalyzují přeměnu organických látek na uhlík [24,63]. Modifikace povrchu je poměrně jednoduchý a vysoce reprodukovatelný proces. Je možno dosáhnout pokrytí až z 97% povrchu ZrO₂ uhlíkem.

Adsorpce analytu na povrch stacionární fáze je závislá také na tvaru molekuly, a proto mají tyto stacionární fáze výbornou selektivitu vůči geometrickým izomerům narozdíl od stacionárních fází s vázanými řetězci nebo fází modifikovaných polymerem [112]. Weber a Carr dokládají odlišnou selektivitu na C-ZrO₂ pro geometrické izomery než jaká byla pozorována u běžné C18 fáze [113]. Schopnost C-ZrO₂ separovat izomery byla dále doložena na analýze diastereoizomerů např. warfarinu, některých aminokyselin a alkoholů s α -methoxy- α -(trifluormethyl)-fenylnacetylchloridem (MTPA-Cl) [114].

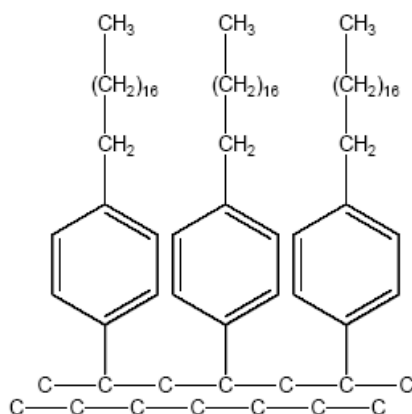
ZrO₂ modifikovaný uhlíkem se liší od fáze s navázaným alkylem následujícími vlastnostmi:

- je více selektivní pro separaci polárních i nepolárních geometrických izomerů;
- je více hydrofobní;
- narozdíl od fází s navázaným alkylem jsou polární analyty také zadržovány π - π interakcemi [115].

Nedávno se podařilo modifikovat uhlíkový povrch prostřednictvím reakcí s diazoniovou solí a navázat tak na tento povrch C18 řetězec, viz obr. 22. Tato fáze je stabilní v celém rozsahu pH při 40°C a je také termálně stabilní do 200°C v neutrálním pH [63,95].

3.3.3 Separace za zvýšené teploty

Tepelná a chemická stabilita ZrO₂ umožnila vývoj ultrarychlé HPLC, která je založena na použití daleko vyšší teploty, než která je tolerována běžnou silikagelovou kolonou.

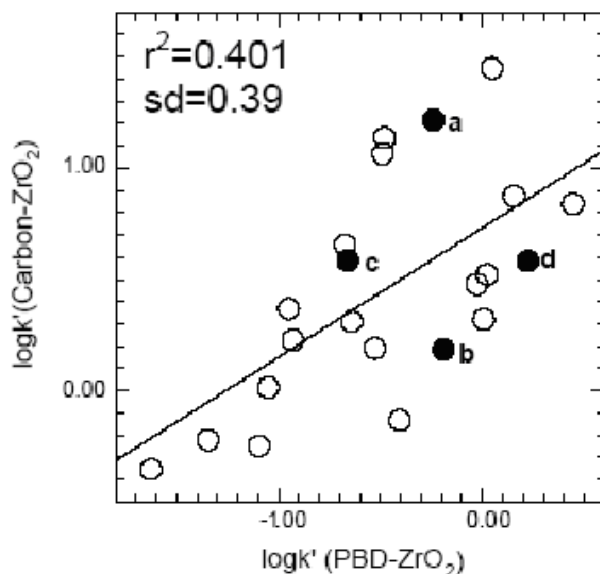
Obr. 22 Povrch C-ZrO₂ modifikovaný oktadecylovými řetězci, převzato z ref. 64,95.

Vysoká teplota výrazně urychluje analýzu díky poklesu viskozity mobilní fáze a zvýšení počtu ustanovujících se rovnovážných stavů mezi fázemi. Dále bylo prokázáno, že rychlý průchod analytu kolonou kompenzuje v mnoha případech jeho degradaci na koloně. Teplota výrazně ovlivňuje retenci, efektivitu separace a selektivitu u větších molekul a v menším rozsahu malých molekul. V současné době stále přibývá separací, které využívají zvýšené teploty pro separaci nejrůznějších analytů [72,97,98,99,116,117,118,119]. Vysoká teplota redukuje obsah organických rozpouštědel v mobilní fázi. Voda má při teplotě 200-250°C podobnou polaritu jako MeOH, proto může být použita jako mobilní fáze pro RPLC [72,117,118,119]. Fields studoval retenci derivátů testosteronu na PBD-ZrO₂ za použití vody při teplotě kolonového prostoru 160°C [72]. Bylo dosaženo obdobné selektivity jako u konvenční HPLC. Protože bylo opakovaně prokázáno, že PBD-ZrO₂ je dlouhodobě stabilní při vysokých teplotách [72,96,97,98], byla tato stacionární fáze použita ke studiu vlivu teploty na selektivitu. Vliv teploty na selektivitu je závislý na druhu analytu. Pro látky podobné struktury nebo s podobnými funkčními skupinami nemá změna teploty žádný efekt. Avšak pro látky s odlišnými funkčními skupinami se může selektivita měnit s teplotou. Dále bylo prokázáno, že vysoká teplota může vylepšit efektivitu separace až o 30 % hlavně díky zvýšení difúzního poměru ve stacionární fázi [98,99].

Selektivita mezi jednotlivými ZrO₂ fázemi se výrazně liší, např. C-ZrO₂ a PBD-ZrO₂ jsou obě reverzní fáze, ale jejich selektivita je značně rozdílná [120]. Korelace mezi retencí na C-ZrO₂ a PBD-ZrO₂ je minimální. Z obr. 23 je patrné, že analyty „a“ a „b“ jsou těžko separovatelné na PBD-ZrO₂, ale lze je velmi snadno rozdělit na koloně C-ZrO₂. Pro analyty „c“ a „d“ to platí opačně. Ovšem kombinace obou stacionárních fází může mít zásadní efekt na separační schopnost celého systému. Na základě těchto výsledků je možný vývoj dalších aplikací na zirkoniových stacionárních fázích a to v tzv. T³C konceptu (termaly tuned tandem column concept). Tento systém je založen na využití dvou tandemových kolon, které se liší selektivitou. Každá kolona je individuálně teplotně kontrolována. Selektivita systému

je pak laděna pomocí teploty. T³C koncept byl využit pro separace různých látek např. barbiturátů, fenylothiohydantoin-aminokyselin na ODS a C-ZrO₂; triazinů, karbamátů a některých bazických léčiv v systému ODS a PBD-ZrO₂ [120,121,122].

Obr. 23 Porovnání retence a selektivity na C-ZrO₂ a PBD-ZrO₂ stacionárních fázích, převzato z ref. 120.



3.3.4 Chirální stacionární fáze na bázi ZrO₂

HPLC je v současné době dominantní technikou i pro separace optických antipodů. Dnes existuje celá řada chirálních stacionárních fází (CSP), které jsou schopny separovat různé chirální látky. Některé z nich jsou univerzálnější, jiné jsou vhodné pro užší skupinu látek nebo jsou vyvinuté tzv. „na míru“.

ZrO₂, díky chemické i termální stabilitě, je také zkoumán jako vhodný nosič pro chirální stacionární fáze.

3.3.4.1 Zirkoniová CSP na bázi tris(3,5-dimethylfenyl)karbamátu celulosy

Castells a Carr nejprve publikovali přípravu chirální zirkoniové stacionární fáze potažením tris(3,5-dimethylfenyl)karbamátem celulosy na 2,5 μm částice ZrO₂. Optimální množství chirálního polymeru ukotvené na ZrO₂ bylo 3%. Na základě dynamických studií bylo prokázáno, že kolony s vyšším obsahem polymeru jsou méně efektivní [123]. V následující studii zkoumali možnosti jejího využití v NPLC na skupině bazických látek včetně několika β-blokátorů. Byl sledován vliv experimentálních podmínek na separaci jednotlivých enantiomerů (složení mobilní fáze, vliv aditiv, teploty a rychlosti průtoku) [124]. Výsledky lze shrnout následovně:

- optimalizací složení mobilní fáze hexan:alkohol (ethanol, propan-1-ol, propan-2-ol, butan-1-ol a *terc.*-butanol) a přidavku bazického aditiva

k mobilní fázi (diethylamin, ethanolamin a 2-(ethyl)aminoethanol) bylo dosaženo enantioseparace pro většinu látek zahrnutých do studie. Ve všech případech bylo rozlišení nejlepší za laboratorní teploty;

- β -blokátory, které nemají ve struktuře etherový můstek, se nepodařilo chirálně rozdělit, tzn. že kyslíkový atom se aktivně podílí na interakci s CSP. Záměnou ethanolu za butan-1-ol resp. za *terc.*-butanol se podařilo separovat 4 enantiomery nadololu;
- kombinací malého průměru částic (2,5 μm), krátké kolony (7,5 cm) a vysokého průtoku (3-4 $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$) se podařilo většinu látek separovat v čase cca 1 minuta s výborným rozlišením ($R_s > 2$).

Vliv teploty na chirální separaci za použití výše zmíněné CSP byl zkoumán v další studii [125]. U většiny studovaných sloučenin bylo pozorováno předpokládané chování. Selektivita CSP pro danou skupinu látek klesala s rostoucí teplotou. Avšak u dvou látek (*trans*-stylbenoxid; 1-(9-antryl)-2,2,2-trifluorethanol) byla nalezena opačná závislost selektivity na teplotě separace. S rostoucí teplotou se pro tyto dva analyty zlepšila selektivita CSP.

3.3.4.2 Zirkoniová CSP na bázi BSA a karboxymethyl- β -cyklodextrinu

J. H. Park et al. [126] a S. Y. Park et al. [127] publikovali využití modifikovaného ZrO₂ pomocí BSA (bovinní sérový albumin) [126] a karboxymethyl- β -cyklodextrinu [127] v reverzním módu.

Kvůli nestabilitě kovalentní vazby Zr-C a Zr-O-C byl BSA ukotven na ZrO₂ pomocí glutaraldehydu. Chirální bazické látky byly separovány s velkou selektivitou, díky malé retenci prvního enantiomeru. Tato skutečnost naznačuje malý příspěvek neselektivních interakcí k enantioseparaci a možnou denaturaci takto imobilizovaného BSA. Výsledkem jsou neobvyklé enantiodiskriminační vlastnosti této stacionární fáze [126]. Na tuto práci navazuje studie, ve které se autoři pokoušeli imobilizovat na povrch ZrO₂ karboxymethyl- β -cyklodextrin. Pomocí této zirkoniové CSP byly separovány dinitrofenylderiváty aminokyselin. Byl studován vliv složení mobilní fáze a jejího pH na retenci a enantioselektivitu. I přesto, že se autorům nepodařilo imobilizovat dostatečné množství chirálního selektoru na částice oxidu zirkoničitého jsou tyto pilotní výsledky příslibem do budoucna [127].

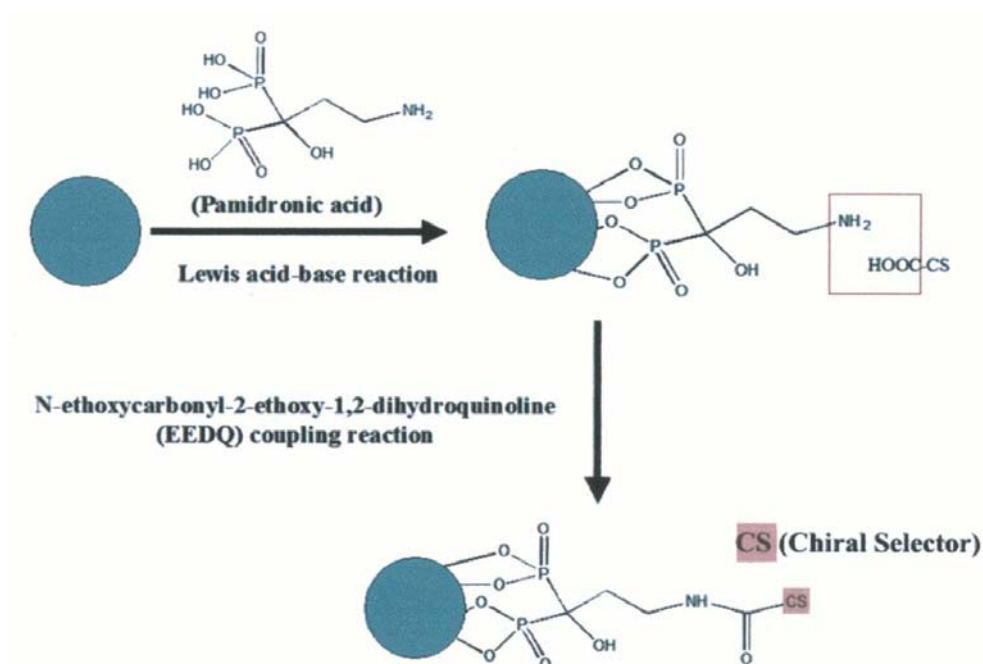
3.3.4.3 Komerčně dostupné CSP na bázi ZrO₂

První komerčně dostupné chirální stacionární fáze byly uvedeny na trh až během roku 2005 firmou Zirchrom Separations, Inc. Díky tomu, že atomy zirkonia působí jako Lewisovy baze, je možno navázat chirální stacionární fázi prostřednictvím spojujícího řetězce, který má silné elektron-donorové vlastnosti. Chirální fáze vznikají jednoduchou dvoustupňovou syntézou, kdy v prvním stupni je na povrch ZrO₂ navázán spojující řetězec a v druhém stupni je navázána CSP, viz obr. 24. Tyto

stacionární fáze mají výbornou stabilitu za podmínek NPLC, ale mohou být kompletně vymyty ve vodném alkalickém prostředí. V současné době je zatím k dispozici pět typů chirálních kolon s Pirklovými fázemi [64]:

- (*S*)-3,5-dinitrobenzoylleucin
- (*S*)-3,5-dinitrobenzoylfenylglycin
- (*R*)-3,5-dinitrobenzoylfenylglycin
- (*S*)-*N*-[1-(1-naftyl)ethyl]jantarová kyselina
- (*R*)-*N*-[1-(1-naftyl)ethyl]jantarová kyselina

Obr. 24 Příklad navázání chirálního selektoru pomocí spojovacího řetězce na ZrO₂, převzato z ref. 64.



3.4 Chirální stacionární fáze v HPLC

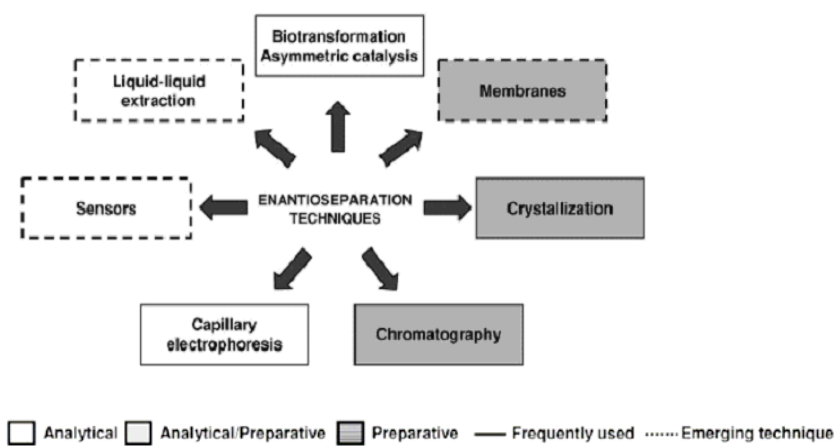
Optická izomerie je spojena s přítomností asymetrického centra (nejčastěji uhlíkového atomu). Na tomto atomu jsou vázány čtyři různé substituenty, které lze uspořádat dvojím způsobem, aniž by bylo možné je jakýmkoliv posunem či rotací vzájemně ztotožnit. Izomery lišící se tímto uspořádáním se nazývají enantiomery. Enantiomery mají identické fyzikální a chemické vlastnosti, pokud na ně nepůsobí opticky aktivní látky nebo prostředí. Liší se chováním vůči polarizovanému světlu, jehož rovinu stáčí v opačném smyslu avšak o stejnou hodnotu. Podle smyslu otáčení rozlišujeme enantiomery (+) a (-). Obecně používaná nomenklatura označuje optické izomery předponami R (rectus) a S (sinister). V tomto případě mluvíme o tzv. absolutní konfiguraci a k určení priority substituentů je použito atomového čísla prvních, popřípadě dalších atomů vázaných na chirální centrum. R a S konfigurace se určí podle směru poklesu priorit jednotlivých substituentů. Směr tohoto otáčení se může, ale nemusí shodovat s otáčením roviny polarizovaného světla [11].

Chiralita nás provází na každém kroku naší existence, např. sledování racemizace aminokyselin se využívá k určování věku jedinců a i k datování archeologických nálezů [10]. Mezi oblastmi, kde se chiralitě věnuje zvýšená pozornost, patří především sledování enantioselektivního účinku léčiv, zkoumá se však i odlišné působení enantiomerů pesticidů a složek potravin [11,128]. Téměř polovina používaných léčiv má chirální charakter. Je známo, že farmakologický efekt je ve většině případů omezen na jeden enantiomer – eutomer. Druhý enantiomer je označován jako distomer a může být pouze méně aktivní až neaktivní nebo může být zodpovědný za vedlejší účinky racemátu (antagonistický, toxický nebo jiný farmakologický efekt). Dále se enantiomery mohou lišit v absorpci, distribuci, vazbě na proteiny, afinitě k receptoru popř. metabolismem [11,10,128,129]. Poměr účinnosti eutomeru a distomeru se nazývá eudismický a jeho logaritmus je označován jako eudismický index. Minimálně v sériích strukturně podobných látek byla prokázána lineární závislost mezi eudismickým indexem a afinitou eutomeru (v logaritmické formě) – směrnice této závislosti je mírou stereoselektivity systému. Pokud tedy máme látku s chirálním centrem, jejíž enantiomery mají podobou účinnost, je velmi pravděpodobné, že v dané skupině látek nebylo dosaženo optimální účinnosti [11]. Pro vývoj většiny léčiv platí, že látky obsahující chirální centrum mají větší předpoklady pro interakci s receptory. Proto není překvapivé, že v posledním desetiletí výrazně stoupá počet i produkce chirálních léčiv. V období let 1997 - 2001 stoupla jejich produkce téměř o 69 %. K smysluplnému přechodu od racemického k opticky čistému léčivu tzv. „chiral switch“ se přistupuje zejména v případech, kdy se použití čistých izomerů vyznačuje lepším terapeutickým indexem, přináší prodloužení účinku nebo se vyznačuje nižším sklonem k interakcím s jinými látkami [11].

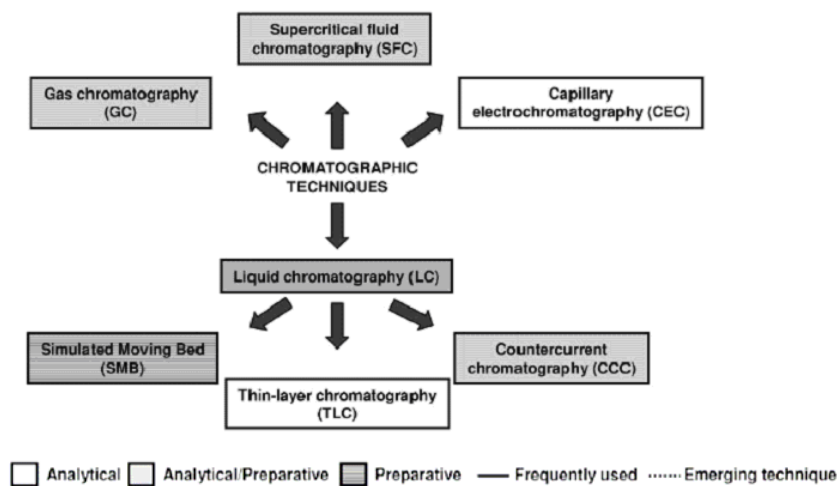
Všechny uznávané lékopisné monografie již reflektují tyto současné trendy ve vývoji léčiv. Současná politika FDA (Food and Drug Administration) požaduje u nově zaváděných léků popis všech izomerů daného léčiva, včetně stanovení účinků a farmakokinetiky. Tato politika se výrazně odráží i v doporučení ICH (International Conference on Harmonisation) pro hodnocení nových chirálních léčiv [10,129,130,131]. Ideální způsob pro získání čistého enantiomeru by byla asymetrická syntéza, ale tento postup není vždy proveditelný a je náročný na finanční prostředky. Navíc je často vyžadována kontrola intermediátů reakcí a finálních produktů [129].

Optické izomery lze oddělit libovolnou technikou pokud se vytvoří stereoselektivní prostředí. Hlavní techniky používané k dělení enantiomerů jsou shrnuty na obr. 25. Do popředí zájmu se dostaly separační metody, především HPLC a kapilární elektroforéza (CE). Větší robustnost chromatografických metod je předpokladem pro jejich širší uplatnění v provozních laboratořích [128,129]. Přehled chromatografických metod je na obr. 26.

Obr. 25 Přehled metod umožňující separaci optických izomerů, převzato z ref. 10.



Obr. 26 Přehled chromatografických technik používaných k separaci optických izomerů, převzato z ref. 10.



V HPLC se pro separaci enantiomerů využívají:

a) nepřímé metody – jsou založeny na reakci racemátu s opticky čistým derivatizačním činidlem. Výsledkem reakce jsou tzv. diastereoizomery, které se liší jak ve svých fyzikálních, tak chemických vlastnostech. Diastereoizomery je možno separovat v běžném achirálním HPLC systému. Většinou se provádí v reverzním uspořádání kvůli větší selektivitě pro izomery. Tento přístup byl rozšířen během sedmdesátých a osmdesátých let dvacátého století. V současné době jsou preferovány pro dělení jednotlivých enantiomerů přímé metody (méně časově náročné, odpadá riziko racemizace vzorku při derivatizační reakce) [2,129].

b) přímé metody – jsou založeny na přímé interakci enantiomerů s chirálními selektory. Experimentální provedení je dvojí - využití chirální stacionární fáze nebo přídavek chirálního aditiva do mobilní fáze. Enantiomery tvoří s aditivem dočasné diastereoizomerní komplexy, které je možno oddělit pomocí běžné HPLC. Tento přístup k chirálním separacím se uplatňuje především v elektromigračních technikách [2]. V HPLC se přidávání chirálního selektoru do mobilní fáze nerozšířilo vzhledem k několika nevýhodám:

- velká spotřeba drahých chirálních selektorů;
- problémy s detekcí;
- nízká efektivita separace (nesymetrické píky, nízký počet teoretických pater).

V současné době je na trhu více jak 100 typů CSP. Některé kolony jsou univerzálnější a některé jsou vhodnější jen pro separaci užší skupiny látek [2]. Zatím neexistuje žádný sofistikovaný model, dle kterého by bylo možno na základě struktury analytu vytipovat vhodnou chirální kolonu. Separace strukturně blízkých látek může sloužit jako orientační vodítko, ale vždy je nutno vyzkoušet konkrétní CSP pro konkrétní analyt [132].

CSP jsou kovalentně nebo iontově vázány popř. fyzikálně ukotveny na achirálním nosiči (silikagel, aminopropylsilikagel). Při interakcích enantiomeru s CSP vznikají na velmi krátkou dobu diastereoizomerní komplexy. V případě, že jsou vazebné interakce jednoho enantiomeru s CSP silnější, dochází k chirální separaci. Mechanismus chirálních separací není zatím zcela objasněn a je stále studován. Obecně se předpokládá, že pro rozdělení dvou enantiomerů je třeba nejméně tříbodová interakce enantiomeru s CSP, přičemž alespoň jedna musí být stereospecifická [2,129]. Většinou se nejedná o jeden typ interakce ale o kombinaci více rozdílných sil. Na vytvoření dočasného diastereoizomerního komplexu se podílí vodíkové můstky, π - π interakce, dipól-dipól interakce, inkluzní komplexy a sterické vlivy. V tab. 1 jsou shrnuty základní typy interakcí pro nejužívanější CSP, které se podílí na chirální separaci. Při volbě systému pro chirální separace je důležité zohlednit strukturu analytu (rozpustnost v různých rozpouštědlech, schopnost tvorby

H-můstků, π - π interakcí, pKa, funkční skupiny, UV spektrum, přítomnost či absence objemných substituentů, schopnost vytvářet inkluzní komplexy). Důležitým faktorem je zhodnocení přítomnosti funkčních skupin a jejich schopnost podílet se na interakcích s CSP nebo jim stericky bránit. Prostorové uspořádání těchto skupin vzhledem k chirálnímu centru hraje velmi důležitou roli. Ve většině případů platí, že čím blíže je skupina chirálnímu centru, tím větší vliv má na separaci optických antipodů. Pokud studovaná molekula nemá funkční skupiny, které by mohly interagovat s CSP, je nutno provést derivatizaci [2].

Chirální separace v preparativním měřítku – většina komerčně dostupných kolon je v analytickém provedení a některé CSP se dodávají i pro preparativní chromatografii (cyklodextrinové, polymerní polysacharidové, Pirklovy). Proteinové fáze mají obecně menší kapacitu, a proto jsou méně vhodné k preparativním účelům [2,133].

3.4.1 Proteinové CSP

Proteiny jsou tvořeny aminokyselinami a glykoproteiny obsahují navíc cukernou složku. Díky své chirální podstatě váží proteiny malé molekuly např. léčiva stereospecificky a reverzibilně. Imobilizované proteiny patří k nejuniverzálnějším CSP [129,133].

Významnou výhodou imobilizovaných proteinů je jejich enantioselektivita k širokému spektru látek a kompatibilita s vodnými pufovanými mobilními fázemi, které jsou často využívány v biologických aplikacích. Na druhé straně nejsou vhodné pro preparativní účely vzhledem k menší kapacitě a vyšší ceně. Bývá uváděna i jejich nižší robustnost [133].

Stereoselektivní interakce analytu s CSP mají komplexní povahu a nejsou zcela objasněny. Proteiny tvoří trojdimenzionální strukturu a za hlavní jsou považovány hydrofobní a elektrostatické interakce, přičemž se na výsledném efektu mohou podílet i H-můstky a přenos náboje [129]. Pravděpodobně jsou do interakcí s různými látkami zapojeny odlišné části proteinů a na enantioselektivitu se může podílet také tvorba inkluzních komplexů [134,135]. Hydrofobní interakce jsou ovlivněny zastoupením organické složky v mobilní fázi. S rostoucí koncentrací organického modifikátoru jsou vzájemné interakce oslabovány a naopak. Výměna iontů mezi analytem a CSP představuje hlavní složku elektrostatických interakcí, protože imobilizovaný protein nese na svém povrchu náboj nad i pod hodnotou pI. Změnou pH mobilní fáze lze tedy kontrolovat retenci i enantioselektivitu.

V současné době byla použita celá řada různých proteinů pro separace opticky aktivních látek (sérové albuminy - HSA, BSA; glykoproteiny - AGP, ovomukoid, ovoglykoprotein, avidin, flavoprotein; enzymy – pepsin, celobiohydrolasa, lysozym, tripsin atd. [133,136].

Tabulka 1 Základní typy interakcí analytu s nejpoužívanějšími CSP.

Typ CSP	Interakce mezi analytem a CSP	Typ analytu	LC uspořádání
Proteiny	hydrofobní a elektrostatické interakce	ionizovatelná skupina (amin nebo kyselina); žádoucí přítomnost aromatického kruhu	jen reverzní mód
Cyklodextriny	inkluzní komplexy, H-můstky	planární a aromatické skupiny	reverzní, normální a polárně organický mód
Polysacharidy	inkluzní komplexy, dipól-dipól, π - π interakce, hydrofobní interakce, sterické efekty,	schopnost interakce prostřednictvím H-můstků, žádoucí stericky objemná skupina v blízkosti chirálního centra	reverzní i normální mód
Pirklovy fáze	vodíkové můstky, π - π interakce, interakce dipól-dipól	schopnost interakcí prostřednictvím H-můstků a π elektronů, žádoucí aromatická skupina	většinou normální mód; na některých typech i reverzní mód
Makrocyclická antibiotika	vodíkové můstky, π - π interakce, interakce dipól-dipól, sterické efekty, hydrofobní	schopnost interakce prostřednictvím H-můstků a π elektronů, dipól - dipól interakce, žádoucí stericky objemná skupina v blízkosti chirálního centra	reverzní, normální a polárně organický mód

Komerčně jsou dostupné kolony s bovinním (BSA), lidským (HSA) sérovým albuminem, kyselým α_1 -glykoproteinem (AGP), celobiohydrolasou (CBH), pepsinem a avidinem (AVI) [2,133,136]. Proteinové stacionární fáze jsou relativně stabilní. Obecně jsou použitelné v rozmezí pH 3-8. Tento interval je na jedné straně dán stabilitou silikagelu, který se používá nejčastěji jako nosič proteinu [133,137], a na druhé straně faktem, že v extrémních pH může dojít k denaturaci proteinu [2,133,136]. Pro každý typ stacionární výrobce přesně specifikuje, za jakých podmínek lze pracovat, aby byla zaručena maximální efektivita a stabilita dané kolony [2,137]. Přehled a charakteristika používaných selektorů je uveden v tab. 2.

α_1 -kyselý glykoprotein (AGP) a ovomukoid (OVM) obsahují vysokou koncentraci uhlovodíkových skupin. Tyto skupiny jsou pravděpodobně zodpovědné za vysokou enantioselektivitu těchto materiálů. Disulfidické můstky přispívají ke stabilitě imobilizovaného proteinu. Všechny selektory jsou imobilizovány na materiálu s velkými póry (125–500 Å), aby relativně velké molekuly proteinu pronikly i do jeho vnitřních struktur.

- Hovězí sérový albumin (BSA) je globulární protein, tvoří jej 581 aminokyselin, jeho struktura je stabilizována 17-ti disulfidickými můstky. BSA má relativně kyselý charakter a více hydrofobních vazebných skupin.
- Lidský sérový albumin (HSA) má přibližně stejnou molekulovou hmotnost jako BSA, ale pro mnoho analytů má poněkud odlišnou selektivitu. Ve srovnání s BSA může dojít i ke změně elučního pořadí, např. (*S*)-warfarin je na HSA eluován jako první, ale na BSA je méně zadržován (*R*)-warfarin [138].
- α_1 -kyselý glykoprotein (AGP, orosomukoid) je tvořen polypeptidem (181 zbytků aminokyselin) a dále 14-ti zbytky sialové kyseliny inkorporovaných do uhlovodíkové struktury molekuly. Předpokládá se, že sialová kyselina se podílí na vazbě bazických látek v neutrálním pH. Na základě MALDI-TOF experimentu by mohla být jeho molekulová hmotnost poněkud nižší (cca 33 000), stejně jako obsah cukerné složky (cca 34%) než je uvedeno v tab. 2 [133].
- Ovomukoid (OVM) je trypsinový inhibitor získaný ze slepičího vaječného bílku. Aktivní složkou OVM je ovoglykoprotein a kolony s tímto glykoproteinem mají lepší dlouhodobou stabilitu a lepší separační vlastnosti [2,133].
- Celobiohydrolasa (CBH) je produktem houby *Trichoderma reesei*. Celobiohydrolasa patří mezi tzv. celulasy, enzymy schopné hydrolyzovat β -1,4 glykosidické vazby. Rozlišujeme dva typy CBH I a CBH II. CBH II má ale v porovnání s CBH I daleko menší enantioseparační efektivitu [133,137].

- Pepsin, tento enzym je charakteristický velmi nízkým isoelektrickým bodem <1 . Nad pH 7 dochází k jeho ireversibilní denaturaci a ztrácí enantioseparační vlastnosti.
- Avidin (AVI) je bazický glykoprotein získaný z vaječného bílku. AVI silně váže biotin a tato vazba negativně ovlivňuje jeho enantioseparační vlastnosti. Vazbou biotinu na AVI jsou buď zablokována vazebná místa na proteinu pro některé typy látek nebo dochází ke změnám v jeho prostorovém uspořádání [133].

Kompatibilita proteinových CSP s převážně vodnými pufovanými mobilními fázemi dovoluje dosáhnout vhodných interakcí s imobilizovaným proteinem. Přímým důsledkem těchto mnohočetných interakcí je vysoká selektivita pro různé skupiny látek. Nejčastěji se používají pufrы fosfátové, citrátové a octanové v koncentracích 10 – 50 mM [2,137].

Rozlišení mezi enantiomery je možno ovlivnit změnou různých experimentálních podmínek (pH, iontová síla pufru, přídavek ion-párových činidel, změna organické složky mobilní fáze a změna teploty). Vhodné postupy, jak snadno a rychle optimalizovat podmínky pro separaci cílové struktury, bývají doporučovány výrobci [2,137].

OVМ, AGP i AVI kolony jsou nejuniverzálnější ve smyslu použitého organického modifikátoru. Propan-1-ol a propan-2-ol jsou nejčastěji používané organické složky mobilní fáze. Při práci s HSA a BSA kolonami se doporučuje používat nejvýše 10 % organického modifikátoru, aby byla zaručena dlouhodobá stability kolony. Obecně platí že rostoucí koncentrace organického modifikátoru zeslabuje interakce mezi analytem a proteinovou stacionární fází [134]. Kromě propan-1-olu a propan-2-olu lze použít jako alternativu i další organická rozpouštědla mísitelná s vodou, viz tab. 2.

Vliv pH – obecně roste retence, pokud mají protein a analyt opačný náboj (náboj proteinu závisí na jeho pI). Zvýšení pH znamená zvýšení negativního náboje a tudíž klesá retence kyselin a retence bazických látek stoupá. Vzhledem ke komplexní struktuře proteinů je vliv pH na retenci těžko předvídatelný a i malé změny v pH mohou mít velký vliv na dosaženou separaci. Iontová síla mobilní fáze má obvykle malý vliv na enantioselektivitu i retenci, ale ovlivňuje tvar píků. Pokud je náboj analytu a stacionární fáze opačný, je retence způsobena převážně díky iontové výměně a rostoucí koncentrace soli bude snižovat retenci.

K ovlivnění retence a rozlišení obzvláště u AGP, BSA a HSA může být použit přídavek ion-párového činidla. Tento postup se používá zejména u silně hydrofilních látek, které mají malou retenci. Ion-párová činidla lze také použít na zvýšení rozlišení mezi enantiomery, které jsou za použití běžných mobilních fází těžko separovatelné (např. dimethyloktylamín, tetrabutylamonium-bromid, oktanová kyselina, hexansulfonová kyselina).

Tabulka 2 Přehled komerčně dostupných CSP s proteinovými selektory.

Protein	Molekulová hmotnost	Isoelektrický bod	Molekulární S-S vazby	Procento uhlovodíků	pH stabilita	Separace	Alternativy propan-1-olu a propan-2-olu
BSA	66000	4,7	17	----	4,5 - 8	kyselin	----
HSA	66000	4,7	17	----	4 - 7	kyselin	MeOH, EtOH, ACN
AGP	41000	2,7	2	45	3 - 7	kyselin i bazí	MeOH, EtOH, ACN
OVM	28800	3,7 - 4,5	8	30	2 - 7,5	kyselin i bazí	MeOH, EtOH, ACN
CBH	64000	3,9	12	6	4 - 7	bazí	ACN, THF, MeOH
AVI	68000	10,0-10,5	-----*	7	2 - 7,5	kyselin	MeOH, ACN
Pepsin	34600	<1	3	----	3 - 6	bazí	EtOH, MeOH, ACN

* nepublikováno

Ion-párová činidla silně ovlivňují i tvar píku a již v koncentraci $<1\%$ mohou výrazně změnit enantioselektivitu. Jejich nevýhodou je, že se velmi obtížně odstraňují z kolony, a proto je vhodné mít pro každé ion-párové činidlo zvláštní kolonu [2,137].

Jak už bylo řečeno výše, proteinové CSP mají menší vazebnou kapacitu než ostatní CSP a díky tomu je omezené jejich uplatnění v preparativní chromatografii. Počet teoretických pater a rozlišení jsou většinou negativně ovlivněny pokud je množství vzorku větší než $0,5\text{--}1\mu\text{g}$ u kolon o vnitřním průměru $0,4\text{--}0,5\text{ cm}$ [139].

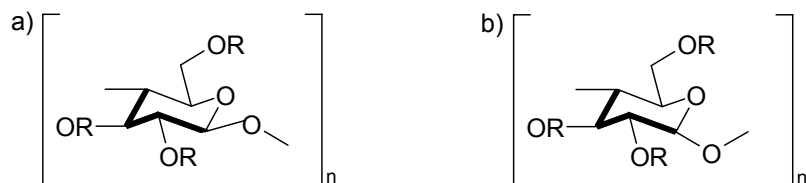
Vliv teploty – startovacím bodem při vývoji nové metody bývá laboratorní teplota. Zvýšení teploty vede ke snížení hodnoty k' enantiomerů na všech proteinových kolonách. Při teplotě nad 40°C může dojít k denaturaci proteinů nebo k racemizaci analytu. Při nižších teplotách než je laboratorní, může (ale nemusí) dojít ke zlepšení separace [140].

3.4.2 Polysacharidové CSP

Velmi důležitou skupinu CSP tvoří polysacharidové fáze. Poskytují reprodukovatelné výsledky a mají enantioselektivitu vůči širokému spektru látek [2,128,141,142]. Z celé řady polysacharidů jako chitosan, chitin, xylan, curdlan, dextran, inulin, amylopektin, byly pro výrobu komerčně dostupných stacionárních fází vybrány celuloza a amylosa.

Ani nemodifikovaná celuloza ani amylosa nemá velkou schopnost separovat optické antipody. Z tohoto důvodu byly tyto polysacharidy derivatizovány za vzniku jejich trikarbamátů nebo triesterů [128]. Mikrokrytalický triacetát celulosy (MCT) byl jedním z prvních použitelných materiálů pro chirální separace, ale vzhledem k nízké efektivitě separace se jeho použití nerozšířilo. Efektivnější jsou CSP, kdy je chirální selektor nanesen v podobě polymerního filmu na silikagel [2,128,129]. Enantiomerní selektivita je často důsledkem rozdílného uspořádání polysacharidů, viz obr. 27. Díky odlišnému spojení glukosových jednotek $\beta\text{-}1,4$ (celuloza) a $\alpha\text{-}1,4$ (amylosa) má celuloza lineární a amylosa helikální strukturu [2,128,141]. Selektivita stacionární fáze se také výrazně mění se změnou skupiny navázané na polysacharidovém řetězci.

Obr. 27 Struktura chirálních derivátů (a) celulosy (b) amylosy



V současné době jsou k dispozici stacionární fáze jak pro normální, tak pro reverzní mód [143].

Jistou nevýhodou komerčně dostupných CSP, které jsou připraveny potažením aminopropylsilikagelu polymerní vrstvou, je jejich kompatibilita s omezeným počtem rozpouštědel. V klasickém uspořádání se jedná o směsi uhlovodíků a alkoholů popř. etherů. V reverzním uspořádání je vodná složka tvořena roztokem chloristanu sodného nebo kyseliny chloristé a jako organické modifikátory lze využít ACN, EtOH, MeOH nebo IPA. Rozpouštědla jako chloroform, THF se nedoporučují, protože dochází k rozpouštění polymerní vrstvy chirálního selektoru. Ještě výraznější je tato nevýhoda v preparativním měřítku, kdy je omezená rozpustnost racemátu limitujícím prvkem pro možnost většího nástřiku na kolonu. Širší volba rozpouštědla s sebou přináší i možnost dosáhnout lepší selektivity. Řešení tohoto problému spočívá v přímém navázání chirálního selektoru na silikagel. Možné způsoby přípravy přímo vázaného chirálního selektoru na silikagel jsou publikovány v práci P. Franco et al. [144].

Nedávno byly zavedeny na trh nové typy polysacharidových stacionárních fází. Jedná se o tris(3,5-dimethylfenylylkarbamát) amylosy [145] a tris(3,5-dimethylfenylylkarbamát) celulosy [143]. Odlišný způsob imobilizace chirálního selektoru umožňuje použít širokou škálu rozpouštědel, včetně méně obvyklých dichlormethan, (methyl)(*t*-butyl)ether, THF, ethyl-acetát.

Komerčně dostupné polysacharidové CSP vyrábí firma Daicel Chemical Industries (Tokyo, Japonsko) a jsou vhodné pro analytické i preparativní využití. Výběr stacionární fáze pro cílový analyt nelze však s určitostí předpovědět. Vodítkem může být separace strukturně podobných látek [143,146]. Stručný přehled a použití těchto stacionárních fází je uvedeno v tab. 3.

Mechanismy uplatňující se v chirální separaci – při retenci na polysacharidových stacionárních fázích se uplatňuje celá řada jevů a mechanismus separace není dodnes zcela vysvětlen. Většina stacionárních fází je určena pro NPLC. Schopnost separovat enantiomery je ovlivněna následujícími faktory: typ cukru, typ funkční skupiny na polysacharidu, průměrná molekulová hmotnost polysacharidu a distribuce molekulových hmotností polysacharidu, způsob zakotvení polysacharidu na nosič, charakter samotného nosiče [2,144,145]. Stejně jako u jiných stacionárních fází se na separačním procesu podílí celá řada interakcí mezi analytem a CSP (hydrofobní, dipól-dipól, π - π interakce, H-můstky). Nedávno bylo zjištěno, že pro molekuly, které mají ve své struktuře atom síry, přispívají k separaci i koordinační interakce. Dále se na separaci podílejí sterické efekty [128]. Selektory založené na esterech benzoové kyseliny se do procesu separace zapojují patrně dipól-dipól interakcemi karbonylové skupiny a vodíkovými vazbami s látkami, které mají hydroxy- nebo aminoskupiny. Enantioselektivita u fenylylkarbamátů je ovlivněna také substitucí na fenylovém kruhu [2,129]. Např. substituce skupinami přitahující elektrony (*m*-methoxy nebo *m*-nitro) se projeví menší schopností separovat enantiomery, zatímco skupiny poskytující elektrony (methylové v poloze 3 nebo 4) jsou v tomto

ohledu výhodnější. Analyty s polárními skupinami interagují pravděpodobně s karbamátem prostřednictvím vodíkových vazeb. [147]. Polysacharidové fáze většinou nepotřebují kombinaci funkčních skupin, aby došlo k separaci racemátu, jako tomu je u některých jiných CSP. Ve většině případů není třeba vzorek derivatizovat. Přítomnost aromatické skupiny také není podmínkou separovatelnosti enantiomerů na polysacharidových CSP.

Experimentální podmínky pro polysacharidové CSP

Pro dosažení žádoucí separace v NPLC se optimalizuje vzájemný poměr nepolární (hexan, cyklohexan, pentan, heptan) a polární složky (propan-2-ol nebo ethanol) mobilní fáze. Rozlišení mezi enantiomery může být dále optimalizováno pomocí přídavku kyseliny nebo aminu (0,1-1,0 %). Náhrada propan-2-olu za vyšší alkoholy může vést k nárůstu selektivity. Tento efekt byl pozorován při separaci chirálních esterů na koloně Chiralcel OD [148]. Propan-2-ol byl postupně nahrazován butanolem, isobutanolem a *tert*-butanolem a byl pozorován nárůst v selektivitě. Alkoholy s vyšší molekulovou hmotností mají pravděpodobně nižší tendenci interagovat s CSP prostřednictvím vodíkových vazeb. Díky tomu je pozorována vyšší enantioselektivita pro analyty, u nichž se vodíkové vazby výrazně podílejí na interakcích s CSP. U některých typů celulosových stacionárních fází mohou být pro zlepšení enantioselektivity použita i aprotická rozpouštědla – (methyl)(*tert*-butyl)ether, ethyl-acetát, dichlormethan. Použití výše zmíněných rozpouštědel ještě více redukuje kompetice mezi analytem a organickou složkou mobilní fáze o vazebná místa na stacionární fázi, na kterých dochází k interakci prostřednictvím vodíkových vazeb. Z hlediska stability polysacharidových CSP doporučují výrobci používat jako mobilní fázi hexan s přídavkem alkoholu. Nicméně na základě experimentů mohou být použita některá aprotická rozpouštědla (methyl(*tert*-butyl)ether do 50 %; THF do 30 %; ethyl-acetát do 10 %, dichlormethan do 10 %) aniž by byly pozorovány problémy pramenící z nestability kolony [148].

V RPLC tvoří hlavní složku mobilní fáze vodný roztok pufru a jako organické modifikátory se používají ACN, MeOH a EtOH. Separace dvou enantiomerů může být také optimalizována přídavkem kyseliny nebo aminu (0,1-1,0%) podobně jako v NPLC.

Vliv průtoku mobilní fáze na dělení enantiomerů bylo sledováno na skupině antifungálních látek na různých typech CSP. Byly studovány průtoky v rozmezí 0,5–2,0 ml·min⁻¹ a pro většinu látek bylo dosaženo maximálního rozlišení mezi enantiomery při průtoku 0,5 ml·min⁻¹. Další snižování průtoku již nevedlo k vyššímu rozlišení [128]. Výrobce doporučuje pro dosažení maximální životnosti kolony nepřesahovat tlak vyšší než 50 barů.

Tabulka 3 Přehled nejčastěji užívaných komerčně dostupných polysacharidových CSP.

A	B	C	D	E	F
alifatické, ne cykloalifatické	cykloalifatické, ale ne cykloalkanony nebo laktony	cykloalifatické, buď cykloalkanony nebo laktony	aromatické látky s dalšími funkční skupiny	aromatické estery	aromatické látky s dalšími funkčními skupinami

Typ stacionární fáze	Obchodní název	Teplotní odolnost	Vhodné pro sloučeniny					
			A	B	C	D	E	F
Karbamáty amylosy	Chiralpak AD	0-40°C	x	x	x			x
	Chiralpak AD-H	0-40°C						
	Chiralpak AD-RH	0-40°C	x	x	x			x
	Chiralpak AS	0-40°C	x	x	x			x
	Chiralpak AS-H	0-40°C						
	Chiralpak AS-RH	0-40°C						
Karbamáty celulosy	Chiralcel OC	0-40°C						
	Chiralcel OD	0-40°C	x	x		x		x
	Chiralcel OD-H	0-40°C						
	Chiralcel OD-R	5-40°C						
	Chiralcel OD-RH	5-40°C						
	Chiralcel OG	0-40°C						x
Estery celulosy	Chiralcel OF	0-40°C						x
	Chiralcel CA-1	0-40°C						
	Chiralcel OA	0-40°C			x		x	
	Chiralcel OB	0-40°C			x		x	
	Chiralcel OB-H	0-40°C						
	Chiralcel OJ	0-40°C					x	
	Chiralcel OJ-H	0-40°C						
	Chiralcel OJ-RH	0-40°C						
Chiralcel OK	0-40°C				x			
Nové typy imobilizovaných stacionárních fází	Chiralpak IA	0-40°C						
	Chiralcel IB	0-40°C						

Vliv teploty – většina kolon je stabilních v teplotním intervalu 0-40°C viz tab. 3. Vyšší teplota vede ke zkrácení doby analýzy a dosažení lepší efektivity separačního procesu, ale obvykle klesá rozlišení [149]. Z hlediska stability CSP je lepší separovat látky za laboratorní nebo nižší teploty. Pro reprodukovatelnost výsledků je vhodné kolonu termostatovat zvláště pak u RPLC [2].

3.4.3 Donor-akceptorové (Pirklovy) CSP

Donor-akceptorové CSP jsou označovány na počest jejich vynálezce jako Pirklovy fáze nebo jsou známy jako tzv. kartáčové CSP. Komerčně dostupných je v současné době více jak 30 typů [2].

Při vývoji těchto CSP vyšel W. H. Pirkle z předpokladu, že není univerzální CSP pro separaci všech enantiomerů, nicméně je možno s racionálně navrženou CSP separovat relativně širokou skupinu látek [150]. Cílený design Pirklových fází vychází z teorie reciprocity tzn. pokud je látka X jako CSP schopna separovat racemát látky Y, tak je také schopna látka Y jako CSP separovat racemát látky X a její strukturně příbuzné látky [2,130]. Pro chirální separaci je třeba současné třibodové interakce mezi CSP a analytem, přičemž alespoň jedna z nich musí být podmíněná stereochemicky. Tyto interakce mohou být jak přitažlivé, tak odpudivé. Separace je založena na preferenčním vzniku diastereoizomeru s jedním enantiomerem. V tomto procesu se uplatňuje kombinace vzájemných interakcí jako H-můstky, π - π interakce, dipól-dipól interakce i sterické efekty. Dvě z těchto sil musí být přitažlivé, zatímco třetí síla je buď přitažlivá nebo odpudivá [2]. Velkou výhodou Pirklových stacionárních fází je jejich dostupnost v obou enantiomerních formách \Rightarrow pouhá výměna kolony s opačným uspořádáním stacionární fáze vede ke změně elučního pořadí enantiomerů. Tento princip je s výhodou využíván v analytickém i preparativním měřítku.

Po zavedení Pirklových fází na trh byla nejvíce využívána kolona se stacionární fází 3,5-dinitrobenzoylfenylglycinem (DNBPG) [2,129], viz obr. 28. Tato stacionární fáze, která je zakončena akceptorem π -elektronů, je vhodná pro separaci aromatických látek, které jsou donory π -elektronů. Má dva kyselé vodíky a dva bazické karboxyly \Rightarrow možné interakce s amidy, aminy nebo alkoholy.

Další typ Pirklovy stacionární fáze obsahuje ve své struktuře π -elektron donorovou jednotku - naftalenový kruh, viz obr. 28, je určen pro separaci aminů, aminoalkoholů, aminokyselin, alkoholů, karboxylových kyselin a thiolů.

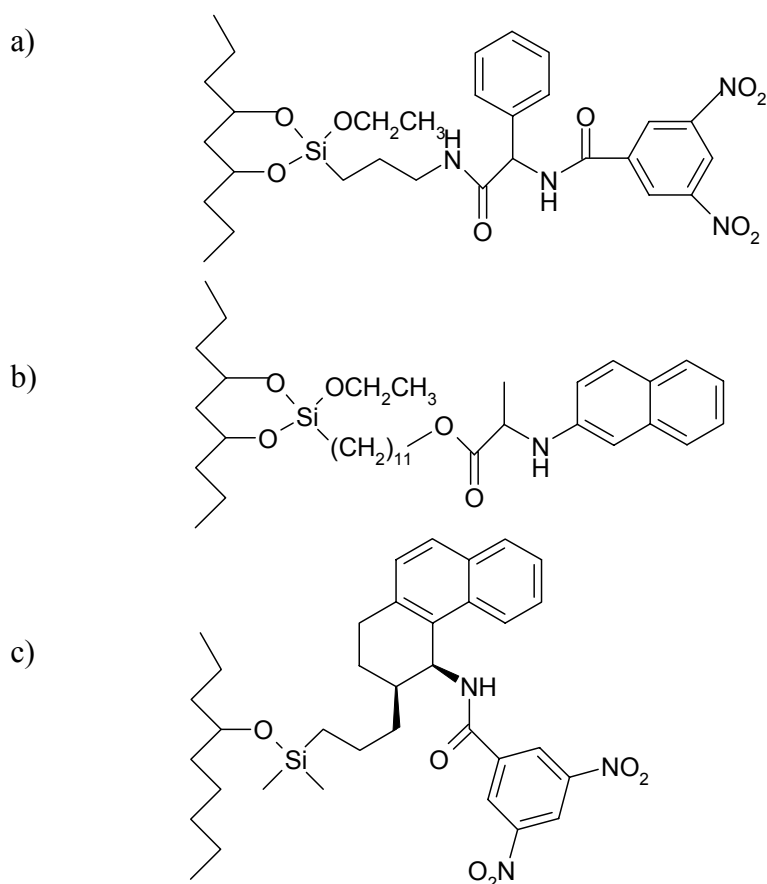
Třetím typem je hybridní stacionární fáze s akceptorovou i donorovou skupinou π -elektronů (Whelk-O1), viz obr. 28. Whelk-O1 lze použít pro separaci široké skupiny látek a je porovnatelná s polysacharidovými stacionárními fázemi, co se týká šíře použití [151]. Vývoj CSP v Pirklových laboratořích byl shrnut Welshem [152].

Pirklové fáze jsou z hlediska životnosti pravděpodobně nejstabilnější CSP. Lze je použít pro NPLC i pro RPLC, i když obecně je lepší dělení enantiomerů v klasickém uspořádání chromatografie. Nejčastěji používanou mobilní fází je hexan v kombinaci s IPA nebo EtOH (v některých případech lze dosáhnout lepšího výsledku s dichlormethanem nebo ethyl-acetátem). Rozlišení pro daný enantiomerní pár je dáno spíše typem CSP než složením mobilní fáze. Pokud je separace v NPLC na hranici akceptovatelnosti, pak je obvykle separace v reverzním módu horší. Jako mobilní fáze lze v RPLC použít směs alkoholu nebo acetonitrilu v kombinaci s vodou nebo pufrem (pH stabilita v rozmezí 3-8) [2].

Vliv teploty - hodnotu α lze obecně u CSP zvýšit snížením teploty. Pokud ale není dosaženo alespoň náznaku separace za laboratorní teploty, tak snížením teploty k separaci nedojde.

Vliv průtoku - průtok má daleko menší vliv na rozlišení než u proteinových nebo polysacharidových CSP. Pokud není dosaženo alespoň částečné separace na určité Pirklově CSP, tak změny průtoku jsou pro zlepšení separace neefektivní.

Obr. 28 Základní typy Pirklových fází. a) stacionární fáze s elektron-akceptorovou skupinou (DNBPG); b) stacionární fáze s elektron-donorovou skupinou; c) stacionární fáze s elektron-donorovou i akceptorovou skupinou (Whelk-O1)



3.4.4 Cyklodextriny

Cyklodextriny (CyD) jsou cyklické oligosacharidy, které vznikají částečnou hydrolyzou škrobu za enzymatického působení cyklodextrinové glykosyltransferázy [153]. V chirálních separacích se využívají α , β a γ -cyklodextriny, tvořené 6, 7 a 8 glukopyranosovými jednotkami spojených α -1,4 vazbou [2,129]. Kavita cyklodextrinů má chirální charakter. Vnitřní část je hydrofobní, ale okraj je lemován hydrofilními sekundárními hydroxyly.

Velikost analytu předurčuje, který CyD je vhodný pro jeho analýzu, viz tab. 4.

Tabulka 4. Charakteristiky α , β a γ -cyklodextrinů [155,154].

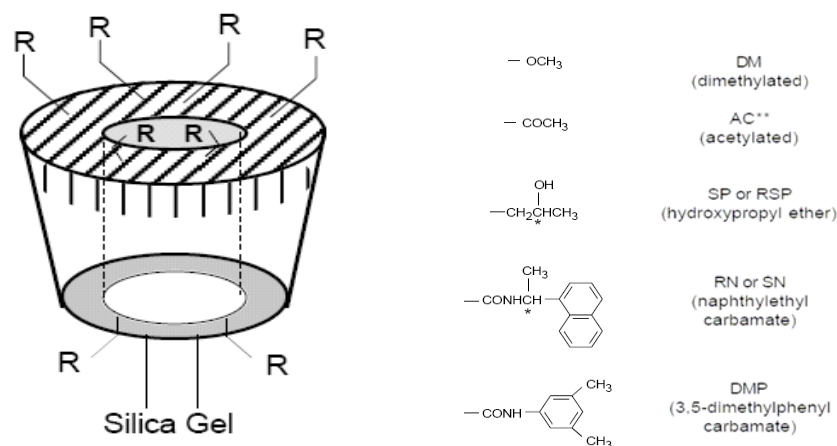
Typ cyklodextrinu	α	β	γ
Počet glukopyranos	6	7	8
Molekulová hmotnost	973	1 135	1 297
Vnitřní průměr kavity [nm]	0,57	0,78	0,95
Hloubka kavity [nm]	0,79-0,80	0,79-0,80	0,79-0,80
Objem kavity [nm]	1,74	2,62	4,27
Specifická otáčivost	150,5	162,5	177,4
Bod tání [K]	551	572	540

Struktura α -CyD CSP je méně rigidní a kavita se může částečně roztáhnout. β a γ -CyD CSP mají struktury více rigidní. Obecně platí, že látky s maximálně jedním kruhem lze separovat pomocí α -CyD; látky se dvěma kruhy lze separovat pomocí β -CyD a látky se třemi kruhy lze separovat pomocí γ -CyD [155].

CyD byly využívány i jako chirální aditiva mobilní fáze, ale v současné době se používají v HPLC téměř výhradně jako CSP. Pro výrobu chirálních stacionárních fází je nejvíce využíván β -CyD a jeho deriváty. α -CyD a γ -CyD jsou využívány k separacím polohových izomerů. Derivatizované CyD CSP byly připraveny navázáním skupin jako methyl, acetyl, karboxymethyl, 2-hydroxypropyl a naftalenkarbamát na hydroxyly v poloze 2,3,6. Derivatizací může dojít ke zlepšení

separačních vlastností a změně enantioselektivity viz obr. 29 [129,155,156]. Jejich použití je především v RPLC, některé typy lze použít i v NPLC.

Obr. 29 Struktura CyD a příklady možné chemické modifikace struktury, převzato z ref. 156.



Mechanismy uplatňující se v chirální separaci - do chirální kavity CyD vstupuje jeden nebo oba enantiomery a tím dochází k jejich vzájemné separaci. Na separaci enantiomerů se podílí, podobně jako u ostatních typů chirálních selektorů, více typů interakcí mezi analytem a stacionární fází. Mezi hlavní interakce patří vodíkové vazby, dipól-dipól interakce a tvorba inkluzních komplexů [2,129,155]. Pravděpodobnost separace látky na CyD CSP se zvyšuje pokud:

- molekula analytu je schopna vstoupit do kavity CyD;
- aromatický nebo cykloalkylový kruh je v blízkosti chirálního centra;
- látka má substituenty na nebo v blízkosti chirálního centra molekuly, které jsou schopny interagovat s OH skupinami na vstupu do hydrofobní kavity.

Jestliže je hydrofobní část molekuly větší než je velikost vstupu do kavity, tak jsou vazebné interakce mezi analytem a CyD velmi slabé nebo nevzniknou vůbec a k chirální separaci tedy nedojde. Pokud však je hydrofobní část molekuly výrazně menší než je velikost CyD kavity, tak bude inkluzní komplex také velmi slabý, protože interakce mezi analytem a stěnou kavity CyD jsou méně pravděpodobné. V případě, že molekula má ještě hydrofilní skupiny schopné vytvářet H-můstky s hydroxyly na okraji CyD je možné enantioselektivitu zvýšit.

Separaci enantiomerů pomocí CyD CSP lze realizovat ve třech módech normálním, reverzním a polárně organickém. Důležitým aspektem pro volbu módu je rozpustnost vzorku [2].

- 1) Vzorek je rozpustný pouze v organických rozpouštědlech
 - a) normální mód – výchozím bodem je mobilní fáze hexan:IPA (9:1, v/v)

- b) polárně organický mód – jako mobilní fáze se použije 100% ACN s přídatkem MeOH, kyseliny octové nebo triethylaminu (0,1 %)
- 2) Vzorek je rozpustný pouze ve vodě – reverzní mód - výchozím bodem je mobilní fáze ACN-pufr (pH 3,5-7,0) (80:20, v/v)
- 3) Vzorek je rozpustný ve vodě i organických rozpouštědlech – možná volba ze všech tří experimentálních uspořádání.

Obecně lze říci, že pravděpodobnost úspěchu chirální separace racemátu klesá v pořadí reverzní mód > polárně organický mód > normální mód.

Reverzní mód – používají se derivatizované i nederivatizované CyD-CSP. Hlavním mechanismem zodpovědným za separaci enantiomerů je tvorba inkluzních komplexů [155,156]. Změnou % organické složky mobilní fáze (nejčastěji MeOH, ACN) je možno modifikovat retenci i rozlišení enantiomerů. Příležitostně lze použít také IPA, EtOH, dimethylformamid, dioxan. Do určité míry může být selektivita modifikována změnou organické složky mobilní fáze, pH a iontovou silou. Používání pufrů zvyšuje efektivitu a reprodukovatelnost separačního procesu. Vhodné pufrů jsou s triethanolaminem, trifluoroctovou kyselinou, octanem amonným, dusičnanem amonným.

Vliv pH - stabilita inkluzního komplexu je závislá na náboji analytu. Pokud obsahuje molekula ionizovatelné skupiny, tak lze pomocí pH ovlivnit retenci i selektivitu. Obecně platí, že inkluzní komplex je pevnější, jestliže je analyt v neionizované formě. Volba pufru může také ovlivnit dosaženou separaci, protože molekuly pufru mohou také vstupovat do kavity CyD. S rostoucí koncentrací pufru klesá retence a píky jsou ostřejší.

Vliv průtoku - průtok mobilní fáze může mít velký vliv na efektivitu použité kolony. Při vyšších průtocích ($1,0\text{--}2,0\text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$) je v některých případech nedostatek času pro vytvoření inkluzního komplexu, což se projeví nízkou efektivitou separačního procesu. V tomto případě se doporučuje snížit průtokovou rychlost na $0,4\text{--}1,0\text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$.

Vliv teploty - i změna teploty může vést k zlepšení enantioselektivity. Vazebná konstanta vazby CyD-analyt je teplotně závislá a s klesající teplotou roste [2]. Na druhé straně je nutno počítat s faktem, že s rostoucí teplotou roste efektivita separace na koloně [155].

Polárně organický mód – jako mobilní fáze se používá ACN. Příklad metanolu, kyseliny octové nebo triethylaminu může ovlivnit selektivitu. Předpokládá se, že pro enantioselektivitu je důležitá vazba vodíku analytu s hydroxylovými skupinami cyklodextrinu. Svou roli hrají i interakce dipól-dipól a prostorové efekty [157].

Normální mód – separace se provádí převážně na nederivatizovaném CyD. Nepochybně část mobilní fáze obsadí kavitu CyD a analyt interaguje se sekundárními

hydroxyly na jejím okraji. V tomto experimentálním uspořádání se CyD CSP podobá diolové stacionární fázi a retence je více závislá právě na interakcích s OH skupinami. Předpokládá se, že nedochází ke vzniku inkluzních komplexů. Nejpoužívanější mobilní fází je směs hexanu s IPA. Náhradou IPA za EtOH nebo butanol může dojít v některých případech k lepší separaci. CyD CSP jsou stabilní ve všech běžně užívaných rozpouštědlech užívaných v chromatografii. Halogenovaná rozpouštědla však tvoří pevné komplexy s CyD a tudíž snižují interakce CyD s analytem [155,156].

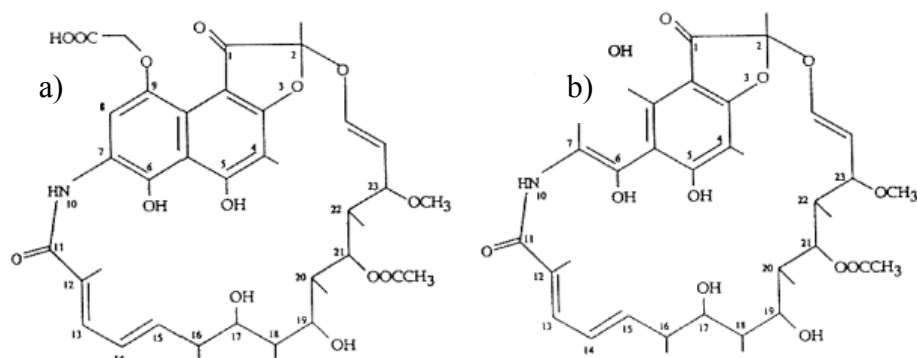
3.4.5 Makrocyclická antibiotika jako CSP

Makrocyclická antibiotika patří k velmi významným chirálním selektorům jak pro HPLC, tak i pro CE. Díky mnoha stereogenním centrům a funkčním skupinám mají makrocyclická ATB schopnost interagovat s opticky aktivními látkami. Mohou mít kyselý, bazický nebo neutrální charakter. Jejich molekulová hmotnost se pohybuje v rozmezí 600–2000. Kromě hydrofobních částí obsahují jejich molekuly také hydrofilní části a množství ionizovatelných skupin. Při chirálních separacích se uplatňuje tedy celá řada interakcí a v mnoha případech se interakce navzájem kombinují - interakce hydrofobní, dipól-dipól, π - π , H-můstky, sterické efekty, interakce mezi anionty a kationty [128,158,159,160]. Síla těchto interakcí je závislá na volbě mobilní fáze. Za podmínek RPLC jsou preferovány H-můstky, sterické interakce, inkluzní komplexy i iontové interakce. V NPLC jsou preferovány H-můstky, sterické efekty, π - π a dipól-dipól interakce. V polárně organickém módu převládají H-můstky, sterické vlivy a iontové interakce [128,130]. Vankomycin, rifamycin B a thiostrepton byla první makrocyclická ATB použita jako vázané CSP [159].

Makrocyclická antibiotika lze rozdělit na:

- Ansamyciny – nejčastěji užívané selektory jsou rifamycin B a rifamycin SV, viz obr. 30. Před použitím v HPLC byla tato ATB využita v CE. Rifamycin B je vhodný pro separace kationických analytů a rifamycin SV je vhodný spíše pro separace aniontů [159].
- Glykopeptidy – všechny glykopeptidy jsou tvořeny aglykonem, který vytváří charakteristický „košík“ a na něj je vázána cukerná složka viz obr. 31. Do této skupiny patří vankomycin (využití v HPLC, CE, TLC), teikoplanin (využití v HPLC, CE), ristocetin A (využití v HPLC, CE) a avoparcin (využití v CE). Avoparcin, ristocetin A a teikoplanin nejsou čisté látky ale směsi podobných látek o známém složení [159]. V současné době patří tato skupina k nejvýznamnějším chirálním selektorům.

Obr. 30 Struktura ansamycinů a) rifamycin B; b) rifamycin SV



Od svého zavedení se stala makrocyclická ATB velmi populární díky schopnosti separovat enantiomery různých typů látek. Tyto CSP jsou podobné proteinovým CSP, ale mají větší kapacitu a jsou stabilnější. Komerčně jsou dostupné Chirobiotic V (vankomycin), Chirobiotic T (teikoplanin), Chirobiotic R (ristocetin A), Chirobiotic Tag (teikoplanin aglykon) od firmy Astec (Whippey, NJ, USA) [129].

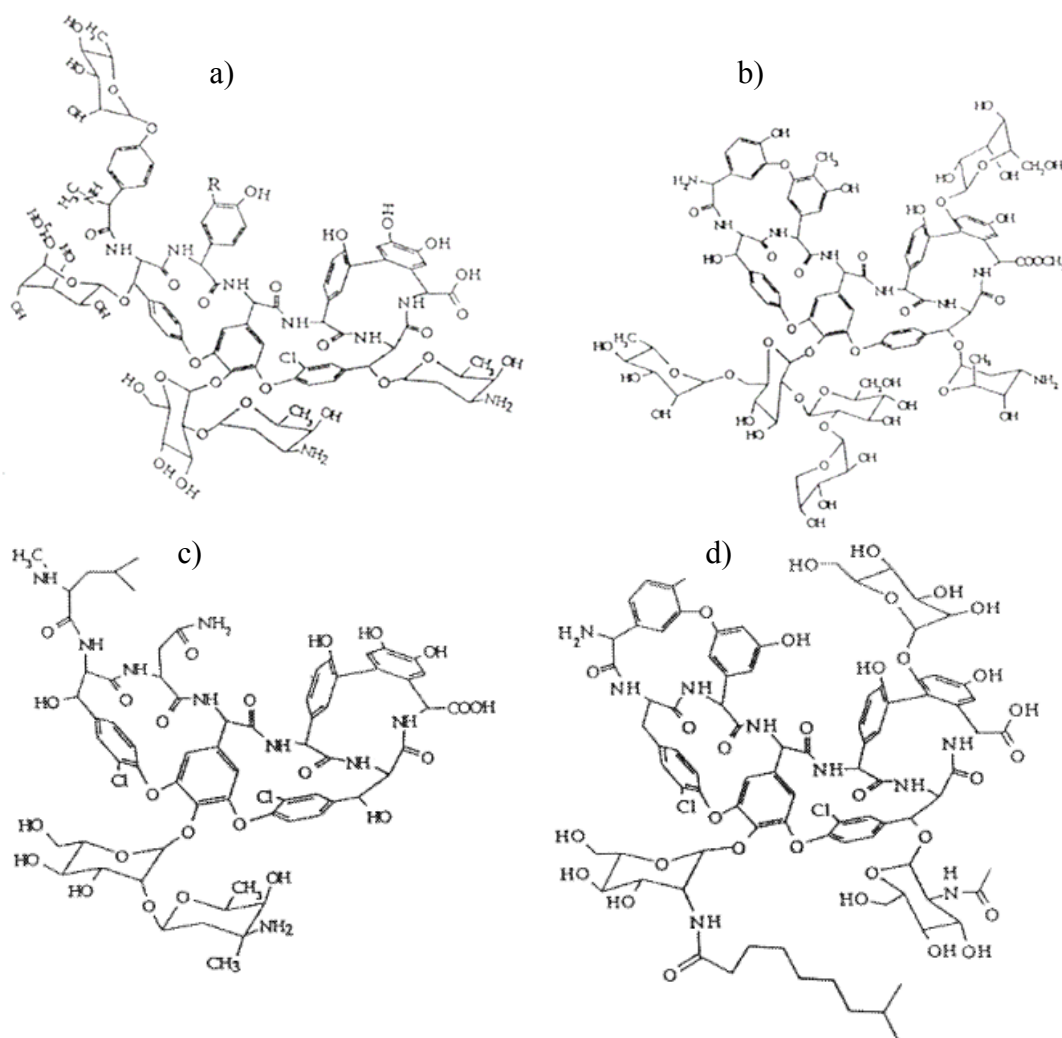
Vankomycin [161] byl z této skupiny zaveden do praxe jako první, v krátkém sledu po vankomycinu následoval teikoplanin [162] a jako poslední byl zaveden ristocetin A [163]. Avoparcin je strukturně podobný všem výše zmíněným makrocycklům a má také podobné vlastnosti. V současné době není tato fáze komerčně dostupná pro HPLC, ale měla by se objevit v blízké době [159]. Avoparcin byl úspěšně použit jako aditivum do elektrolytu v CE [164].

V současné době probíhají také studie methylovaného aglykonu teikoplaninu. Předpokládá se, že zablokováním hydroxylových skupiny dojde ke zlepšení přenosu hmoty mezi analytem a CSP a efektivita separace by se mohla zvýšit v porovnání se samotným aglykonem teikoplaninu [160].

Jednou z charakteristik glykopeptidových CSP je možnost předpovědět separaci racemátu se stejným stereogenním uspořádáním. Jestliže je látka separována na glykopeptidové koloně za určitých podmínek, je velmi pravděpodobné, že molekuly s podobným uspořádáním na asymetrickém centru je možno separovat za stejných podmínek [130,159].

Glykopeptidové CSP jsou také unikátní tzv. principem komplementarity fází. Pokud se nepodaří separovat látku na jednom typu glykoproteinové CSP je možné dosáhnout lepšího výsledku za stejných nebo podobných podmínek na některé další glykoproteinové koloně [130,159]. To nasvědčuje tomu, že mechanismus separace je na těchto kolonách podobný ale ne identický. První výhodou principu komplementarity je, že výměnou kolony lze dosáhnout lepší selektivity bez změny mobilní fáze. Druhá výhoda spočívá v možnosti zapojení dvou nebo tří glykopeptidových fází do série a získat separační systém s širokou selektivitou. Toho se využívá např. při screeningu vhodné CSP pro velké série vzorků.

Obr. 31 Struktura glykopeptidových ATB a) vankomycin; b) teikoplanin; c) avoparcin; d) ristocetin A.



K modifikaci enantioselektivity glykopeptidových stacionárních fází lze použít reverzní, normální i polárně organický mód [130,128,159,161,162]. Ve všech experimentálních uspořádáních lze pozorovat odlišnou selektivitu pro různé skupiny látek.

NPLC - nejčastěji se jako složky mobilní fáze užívají hexan, acetonitril, methanol, ethanol. Rozlišení je možno optimalizovat přidávkem THF nebo octové kyseliny.

RPLC - hlavní složkou mobilní fáze jsou pufrы (dusičnan amonný, octan triethylamonia, citronan sodný) s 10-20% přidávkem organického rozpouštědla (ACN, MeOH, THF, EtOH, IPA) [128].

V případě, že látka má více jak jednu funkční skupinu schopnou interakce se stacionární fází a alespoň jedna z těchto skupin je na chirálním centru nebo v jeho blízkosti, je vhodné využít pro chirální separaci polárně organickou mobilní fázi.

V tomto provedení se používá 100% MeOH nebo ACN s malým přidávkem kyseliny (octová, trifluoroctová) a baze (triethylamin, hydroxid amonný). Klíčovým prvkem

pro dosažení potřebné selektivity separace je poměr kyseliny a baze (jejich koncentrace ovlivňuje pouze retenci). Jejich poměr ovlivňuje náboj na stacionární fázi i na analytu. Poměr kyselina-baze se mění v závislosti na náboji vzorku od 4:1 do 1:4. Většinou se začíná s poměrem 1:1 a pak jeho změnou na 1:2, resp. 2:1 se sleduje vliv na rozlišení. Pokud je analyt eluován příliš brzy z kolony, sníží se aktuální koncentrace páru kyselina-baze a naopak. Aktuální koncentrace páru kyselina-baze se pohybuje v rozmezí 0,001–1,0 %. Nad 1 % je analyt příliš polární a chová se jako v RPLC a pod 0,001 % se naopak chová jako v NPLC [128,130,157]. Pokud má analyt pouze jednu funkční skupinu, volí se na základě rozpustnosti mezi NPLC (hexan/EtOH) a RPLC (THF/pufr).

Vliv pH v RPLC – látky interagují se stacionární fází, pokud nejsou ionizovány, proto může být dosažená separace ovlivněna pomocí změny pH. V RPLC se obvykle testuje rozmezí 4,0-7,0 [161].

Vliv průtoku - Armstrong sledoval vliv průtoku na dosaženou separaci u vybraných analytů na teikoplaninové CSP [162]. Nebyl pozorován vliv na enantioselektivitu, ale efektivitu separace. Snížením průtoku ze 2 ml·min⁻¹ na 1 ml·min⁻¹ se zlepšilo rozlišení o 20-30%.

Vliv teploty - u vybraných analytů byl vysledován i vliv teploty na separaci [161]. S rostoucí teplotou došlo k poklesu retence, rozlišení i selektivity. Dále bylo pozorováno, že vliv teploty je podstatnější v NPLC než v RPLC. Tento jev je možno vysvětlit existencí vzájemných interakcí mezi analytem a CSP, jejichž intenzita je ovlivněna teplotou. Např. při nižších teplotách dochází k zesílení slabších vazebných sil [128,165].

3.4.6 Ostatní typy CSP

- a) *CSP založené na mnohonásobných vodíkových interakcích* - aplikace těchto CSP jsou omezené, protože vodíkové vazby, jako výhradní interakce pro chirální separaci, nejsou příliš silné. Tento typ CSP byl prvně publikován Dobashim a Haraou. Jako stacionární fáze byly použity amidy aminokyselin navázané na silikagel popř. amid (*R,R*)-tartarové kyseliny [129].
- b) *Crown ethery* - jsou makrocyclické polyethery, které jsou známy svou schopností vytvářet komplexy s ionty alkalických kovů, alkalických zemin a primárními amoniiovými kationty. Pokud je použit chirální crown ether, je interakce s primárními aminy stereoselektivní. Vzájemné interakce mezi třemi vodíkovými atomy primární aminoskupiny a kyslíky na makrocyccku jsou považovány z hlediska chirální separace za nejdůležitější. Dále se při chirální separaci uplatňuje i bariéra, kterou tvoří substituenty crown etheru. Tyto substituenty jsou vázány kolmo na rovinu makrocyccku a při tvorbě komplexu mezi analytem a crown etherem se uplatňují sterické efekty [129]. CSP vhodnou

pro HPLC vyvinul Shinbo a kolektiv a byla aplikována na chirální separace aminokyselin [166]. Tyto stacionární fáze jsou komerčně dostupné od firmy Daicel Chemical Industries (Tokyo, Japonsko).

- c) *Chirální syntetické polymery* – jedná se o polymerní látky, které lze rozdělit z chemického hlediska na adiční, kondenzační a zesíťované gely [167]. Každá syntetická polymerní CSP má své charakteristické vlastnosti, co se týká chirální separace. Některé typy těchto fází jsou již komerčně dostupné např. helikální isotaktické polymetakryláty, Daicel Chemical Industries (Tokyo, Japonsko). Nový trend v této oblasti tvoří příprava chirálních polymerních monolitických stacionárních fází [129].
- d) *Chirálně imprintované polymery (molecular imprinted polymers MIPs)* – vznikají polymerační reakcí monomeru a síťující látky v přítomnosti chirálního templátu. Po jeho odstranění zůstane v polymeru kavita, která je stereoselektivní k templátové molekule a strukturně podobným látkám. Výhodou MIPs je vysoká enantioselektivita, podobná selektivitě antigen-protilátka. Nevýhodou je relativně malá efektivita separačního procesu a omezený okruh aplikací na strukturně podobné látky [129].
- e) *Ligand-exchange chromatografie* - k chirální separaci dochází na základě vzniku smíšeného terciárního kovového komplexu mezi selektorem a analytem. Stacionární fáze určené pro tento typ chromatografie jsou také komerčně dostupné ChiralPak WH, Daicel Chemical Industries (Tokyo, Japonsko) [129].

3.4.7 Techniky pro preparativní účely

Tato kapitola obsahuje krátký popis používaných technik (mimo krystalizaci a HPLC) pro preparativní separaci enantiomerů v průmyslovém měřítku.

- a) *Counter-current chromatografie (CCC)* - metoda je založena na mnohonásobném dělení látky mezi dvě nemísitelná rozpouštědla. První rozpouštědlo s chirálním selektorem tvoří v koloně stacionární fázi a druhé je pumpováno přes kolonu. Nejefektivnější chirální selektory v této oblasti jsou *N*-dodekanoyl-L-prolin-3,5-dimethylanilin, sulfatovaný β -CyD, albumin a vankomycin [129,130,168]. Instrumentální modifikací této metody je centrifugal partition chromatography (CPC) [168].
- b) *Simulated Moving Bed (SMB)* - je výkonná technika pro preparativní chromatografii, která byla patentována na počátku šedesátých let 20. století. Je založena na propojení mnoha kolon do série tak, že vytváří kruh. Tento systém je opatřen několika ventily, kterými se přivádí mobilní fáze, racemická směs a odvádí se rozdělené enantiomery. Přívod mobilní fáze, racemátu a sběr vzorku není statický, ale jejich pozice se mění tak, aby byl

simulován opačný pohyb mobilní a stacionární fáze. Principiálně dochází k separaci směsi mezi dvě fáze (pevnou a kapalnou) pohybující se v opačném směru. SMB technika dovoluje kontinuální dávkování a separaci binární směsi. Tato technika našla uplatnění v biotechnologii, farmacii a chemickém průmyslu. Dostupná zařízení lze získat pro dělení racemátu od 10-1000 g/den až po 5-50 t/rok [130].

- c) *Stereoselektivní membrány* - rostoucí potřeba získávat čisté enantiomery v chemickém i farmaceutickém průmyslu je soustředěna pozornost i na využití stereoselektivních membrán k preparativním účelům. Jejich výhodou je flexibilita, možnost kontinuálního dávkování vzorku a ve většině případů práce za laboratorní teploty. Membrána se zapojuje do separačního procesu:

přímo - separace pomocí enantioselektivní membrány (enantioselektivní polymer nebo kapalina);

nepřímo - neselektivní membrána asistuje v enantioselektivním procesu a tvoří výztuž pro chirální nosič [10,130].

3.4.8 Současné trendy v oblasti chirálních separací

V souvislosti s rozmachem kombinatorní chemie, která umožňuje navrhnout velké množství molekul během krátkého času, je současný vývoj v oblasti chirálních separací zaměřen na techniky, které jsou flexibilní, rychlé a také ekonomicky výhodné [10].

a) *Enantioselektivní senzory* - vývoj obecně použitelných enantiomerních senzorů, které kombinují vysokou substrátovou specifitu a enantioselektivitu se snadnou detekcí (změna v absorpčním spektru, ve fluorescenci) představuje slibnou alternativu k tradičním a často instrumentálně náročným technikám. Enantioselektivní senzory dovolují rychlou kvalitativní i kvantitativní analýzu enantiomerní čistoty. Levná zařízení určená na jedno použití mohou v budoucnu nahradit „off-line“ metody v procesu kontroly jakosti, klinické diagnostiky, screeningu chirálních látek atd.

b) *Miniaturizace* - kapacita současně užívaných analytických technik pro hodnocení enantiomerních látek je limitována relativně dlouhou dobou analýzy, provozními náklady a také lidskými zdroji. Vzhledem k rostoucí potřebě velkého počtu analýz je snaha tento proces urychlit. Miniaturizace je jedním z možných směrů. Zavedení tzv. micro total analysis systems (μ -TAS) umožňuje zvládnout daleko více analýz, automatizaci procesu, snižuje spotřebu organických rozpouštědel, reagensů, vzorků a také provozní náklady. Miniaturizace však sebou nese i technické problémy spojené s detekcí, mrtvými objemy a propojením kapilár s injektory a detektory.

c) *Optické metody* - pozornost je rovněž věnována optickým metodikám, kdy je možno posoudit enantiomerní čistotu látky bez předchozí separace. Své uplatnění nachází CD detektory, kdy tzv. anizotropní faktor ($g = \Delta\epsilon/\epsilon$) je nezávislý při určité vlnové délce na koncentraci látky, ale je přímo úměrný enantiomernímu poměru. Měření CD u přechodných vibračních stavů molekuly tzv. VCD by mohlo být vhodnou technikou pro určení nejen enantiomerní čistoty látky, ale také pro určení absolutní konfigurace.

d) *Chemical force microscopy* - tato technika může být vhodným kandidátem pro přímé sledování interakcí mezi analytem a CSP. Může se uplatnit v objasnění mechanismů chirálních separací a při výběru vhodných chirálních stacionárních fází.

4 PŘEHLED PUBLIKOVANÝCH PRACÍ

4.1 Práce publikované ve vědeckých časopisech

Available online at www.sciencedirect.com

Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 38 (2005) 609–618

JOURNAL OF
PHARMACEUTICAL
AND BIOMEDICAL
ANALYSISwww.elsevier.com/locate/jpba

Use of the zirconia-based stationary phase for separation of ibuprofen and its impurities

R. Kučera^{a,*}, J. Sochor^a, J. Klimeš^a, J. Dohnal^b^a Charles University in Prague, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové, Department of Pharmaceutical Chemistry and Drug Control, Heyrovského 1203, CZ-50005 Hradec Králové, Czech Republic^b Zentiva, a.s., U Kabelovny 130, CZ-10237 Prague 10, Czech RepublicReceived 25 October 2004; received in revised form 5 February 2005; accepted 5 February 2005
Available online 17 March 2005

Abstract

A new reversed-phase liquid chromatographic method using zirconia-based stationary phase was developed for determination of ibuprofen, its related compounds and its main degradation products. The chromatographic separation was successfully achieved on the Discovery[®]Zr-PS column (150 mm × 4.6 mm i.d., 5 μm), using a mobile phase methanol–phosphate buffer (pH 4.5; 0.05 M)–tetrahydrofuran (21:74:5, v/v/v) and the flow rate 0.5 ml min⁻¹. The UV detection was performed in dual wavelength mode (219 and 258 nm) to detect all compounds of interest. The column temperature was set on 60 °C to shorten the analysis time and improve the peak symmetry. The method is simple, rapid and cuts down the amount of hazardous waste produced in the analysis. The assay is completed within 22 minutes.
© 2005 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Zirconia-based stationary phase; Ibuprofen; Impurities

1. Introduction

1.1. Zirconia-based analytical columns

Nowadays most analytes are processed on alkyl silane bonded silica-based stationary phases. Solutes are bonded predominately by hydrophobic (reversed-phase) interactions with the bonded site. However, the presence of residual silanol groups on silica's surface greatly complicates the retention process especially for basic drugs [1].

Zirconia is a material with many unique properties which make it attractive as a chromatographic support, notably its excellent chemical stability and unique surface chemistry [2]. Zirconia due to its superb chemical and thermal stability is one of the major alternatives to a silica [2–5]. It is an amphoteric material with anion-exchange properties in neutral and acidic solutions and cation-exchange properties in alkaline solutions [2]. Numerous studies have shown that zirconia-

based materials can be used for separation of nonpolar and polar solutes over the pH range 0–14 and temperatures up to 200 °C [1,6–10]. In contradistinction to the behaviour of the silanol groups, Zr(IV) sites (hard Lewis acids) on zirconia cause hard Lewis base analytes (R-SO₃⁻, R-PO₃⁻, R-COO⁻, etc.) to absorb quite tenaciously [1]. Such Lewis acid–base interactions are characterised by especially slow desorption kinetics, which can broaden and tail peaks. However when a strongly competing Lewis base (PO₄³⁻, F⁻, carboxylates) is deliberately added to the eluent in sufficiently high concentration, the accessible Zr(IV) sites are dynamically blocked by absorption of the eluent. Addition of the hard Lewis base to the eluent thereby greatly improves the peak shape of the analytes. Polybutadiene-coated zirconia (PBD-ZrO₂) has been the most studied zirconia bonded reversed-phase material today [1,9–13].

According to the paper reported by Zhao and Carr [14] another type of zirconia coated stationary phase seems to have more favourable properties than PBD-ZrO₂. Polystyrene coated-zirconia (PS-ZrO₂) does exhibit different selectivity than PBD-ZrO₂ or octadecyl-bonded silica (C18-SiO₂) to-

* Corresponding author. Tel.: +420 495 067 446; fax: +420 495 512 423.
E-mail address: kucerar@faf.cuni.cz (R. Kučera).

wards a variety of analytes and it is a unique, selective stationary phase, which can provide effective separations for many compounds. In addition, PS-ZrO₂ exhibits much greater selectivity than does PBD-ZrO₂ for the separation of structural isomers which differ in the position of phenyl group. In general, even though the carbon content of PS-ZrO₂ is much lower than that of conventional reversed-phase material, such as C18-SiO₂, polar analytes display sufficient retention. In several examples comparable or better resolution were found in much shorter analysis time. PS-ZrO₂ exhibits good mass transfer characteristics, furthermore the material is stable at extreme pH (1–13) and at temperatures as high as 160 °C [14].

1.2. Ibuprofen

Ibuprofen – (*R,S*)-2-(4-isobutylphenyl)propionic acid – was introduced in the late sixties as a safe non-steroidal anti-inflammatory drug. Ibuprofen (Ibu) is for its analgesic, antipyretic and platelet antiaggregatory properties used in a treatment of rheumatic arthritis, osteoarthritis, fever, pain, migraine and dysmenorrhoea. Ibu is better tolerated than aspirin, indomethacin and pyrazolonic derivatives. In addition, it is well absorbed from gastrointestinal tract following oral or rectal administration. There is also some absorption following topical application to the skin [15–17].

Ibu is widely used as a therapeutic drug and several HPLC [18–22], ITP [23], MEKC [24–26] or SPE-UV [27] methods for its determination in pharmaceutical preparations, as well in the biological material [28] have been described in the literature.

The approach to quality control of Ibu differs in the United States and in the European countries. The US Pharmacopoeia describes a RP-HPLC method for impurities using a 150 mm × 4.0 mm i.d., column, mixture of water (pH 2.5)–acetonitrile (1340:680, v/v) as an eluent, UV detection at 214 nm and the temperature 30 °C. The area of an

individual secondary peak, which appears in the test sample, should not exceed 0.3% and the sum of secondary peaks must not be higher than 1%. The compounds are not specified. A special attention is paid to a content of 4-isobutylacetophenone (Ibap) [29]. It is well known that Ibap causes adverse effect in the central nervous system and presents high dermal adsorption [19]. The assay is carried out under different conditions than the first chromatography 250 mm × 4.6 mm i.d. column, a mixture of 1% chloroacetic acid solution (pH 3.0)–acetonitrile (40:60, v/v) as an eluent, UV detection at 254 nm, ambient temperature. The amount of 4-isobutylacetophenone is not higher than 0.1% [29].

The British Pharmacopoeia (BP) describes a similar HPLC method for related substances of Ibu in raw material and in pharmaceuticals like the USP. The BP specifies five substances as possible impurities and indicates the importance of control of 2-(4-*n*-butylphenyl)propionic acid (Bppa) in raw material and pharmaceuticals (except oral suspension), which content must not exceed 0.3% and the area corresponding to the sum of secondary peaks must be lower than 0.7% of the Ibu peak. The amount of 4-isobutylacetophenone in oral suspension is controlled (0.25%) [30].

The European Pharmacopoeia has brought into practice a gradient method for quality control of Ibu and has described potential impurities A–R. The substances A–E correspond with impurities mentioned in the BP. The main attention is paid to the Bppa and the limit is the same as in the BP [31].

The critical point of Ibu assays, mentioned in the European Pharmacopoeia and in the BP, is the separation of the main peak and Bppa, because both individuals are chain isomers and their characteristics are very kindred [32], see Table 1. The chromatographic system can be used for Ibu evaluation only in the case that the ratio of peak height due to Bppa and the height above base-line of the lowest point of the curve separating this peak from the peak due to Ibu is greater than 1.5. If necessary the amount of acetonitrile in the mobile phase has to be adjusted in order to obtain the required resolution

Table 1
Comparison of physical–chemical characteristic of ibuprofen and 2-(4-*n*-butylphenyl)propionic acid (Bppa)

Ibu			Bppa		
Property	Value	Condition	Property	Value	Condition
H donors	1		H donors	1	
H acceptors	2		H acceptors	2	
Molecular weight	206.28		Molecular weight	206.28	
log <i>P</i>	3.722 ± 0.227		log <i>P</i>	3.906 ± 0.222	
log <i>D</i>	3.72	pH 1	log <i>D</i>	3.91	pH 1
log <i>D</i>	3.58	pH 4	log <i>D</i>	3.77	pH 4
log <i>D</i>	1.15	pH 7	log <i>D</i>	1.35	pH 7
log <i>D</i>	0.25	pH 8	log <i>D</i>	0.45	pH 8
log <i>D</i>	−0.036	pH 10	log <i>D</i>	−0.18	pH 10
p <i>K</i> _a	4.41 ± 0.20	Most acidic	p <i>K</i> _a	4.43 ± 0.20	Most acidic
Molar solubility	Sparingly soluble	pH 1	Molar solubility	Sparingly soluble	pH 1
Molar solubility	Sparingly soluble	pH 4	Molar solubility	Sparingly soluble	pH 4
Molar solubility	Slightly soluble	pH 7	Molar solubility	Slightly soluble	pH 7
Molar solubility	Soluble	pH 8	Molar solubility	Soluble	pH 8
Molar solubility	Very soluble	pH 10	Molar solubility	Very soluble	pH 10

[30,31]. Several authors have already dealt with the problems of separation of Ibu and its impurities [19–21,25,26]. Neither HPLC methods using silica based C18 columns as stationary phase [19,21], nor MEKC method [25,26] gave the sufficient resolution between Ibu and Bppa. Recently, has been reported a CEC method for quality control of Ibu by Quaglia et al. The peaks of Ibu and Bppa are separated quite well but the analysis time is about 100 minutes [33].

The goal of our study was to find better chromatographic conditions for the separation of Ibu and its related compounds, especially for the separation of Ibu and its chain isomer Bppa. The resolution is controlled by the selectivity factor (α), plate number (N) and retention factor (k'), and among these parameters, the selectivity factor has the most significant effect on resolution [34]. As a result, tuning the selectivity by changing the eluent type, the stationary-phase type, the eluent composition and sometimes the temperature can optimise the resolution. In fact, eluent type and the stationary-phase type are two of the most effective variables for modulating the selectivity [3]. That is why the polystyrene-coated zirconia stationary phase was chosen as a potential key to solving the above-mentioned separation problem.

2. Experimental

2.1. Instruments

All chromatographic work was performed on a Shimadzu chromatography system equipped with system controller SCL-10A_{VP}, detector SPD-10A_{VP}, pump LC-10AD_{VP}, autoinjector SIL-10AD_{VP}, column oven CTO-10AS_{VP}, degasser DGU-14A, low pressure module FCV-10AL_{VP} and a computer-based chromatographic software Class-VP, ver. 6.12 Shimadzu (Tokyo, Japan). The UV-vis spectrometer UV2401PC Shimadzu (Tokyo, Japan) was used for measurement of the UV-spectra.

2.2. Chromatographic columns

In experimental work, following analytical HPLC columns were used: Discovery[®]Zr-PS, 150 mm × 4.6 mm i.d., particle size 5 μ m, Sigma-Aldrich Chemie (Schnelldorf, Germany) and Sepharon SGX RPS, 150 mm × 4.0 mm i.d., particle size 5 μ m, Tessek (Prague, Czech Republic).

2.3. Chemicals

Ibuprofen Sigma (St. Louis, MO, USA); 4-isobutylacetophenone 98% (Lancaster, UK); 2-(4-*n*-butylphenyl)propionic acid was purchased from Council of Europe, European Directorate for the Quality Control of Medicines (Strasbourg, France);

2-Hydroxy-2-(4-isobutylphenyl)propionic acid (2OH), 2-(4-isobutylphenyl)propionic acid (Bopa) and 2-(4-isobu-

tylphenyl)propionamide (Amide), Zentiva, a.s. (Czech Republic). Methanol (MeOH), acetonitrile (ACN), tetrahydrofuran (THF), propane-2-ol (IPA), sodium dihydrophosphate p.a., phosphoric acid 85% p.a., sodium chloride p.a., sodium phosphate p.a. were obtained from Lach-Ner (Czech Republic); tetramethylammonium chloride was purchased from Fluka AG (Buchs SG, Switzerland).

2.4. Sample preparation

A mixture of methanol–water (50:50, v/v) was used as a solvent for preparation of all solutions. Stock solutions of Ibu impurities were prepared at concentration 1 mg ml⁻¹. The standard solutions were obtained by diluting the stock solutions to the concentration 0.006 mg ml⁻¹ what corresponds to 0.3% of Ibu content (2 mg ml⁻¹). The test solution of Ibu was prepared by accurately weighing 20.0 mg of Ibu into 10 ml volumetric flask, dissolved and diluted to the mark. The solution with admissible amount of Ibu impurities (Limit solution) was prepared by accurately weighing 20.0 mg of Ibu into 10 ml volumetric flask and 60 μ l from each stock solution of Ibu impurities was added and diluted to the mark.

2.5. Buffer preparation

- Phosphate buffer pH 6.4 was prepared by dissolving 2.5 g sodium phosphate, 2.5 g sodium dihydrophosphate and 8.2 g sodium chloride in 1000 ml flask [35].
- Phosphate buffer pH 2.33 – 50 mM phosphoric acid solution was adjusted with 1 M NaOH to pH 2.33.
- Phosphate buffer pH 4.5 – 50 mM sodium dihydrogenphosphate solution was adjusted with 5% phosphoric acid to pH 4.5.

3. Results and discussion

3.1. Alteration of eluent type

The problematic point of the pharmacopoeial assay [30,31] is to manage the sufficient resolution between peaks due to Ibu and Bppa. We focused on this problem firstly. As mentioned earlier the resolution can be optimised by tuning the selectivity by changing the eluent type, the eluent composition, temperature or the stationary phase. In the preliminary study MeOH instead of ACN in the mobile phase was tested to overcome the separation problem. Standard C18 column, as described in the Pharmacopoeias [30,31] was used. The best results were obtained with MeOH–phosphate buffer (pH 6.4) (45:55, v/v) containing 5 mM tetramethylammonium chloride as ion-pair additive, see Fig. 1. The results have shown, that there was a potential to achieve satisfactory separation with MeOH, but it was not possible to get better selectivity solely by altering the mobile phase composition.

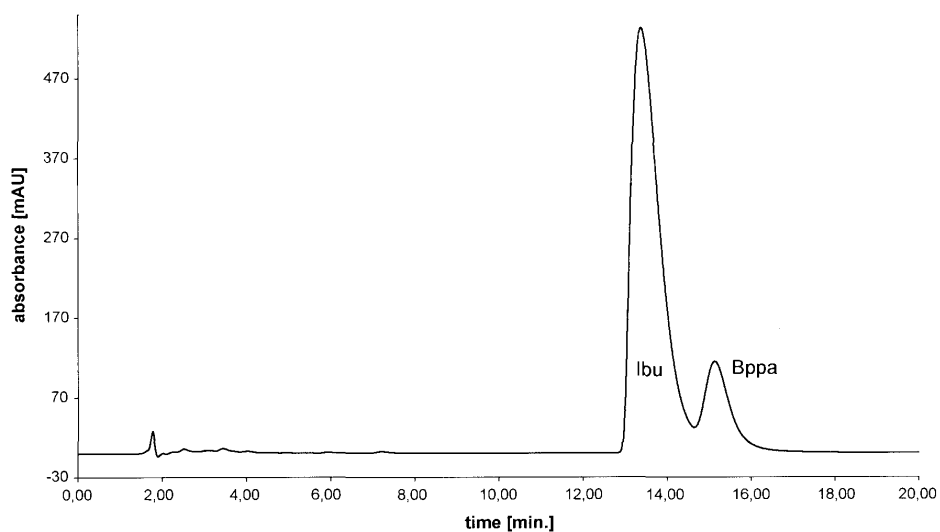


Fig. 1. Separation of Ibu and Bppa on silica based C18 column. Mobile phase MeOH–phosphate buffer (pH 6.4) (45:55, v/v) with 5 mM tetramethylammonium chloride; flow rate 0.5 ml min^{-1} , UV detection at 219 nm.

3.2. Alteration of stationary phase type

The stationary phase is another most effective variable for modulating the selectivity [3,34]. The retention mechanism on the zirconia-based stationary phases is a result of classical reversed-phase interactions and ion exchange properties. According to previously reported papers the PS-ZrO₂ column seemed to be good for our purpose – it shows good mass

transfer characteristics, stability at extreme pH and temperature, substantial difference in selectivity compared to other phases, especially with respect to polybutadiene-coated zirconia [14,36].

We first tried to use the reverse phase mechanism that manifests especially at low pH area, for separation Ibu and Bppa. Lewis acid–base interactions on zirconia are characterised by especially slow desorption kinetics, which can broaden

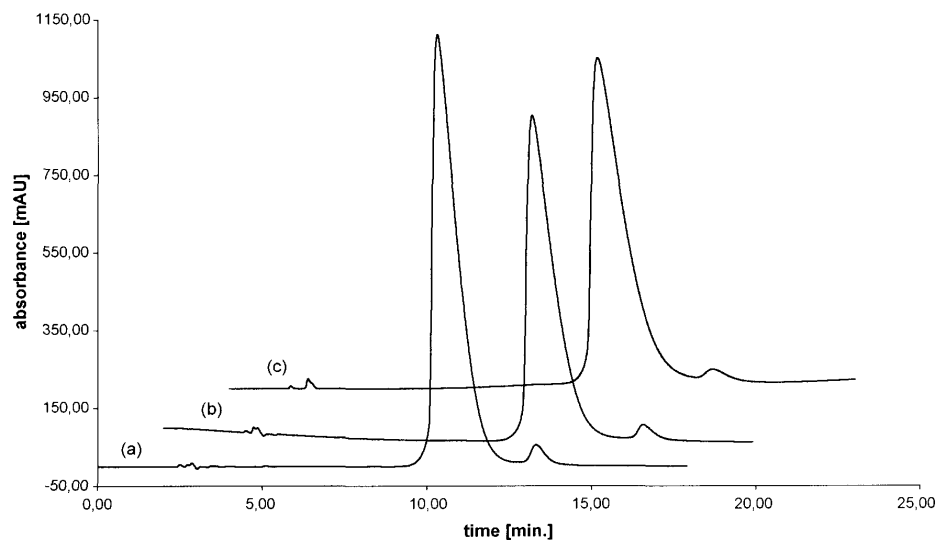


Fig. 2. Effect of different organic solvent on peak shape and symmetry on PS-ZrO₂ column. Mobile phase methanol–phosphate buffer (pH 2.33)–organic modifier (31:64:5, v/v/v). First peak Ibu, second peak Bppa; (a) tetrahydrofuran; (b) acetonitrile; (c) propane-2-ol.

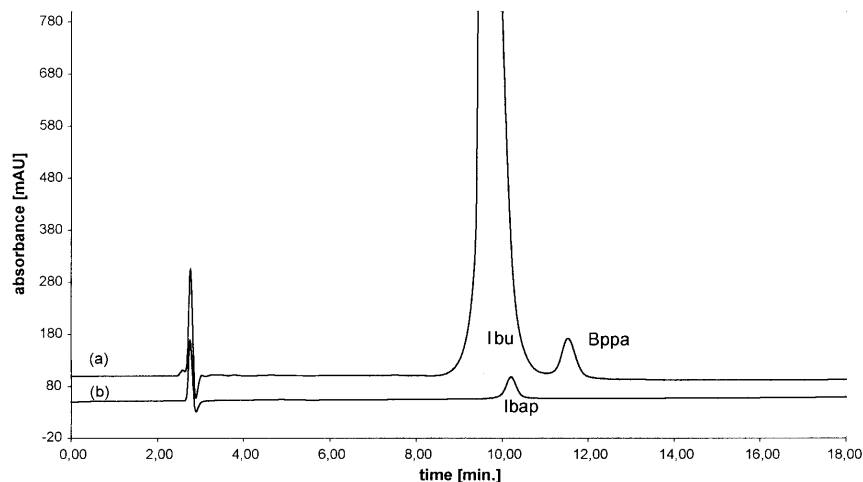


Fig. 3. (a) Separation of Ibu and Bppa on PS-ZrO₂ column. Mobile phase MeOH–phosphate buffer (pH 2.33)–tetrahydrofurane (30:65:5, v/v/v), flow rate 0.5 ml min⁻¹, column temperature 60 °C, UV detection at 219 nm. (b) Analysis of Ibap under the same conditions, detection at 258 nm.

peaks. However, addition of the hard Lewis base to the eluent (PO₄³⁻, in our case) greatly improves the peak shape of the analytes. In order to improve more the peak profile a small amount of organic modifier was added and temperature was adjusted. IPA, ACN and THF were tested as possible organic modifiers. THF had the best effect on peak tailing, see Fig. 2. The temperature 60 °C proved to be sufficient for peak shape and resolution between the peaks. The best conditions

were obtained with MeOH–phosphate buffer (pH 2.33)–THF (30:65:5, v/v/v), see Fig. 3a.

3.2.1. Zirconia-based stationary phase at optimal pH

The PS-ZrO₂ exhibits different selectivity toward silica-based stationary phases, and this fact manifested negatively on separation of degradation product Ibap from Ibu and Bppa. Ibu was co-eluted with the peak due to Ibu under pH 2.33,

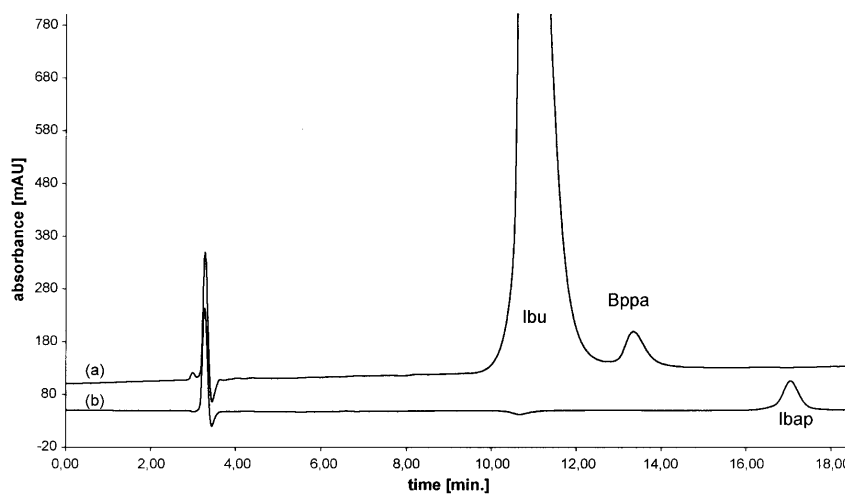


Fig. 4. (a) Separation of Ibu and Bppa on PS-ZrO₂ column. Mobile phase MeOH–phosphate buffer (pH 4.5)–tetrahydrofurane (25:70:5, v/v/v), flow rate 0.5 ml min⁻¹, column temperature 60 °C, UV detection at 219 nm. (b) Analysis of Ibap under the same conditions, detection at 258 nm.

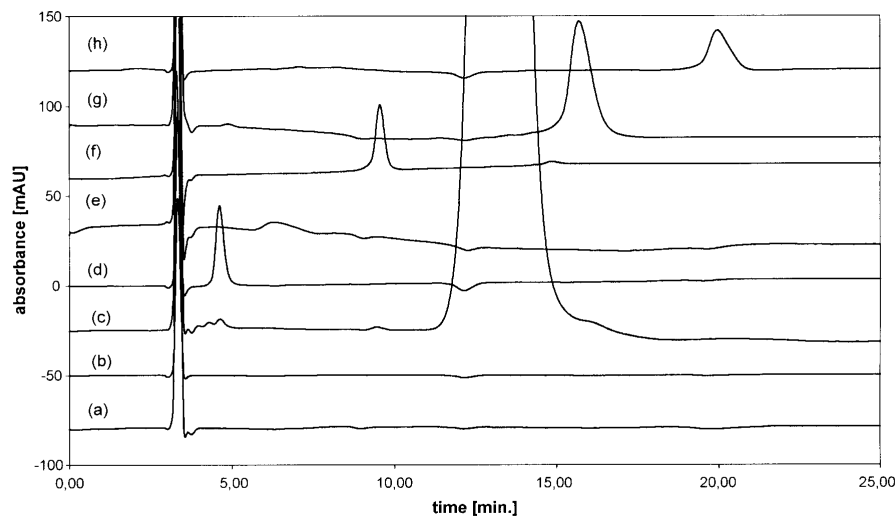


Fig. 5. Demonstration of the selectivity of the method. (a) Methanol–water (50:50, v/v), detection at 219 nm; (b) methanol–water (50:50, v/v), detection at 258 nm; (c) Ibu detection at 219 nm; (d) Bopa, detection at 258 nm; (e) 2OH, detection at 219 nm; (f) Amide, detection at 219 nm; (g) Bppa, detection at 219 nm; (h) Ibap, detection at 258 nm; All chromatograms were obtained under optimal conditions.

see Fig. 3. To overcome this problem the ion-exchange capability of the PS-ZrO₂ column was used. The mobile phases with different pH values were tested. The co-elution was still observed in the area of pH 2.33–4.0. The retention of Ibap was stronger in the range of pH values above 5.0 than that of Ibu and Bppa, but the separation of these two compounds got worse. The pH 4.5 was proved to be optimal for separation of all three compounds, see Fig. 4. If phosphate buffer was replaced with the acetate buffer at the same pH the analysis was impracticable. Acetate is a weaker Lewis base than phosphate is and the interactions between the analyte and stationary phase were so strong that unacceptable retention time (above 40 min) and peak tailing were occurred.

3.3. Separation of other related compounds

The pharmacopoeias [29–31] pay special attention to Bppa – impurity from the manufacture process [37], and Ibap – the main degradation product of Ibu [17]. The analytical profiles of drug substances describe 2-(4-isobutylphenyl)propionic acid (Bopa) as another possible impurity of Ibu, which was observed together with Ibap after exposition to harsh conditions such as 1 M NaOH, 1 M HCl or 50% H₂O₂. Ibap arises via radical induced decarboxylation followed by benzylic oxidation [17]. In the recently published paper Bopa is presented as a product of oxidation process [38]. Hence presence of Ibap and/or Bopa is indicating a decomposition of Ibu. 2-(4-Isobutylphenyl)propionamide (Amide) and 2-hydroxy-2-(4-isobutylphenyl)propionic acid (2OH) described as impurities C and M, respectively [31]

were separated successfully under these conditions too, see Fig. 5.

3.4. Choice of an optimal wavelength

The related compounds of Ibu (Bppa, Amide, 2OH) have the local absorption maxima around 220 nm. The degradation products (Ibap, Bopa) exhibit bathochromic shift and the maxima of absorption are shifted to 258 nm, see Fig. 6. Unfortunately in the area around 220 nm these compounds have local minima, so the sensitivity of detection is very low. In order to gain maximal sensitivity of the assay the dual-wavelength modus at 219 nm and 258 nm was performed.

3.5. Optimal chromatographic condition for analysis of Ibu impurities

Mobile phase MeOH–phosphate buffer (pH 4.5, 50 mM)–THF (21:74:5, v/v/v), detector in the dual-wavelength modus set at 219 nm and 258 nm, flow rate 0.5 ml min⁻¹ and the column temperature 60 °C are the optimal chromatographic conditions for the analysis of all above-mentioned compounds. The analysis under these conditions is completed within 22 minutes. The applicability of the method was also tested.

3.5.1. Linearity

The linearity test was performed using five concentrations levels for each impurity i.e. Bopa, 2OH, Amide, Bppa and Ibap in the range 0.03–0.36% of Ibu content. The linearity of

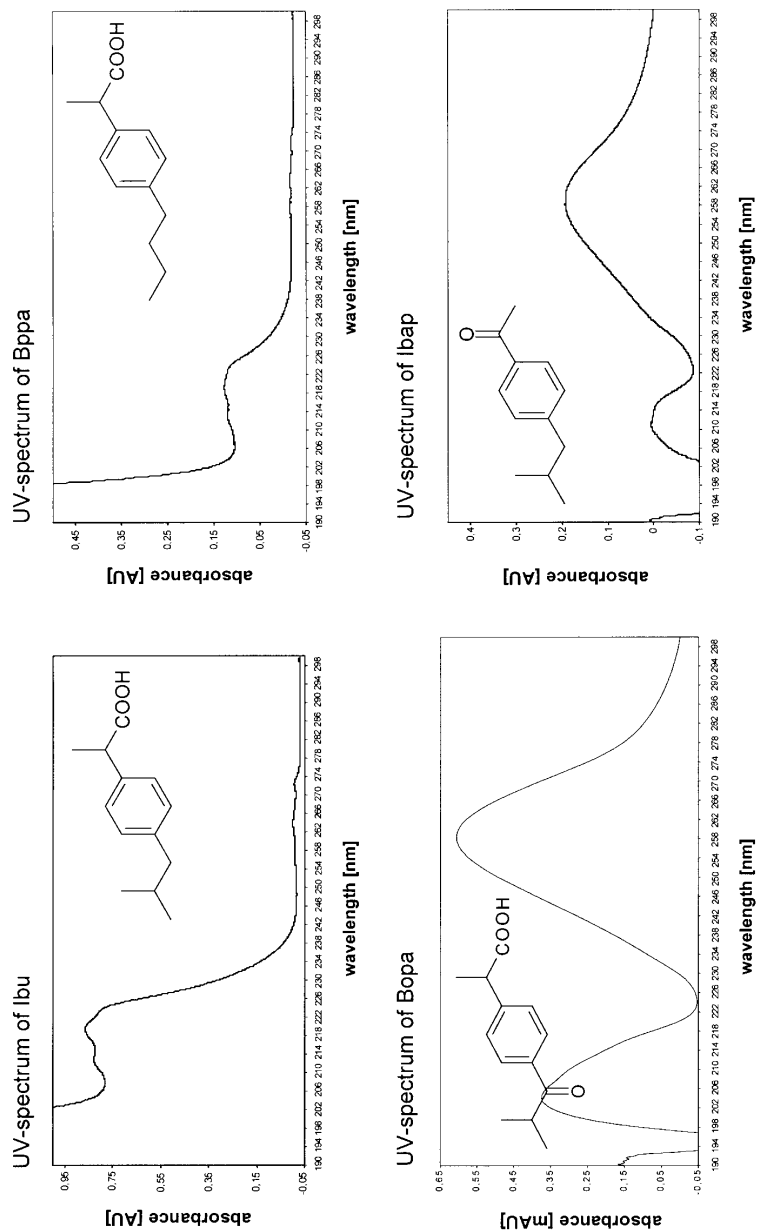


Fig. 6. Differences in the UV-spectra of Ibu, its related compounds and degradation products.

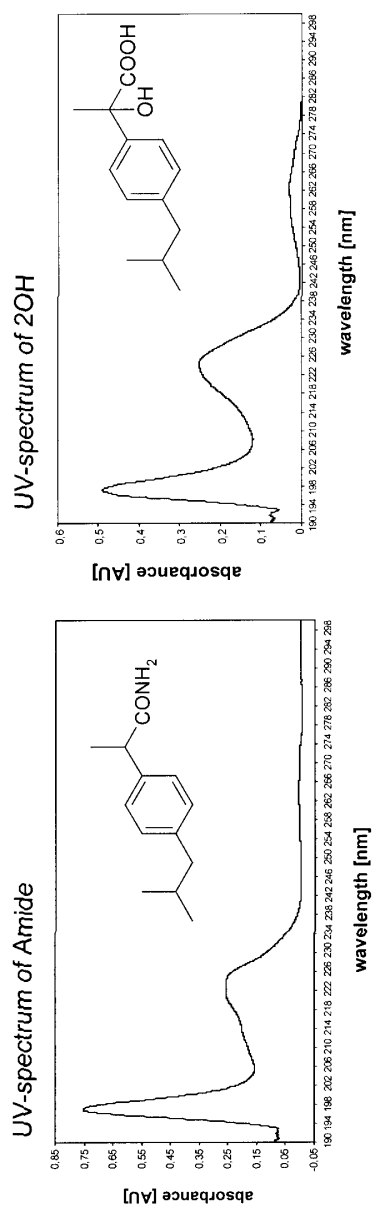


Fig. 6. (Continued).

Table 2
Limits of detection (LOD) and limits of quantification (LOQ) of each analyte

Analyte	LOD (mg ml ⁻¹)	LOQ (mg ml ⁻¹)
Bppa	4.56×10^{-5}	1.52×10^{-4}
Bopa	4.73×10^{-5}	1.57×10^{-4}
Ibap	5.22×10^{-5}	1.74×10^{-4}
Amide	3.47×10^{-4}	1.15×10^{-3}
2OH	8.22×10^{-4}	2.74×10^{-3}

Ibu was tested in the range 80–120%. The correlation coefficients, *r*, found were higher than 0.999.

3.5.2. Limit of detection (LOD) and limit of quantification (LOQ)

A signal-to-noise (S/N) ratio of 3 is generally considered to be acceptable for estimating the detection limit. A typical S/N ratio for calculating the quantitative limit is 10:1. Both limits were calculated, see Table 2.

3.5.3. Response factor

The responses of the detector to 0.3% solutions of 2OH, Amide and Bppa at 219 nm were divided by response of the detector to a 0.3% solution of Ibu at 219 nm. The response factors for Bopa and Ibap were calculated for wavelength 258 nm in the same way, see Table 3. The response factors differ considerably from each other; and thus it is better to prepare the solution with limit concentration of Ibu impurities for verification of Ibu quality, see Fig. 7.

Table 3
Response factors of each analyte

Analyte	Response factor
2OH	0.14
Amide	0.14
Bppa	2.78
Bopa	16.67
Ibap	33.33

3.5.4. Selectivity

The chromatograms obtained under optimal conditions, Fig. 5, exemplify the selectivity for Ibu, Amide, 2OH, Bppa, Bopa and Ibap. All the compounds were well separated within 22 minutes.

3.5.5. Robustness

The problematic point of the assay was to manage the sufficient resolution between peaks due to Ibu and Bppa and this criterion was the parameter for robustness test. The parameters, which might influence the resolution, (composition of mobile phase $\pm 2\%$ of MeOH, pH ± 0.2 , temperature $\pm 5^\circ\text{C}$, flow rate $\pm 0.1 \text{ ml min}^{-1}$) were implied in the test. These small changes do not affect substantially the resolution between Ibu and Bppa.

Interesting results were obtained with the sample that was dissolved not in methanol but in acetonitrile. The peaks of Ibu and Bppa were not sufficiently resolved. The solvent has importance for achieving the expected selectivity of the assay. The conclusion is that the method is robust enough for evaluation of tested Ibu related compound and degradation products.

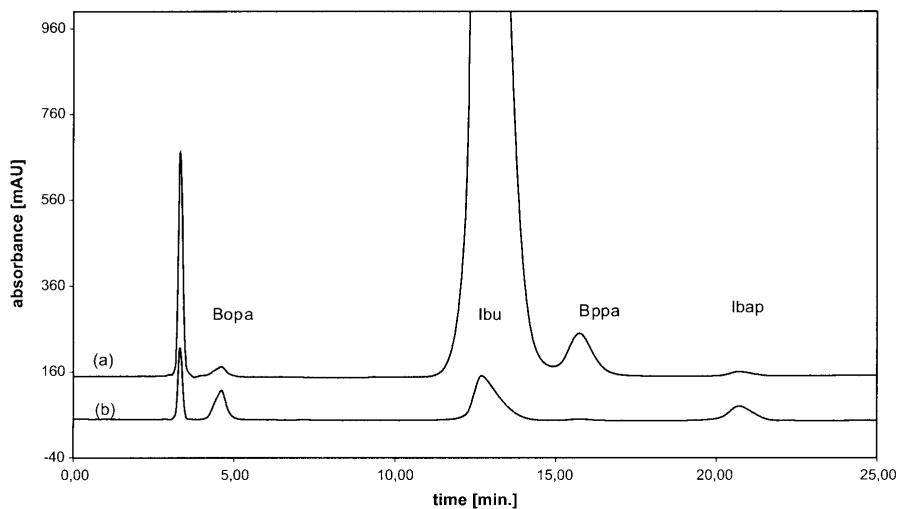


Fig. 7. (a) Separation of Ibu decomposition products (Bopa, Ibap) and Bppa under optimal conditions; detection performed at 219 nm. (b) Separation of Ibu decomposition products (Bopa, Ibap) and Bppa under optimal conditions; detection performed at 258 nm.

4. Conclusions

Zirconia-based stationary phase coated with polystyrene is substantially different from the conventional C18-SiO₂. We used this column with advantage for a HPLC separation of ibuprofen from some related compounds and its two decomposition products. This type of column offers both wide range of pH and also wide range of temperature to achieve optimal separation. It has been shown one practical example of employing zirconia-based stationary phase. Even though the carbon content of PS-ZrO₂ is much lower than that of conventional reversed-phase material, analytes exhibit sufficient retention and resolution, but with substantially improved analysis time. In conclusion, the method is applicable for evaluation of Bopa, 2OH, Amide, Bppa and Ibap in the raw material and for the monitoring of the degradation processes. It can be also used for the assay of ibuprofen. The method is simple, rapid and sensitive enough. The mobile phase contains less organic solvent than it is generally common. The flow rate is 0.5 ml min⁻¹, so the total amount of organic solvent consumption during analysis has been reduced to 18% of original value, which is not negligible from an environment viewpoint.

Acknowledgement

This work was implemented with the support of Research Project MSM 111600001.

References

- [1] X. Yang, J. Dai, P.W. Carr, *J. Chromatogr. A* 996 (2003) 13–31.
- [2] J. Nawrocki, M.P. Rigney, A. McCormick, P.W. Carr, *J. Chromatogr. A* 657 (1993) 229–282.
- [3] J. Zhao, P.W. Carr, *Anal. Chem.* 71 (1999) 2332–2623.
- [4] J.W. Li, P.W. Carr, *Anal. Chem.* 69 (1997) 837–843.
- [5] J.W. Li, Y. Hu, P.W. Carr, *Anal. Chem.* 69 (1997) 3884–3888.
- [6] Y. Hu, X. Yang, P.W. Carr, *J. Chromatogr. A* 968 (2002) 17–29.
- [7] J. Zhao, P.W. Carr, *Anal. Chem.* 71 (1999) 5217–5224.
- [8] M.P. Rigney, E.F. Funkenbush, P.W. Carr, *J. Chromatogr.* 499 (1990) 291–304.
- [9] S.M. Fields, C.Q. Ye, D.D. Zhang, B.R. Branch, X.J. Zhang, N. Okafo, *J. Chromatogr. A* 913 (2001) 197–204.
- [10] S.J. Marin, B.A. Jones, W.D. Felix, J. Clark, *J. Chromatogr. A* 1030 (2004) 255–262.
- [11] M.P. Rigney, T.P. Weber, P.W. Carr, *J. Chromatogr.* 494 (1984) 273–291.
- [12] B.C. Trammell, M.A. Hillmyer, P.W. Carr, *Anal. Chem.* 73 (2001) 3323–3331.
- [13] J. Dai, X. Yang, P.W. Carr, *J. Chromatogr. A* 1005 (2003) 63–82.
- [14] J. Zhao, P.W. Carr, *Anal. Chem.* 72 (2000) 302–309.
- [15] W. Martindale, in: J. Reynolds (Ed.), *The Extra Pharmacopoeia*, 30th ed., Pharmaceutical Press, London, 1999.
- [16] B.G. Katzung, *Basic and Clinical Pharmacology*, H&H, Prague, 1994.
- [17] J.D. Higgins, T.P. Gilmore, S.A. Martellucci, R.D. Bruce, *Analytical Profiles of Drug Substances and Excipients*, vol. 27, Academic Press, New York, 2001.
- [18] P.C. Damiani, M.D. Borragetti, A.C. Olivieri, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 25 (2001) 679–683.
- [19] A.I. Gasco-Lopez, R. Izquierdo-Hornillos, A. Jimenez, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 21 (1999) 143–149.
- [20] V.E. Haikala, I.K. Heimonen, H.J. Vuorela, *J. Pharm. Sci.* 80 (1991) 456–458.
- [21] P.A. Asmus, *J. Chromatogr.* 331 (1985) 169–176.
- [22] S. Ravisankar, M. Vasudevan, M. Gandhimathi, B. Suresh, *Talanta* 46 (1998) 1577–1581.
- [23] J. Sadecka, M. Cakrt, A. Hercegovca, J. Polonsky, I. Skacani, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 25 (2001) 881–891.
- [24] M.G. Donato, W. Baeyens, W. Van Den Bossche, P. Sandra, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 12 (1994) 21–26.
- [25] K. Persson-Stubberud, O. Astrom, *J. Chromatogr. A* 798 (1998) 307–314.
- [26] K. Persson-Stubberud, O. Astrom, *J. Chromatogr. A* 826 (1998) 95–102.
- [27] D. Bonazzi, V. Andrisano, R. Gatti, V. Cavrini, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 13 (1995) 1321–1329.
- [28] J. Sochor, J. Klimes, J. Sedlacek, *Czech Slovak Pharm.* 46 (1997) 78–83.
- [29] *Proceedings of the United States Pharmacopoeia XXVI*, The United States Pharmacopoeial Convention, Rockville, USA, 2003.
- [30] *The British Pharmacopoeia*, Health Ministry, Stationary Office, London, 2001.
- [31] *The European Pharmacopoeia*, Supplement 4.2, fourth ed., Council of Europe, Directorate for the Quality of Medicines, 2002.
- [32] *Advanced Chemistry Development (ACD)*, Software Solaris V4.67 (1994–2003 ACD).
- [33] M.G. Quaglia, E. Donati, S. Fanali, P. Catarcini, *Farmaco* 58 (2003) 699–705.
- [34] L.R. Snyder, L.J. Gleich, J.J. Kirkland, *Practical HPLC Method Development*, second ed., Wiley/Interscience, New York, 1996.
- [35] *Czech Pharmacopoeia*, Grada Publishing s.r.o., Prague, 2002.
- [36] J. Zhao, P.W. Carr, *Anal. Chem.* 72 (2000) 4413–4419.
- [37] A. Kleeman, J. Engel, B. Kutcher, D. Reichert, *Pharmaceutical Substances, Synthesis Patent Applications*, 4th ed., Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 2000.
- [38] G. Caviglioli, V. Posocco, V. Parodi, S. Cafaggi, A. Alzati, G. Bignardi, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 30 (2002) 499–509.

Radim Kučera¹
Václav Žižkovský¹
Jaroslav Sochor¹
Jiří Klimeš¹
Jiří Dohnal²

¹Charles University in Prague,
Faculty of Pharmacy in Hradec
Králové, Department of
Pharmaceutical Chemistry and
Drug Control, Hradec Králové,
Czech Republic

²Zentiva, a.s., Prague 10, Czech
Republic

Utilization of zirconia stationary phase as a tool in drug control

Zirconia-based stationary phases represent an interesting alternative to silica-based materials. Two zirconia-based stationary phases were studied as an option for use in drug analysis. The different properties of zirconia material, distinct from RP silica-columns, were employed for the development of a novel and rapid stability monitoring HPLC method. This method enables simultaneous control of possible degradation processes of active substance (ibuprofen) as well as antimicrobial excipients (methyl- and propylparaben). The separation of ibuprofen, its two main degradation products 2-(4-isobutrylphenyl)propionic acid and 4-isobutylacetophenone, parabens, and 4-hydroxybenzoic acid as their degradation product was successfully accomplished on a Zr-CarbonC18 column using a mobile phase consisting of acetonitrile-phosphate buffer (pH 4.8)-propan-2-ol (27:56:17, v/v/v). Detection was performed at 258 nm and the analysis was completed within 17 minutes.

Key Words: Zirconia-based stationary phase; Stability monitoring; Ibuprofen; Parabens

Received: February 15, 2005; revised: May 6, 2005; accepted: May 31, 2005

DOI 10.1002/jssc.200500076

1 Introduction

High performance liquid chromatography is a widespread separation technique that occupies the leading position in routine pharmaceutical analysis. A chromatographic column is without doubt the heart of a chromatographic system. At present, most analytes are processed on various RP silica-based stationary phases. Solutes are retained predominantly by hydrophobic (reversed-phase) interactions with the bonded phase [1, 2]. Silica possesses known limitations despite its numerous positive properties [3, 4].

Zirconia-based stationary phases were relatively recently introduced into HPLC and they offer some advantages over silica-based phases. Zirconia is a material with many unique properties that make it attractive as a chromatographic support. These columns represent very useful alternatives to silica-based materials and they have been studied extensively [2, 3, 5–14]. Zirconia is an amphoteric material with anion-exchange properties in neutral and acid solutions and with cation-exchange properties in alkaline solutions. The most useful features are its high

Correspondence: Radim Kučera, Charles University in Prague, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové, Department of Pharmaceutical Chemistry and Drug Control, Heyrovského 1203, CZ-500 05 Hradec Králové, Czech Republic.
Phone: +420 495 067 446. Fax: +420 495 512 423.
E-mail: radim.kucera@faf.cuni.cz.

Abbreviations: Ibu, Ibuprofen; Bopa, 2-(4-isobutrylphenyl)propionic acid; Ibap, 4-isobutylacetophenone; MeP, methylparaben; PrP, propylparaben; PhBa, 4-hydroxybenzoic acid.

thermal and chemical stability over a wide range of temperature (up to 200°C) and pH (1 to 14) [1–3, 8, 10, 11, 15]. In contradistinction to the behaviour of the silanol groups, Zr(IV) sites (hard Lewis acids) on zirconia cause hard Lewis base analytes (R-SO₃⁻, R-PO₃⁻, R-COO⁻, etc.) to adsorb quite tenaciously. Such Lewis acid-base interactions are characterised by especially slow desorption kinetics, which cause broad and tailed peaks. However, when a strongly competing Lewis base (PO₄³⁻, F⁻, carboxylates) is deliberately added to the eluent in sufficient high concentration, the accessible Zr(IV) sites are dynamically blocked by adsorption of the eluent. Thus addition of the hard Lewis base to the eluent greatly improves the peak shape of the analytes [1, 3, 9, 12]. Polybutadiene-coated zirconia (PBD-ZrO₂) has been the most studied zirconia-based reversed-phase material up to today [2, 3, 6, 9, 11].

Zirconia-based stationary phases have been used for separation of many chemical substances with different structures and physico-chemical characteristics, for example variety of nonpolar aromatic positional isomers, triazines, steroids [13], alkaloids, and antidepressants [16], beta-blockers, local anesthetics, *p*-alkylbenzylamines [3, 9], testosterone, and a series of related compounds [8]. From the chemical point of view all these compounds have basic or neutral character. The separation of samples containing hard Lewis base moieties such as anions of acidic compounds, nucleotides, peptides or proteins is rather problematic due to the presence of hard Lewis acid sites on the zirconia surface. Polymers coated on zirconia's surface do not completely block these Lewis

1308 Kučera, Žižkovský, Sochor, Klimeš, Dohnal

acid sites. The salt content is needed to suppress the strong coulombic interactions and to block unwanted Lewis acid-base interactions [17–22].

Quality control of raw materials and consecutive monitoring of potency and safety of pharmaceutical products constitutes an important current subject of investigation in the pharmaceutical sector. The decomposition process can result in a loss of potency and quality or in a loss of safety of drugs and drug formulations due to creation of minor ineffective or toxic degradation products. In contrast to model samples used in studies describing features of columns, real samples are usually more complicated because they contain different moieties with variable physical-chemical properties. It is also necessary to optimize resolution. In fact, eluent type and stationary phase type present effective variables for modulating the selectivity and thus also for achieving successful separation on an HPLC column [5, 13].

Ibuprofen – (*R,S*)-2-(4-isobutylphenyl)propionic acid – is a non-steroidal anti-inflammatory drug with analgesic, antipyretic, and platelet antiaggregant properties. From the chemical point of view ibuprofen (ibu) is relatively stable, but its sensitivity to oxidation and photolytic degradation has been reported [23]. Especially in solution, 4-isobutylacetophenone (Ibap) and 2-(4-isobutylphenyl)propionic acid (Bopa) are present. Ibap arises via radical-induced decarboxylation followed by benzylic oxidation. Bopa is a product of oxidative processes acting on the basic structure [24]. 4-Isobutylacetophenone has shown

adverse effects on the central nervous system and presented high dermal absorption [23, 25].

Alkyl (methyl, ethyl, propyl or butyl) esters of 4-hydroxybenzoic acid (parabens) are widely used as antimicrobial preservatives in the pharmaceutical, cosmetic, and food industry. They are generally used as a combination of two or more alkyl esters, because such combinations show enhanced antimicrobial activity. Parabens degrade by hydrolysis under alkaline or acidic conditions to form 4-hydroxybenzoic acid (PhBa), whose antimicrobial activity is not high enough [6] to prevent microbial attack [26–28].

The analysis of Ibu, methyl-, propylparaben and their degradation products on silica reversed C18 stationary phases failed. The aim of our study was to exploit the benefits of zirconia-based stationary phases, especially the combination of reversed phase mechanism and ion-exchange interaction in the separation process. These features have been employed in development of the analytical procedure for monitoring the stability of the active agent as well as the antimicrobial excipients (**Fig. 1**) in topical creams. Two types of zirconia-based stationary phases were tested to achieve satisfactory results.

2 Experimental

2.1 Instruments and chromatographic columns

All chromatographic work was performed on a Shimadzu chromatography system equipped with SCL-10A_{VP} system controller, SPD-10A_{VP} detector, LC-10AD_{VP} pump,

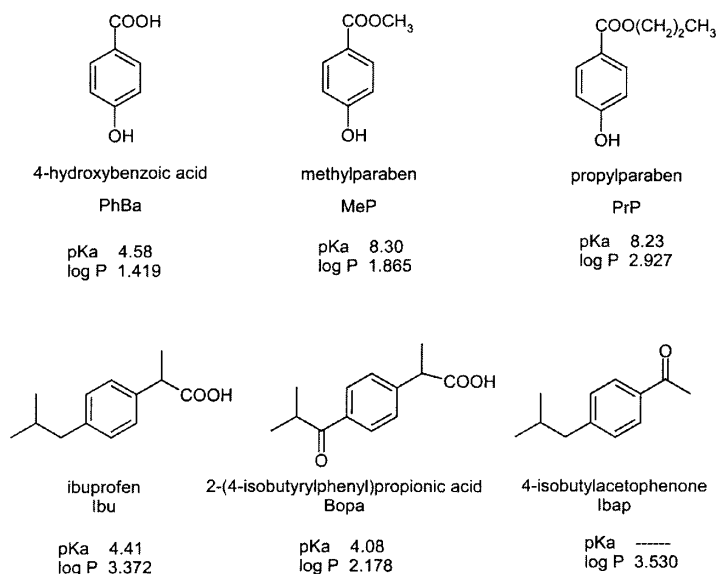


Figure 1. Structures, pK_a, and log P values of all analytes involved in the study

SIL-10AD_{VP} autoinjector, CTO-10AS_{VP} column oven, DGU-14A degasser, FCV-10AL_{VP} low pressure module, and computer-based chromatographic software Class-VP (Shimadzu, Tokyo, Japan). A Shimadzu UV2401PC UV-VIS spectrometer (Tokyo, Japan) was used for measurement of UV spectra. A K10 Ultrasonic bath (Kraimek, Slovakia) and MLW T51 centrifuge (Engelsdorf, Germany) were used during the extraction process.

The following analytical columns were used in the experimental work: Discovery[®]Zr-CarbonC18, 150 × 4.6 mm ID, particle size 3 μm, Discovery[®]Zr-PS, 150 × 4.6 mm ID, particle size 5 μm, Sigma-Aldrich (Schnellendorf, Germany); and Sepharon SGX RPS, 150 × 4.0 mm ID, particle size 5 μm, Tessek (Prague, Czech Republic).

2.2 Chemicals

Ibuprofen Sigma (St. Louis, MO, USA), 4-isobutylacetophenone 98% (Lancaster, UK), 2-(4-isobutylphenyl)propionic acid, Zentiva, a.s. (Czech Republic). Methylparaben (MeP), propylparaben (PrP), acetonitrile, propan-2-ol, ammonium dihydrogenphosphate p.a., phosphoric acid 85% p.a., and sodium hydroxide p.a. were obtained from Lach-Ner (Czech Republic). 4-Hydroxybenzoic acid and butylparaben were purchased from Sigma-Aldrich (Schnellendorf, Germany).

2.3 Sample preparation

2.3.1 Standard solutions

A mixture of acetonitrile-water (90:10, v/v) was used as solvent for the preparation of all solutions. All stock solutions were prepared at concentration 1 mg mL⁻¹, except for Ibu (2.5 mg mL⁻¹). The standard solution was prepared by adding appropriate amounts of stock solutions to the 10 mL volumetric flask. The final concentrations in the standard solution were Ibu 1.25 mg mL⁻¹, methylparaben 0.05 mg mL⁻¹, propylparaben 0.0125 mg mL⁻¹, Bopa and IbaP 3.75 × 10⁻³ mg mL⁻¹, PhBa 1.25 × 10⁻³ mg mL⁻¹.

2.3.2 Extraction

An accurately weighed portion of pharmaceutical cream corresponding to 2.5 mg of ibuprofen (about 0.5 g) was transferred into 25 mL extraction flask and 20.0 mL of extraction solution was added (mixture of acetonitrile-water (90:10, v/v)). The mixture was placed in the ultrasonic bath for 10 min and then centrifuged for 5 min (60 Hz). A volume of 20 μL of supernatant was analysed.

2.4 Buffer preparation

Phosphate buffers (50 mM) were prepared by dissolving ammonium dihydrogenphosphate in water and pH value was adjusted by adding 0.1 M NaOH or 5% phosphoric acid.

3 Results and discussion

Our attempt to accomplish the separation of all compounds with a conventional silica C18 stationary phase failed, even when the column with higher carbon content was tested. The co-elution of peaks due to PrP and Bopa constituted the problematic point of the analysis using acetonitrile-water (pH 2.6) (60:40, v/v) as the eluent. It was necessary to decrease the percentage of acetonitrile in the mobile phase to 40% or below in order to achieve better separation of PrP and Bopa. Unfortunately, this change in composition of the mobile phase dramatically increases the retention times of other analytes, especially of IbaP. For this reason, alternative stationary phases were tested as a potential key to solve the above-mentioned separation problem, including acceptable analysis time. Zirconia-based stationary phases exhibit unique properties and selectivity for different type of solutes. One of the most chemically interesting aspects of using zirconia supports is that of their surface chemistry, which is radically different from that of silica supports. In particular, there are many hard Lewis acid sites on the zirconia surface [29, 30]. In aqueous media the surface is populated with hydroxylated and aquated Zr(IV) sites which can undergo ligand exchange with hard Lewis bases. This type of coordination chemistry does not take place on silica as it is not a metal [4]. Thus ionised carboxylic acid analytes show strong ligand exchange interactions with the accessible hard Lewis acid sites. To avoid long retention times and very poor peak shapes, phosphate was added to the eluent in all experiments. If phosphate buffer was replaced with acetate buffer the analysis was no longer feasible. Since acetate is a weaker Lewis base than phosphate, interactions between the analyte and stationary phase became stronger which resulted in unacceptable peak tailing and long analysis times.

3.1 Polystyrene coated zirconia stationary phase

According to our recent study [31] dealing with quality control of raw material of Ibu using zirconia stationary phase, the polystyrene-zirconia stationary phase (PS-ZrO₂) was chosen first. PS-ZrO₂ exhibits different selectivity from octadecyl-bonded silica (C18-SiO₂) towards a variety of analytes and it is a unique, selective stationary phase, which can provide effective separations for many compounds [15]. In order to achieve separation of all analyzed compounds, several experiments were performed. The percentage and type of organic solvent (MeOH, ACN) in a mobile phase and pH value were tested as the most important variables to influence the performance of the column. Retention of PhBa was weak under all tested conditions, even though other compounds were base-line separated. PhBa was mostly eluted with the system peak. Its retention was not greatly improved by the changes of organic solvent or the changes of pH. Its highest retention

1310 Kučera, Žižkovský, Sochor, Klimeš, Dohnal

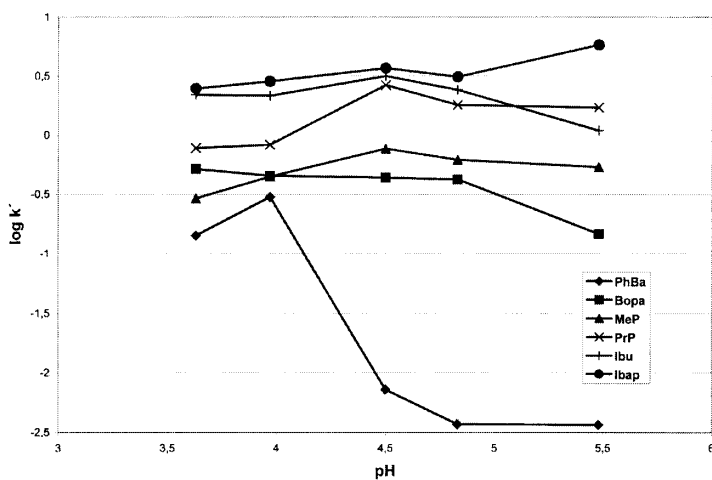


Figure 2. Effect of phosphate buffer pH on retention factors of all solutes on PS-ZrO₂ stationary phase. Mobile phase acetonitrile-phosphate buffer-tetrahydrofuran 25:70:5 (v/v/v), flow rate 0.6 mL min⁻¹, temperature 60°C. Phosphate buffer pH 3.67; 3.97; 4.5; 4.83; and 5.48. The system dead time (*t*₀) was estimated from the first significant baseline disturbance.

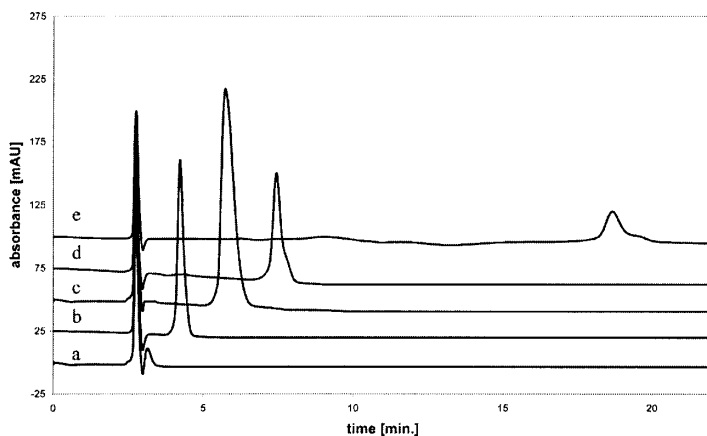


Figure 3. The best separation achieved on PS-ZrO₂ stationary phase. Mobile phase MeOH-phosphate buffer (50 mM, pH 5.48)-tetrahydrofuran 25:70:5 (v/v/v), flow rate 0.6 mL min⁻¹, temperature 60°C, and detection at 258 nm. a) Bopa; b) MeP; c) Ibu; d) PrP; e) lbap.

was observed at pH 4.0, **Fig. 2**, but peaks due to MeP, Bopa and Ibu, lbap were co-eluted. The best condition for separation of all compounds (except PhBa) are as follows: mobile phase MeOH-phosphate buffer (50 mM, pH 5.48)-tetrahydrofuran 25:70:5 (v/v/v), flow rate 0.6 mL min⁻¹, and temperature 60°C, see **Fig. 3**. The experiments show that the retention of PhBa on the PS-ZrO₂ column is insufficient and thus it is impossible to obtain reasonable separation of this diverse group of solutes.

3.2 Zr-CarbonC18 stationary phase

To increase the retention especially of PhBa another type of zirconia-based stationary phase was chosen. Zr-CarbonC18 is more hydrophobic than the PS-ZrO₂ stationary

phase and also offers ion-exchange interactions to influence the separation process as opposed to conventional silica C18 phase. The simultaneous action of reversed phase mechanism and ion-exchange interactions between stationary phase and solute led to the expected effect. All compounds including PhBa were retained and satisfactorily resolved within an acceptable analysis time. As in the case of PS-ZrO₂, the pH optimization of the eluent was the most important variable to influence separation. Decreasing the pH value increased the retention times of all analytes because of the enforcement of hydrophobic interactions with the stationary phase. Increasing pH negatively influenced the retention of PhBa due to the impairment of hydrophobic interactions and due to possible electrostatic repulsion of analyte from the negatively

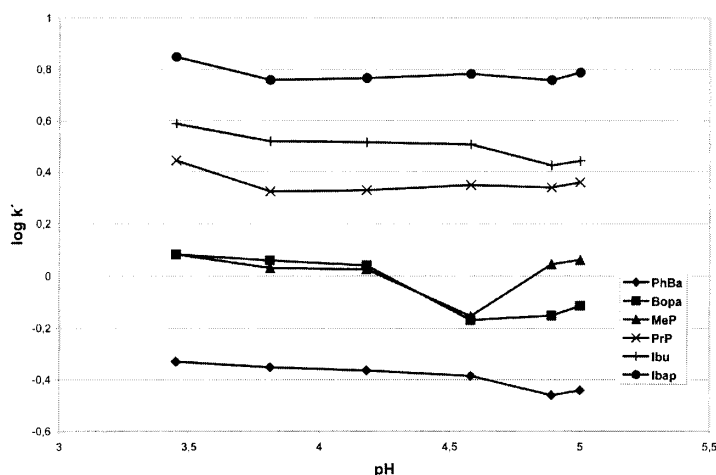


Figure 4. Effect of phosphate buffer pH on retention factors of all solutes on ZrCarbonC18 stationary phase. Mobile phase acetonitrile-phosphate buffer-tetrahydrofuran 45:55:5 (v/v/v), flow rate 0.6 mL min⁻¹, temperature 60°C. Phosphate buffer pH 3.45; 3.81; 4.18; 4.58; 4.83; and 5.0. The system dead time (t_0) was estimated from the first significant baseline disturbance.

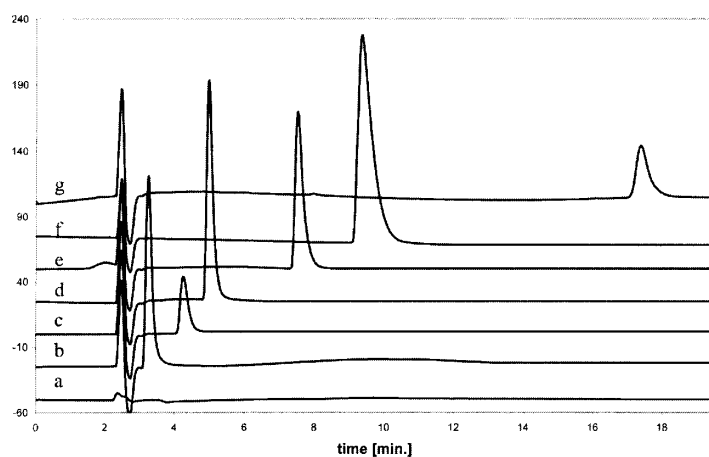


Figure 5. The best separation achieved on ZrCarbonC18 stationary phase. Mobile phase acetonitrile-phosphate buffer (50 mM, pH 4.8)-propan-2-ol 27:56:17 (v/v/v), flow rate 0.6 mL min⁻¹, temperature 70°C and detection 258 nm. a) acetonitrile-water (90:10, v/v); b) PhBa; c) Bopa; d) MeP; e) Ibu; f) PrP; g) Ibap.

charged zirconia surface. Decreasing retention of PhBa with increasing pH is more marked on PS-ZrO₂ stationary phase. Hence, a pH range from 3.45 to 5.0 was tested to reach a compromise between sufficient retention and acceptable analysis time, see **Fig. 4**. The experiments established an optimal pH 4.8 for separation of all six compounds. The final mobile phase composition was acetonitrile-phosphate buffer (50 mM, pH 4.8)-IPA 27:56:17, v/v/v, see **Fig. 5**. The retention time of Ibap under these conditions was approximately 17.5 min and the total analysis time was 19 min. Ibap exhibits stronger interactions with stationary phase on account of its physical-chemical properties (Fig. 1). In order to shorten the analysis time some gradients of acetonitrile in the mobile

phase were tested. Higher content of organic solvent did not shorten the retention time as expected. In addition, the time needed for equilibration of the column even prolonged the analysis. Increasing the flow rate proved to be more useful than the use of the acetonitrile gradients given in **Table 1**. This approach cut the total analysis time by six minutes (including re-equilibration), **Fig. 6**.

3.3 Detection and temperature

Compared to Ibu, Ibap and Bopa exhibit a bathochromic shift, and their absorption maxima are shifted to 258 nm. Therefore, UV detection was performed at 258 nm to attain maximal sensitivity for detection of Ibu degradation

1312 Kučera, Žížkovský, Sochor, Klimeš, Dohnal

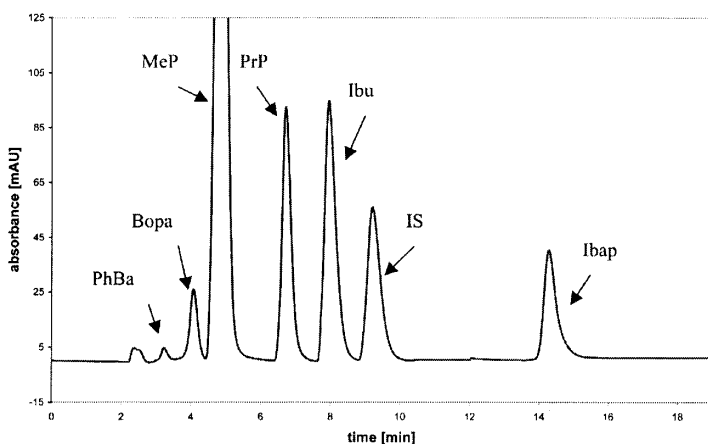


Figure 6. Chromatogram of all analytes including internal standard for quantitative assay of Ibu and both parabens. Chromatographic conditions: mobile phase acetonitrile-phosphate buffer (50 mM, pH 4.8)-propan-2-ol (27:56:17, v/v/v), detection at 258 nm, flow rate step gradient, and the column temperature 70°C. IS content 0.033 mg mL⁻¹.

Table 1. Step gradient of flow rate.

Time [min]	Flow rate [mL min ⁻¹]
0–5	0.6
5–15	0.8
15–16	0.8 → 0.6
16–17	0.6

products. The detection of parabens and 4-hydroxybenzoic acid is also sensitive at this wavelength. If it is needed to make the method more sensitive to PhBa as a stability marker of parabens, it is possible to use the dual wavelength mode for its detection (absorption maximum at 274 nm).

High temperature provides an opportunity to increase analyte mass transfer rates (and thereby decrease peak width). Within the mobile phase, increased temperatures serve to increase diffusion and decrease viscosity, where the ratio of the diffusion coefficient to the viscosity-temperature product is appropriately constant over a wide range of pressure and temperature conditions. An additional benefit of lower viscosity is the potential to operate at higher flow rates and thereby reduce total analysis time [8]. The temperature 70°C has been found to be sufficient for shortening the analysis time and for improvement of peak shape.

3.4 Optimal chromatographic condition for analysis of all decomposition products

The choice of optimal chromatographic conditions was based on the experiments described above. Only the ZrCarbonC18 stationary phase, due to its higher hydrophobicity, could be used in separation of all studied compounds. The pH of phosphate buffer in the mobile phase,

as an important retention-affecting factor, was adjusted to a value of 4.8. The retention of PhBa as well as the resolution of MeP and Bopa were sufficient. Acetonitrile possessed higher elution power and that is why it was preferred to MeOH as an organic component of the mobile phase. To improve peak shape, propan-2-ol was added to the mobile phase. Optimal mobile phase contained acetonitrile-phosphate buffer (50 mM, pH 4.8)-propan-2-ol (27:56:17, v/v/v). Detection was performed at 258 nm; the flow gradient was as specified in Table 1; a column temperature of 70°C was found to be satisfactory with regard to analysis time and peak shape. These chromatographic conditions were optimal for the analysis of all the above-mentioned compounds. Analysis under these conditions was complete within 17 min.

The developed method is applicable for determination of both the active agent and preservatives. The response of Ibu, MeP, and PrP is linear in the range of 10%–120% of the defined amount (seven concentrations). Butylparaben has been chosen as suitable internal standard for the assay, see Fig. 6. The linear response of decomposition products was tested in the range of 10%–120% of the admissible amount (seven concentrations). The correlation coefficients, *r*, found were higher than 0.999 for all compounds. A signal-to-noise (*S/N*) ratio of 3 is generally considered to be acceptable for estimating the detection limit. A typical *S/N* ratio for calculating the quantitative limit is 10:1. Both limits were calculated, see Table 2.

Accuracy was determined using spiked placebo (six preparations). Relative standard deviation values (RSD) were calculated for repeated standard injections (system precision) as well as injections of multiple sample preparations (method precision), Table 2. The responses of the detector to 0.3% solutions of PhBa, Bopa, and Ibap at 258 nm were divided by response of the detector to a

Table 2. Validation results. (repeatability six injection of standard; method precision, accuracy six preparation of spiked placebo; linearity – 10%, 20%, 40%, 60%, 80%, 100%, 120% for Ibu, MeP, and PrP; 10%, 20%, 40%, 60%, 80%, 100%, 120% of admissible amount for PhBa, Bopa, and lbap).

		PhBa	Bopa	MeP	PrP	Ibu	lbap
Repeatability	RSD [%]	1.30	1.36	0.62	0.85	0.56	0.63
Method precision	RSD [%]	1.53	1.57	0.98	1.01	1.28	1.52
Accuracy	recovery [%]	97.04	97.50	101.00	99.23	97.09	100.28
Linearity	correlation coefficient	0.9992	0.9993	0.9993	0.9995	0.9995	0.9991
	slope	2.14	4.18	92.7	15.68	19.57	5.41
	intercept	20.8	-13.8	8	82	72	4.3
LOD	[mg · mL ⁻¹]	1.88×10^{-4}	4.5×10^{-4}	–	–	–	4.3×10^{-5}
LOQ	[mg · mL ⁻¹]	6.25×10^{-4}	1.5×10^{-3}	–	–	–	1.43×10^{-4}

0.3% solution of Ibu at 258 nm, see **Table 3**. The response factors differ considerably from one another; and thus it is necessary to prepare the solution with limited concentrations of all impurities for monitoring of Ibu, MeP, and PrP stability.

The influence of small changes of composition of mobile phase, flow rate, and temperature on separation was also tested. The most important factor for sufficient separation of all compounds from one another, especially Bopa-MeP and PrP-Ibu, is the pH value of the phosphate buffer. It has been verified that the separation is not influenced in range of pH 4.8 ± 0.1 . The temperature does not affect the separation very much but it is worth keeping the column above 60°C with regard to peak shape. The flow rate at the beginning of analysis should not be higher than 0.6 mL min^{-1} with respect to resolution between PrP and Ibu. The experiments have shown that small changes of optimal parameters do not dramatically affect the performance and the developed method could be used for evalua-

Table 3. Responses of the detector to 0.3% solutions of PhBa, Bopa, and lbap were divided by the response of the detector to a 0.3% solution of Ibu at 258 nm.

Analyte	Response factor
PhBa	0.05
Bopa	16.67
lbap	33.33

tion of Ibu, parabens, and their degradation products. The chromatogram of real pharmaceutical cream sample (after expiration) is also shown, **Fig. 7**. The degradation products of Ibu and parabens were detected.

4 Conclusion

Two types of zirconia-based stationary phases were tested as a possible alternative to commonly used silica reversed phases. Considerable differences were

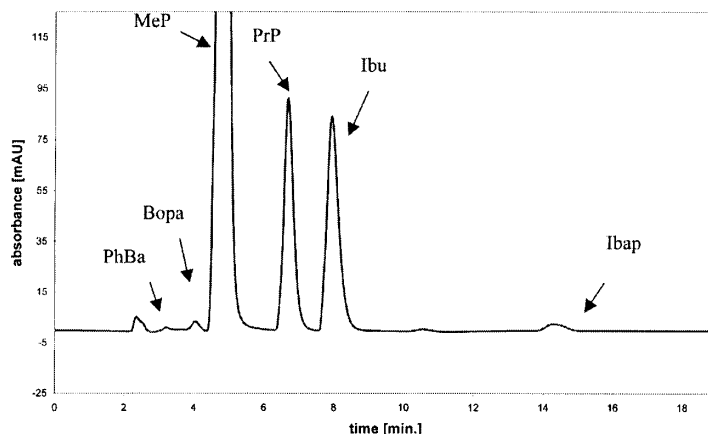


Figure 7. Chromatogram of real sample, pharmaceutical cream after its expiration. Chromatographic conditions mobile phase acetonitrile-phosphate buffer (50 mM, pH 4.8)-propan-2-ol (27:56:17, v/v/v), detection 258 nm, step gradient of flow rate, column temperature 70°C.

observed in retention on zirconia stationary phases and on C18 silica stationary phase.

Zirconia as an amphoteric material possesses anion-exchange properties in acidic or neutral pH. The presence of hard Lewis acids – Zr(IV) sites – causes hard absorption of analytes – especially Lewis bases – on the zirconia surface which results in broad peaks. To avoid these unwanted interactions a competing Lewis base which blocks dynamically accessible zirconia sites was added. According to our previous study [31], acetate is not strong enough to suppress such interaction – tailed peaks and increased retention time were observed. When phosphate was used in the eluent the peak shape was acceptable, as was the analysis time. The tested zirconia columns differ from each other in selectivity and retention, see Fig. 2 and Fig. 4. The carbon content in PS-ZrO₂ is much lower than that of conventional reversed-phase material and ZrCarbonC18, but most of the studied compounds were well separated from one another. The lower hydrophobicity was insufficient only for PhBa. The most important factor affecting separation was the pH of phosphate buffer on both types of zirconia columns. The effect on retention is more significant on the PS-ZrO₂ column. Retention of carboxylic acids (Ibu, Bopa, and PhBa) decreased remarkably with increasing pH compared to parabens and IbaP. From a practical point of view higher hydrophobicity is needed especially for sufficient retention of 4-hydroxybenzoic acid and thus the ZrCarbonC18 column was chosen for simultaneous analysis of ibuprofen, its degradants, parabens and their decomposition product. Detection of Bopa and IbaP as first products of degradation of ibuprofen enables evaluation of degradation progression in topical pharmaceuticals. In addition, monitoring of 4-isobutylacetophenone is important because of its toxic effect on the nervous system. Simultaneous monitoring of 4-hydroxybenzoic acid enables identification of possible decomposition of antimicrobial excipients. The method can serve also for quantification of the active substance ibuprofen and parabens, using butylparaben as an internal standard. The possible applicability of zirconia-based stationary phase in pharmaceutical analysis was documented for a practical example. Simultaneous activity of ion-exchange and hydrophobic (reversed) interactions on zirconia-based stationary phase provides a wide range for modulating column selectivity and thus attaining appropriate resolution between analytes in the mixture.

Acknowledgement

This work was implemented with the support of Research Project MSM 0021620822.

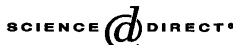
References

- [1] J. Dai, X. Yang, P.W. Carr, *J. Chromatogr. A* **2003**, *1005*, 63–82.
- [2] X. Yang, J. Dai, P.W. Carr, *J. Chromatogr. A* **2003**, *996*, 13–31.
- [3] J. Nawrocki, M.P. Rigney, A. McCormick, P.W. Carr, *J. Chromatogr.* **1993**, *657*, 229–282.
- [4] J. Nawrocki, *J. Chromatogr. A* **1997**, *779*, 29–71.
- [5] J. Zhao, P.W. Carr, *Anal. Chem.* **1999**, *71*, 2623–2332.
- [6] J.W. Li, P.W. Carr, *Anal. Chem.* **1997**, *69*, 837–843.
- [7] J.W. Li, Y. Hu, P.W. Carr, *Anal. Chem.* **1997**, *69*, 3884–3888.
- [8] S. M. Fields, C.Q. Ye, D.D. Zhang, B.R. Branch, X.J. Zhang, N. Okafo, *J. Chromatogr. A* **2001**, *913*, 197–204.
- [9] Y. Hu, X. Yang, P.W. Carr, *J. Chromatogr. A* **2002**, *968*, 17–29.
- [10] J. Zhao, P.W. Carr, *Anal. Chem.* **1999**, *71*, 5217–5224.
- [11] S.J. Marin, B.A. Jones, W.D. Felix, J. Clark, *J. Chromatogr. A* **2004**, *1030*, 255–262.
- [12] B.C. Trammell, M.A. Hillmyer, P.W. Carr, *Anal. Chem.* **2001**, *73*, 3323–3331.
- [13] J. Zhao, P.W. Carr, *Anal. Chem.* **2000**, *72*, 302–309.
- [14] C.B. Castells, P.W. Carr, *J. Chromatogr. A* **2000**, *904*, 17–33.
- [15] M.P. Rigney, E.F. Funkenbush, P.W. Carr, *J. Chromatogr.* **1990**, *499*, 291–304.
- [16] Z.G. Shi, Y.Q. Feng, L. Xu, M. Zhang, S.L. Da, *Talanta* **2004**, *63*, 593–598.
- [17] J. Zhao, P.W. Carr, *Anal. Chem.* **2000**, *72*, 4413–4419.
- [18] C. McNeff, Q.H. Zhao, P.W. Carr, *J. Chromatogr.* **1994**, *684*, 201–211.
- [19] J. Zhao, P.W. Carr, *Anal. Chem.* **1999**, *72*, 5217–5224.
- [20] C. McNeff, P.W. Carr, *Anal. Chem.* **1995**, *67*, 3886–3892.
- [21] J.W. Li, P.W. Carr, *Anal. Chem.* **1996**, *68*, 2857–2868.
- [22] L. Sun, A.V. McCormick, P.W. Carr, *J. Chromatogr. A* **1994**, *658*, 465–473.
- [23] G. Caviglioli, V. Posocco, V. Parodi, S. Cafaggi, A. Alzati, G. Bignardi, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2002**, *30*, 499–509.
- [24] J.D. Higgins, T.P. Gilmor, S.A. Martellucci, R.D. Bruce, *Analytical Profiles of Drug Substances and Excipients*, Vol. 27. Academic Press, New York 2001.
- [25] A.I. Gasco-Lopez, R. Izquierdo-Hornillos, A. Jimenez, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **1999**, *21*, 143–149.
- [26] N.N. Ravali, E.L. Parrott, *J. Pharm. Sci.* **1967**, *56*, 274–275.
- [27] S.M. Blaug, D.E. Grant, *J. Soc. Cosmet. Chem.* **1984**, *25*, 495–506.
- [28] R. Driouch, T. Takayanagi, M. Oshima, S. Motomizu, *J. Chromatogr. A* **2000**, *903*, 271–278.
- [29] J.A. Blackwell, P.W. Carr, *Anal. Chem.* **1992**, *64*, 853–863.
- [30] J.A. Blackwell, P.W. Carr, *Anal. Chem.* **1992**, *64*, 863–873.
- [31] R. Kučera, J. Sochor, J. Klimeš, J. Dohnal, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2005**, *38*, 609–618.



ELSEVIER

Available online at www.sciencedirect.com



Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 37 (2005) 1049–1057

JOURNAL OF
PHARMACEUTICAL
AND BIOMEDICAL
ANALYSIS

www.elsevier.com/locate/jpba

Use of chiral liquid chromatography for the evaluation of stereospecificity in the carbonyl reduction of potential benzo[*c*]fluorene antineoplastics benfluron and dimefluron in various species

R. Kučera^{a,*}, M. Nobilis^{a,b}, L. Skálová^c, B. Szotáková^c, P. Císař^a, Th. Jira^d, J. Klimesš^a, V. Wsól^c^a Charles University, Faculty of Pharmacy, Department of Pharmaceutical Chemistry and Drug Control, Heyrovského 1203, CZ-50005 Hradec Králové, Czech Republic^b Institute of Experimental Biopharmaceutics, Joint Research Center of Academy of Sciences and PRO.MED.CS Praha a.s., Heyrovského 1207, CZ-50005 Hradec Králové, Czech Republic^c Charles University, Faculty of Pharmacy, Department of Biochemical Sciences, Heyrovského 1203, CZ-50005 Hradec Králové, Czech Republic^d Ernst-Moritz-Arndt-University Greifswald, Institute of Pharmacy, Department of Pharmaceutical/Medical Chemistry, F.-L.-Jahn-Strasse 17, D-17487 Greifswald, GermanyReceived 20 May 2004; received in revised form 4 October 2004; accepted 4 October 2004
Available online 28 November 2004

Abstract

Benfluron (B) [5-(2-dimethylaminoethoxy)-7H-benzo[*c*]fluorene-7-one hydrochloride] is a potential antineoplastic agent. In the organism, B undergoes a rapid phase I biotransformation through oxidative and reductive metabolic pathways. The carbonyl reduction of B leads to reduced benfluron, red-B, this is one of the principal pathways for the deactivation of this compound.

The structure of B was modified to suppress its rapid deactivation *via* the carbonyl reduction on C₇. Dimefluron, D (3,9-dimethoxy-benfluron) is one of the derivatives of B, in which an alternative metabolic pathway (*O*-desmethylation) prevails over the carbonyl reduction.

The goal of this study was to develop HPLC methods enabling chiral separations of the red-B and -D enantiomers. The separation of red-B enantiomers was successful done on a Chiralcel OD-R column (250 mm × 4.6 mm ID, 5 μm) using a mobile phase acetonitrile–1 M NaClO₄ (40:60, v/v). Another mobile phase, methanol–1 M NaClO₄ (75:25, v/v), had to be employed for the sufficient resolution of red-D enantiomers. Flow rate was 0.5 ml min⁻¹ in both cases. Red-B was detected at 340 nm, red-D at 370 nm.

The above chiral HPLC methods were used for the study of the biotransformation of B and D in the microsomal fractions of liver homogenates prepared from various species (rat, rabbit, pig, guinea pig, goat and human). The enantiospecificity of the respective carbonyl reductases was evaluated and discussed for both prochiral compounds, B and D.

© 2004 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Chiral HPLC; Potential antineoplastics; Benfluron and dimefluron; Carbonyl reduction metabolites

1. Introduction

Drug metabolism studies belong to the fundamental items to be resolved in the research and development of new drugs. The metabolism of drugs is usually extensively studied with

regards to their oxidation. Less attention has been paid to their reductive metabolism, although it is well known that a variety of pharmacologically important substances undergo reductive reactions in their biotransformation [1]. Carbonyl reaction is a significant step in the phase I biotransformation of a great variety of aromatics, alicyclic and aliphatic carbonyl compounds, including pharmacologically active substances [2,3]. Carbonyl reduction has always been shown to

* Corresponding author. Tel.: +420 495 067 446; fax: +420 495 512 423.
E-mail address: kucerar@faf.cuni.cz (R. Kučera).

be of significance in various inactivation processes of drug containing a carbonyl group, such as warfarin, haloperidol, daunorubicin and doxorubicin [4,5].

Benfluron (B) [5-(2-dimethylaminoethoxy)-7H-benzo[c]fluorene-7-one hydrochloride], first prepared in the Research Institute for Pharmacy and Biochemistry in Prague, is a typical representant of the first generation of potential antineoplastic agents exhibiting the activity against a broad spectrum of experimental tumors in vitro and in vivo [6]. The metabolism of B has been studied extensively in vivo as well as in vitro [7–21]. B undergoes a rapid phase I biotransformation through oxidative and reductive metabolic pathways [8,12,16]. The carbonyl reduction of B leads to C₇-reduced benfluron, 5-(2-dimethylaminoethoxy)-7H-benzo[c]fluorene-7-ol (red-B), this is one of the principal pathways for the deactivation of this compound [8,12,16,20,21].

In recent years, the chemical structure of B has been modified with the aim to suppress its disadvantageous pharmacokinetic properties (low accessibility from the gastrointestinal tract and strong binding to tissue proteins) and to prevent from deactivating through carbonyl reduction.

Dimefluron (D) [3,9-dimethoxy-5-(2-dimethylaminoethoxy)-7H-benzo[c]fluorene-7-one hydrochloride], is one of the developed derivatives of B, in which an alternative metabolic pathway (O-desmethylation) prevails over the carbonyl reduction, although the C₇-reduced metabolite, 3,9-dimethoxy-5-(2-dimethylaminoethoxy)-7H-benzo[c]fluorene-7-ol (red-D), was also detected [20–24]. Higher antineoplastic efficiency of D (in comparison with B) could be expected in vivo [25–27] and the respective studies have been done or are currently in progress.

As mentioned above, both B as well as D undergoes in organism the metabolic changes leading to reduced derivatives. The substituents on the carbon atom bearing the carbonyl group are different, thus this carbon is a prochiral centre. The reduction of such a carbonyl group produces then two enantiomers of red-B (red-D, respectively). The carbonyl reductases tend to be stereospecific [4].

The goal of this study was to develop an HPLC method enabling chiral separations of the red-B and -D enantiomers. The enantiospecificity of the respective carbonyl reductases was evaluated and discussed for both prochiral compounds, B and D in various species.

2. Experimental

2.1. Chemicals, solutions and material

Benfluron [5-(2-dimethylaminoethoxy)-7H-benzo[c]fluorene-7-one hydrochloride], C₂₁H₂₀ClNO₂, MW = 353.84 g mol⁻¹, racemic 5-(2-dimethylaminoethoxy)-7H-benzo[c]fluorene-7-ol hydrochloride C₂₁H₂₂ClNO₂, MW = 355.86 g mol⁻¹, dimefluron [3,9-dimethoxy-5-(2-dimethylaminoethoxy)-7H-benzo[c]fluorene-7-one hydrochloride], C₂₃H₂₄ClNO₄, MW = 413.89 g mol⁻¹, racemic 3,9-dimethoxy-5-(2-dimethylaminoethoxy)-7H-benzo[c]fluorene-7-ol hydrochloride, C₂₃H₂₆ClNO₄, MW = 415.91 g mol⁻¹ (see Fig. 1) were synthesized in the laboratories of Institute of Experimental Biopharmaceutics and characterized using NMR experiments. Acetonitrile (ACN), chloroform, methanol (MeOH), ethanol (EtOH), hexane (Hex), 2-propanol, triethylamine (HPLC grade, Merck, Darmstadt, Germany), diethyl ether (analytical grade, Merck, Germany), hydrochloric acid 35%, sodium perchlorate (analytical grade, Lachema, Czech Republic), sodium borohydride (powder, 98+%, Janssen-Chimica, Belgium), ultra-high-quality (UHQ) water (prepared using Elgastat UHQ PS apparatus, Elga Ltd., Bucks, England) were used for the liquid–liquid extraction of biomatrices and chiral chromatography. Kieselgel 60H (Merck, Darmstadt, Germany) was used for preparative TLC.

oxy-5-(2-dimethylaminoethoxy)-7H-benzo[c]fluorene-7-ol hydrochloride, C₂₃H₂₆ClNO₄, MW = 415.91 g mol⁻¹ (see Fig. 1) were synthesized in the laboratories of Institute of Experimental Biopharmaceutics and characterized using NMR experiments. Acetonitrile (ACN), chloroform, methanol (MeOH), ethanol (EtOH), hexane (Hex), 2-propanol, triethylamine (HPLC grade, Merck, Darmstadt, Germany), diethyl ether (analytical grade, Merck, Germany), hydrochloric acid 35%, sodium perchlorate (analytical grade, Lachema, Czech Republic), sodium borohydride (powder, 98+%, Janssen-Chimica, Belgium), ultra-high-quality (UHQ) water (prepared using Elgastat UHQ PS apparatus, Elga Ltd., Bucks, England) were used for the liquid–liquid extraction of biomatrices and chiral chromatography. Kieselgel 60H (Merck, Darmstadt, Germany) was used for preparative TLC.

2.2. Preparation of synthetic rac. 5-(2-dimethylaminoethoxy)-7H-benzo[c]fluorene-7-ol and rac. 3,9-dimethoxy-5-(2-dimethylaminoethoxy)-7H-benzo[c]fluorene-7-ol

Base of benfluron (0.84 g, 2.65 mmol) or dimefluron (1 g, 2.65 mmol) was dissolved in methanol (40 ml). Sodium borohydride (0.3 g, 7.94 mmol) was added and the reaction mixture was stirred under ambient temperature for 1 h and then refluxed for half of an hour. Methanol was removed under reduced pressure, the residue was diluted by 5% aqueous NaOH (20 ml), and C₇-reduced dimefluron was extracted into ethyl acetate. The organic layer containing the product was dried over anhydrous Na₂SO₄. After ethyl acetate removal, the crude base of rac. 3,9-dimethoxy-5-(2-dimethylaminoethoxy)-7H-benzo[c]fluorene-7-ol (base of rac. 5-(2-dimethylaminoethoxy)-7H-benzo[c]fluorene-7-ol, respectively) was obtained.

Preparative thin-layer chromatography was used for isolation of red-B and -D from reaction mixtures. Chromatographic layers of Kieselgel 60H (0.3 mm thick on 20 × 20 glass plates) were prepared from a suspension in triethylamine–methanol 1:1 (v/v) using a Camag Automatic TLC Plate Coater (Muttentz, Switzerland) and left to dry for about 20 min. The reaction mixture was dissolved in a minimum volume of the mobile phase and the solution was transferred onto the start of a chromatographic plate and developed in a chloroform–methanol–triethylamine mixture (80:10:5, v/v). After chromatography, the individual fluorescence bands pertaining to red-B or -D were scraped off from the silica gel. Each individual purified product was eluted from silica gel with methanol using a sintered-glass filter (No. 4, porosity 40 μm) and filtrate was evaporated to dryness. The identity of the compounds was confirmed by NMR analysis.

A Varian Mercury-Vx BB 300 NMR spectrometer was used for the NMR analyses of the synthetic standards of red-B and -D metabolites. The NMR spectra were recorded at 300 MHz for ¹H, and 75 MHz for ¹³C. Chemical shifts are given as δ values in ppm, the coupling constants are given in

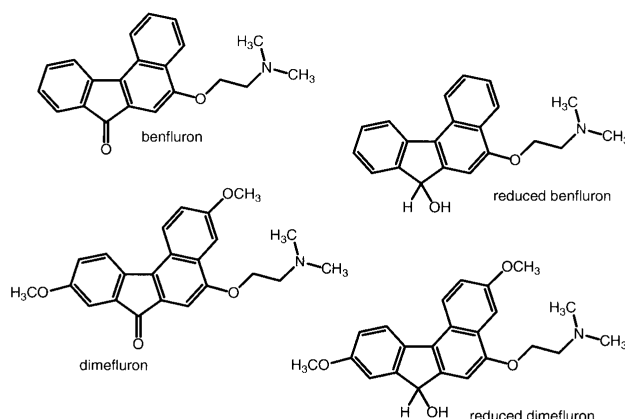


Fig. 1. Structures of the compounds under study.

Hz. Analytical sample (15–20 mg) was dissolved in deuterated dimethylsulfoxide (0.7 ml) and the solution was transferred *via* pipette into an NMR tube (203 mm length, 5 mm diameter).

2.2.1. NMR analysis of red-B

^1H NMR (300 MHz, DMSO) δ 8.65 (1H, d, $J=8.51$ Hz, H1), 8.28 (1H, dd, $J=8.51$ Hz, $J=1.10$ Hz, H4), 8.20 (1H, d, $J=7.69$ Hz, H11), 7.73–7.65 (1H, m, H2), 7.62 (1H, d, $J=7.69$ Hz, H8), 7.60–7.53 (1H, m, H3), 7.46–7.38 (1H, m, H10), 7.31–7.22 (2H, m, H6, H9), 5.90 (1H, d, $J=7.42$ Hz, OH), 5.47 (1H, d, $J=7.41$ Hz, H7), 4.39–4.25 (2H, m, OCH_2), 2.83 (2H, t, $J=5.49$ Hz, NCH_2), 2.30 (3H, s, CH_3).

^{13}C NMR (75 MHz, DMSO) δ 154.6, 147.6, 147.3, 140.6, 129.5, 128.7, 127.8, 126.1, 125.6, 125.6, 125.2, 124.7, 124.0, 123.1, 121.7, 102.8, 74.3, 66.9, 57.9, 45.9.

2.2.2. NMR analysis of red-D

^1H NMR (300 MHz, DMSO) δ 8.51 (d, 1H, $J=9.34$ Hz, H1), 8.04 (d, 1H, $J=8.51$ Hz, H11), 7.59 (d, 1H, $J=2.75$ Hz, H4), 7.30 (dd, 1H, $J=9.34$ Hz, $J=2.75$ Hz, H2), 7.22 (s, 3H, H6), 7.20 (d, 1H, $J=2.61$ Hz, H8), 6.94 (dd, 1H, $J=8.51$ Hz, $J=2.61$ Hz, H10), 5.87 (bs, 1H, OH), 5.39 (s, 1H, CH), 4.34–4.23 (m, 1H, OCH_2), 3.88 (s, 3H, OCH_3), 3.81 (s, 3H, OCH_3), 2.82 (t, 2H, $J=5.27$ Hz, NCH_2), 2.30 (s, 6H, NCH_3).

^{13}C NMR (75 MHz, DMSO) δ 158.1, 156.7, 152.8, 149.9, 143.6, 133.3, 126.9, 126.6, 125.7, 124.2, 122.1, 119.1, 113.5, 111.2, 103.6, 102.0, 74.1, 67.1, 57.9, 55.5, 55.2, 45.9.

2.3. Biological material

Young adult intact males, sexually matured, 3–5 animals from each species, were used for experiments. All animals used were healthy and have not been subjected to any pharmacological treatments. Wistar rats (*Rattus norvegicus*

var. alba, 10–14 weeks old) and guinea pigs (*Cavia aperea var. porcellus*, weight 450–500 g) were fed a standard diet and sacrificed by decapitation under ether anaesthesia. Rabbits (*Oryctolagus cuniculus f. domesticus*, Chinchilla race) were fed a standard diet and sacrificed by cervical spine dislocation at the age of 4 months. Farm animals, boars (*Sus scrofa f. domestica*, Landrace breed) and bucks (*Capra aegagrus f. hircus*, Czech white goat breed), were bred under the usual farm conditions in Czech Republic. They were slaughtered at the age of 7–9 months. All species were subjected to an overnight starvation with free access to tap water. The liver (without any macroscopic alterations) was removed immediately after death of animal. The whole liver or *lobus sinister* or *dexter lateralis* were cut into small pieces, and stored frozen in liquid nitrogen. The human liver samples from three male donors (49, 56 and 64 years old) were obtained from the Cadaver Donor Programme of Transplant Centre of Faculty of Medicine, Charles University, Hradec Králové. Cut part of liver (*lobus hepatis sinister*) in ice-cooled Eurocollins solution was transported from the hospital to the laboratory and after that it was stored in the freezer (-80°C) till preparation of subcellular fractions.

2.4. Preparation of subcellular fractions

Frozen liver samples were thawed at room temperature (up to 15 min) and homogenised at the w/v ratio of 1:6 in 0.1 M sodium phosphate buffer, pH 7.4, using a Potter-Elvehjem homogeniser and sonication with Sonopuls (Bandeline, Germany). The microsomal fractions were isolated by fractional ultracentrifugation of the liver homogenate with the same buffer. A re-washing step (followed by a second ultracentrifugation) was included at the end of the microsome preparation procedure. Microsomes were finally resuspended in the same buffer containing 20% glycerol (v/v) and were stored at -80°C . Protein concentrations were assayed using the

binchonic acid method [28]. Concentrations of protein ranged between 6 and 8 mg ml⁻¹.

2.5. Incubation of hepatic microsomal fraction with benfluron and dimefluron

Suitable conditions for biotransformation assays (substrate and coenzyme concentrations, time of incubation) were chosen according to previous experiments [23]. The microsomal or cytosolic suspensions (0.1 ml in 0.1 M Na-phosphate buffer, pH 7.4) were incubated with 0.6 μmol of coenzymes (mixture NADPH and NADH) and with 0.5 μmol of substrates (benfluron or dimefluron, respectively). The total volume of reaction mixtures was 0.3 ml. First type of blank samples did not contain substrates, while in second types of blanks the buffer was added instead of microsomes. The incubations were carried out at 37 °C for 30 min under aeration and were terminated by addition of 0.1 ml of 26% aqueous ammonia solution.

2.6. Sample preparation of the incubates

When the *in vitro* enzymatic reaction (see Section 2.5) was accomplished by addition of aqueous ammonia solution, ethyl acetate (0.7 ml) was added into the incubation mixture and the content of the tube was vortexed-mixed for 1 min. After centrifugation (2000 × g, 12 min), the tubes were stored in a deep freezer (–75 °C for 30 min) until the lower aqueous layer froze to ice. The upper ethyl acetate layer containing the analytes was decanted into another clean 3-ml tube. The extraction of aqueous layer was repeated once more with the same volume of ethyl acetate as described above. Both ethyl acetate extracts were poured together and the solvent was evaporated (water bath 45 °C, stream of nitrogen). The dry extract in the glass tube was reconstituted in 600 μl of the mobile phase and transferred into the vial of autosampler. An amount of 100 μl of the sample was injected into the chromatographic column.

2.7. Chiral chromatography of benzo[*c*]fluorene derivatives in the incubation mixtures

Routine chromatographic analyses were performed using a Thermo Electron (formerly Thermo Finnigan) chromatograph (San Jose, CA, USA). The chromatographic system was composed of an SCM1000 solvent degasser, P4000 quaternary gradient pump, AS3000 autosampler with a 100 μl sample loop, UV6000 LP photodiode array detector with Light Pipe Technology, SN4000 system controller and a data station with the ChromQuest 4 analytical software (Thermo Electron, Inc., San Jose, CA, USA) working under the Windows 2000 operating system (Microsoft Corporation). During the development of an HPLC method, a polarimetric detector Chiralyser (IBZ Meßtechnik, Hannover, Germany) was used for identification of (+)- and (–)-enantiomer of reduced metabolites of benfluron and dimefluron.

A polysaccharide, cellulose-based reversed phase chiral column 250 mm × 4.6 mm packed with Chiralcel[®] OD-R, 10 μm (Daicel Chemical Industries, Ltd., Tokyo, Japan), pre-column LiChroCART[®] 4-4 (Merck, Darmstadt, Germany) with a C-18 achiral reversed phase.

A mixture of 1 M aqueous NaClO₄ and acetonitrile (60:40, v/v) was applied to the separation and determination of benfluron and its phase I metabolites, including C₇-reduced benfluron (red-B) enantiomers. Benfluron and its metabolites were separated over 50 min.

Likewise, a mixture of 1 M aqueous NaClO₄ and methanol (25:75, v/v) was applied to the separation and determination of dimefluron and its phase I metabolites, inclusive of C₇-reduced dimefluron (red-D) enantiomers. Dimefluron and its metabolites were separated over 90 min.

Flow rate was 0.5 ml min⁻¹ in both cases. Red-B was detected at 340 nm, red-D at 370 nm.

2.8. Calibration

Standard 10⁻³ M stock solutions [31.9 mg of red-B (base) and 37.9 mg of red-D (base)] and each in 100 ml of the respective UHQ-water solution containing equimolar amount of hydrochloric acid were prepared. Lower concentrations of each compound were obtained by dilution with UHQ water. A calibration series of C₇-reduced benfluron (C₇-reduced dimefluron, respectively) with the concentrations 2.5, 10.0, 17.5, 25.0, and 35.0 nmol ml⁻¹ of each analyte was made. All points of calibration curve were made in six replicates. This calibration series was measured using the UV detector under the condition mentioned in Section 2.7 and evaluated using an external standard method.

2.9. Testing and statistical evaluation of the analytical procedure

On-line statistical processing of the calibration analyses by the least-squares method was performed automatically using the ChromQuest 4, software. The linearity of the calibration curve from the aqueous solutions of rac. C₇-reduced benfluron (rac. C₇-reduced dimefluron, respectively) was tested and evaluated for each of the enantiomers [$y = kx + q$, where x is the half concentration of rac. C₇-reduced benfluron (rac. C₇-reduced dimefluron) and y the corresponding peak-area of each enantiomer of C₇-reduced benfluron (C₇-reduced dimefluron). The correlation coefficient (r) was also expressed. The accuracy was determined as a relative error (%) found on the standard curve. The precision of the method, expressed as the relative standard deviation (percentage of coefficients of variation; R.S.D. = 100 S.D./mean), was also assessed. Both statistical parameters were calculated for each concentration level. The range of the applicability of the HPLC method was enclosed within the lower limit of quantification (LLOQ) and the upper limit of quantification (ULOQ). The lower limit of quantification (LLOQ) was determined as the lowest concentration on the standard calibration curve, which was measured

with a precision of 20% and accuracy of 80 or 120%. Upper limit of quantification (ULOQ) was equal to the highest concentration in the 5-level calibration. The recoveries of individual enantiomers of red-B and -D were also calculated [29,30].

3. Results and discussion

3.1. Chiral chromatography of benzo[c]fluorene derivatives

The carbonyl reduction of a prochiral 7*H*-benzo[c]fluorene-7-one derivative (B or D) leads to the formation of two enantiomers. Their enantiomeric ratio is dependent on the conditions of the respective reaction. Reduction of B or D using sodium borohydride in methanol (see Section 2.2) gave a racemic mixture of both enantiomers (enantiomeric ratio 1:1), because the access of hydride anion to the electrophilic

carbon of carbonyl group is possible from both sides of 7*H*-benzo[c]fluorene-7-one molecule with the same probability.

On the other hand, in an enzymatically catalyzed reduction, when a planar 7*H*-benzo[c]fluorene-7-one molecule is fixed on the surface (or in some cavity) of apoenzyme and the prochiral carbonyl is accessible preferentially from one side of the planar molecule, the enantiomeric ratio could be shifted in favour of one of the enantiomers. These differences could be observed using chiral separation methods.

For these purposes, suitable chiral chromatographic columns (chiral selectors) had to be searched for and new bio-analytical chiral HPLC methods were developed, validated and used for the evaluation of interspecies differences in the stereospecificity of reductive metabolism of B and D.

Eleven various chiral columns were tested in the development of the optimal conditions for enantiomeric separations of red-B and -D. Solutions of racemic red-B ($c = 0.2 \text{ mg ml}^{-1}$) and racemic red-D ($c = 0.4 \text{ mg ml}^{-1}$) in 2-propanol were injected into the chiral column and the resolution factor was

Table 1
Results of the enantioselective separation of red-B

Column	Parameters	Particle size (μm)	Mobile phase (v/v)	Flow rate (ml min^{-1}), temperature ($^{\circ}\text{C}$)	Commentary
Chiralcel OD-R	250 mm \times 4.6 mm	10	ACN–1 M NaClO ₄ (60:40)	0.5, 40	Partly separated
			ACN–1 M NaClO ₄ (40:60)	0.5, 40	Baseline separated, analysis time about 20 min
			ACN–1 M NaClO ₄ (40:60)	0.5, 25	Baseline separated; optimal condition
			ACN–0.5 M NaClO ₄ (40:60)	0.5, 40	Decrease of resolution
			ACN–0.25 M NaClO ₄ (40:60)	0.5, 40	Decrease of resolution
			ACN–0.5 M NaClO ₄ (39:61)	0.5, 40	Baseline separated, analysis time about 20 min
Chiralcel OD-H	250 mm \times 4.6 mm	10	Hex–2-propanol (90:10)	1.0, 40	Baseline separated, analysis time about 30 min
			Hex–2-propanol (75:25)	1.0, 40	No separation, analysis time about 23 min
			Hex–EtOH (80:20)	1.0, 30	No separation, analysis time about 8.5 min
Chiralcel OB-H	250 mm \times 4.6 mm	10	Hex–2-propanol (65:35)	0.7, 40	No separation, analysis time about 13 min
Caltrex Chiral R IV	250 mm \times 4.0 mm	5	Hex–EtOH (40:60)	0.9, 40	No separation, analysis time about 22 min
Caltrex Chiral R VIII	250 mm \times 4.0 mm	5	Hex–EtOH (30:70)	0.7, 40	No separation
Caltrex Chiral R X	250 mm \times 4.0 mm	5	Hex–2-propanol (75:25)	1.0, 30	No separation
Chiral AGP	100 mm \times 4.0 mm	5	12 mM Na ₂ HPO ₄ –2-propanol (95:5) pH = 7.03	0.8, 25	No separation
Chiral HSA	150 mm \times 4.0 mm	5	12 mM Na ₂ HPO ₄ –MeOH (88:12) pH = 7.03	0.6, 25	Partly separated
			12 mM Na ₂ HPO ₄ –MeOH (88:12) pH = 7.03	0.6, 25	No separation
(R,R) Whelk-0-1	250 mm \times 4.0 mm	5	Hex–2-propanol (60:40)	1.0, 40	No separation
Kromasil KR 100-5CHI – DMB	250 mm \times 4.6 mm	5	Hex–2-propanol (60:40)	1.0, 40	No separation, analysis time about 3.8 min
	250 mm \times 4.6 mm	5	Hex–EtOH (95:5)	1.0, 40	No separation, analysis time about 3.8 min
Chiraspher	250 mm \times 4.0 mm	5	Hex–EtOH (50:50)	0.6, 30	No separation
			Hex–EtOH (75:25)	0.6, 30	No separation

Table 2
Results of the enantioselective separation of red-D

Column	Parameters	Particle size (μm)	Mobile phase (v/v)	Flow rate (ml min^{-1}), temperature ($^{\circ}\text{C}$)	Commentary
Chiralcel OD-R	250 mm \times 4.6 mm	10	ACN–1 M NaClO ₄ (40:60)	0.5, 40	No separation
			Gradient elution*	0.5, 40	Without effect
			EtOH–1 M NaClO ₄ (29:71)	0.5, 25	Partly separation, low resolution
			(MeOH–EtOH (7:3))–1 M NaClO ₄ (75:25)	0.5, 40	Partly separation, low resolution
			(MeOH–EtOH (8.5:1.5))–1 M NaClO ₄ (75:25)	0.5, 40	Partly separation, low resolution
			(MeOH–EtOH (9:1))–1 M NaClO ₄ (75:25)	0.5, 40	Partly separation, low resolution
			MeOH–1 M NaClO ₄ (75:25)	0.5, 40	Sufficient separation
			MeOH–1 M NaClO ₄ (75:25)	0.5, 25	Sufficient separation, optimal condition
Chiralcel OD-H	250 mm \times 4.6 mm	10	Hex–2-propanol (70:30)	1.0, 40	No separation
			Hex–2-propanol (75:25)	1.0, 40	No separation
			Hex–EtOH (80:20)	0.8, 30	No separation
Chiralcel OB-H	250 mm \times 4.6 mm	10	Hex–2-propanol (60:40)	0.5, 40	No separation
			Hex–2-propanol (75:25)	0.5, 40	No separation
Caltrex Chiral R IV	250 mm \times 4.0 mm	5	Hex–EtOH (40:60)	0.9, 40	No separation
Caltrex Chiral R VIII	250 mm \times 4.0 mm	5	Hex–EtOH (30:70)	0.7, 40	No separation
Caltrex Chiral R X	250 mm \times 4.0 mm	5	Hex–2-propanol (75:25)	1.0, 30	No separation
Chiral AGP	100 mm \times 4.0 mm	5	Hex–2-propanol (10:90)	1.0, 30	No separation
			10 mM CH ₃ COOH, pH = 4.51	0.8, 25	No separation
			10 mM CH ₃ COOH–2-propanol (95:5) pH = 4.51	0.8, 25	No separation
			12 mM Na ₂ HPO ₄ –2-propanol (95:5) pH = 6.58	0.8, 25	No separation
			12 mM Na ₂ HPO ₄ –ACN (82:18) pH = 7.03	0.6, 25	No separation
			12 mM Na ₂ HPO ₄ –ACN (95:6) pH = 6.58	0.6, 25	No separation
			12 mM Na ₂ HPO ₄ –MeOH (82:18) pH = 6.58	0.6, 25	No separation
			12 mM Na ₂ HPO ₄ –MeOH (82:18) pH = 7.03	0.6, 25	No separation
Chiral HAS	150 mm \times 4.0 mm	5	Hex–2-propanol (95:5)	1.0, 40	No separation
			Hex–2-propanol (60:40)	1.0, 40	No separation
(R,R) Whelk-0-1	250 mm \times 4.0 mm	5	Gradient elution**	1.0, 40	Without effect
Kromasil KR 100-5CHI – DMB	250 mm \times 4.6 mm	5	Hex–2-propanol (40:60)	1.0, 40	No separation
			Hex–2-propanol (60:40)	1.0, 40	No separation
			Hex–2-propanol (90:10)	1.0, 40	No separation
			Hex–EtOH (95:5)	0.7, 40	No separation
Chiraspher	250 mm \times 4.0 mm	5	Hex–EtOH (50:50)	0.6, 30	No separation
			Hex–EtOH (75:25)	0.6, 30	No separation

* 0–20 min ACN–1 M NaClO₄ (30:70, v/v); 20–40 min ACN–1 M NaClO₄ (10:90, v/v); 40–50 min ACN–1 M NaClO₄ (10:90, v/v); 50–70 min ACN:1 M NaClO₄ = 30:70; 70–90 min ACN–1 M NaClO₄ (50:50, v/v); 90–120 min ACN–1 M NaClO₄ (50:50, v/v).

** 0 min Hex–2-propanol (100:0, v/v); 30 min Hex–2-propanol (0:100, v/v).

evaluated as a principal criterion for the selection of suitable conditions of enantioselective separation of red-B and -D. The results are shown in Table 1 for red-B and in Table 2 for red-D, respectively.

The best separation of enantiomers in racemic red-B were achieved on a Chiralcel OD-R column, with cellulose tris (3,5-dimethylphenylcarbamate) as chiral selector using a mobile phase acetonitrile–1 M aqueous NaClO₄ (40:60, v/v). Flow rate was 0.5 ml ml⁻¹ and the separation was performed at ambient temperature (see Fig. 2). Increase of the temper-

ature led to the acceleration of analysis but the resolution of enantiomers was worse. An analogous effect was observed after the decrease of sodium perchlorate concentration in the mobile phase. From the whole spectrum of chiral selectors (see Tables 1 and 2), also the AGP-column seemed to give promising results, but the peak symmetry and resolution was not sufficient on this column. The separation properties of the other columns tested were not appropriate for our purpose.

Reduced dimefluron differs from the structure of reduced benfluron by the presence of two methoxy groups on C₃ and

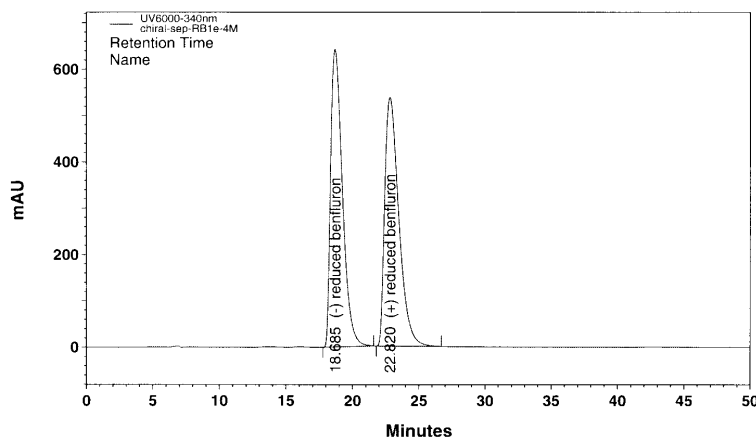


Fig. 2. Chiral separation of red-B under optimal conditions (see Table 1).

C₉ carbons. These methoxy groups seems to be promising for the pharmacokinetic and xenobiochemical properties [22,23] but the chiral separation of red-D is negatively influenced by this substitution. When the same conditions as for red-B had been applied on chiral separation of red-D, the separation of red-D enantiomers failed. The organic component of mobile phase was by sequel replaced with ethanol and then with methanol. In first case, the enantiomers were only in part resolved. Better results were achieved with methanol as an organic modifier. The mobile phase was then optimised to the final composition methanol–1 M aqueous NaClO₄ (75:25, v/v); flow rate was 0.5 ml min⁻¹ at ambient temperature (see Fig. 3).

The peak identity and purity was tested using UV6000 diode-array detector, the same very characteristic UV spectra were obtained for both enantiomers of each com-

pound (red-B or -D). Optical rotation was characterized using a Chiralyser polarimetric detector. (–)-Enantiomer of both compounds left the column as first (*t_R* = 18.685 min for red-B, *t_R* = 20.405 min for red-D) followed by (+)-enantiomer (*t_R* = 22.820 min for red-B, *t_R* = 22.702 min for red-D).

Although only the percentual enantiomeric ratio of red-B (red-D, respectively) after the incubation of the microsomal fractions of various species was evaluated, the validation of an external standard method for both enantiomers of red-B (red-D, respectively) was performed. The calibration curve was found to be linear [$y = 1.43 \times 10^5 x - 8.4 \times 10^4$ for (–)-enantiomer of red-B; $y = 1.43 \times 10^5 x - 8.9 \times 10^4$ for (+)-enantiomer of red-B; $y = 9.89 \times 10^5 x - 7.2 \times 10^4$ for (–)-enantiomer of red-D; $y = 1.09 \times 10^5 x - 5.7 \times 10^4$ for (+)-enantiomer of red-D] in the range of 5.0–17.5 nmol ml⁻¹ with

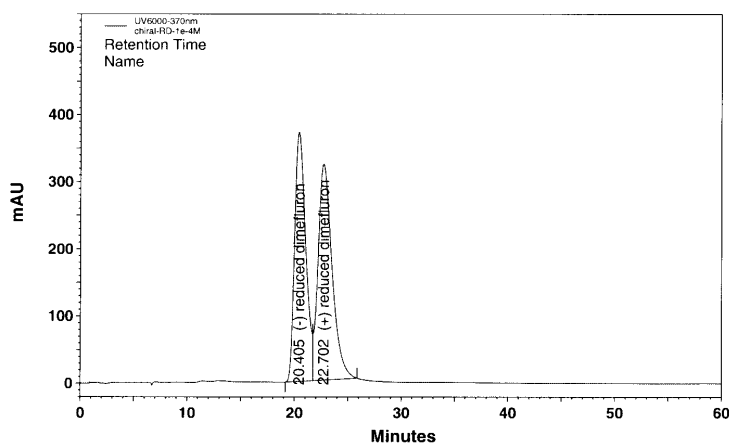


Fig. 3. Chiral separation of red-D under optimal conditions (see Table 2).

$r=0.999$ for both red-B and -D. The accuracy and precision for red-B and -D ranged in the intervals 81.9–103.7% and 0.04–4.0%. LLOQ for red-B (red-D) was 2.5 nmol ml^{-1} . ULOQ was in both cases $17.5 \text{ nmol ml}^{-1}$. Recovery ranged in the interval (72.9–74.5%).

3.2. Enantiomeric ratios of red-B and -D in the incubation mixtures of various species

The extracts from the incubation mixtures were analysed under the optimal conditions for each enantiomer. Differences among species in the metabolism of both compounds (B and D) were observed. The carbonyl reduction of B led predominantly to (+)-red-B in all species except rat. The amount of (–)-red-B was inconsiderable in comparison with (+)-enantiomer, whereas in the metabolisms of rats prevailed (–)-red-B. In some cases, the enantiomeric excess was not

Table 3
Comparison of the enantiomeric excess of red-B

Species	(–)-Red-B	(+)-Red-B	e.e. (–)-red-B vs. (+)-red-B
Red-B			
Rat	Prevalent	Minor	90.2% vs. 9.8%
Guinea pig	Minor	Prevalent	–
Rabbit	Not detected	Prevalent	0% vs. 100%
Goat	Minor	Prevalent	–
Pig	Minor	Prevalent	–
Human	Not detected	Prevalent	0% vs. 100%

specified exactly, because some small amounts of interfering peaks were co-eluted with red-B (see Table 3).

Different results have been found out for red-D. Rat metabolized B mainly to (–)-red-B as D was metabolized to (+)-red-D. More interesting was the comparison of metabolites by rabbits, B was converted completely to the (+)-red-B

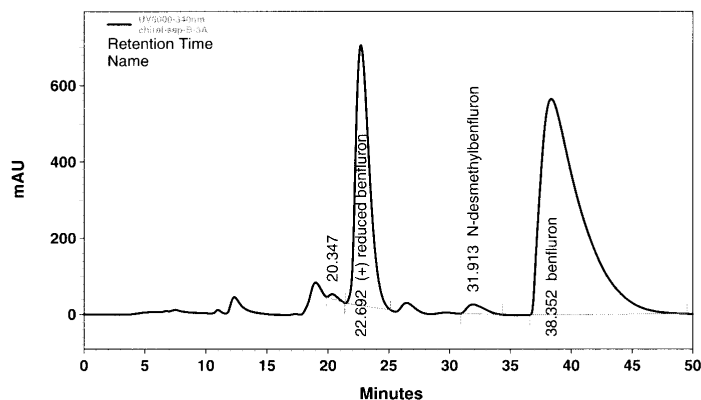


Fig. 4. Chromatogram of benfluron after incubation in rabbit's microsomes.

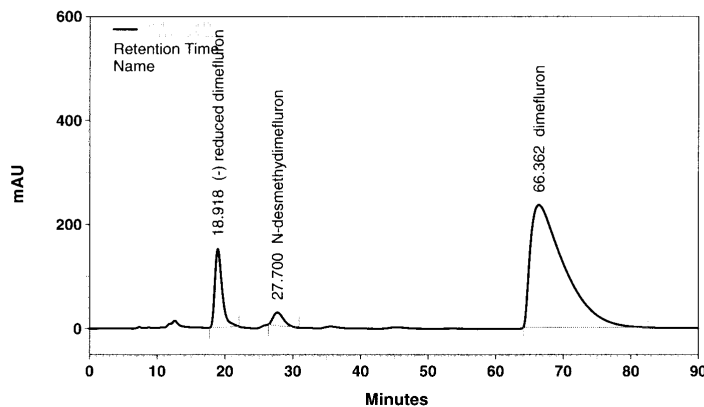


Fig. 5. Chromatogram of dimefluron after incubation in rabbit's microsomes.

Table 4
Comparison of the enantiomeric excess of red-D

Species	(-)-Red-D	(+)-Red-D	e.e. (-)-red-D vs. (+)-red-D
Red-D			
Rat	Minor	Prevalent	19.3% vs. 80.7%
Guinea pig	Minor	Prevalent	23.6% vs. 76.4%
Rabbit	Prevalent	Not detected	100% vs. 0%
Goat	Minor	Prevalent	28.2% vs. 71.8%
Pig	Comparable	Comparable	47.0% vs. 53%
Human	Prevalent	Minor	64.6% vs. 35.4%

(see Fig. 4), but D was converted completely to the (-)-red-D (see Fig. 5). Pig's reductase seems to be not stereospecific in conversion of D to the red-D metabolite, the enantiomeric excess was nearly 1:1, but B undergoes the conversion largely to the (+)-red-B. Results summary is shown in Tables 3 and 4.

4. Conclusions

Optimized chromatographic conditions for chiral separation of red-B and -D were searched out. The best separation was achieved on column Chiralcel OD-R, with cellulose tris (3,5-dimethylphenylcarbamate as chiral selector). The red-B enantiomers were separated successfully using a mobile phase acetonitrile–1 M aqueous NaClO₄ (40:60, v/v). Another mobile phase, methanol–1 M aqueous NaClO₄ (75:25, v/v), had to be employed for the sufficient resolution of red-D enantiomers. Flow rate was 0.5 ml min⁻¹ at ambient temperature in both cases. Red-B was detected at 340 nm, red-D at 370 nm.

The developed analytical procedures were successfully applied to in vitro study of the biotransformation of B and D in the microsomal fractions of liver homogenates prepared from six species (rat, rabbit, pig, guinea pig, goat and human).

Variances in the reductive metabolism were found out in the biotransformation of both parent compounds, i.e. B and D. Interesting results gave the comparison of all species under study. The carbonyl reduction was stereospecific in all cases and led predominately to one enantiomeric form. Only carbonyl-reductase of pig seems not to be stereospecific, if D was used as substrate. The amounts of both enantiomers are comparable in this case.

Acknowledgements

This work was implemented with the support of the Research Project MSM 111600001 and MSM 111600002, Czech Republic and Ministry for Education, Science and Culture of Mecklenburg-Vorpommern, Germany. Authors are grateful to Drs. Pour and Kuneš (Faculty of Pharmacy) for NMR-analyses of red-B and red-D standards and to the Transplant Centre (Hradec Králové) for providing human liver samples.

References

- [1] B. Testa, J. Caldwell, *Biochemistry of Redox Reactions*, Academic Press, London, 1995.
- [2] R. Felsted, N.R. Bachur, *Drug Metab. Rev.* 11 (1980) 1–60.
- [3] B. Wermuth, *Prog. Clin. Biol. Res.* 174 (1985) 209–230.
- [4] J.J.R. Hermans, H.H.W. Thijssen, *Adv. Exp. Med. Biol.* 328 (1993) 351–360.
- [5] E. Masser, *Biochem. Pharmacol.* 49 (1995) 421–440.
- [6] M. Miko, J. Křepelka, M. Mělka, *Biochem. Pharmacol.* 42 (1991) 214–216.
- [7] E. Kvasničková, M. Nobilis, I.M. Hais, *J. Chromatogr.* 295 (1984) 201–209.
- [8] E. Kvasničková, M. Nobilis, A. Šroler, E. Báčová, I.M. Hais, *J. Chromatogr.* 387 (1987) 559–561.
- [9] I.M. Hais, M. Nobilis, E. Kvasničková, *J. Chromatogr.* 500 (1990) 643–653.
- [10] E. Kvasničková, I.M. Hais, M. Nobilis, in: P. Hlavica (Ed.), *Progress in Pharmacology and Clinical Pharmacology*, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, NY, 1991, pp. 137–146.
- [11] M. Miko, J. Křepelka, M. Nobilis, in: D. Adam (Ed.), *Recent Advances in Chemotherapy*, Futuramed Publishers, Munich, 1992, pp. 2620–2621.
- [12] M. Nobilis, E. Kvasničková, A. Šroler, I.M. Hais, *Drug Metab. Drug Interact.* 9 (1991) 225–240.
- [13] E. Kvasničková, M. Nobilis, A. Šroler, V. Wsól, I.M. Hais, in: D. Crommelin, P. Couvreur, D. Duchéne (Eds.), *In vitro and Ex vivo Test Systems to Rationalize Drug Design and Delivery*, Editions de Santé, Paris, 1994, pp. 331–335.
- [14] M. Nobilis, P. Anzenbacher, J. Pastera, Z. Svoboda, K. Hrubý, J. Květina, K. Ubik, F. Trejtnar, *J. Chromatogr. B* 681 (1996) 143–151.
- [15] L. Skálová, M. Nobilis, B. Szotáková, F. Trejtnar, E. Kvasničková, *Exp. Toxicol. Pathol.* 48 (Suppl. II) (1996) 366–370.
- [16] K. Hrubý, E. Anzenbacherová, P. Anzenbacher, M. Nobilis, *Gen. Physiol. Biophys.* 16 (1997) 321–327.
- [17] L. Skálová, M. Nobilis, B. Szotáková, V. Wsól, E. Kvasničková, *Drug Metabol. Drug Interact.* 14 (1998) 221–234.
- [18] L. Skálová, M. Nobilis, B. Szotáková, V. Wsól, E. Kvasničková, *Drug Metabol. Drug Interact.* 14 (1998) 235–250.
- [19] Z. Svoboda, M. Nobilis, J. Květina, K. Lemr, *Acta Med. (Hradec Králové)* 42 (1999) 73–78.
- [20] L. Skálová, M. Nobilis, B. Szotáková, V. Wsól, V. Kubíček, V. Baliharová, E. Kvasničková, *Chem. Biol. Interact.* 126 (2000) 185–200.
- [21] K. Hrubý, E. Anzenbacherová, P. Anzenbacher, M. Nobilis, *Collect. Czech. Chem. Commun.* 65 (2000) 1374–1386.
- [22] M. Nobilis, L. Skálová, B. Szotáková, J. Kujíček, M. Pour, J. Kuneš, M. Mělka, E. Kvasničková, V. Geršl, *Drug Metab. Rev.* 33 (Suppl. 1) (2001) 116.
- [23] L. Skálová, M. Nobilis, B. Szotáková, E. Kondrová, M. Šavlík, V. Wsól, L.P. Garcia, E. Maser, *Biochem. Pharmacol.* 64 (2002) 297–305.
- [24] P. Císař, M. Nobilis, J. Klimeš, in: *Abstract Book of the 32nd conference Synthesis and Analysis of Drugs* (ISBN 80-900306-5-3), p. 19.
- [25] S. Janotová, K. Horáková, *Cell Biochem. Funct.* 11 (1993) 131–135.
- [26] M. Miko, J. Křepelka, M. Mělka, *Anti-cancer Drugs* 2 (1991) 289–295.
- [27] M. Miko, J. Křepelka, M. Nobilis, *Anti-cancer Drugs* 3 (1992) 63–68.
- [28] P.K. Smith, R.I. Krohn, G.T. Hermanson, A.K. Mallia, F.H. Gartner, M.D. Provenzano, E.K. Fujimoto, N.M. Goeke, B.J. Olson, D.C. Klenk, *Anal. Biochem.* 150 (1985) 76–85.
- [29] V.P. Shah, K.K. Midha, S.V. Dighe, *Int. J. Pharm.* 82 (1992) 1–7.
- [30] CDER and CVM Guidance for Industry, *Bioanalytical Method Validation*, May 2001 (<http://www.fda.gov/cder/guidance/>).

4.2 Komentář a diskuse k publikovaným pracím

- R. Kučera, J. Sochor, J. Klimeš, J. Dohnal, Use of the zirconia-based stationary phase for separation of ibuprofen and its impurities, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 38 (2005) 609-618.
- R. Kučera, V. Žižkovský, J. Sochor, J. Klimeš, J. Dohnal, Utilization of zirconia stationary phase as a tool in drug control, *J. Sep. Sci.* 28 (2005) 1307–1314.

Kontrola léčiv patří mezi významná odvětví farmaceutického průmyslu. Sledování jakosti účinných látek a z nich vyrobených léčivých přípravků je základním předpokladem kvalitní terapie pacientů. Přítomnost nečistot (příbuzných látek nebo případných degradačních produktů) znamená vždy snížení kvality a účinnosti léčivé látky nebo léčivého přípravku. V případě, že nečistota má toxický efekt na organismus, představuje její přítomnost i zdravotní riziko pro pacienta.

V těchto dvou publikovaných pracích byla pozornost soustředěna na možnosti využití nových perspektivních stacionárních fází na bázi oxidu zirkoničitého ve farmaceutické analýze. Jako modelová struktura bylo použito nesteroidní antiflogistikum ibuprofen, jeho příbuzné látky a degradační produkty.

ZrO₂ má na rozdíl od silikagelu značnou chemickou a tepelnou stabilitu. Chemická stabilita zirkoniových stacionárních fází vychází ze struktury ZrO₂. Síla vazby mezi atomem zirkonia a kyslíkem je srovnatelná jako vazba mezi atomy křemíku a kyslíku. Rozdíl mezi oběma oxidy je ale v krystalové mřížce, kdy každý atom zirkonia je vázán současně se sedmi atomy kyslíku. Oproti tomu je v krystalové mřížce SiO₂ je každý atom křemíku vázán jen na čtyři kyslíkové atomy [24].

Termální stabilita je výhodná vzhledem k možnosti práce za vysokých teplot, což umožňuje dosáhnout vyšších průtoků za nižšího pracovního tlaku a tím zkrátit dobu analýzy. Dále je možno dosáhnout potřebné selektivity kolony vzájemnou kombinací změny teploty a složení mobilní fáze [69,70,71,72,73].

V RPLC se používá výhradně modifikovaný ZrO₂. Přitom je nutno brát v úvahu, že žádnou modifikací není možné zablokovat úplně všechny skupiny typu Lewisových kyselin. Retence látek je tedy ovlivněna více efekty, které lze využít pro ovlivnění selektivity stacionární fáze, hovoříme o tzv. „smíšeném“ retenčním módu. Jaký efekt se při chromatografii bude dominantně uplatňovat závisí na typu analytu, pH mobilní fáze, typu použitého pufru, jeho iontové síle i na typu použité organické složky mobilní fáze. PBD-ZrO₂ je v současné době nejvíce prostudovaným reverzním materiálem, protože na této stacionární fázi byly studovány jevy, které ovlivňují jak kinetiku tak dynamiku separačního procesu, viz kapitola 3.3.2.3.1 v teoretické části.

Ibuprofen, (*R,S*)-2-(4-isobutylfenyl)propionová kyselina, patří do skupiny nesteroidních antiflogistik a byl zaveden do terapie již koncem šedesátých let. Na základě údajů spotřeby z let 2003 a 2004 je ibuprofen nejfrekventovanějším nesteroidním antiflogistikem v České republice [169].

Ibuprofen (Ibu) je indikován při léčbě zánětlivých a degenerativních kloubních chorob, mimokloubního revmatizmu a chorob páteře. Používá se při revmatoidní artritidě, včetně juvenilní revmatoidní artritidy, osteoartritis, ankylozující spondylitidě, psoriatické artritidě, dnové artritidě, chondrokalcinóze (pseudodna), při distorzi kloubů a zhmoždění pohybového aparátu; Jako analgetikum-antipyretikum při horečnatých stavech a nemocech z nachlazení, dále při migréně vaskulární etiologie, bolestech po operaci, bolestech zubů a bolestivé menstruaci. Protizánětlivý účinek je dán inhibicí enzymu cyklooxygenasy a následnou inhibicí syntézy prostaglandinů. Zánět je zmírňován snížením uvolňování mediátorů zánětu z granulocytů, bazofilů a žírných buněk. Ibuprofen snižuje citlivost cév vůči bradykininu a histaminu, ovlivňuje produkci lymfokinů v T lymfocytech a potlačuje vazodilataci. Tlumí též agregaci krevních destiček.

Po perorálním podání je ibuprofen rychle a prakticky úplně vstřebán ze zažívacího traktu. Maximální plazmatické koncentrace je dosaženo přibližně za 1 hodinu po perorálním podání, poločas eliminace je cca 2 hodiny. Po rektální aplikaci se ibuprofen vstřebává pomaleji, maximální koncentrace v séru je dosaženo za 2 hodiny po aplikaci. Po aplikaci na kůži se ibuprofen dobře vstřebává do podkožních tkání. Maximální hladiny ibuprofenu po topické dávce 250 mg v 5 g krému se pohybovaly kolem průměrné hodnoty $100 \text{ ng}\cdot\text{ml}^{-1}$. To představuje okolo 0,5 % vrcholové koncentrace po srovnatelné perorální dávce ibuprofenu, malá část léčiva proniká do systémové cirkulace. Asi 99 % ibuprofenu se váže na plazmatické bílkoviny, hlavně albumin. Metabolismus probíhá v játrech na neúčinné metabolity. Exkrece ledvinami je rychlá a kompletní [169,170].

Cílem první práce, *J.Pharm.Biomed.Anal.* 38 (2005) 609–618, bylo nalezení lepšího separačního systému pro hodnocení Ibu, jeho příbuzných látek a rozkladných produktů. Hlavní pozornost byla věnována vylepšení separace mezi Ibu a jeho polohovým izomerem 2-(4-*n*-butylfenyl)propionové kyselině (Bppa).

Přístup k analytickému hodnocení nečistot Ibu se mezi Ph.Eur. a USP liší jak ve sledovaných látkách, tak v předepsaných limitech, viz tab. I.

USP věnuje zvláštní pozornost 4-isobutylacetofenonu (Ibap), který působí toxicky na nervovou soustavu [171,172] a je jedním ze dvou hlavních degradačních produktů ibuprofenu [173]. Evropský lékopis uvádí celou řadu příbuzných látek ibuprofenu označených A až R, ale při hodnocení čistoty Ibu pomocí HPLC se zaměřuje na přítomnost polohového izomeru ibuprofenu Bppa, v lékopise označovaný jako nečistota B, viz Fig. 6 v textu publikace.

Tabulka I Srovnání požadavků USP a Ph.Eur. na čistotu ibuprofenu pomocí HPLC metody.

	limit pro jednotlivou nečistotu	limit pro sumu všech nečistot	sledovaná nečistota	limit sledované nečistoty
USP	≤ 0,3 %	≤ 1,0 %	Ibap	≤ 0,1 %
Ph.Eur.	≤ 0,3 %	≤ 0,7 %	Bppa	≤ 0,3 %

Tato nečistota pochází z výrobního procesu [174]. Díky velmi podobným vlastnostem obou látek, viz Table 1 v textu publikace, je jejich separace kritickým parametrem analýzy a jejich dostatečné rozlišení je zahrnuto do testu způsobilosti lékopisné metody (poměr výšky píku nečistoty B k sedlu oddělující tento pík od píku ibuprofenu musí být nejméně 1,5. Pokud není tato podmínka splněna, je nutno upravit množství ACN v mobilní fázi). Naši pozornost jsme zaměřili právě na zlepšení separace Ibu a Bppa.

Rozlišení mezi dvěma píky je ovlivněno počtem teoretických pater (N), selektivitou stacionární fáze (α) a její retenční schopností (k'), viz rovnice (I).

$$(I) \quad R_s = \frac{1}{4} \cdot \sqrt{N} \cdot \left(\frac{\alpha - 1}{\alpha} \right) \cdot \left(\frac{k'}{k' + 1} \right)$$

Z výše uvedených parametrů má největší vliv na rozlišení selektivita [2]. Změnu selektivity lze docílit změnou složení mobilní fáze, změnou složek mobilní fáze, změnou stacionární fáze, popř. změnou teploty. Prakticky má na optimalizaci rozlišení dvou látek nejvýraznější vliv změna typu eluentu a stacionární fáze.

V první fázi bylo snahou zvýšit rozlišení mezi Ibu a Bppa náhradou ACN za MeOH při zachování stacionární fáze předepsané lékopisem. Nejlepšího výsledku bylo dosaženo za použití mobilní fáze MeOH–fosfátový pufr (pH 6,4) (45:55, v/v) s přídavkem tetramethylamonium-chloridu (5mM) jako ion-párového činidla, viz Fig. 1 v textu publikace. Nicméně další změny ve složení mobilní fáze již nevedly k zlepšení separace obou látek, proto jsme přistoupili k testování jiné stacionární fáze. Obě látky se mírně liší v lipofilitě a právě tento rozdíl jsme chtěli ještě více zvýraznit volbou experimentálních podmínek, za kterých by se při retenci látky na koloně uplatňovaly především hydrofobní interakce, tzn. použít kyselou mobilní fázi. Běžné silikagelové stacionární fáze nejsou v nízkých oblastech pH příliš stabilní, protože dochází k hydrolyze vázané fáze a tedy ke ztrátě účinnosti kolony. Stacionární fáze na bázi oxidu zirkoničitého jsou v závislosti na typu sorbentu odolné téměř v celém rozsahu pH. Vysoká chemická stabilita byla prvním důvodem, proč jsme zvolili tento nový perspektivní typ chromatografických kolon. Druhým důvodem byl odlišný mechanismus uplatňující se při retenci látek, což by se

mělo promítnout také do selektivity vůči jednotlivým analytům. Na základě publikovaných prací byla zvolena stacionární fáze PS-ZrO₂, protože díky přítomnosti styrenových jednotek bylo dosaženo unikátní selektivity pro látky aromatického charakteru [63,107].

Separace mezi Ibu a Bppa se v nízkém pH (2,33) oproti lékopisným podmínkám zlepšila, ale díky odlišné selektivitě PS-ZrO₂ došlo ke koeluci Ibu s jeho rozkladným produktem Ibap, viz Fig. 3 a, b v textu publikace. Proto bylo přistoupeno k testování mobilních fází s vyšším pH, kde se na retenčním mechanismu podílí kromě hydrofobních interakcí i interakce typu Lewisova kyselina-Lewisova báze. Kinetika těchto interakcí je z pohledu chromatografie pomalá, což se projeví silnou retencí a chvostujícími píky. Přídavek silné Lewisovy báze do mobilní fáze (v našem případě fosforečnan) tyto interakce výrazně snižuje. Příмым důsledkem je snížení retenčního času a výrazné zlepšení tvaru píku. Tvar píků byl dále optimalizován přidáním malého množství organického modifikátoru (IPA, ACN, THF). Nejvýraznější efekt na symetrii píku měl malý přídavek THF, viz Fig. 2 v textu publikace. Kinetika separačního procesu byla dále zlepšena zvýšením teploty na koloně, optimální teplota pro separaci byla 60°C.

Změna pH mobilní fáze v rozmezí 2,33–4,0 neměla vliv na koeluci Ibap a Ibu. Výrazný rozdíl v retenci Ibu a Ibap se projevil při použití mobilní fáze s hodnotou pH nad 5,0. Nicméně v této oblasti došlo k markantnímu zhoršení separace Ibu a Bppa. Z tohoto důvodu bylo na základě experimentu zvoleno pH mobilní fáze 4,5, kdy je stále dostatečné rozlišení mezi Ibu a jeho nečistotou Bppa, ale nedochází již ke koeluci Ibu s jeho rozkladným produktem Ibap, viz Fig. 4 v textu publikace. Vliv charakteru Lewisovy báze na separaci byl potvrzen záměnou fosforečnanu za acetát. Acetát je slabší Lewisovou bází než fosforečnan a z toho důvodu jsou interakce mezi analytem a stacionární fází daleko silnější. Důsledkem bylo prodloužení retenčního času ibuprofenu na více jak 40 minut.

Optimalizované chromatografické podmínky pro separaci všech tří výše zmíněných látek (Ibu, Bppa a Ibap) jsou mobilní fáze MeOH–fosforečnanový pufr (pH 4,5, 50 mM)–THF (21:74:5, v/v/v), průtok mobilní fáze 0,5 ml·min⁻¹ a teplota 60°C. Za těchto podmínek bylo možno separovat i další příbuzné látky Ibu (amid kyseliny 2-(4-isobutylfenyl)propionové a 2-hydroxy-2-(4-isobutylfenyl)propionová kyselina) označené v Ph. Eur. jako nečistoty C a M včetně dalšího rozkladného produktu Ibu 2-(4-isobutyrylfenyl)propionové kyseliny (Bopa), viz Fig. 5 v textu publikace.

Nečistoty Ibu byly detekovány při dvou vlnových délkách 219 nm pro příbuzné látky a 258 nm pro degradační produkty, u kterých je patrný bathochromní posun maxima absorbance, viz Fig. 6 v textu publikace. Za zvolených podmínek byl čas analýzy 22 minut.

U vyvinuté metody byla testována linearita odezvy detektoru pro všechny látky, LOD a LOQ na základě poměru signálu k šumu základní linie (viz Table 2 v textu publikace), selektivita (Fig. 5 v textu publikace), vliv malých změn experimentálních podmínek na separaci a odezva jednotlivých nečistot vůči ibuprofenu (viz Table 3 v textu publikace). Odezvy jednotlivých látek se od sebe značně liší, proto je pro hodnocení kvality Ibu vhodné připravit standard s limitním obsahem jednotlivých nečistot.

Závěr - odlišné vlastnosti PS-ZrO₂ (chemická, tepelná stabilita; odlišný mechanismus retence) byly s úspěchem využity pro separaci ibuprofenu, jeho doprovodných nečistot a dvou rozkladných produktů. I přes nižší obsah uhlíku PS-ZrO₂ se podařilo dosáhnout dostatečného rozlišení mezi separovanými látkami, obzvláště pak mezi Ibu a Bppa. Díky nižší retenční schopnosti PS-ZrO₂ se podařilo také zkrátit celkový čas analýzy a výrazně zredukovat množství potřebných organických rozpouštědel, což má význam jak z ekonomického hlediska, tak z hlediska životního prostředí.

Druhá práce, *J. Sep. Sci.* 28 (2005) 1307–1314, byla zaměřena na vývoj HPLC metody pro monitorování možného rozkladného procesu ibuprofenu v topické lékové formě, včetně sledování degradace konzervačních látek (parabeny).

Z chemického hlediska je ibuprofen relativně stabilní, ale byla pozorována jeho náchylnost k oxidaci a fotolytické degradaci [172]. Dva hlavní degradační produkty jsou 4-isobutylacetofenon (Ibap) a 2-(4-isobutyrylfenyl)propionová kyselina (Bopa). Ibap vzniká radikálově indukovanou dekarboxylací a následnou oxidací. Bopa je produktem oxidace isobutylového řetězce ibuprofenu. Jak již bylo řečeno výše, Ibap má nežádoucí efekt na nervový systém, a protože se dobře absorbuje pokožkou, je nutno monitorovat jeho přítomnost obzvláště u topických lékových forem [171,172,173].

Alkylestery (methyl-, ethyl-, propyl- nebo butyl-) 4-hydroxybenzoové kyseliny jsou používány jako antimikrobiální přísady ve farmaceutickém a kosmetickém průmyslu. Byly zavedeny do praxe v 30. letech dvacátého století na základě Sabalitschkových prací. Svou účinností jsou srovnatelné s kyselinou benzoovou, působí však nejen v kyselém, ale i v neutrálním a alkalickém prostředí, jsou i méně toxické. Jejich inhibiční účinek vůči mikroorganismům stoupá s velikostí alkyly. Stejným směrem klesá i jejich rozpustnost ve vodě a zvyšuje se rozpustnost v lipofilních rozpouštědlech. Pro zvýšení efektu se většinou kombinují (např. methyl- a propylparaben v poměru 2:1) [175]. Degradačním produktem parabenů je kyselina 4-hydroxybenzoová (PhBa), jejíž mikrobiální aktivita je ve srovnání s parentní látkou nízká.

Analýzu ibuprofenu, jeho degradačních produktů (Bopa, Ibap), methylparabenu (MeP), propylparabenu (PrP) a jejich degradačního produktu (PhBa) nebylo možno

provést již dříve vyvinutou metodou pro hodnocení Ibu, MeP, PrP a Ibap v topických přípravcích na silikagelové C18 koloně (mobilní fáze: acetonitril-voda (pH 2,6, upraveno H₃PO₄) (60:40, v/v), průtok 0,6 ml·min⁻¹) [176], protože došlo ke koeluci PrP a Bopa. Jejich separace byla možná, až když byl snížen obsah acetonitrilu v mobilní fázi o třetinu, popř. níže. Snížením obsahu organické složky mobilní fáze se výrazně prodloužila retence ostatních analytů, zejména pak Ibap.

Na základě předchozích zkušeností s PS-ZrO₂ kolonou, byla zkoušena k řešení dané problematiky opět tato stacionární fáze na bázi oxidu zirkoničitého. Vliv pH mobilní fáze na retenci jednotlivých analytů je znázorněn na Fig. 2 v textu publikace. Je patrné, že nejméně zadržovanou látkou byl degradační produkt parabenů a většinou byl eluován společně s píkem rozpouštědla. Modifikací experimentálních podmínek (druh organické složky mobilní fáze, složení mobilní fáze, pH) se nepodařilo na PS-ZrO₂ dosáhnout pro PhBa dostatečné retence. Zároveň je i Bopa eluována v blízkosti systémového píku, viz Fig. 3 v textu publikace. Změnou stacionární fáze s vyšším obsahem uhlíku tzn. vyšší retenční schopností se podařilo tento separační problém vyřešit. Použili jsme opět kolonu na bázi oxidu zirkoničitého, ale s navázanými oktaldecylovými řetězci - ZrCarbonC18. Tato stacionární fáze je určena především pro separaci kyselých a neutrálních látek a nachází uplatnění tam, kde není principálně možno použít běžnou silikagelovou C18 kolonu nebo se na této fázi nedaří dosáhnout potřebné selektivity.

Retence všech studovaných látek včetně PhBa byla na ZrCarbonC18 dostatečná. Stejně jako na PS-ZrO₂ byla hodnota pH mobilní fáze důležitým nástrojem k ovlivnění selektivity této stacionární fáze. Byly testovány mobilní fáze s pH v rozmezí 3,45-5,0, s cílem dosáhnout dostatečné separace všech sledovaných látek a akceptovatelný čas analýzy. Jak je patrné ze závislosti retenčního faktoru na pH mobilní fáze, viz Fig. 4 v textu publikace, problematickou dvojici tvořil MeP a degradační produkt ibuprofenu Bopa. Rozdíly v retenci MeP a Bopa byly nepatrné, pokud bylo pH mobilní fáze <4,5. Na základě experimentu bylo zvoleno jako nejvhodnější pH mobilní fáze 4,8. Rozlišení bylo dostatečné mezi všemi píky včetně MeP a Bopa. S ohledem na klesající retenci PhBa jsme mobilní fáze s vyšší hodnotou pH již dále netestovali.

Porovnáním závislostí retenčního faktoru na pH mobilní fáze na obou zirkoniových stacionárních fázích je zřejmé, že retence PhBa je výrazněji ovlivněna změnou pH mobilní fáze na PS-ZrO₂, viz Fig. 2 a Fig. 4 v textu publikace.

Finální chromatografické podmínky pro analýzu všech sledovaných látek byly: mobilní fáze acetonitril-fosforečnanový pufr (50 mM, pH 4.8)-IPA (27:56:17, v/v/v). Průtok mobilní fáze byl na počátku 0,6 ml·min⁻¹ a během analýzy byl zvýšen na 0,8 ml·min⁻¹, viz Table 1 v textu publikace. Pro zkrácení analýzy bylo efektivnější využít zvýšení průtoku mobilní fáze než aplikace gradientu, po jehož skončení, bylo nutno ještě ustalovat kolonu. Zvýšení pracovní teploty se příznivě odráží na kinetice

separačního procesu (snížení chvostování píků) a zároveň umožňuje separace za nižších pracovních tlaků. S ohledem na tyto skutečnosti byla kolona termostatována na 70°C. Detekce při 258 nm byla zvolena tak, aby citlivost metody pro rozkladné produkty Ibu byla co nejvyšší. Při této vlnové délce bylo možno sledovat i rozklad parabenů, i když maximum UV absorpce 4-hydroxybenzoové je při 274 nm (v případě potřeby citlivější detekce degradačního produktu parabenů je možno přepnout detektor do duálního módu). Výše popsaná metoda byla také validována, viz Table 2 v textu publikace.

Závěr – ke sledování stability ibuprofenu a konzervačních přísad methylparabenu a propylparabenu v topické lékové formě byly testovány dvě stacionární fáze na bázi oxidu zirkoničitého PS-ZrO₂ a ZrCarbonC18. Obě testované kolony se vzájemně lišily v selektivitě i retenci, viz Fig. 2 a Fig. 4 v textu publikace. Díky vyšší retenci se ukázala být vhodnější pro zvolený účel kolona ZrCarbonC18, protože bylo možno analyzovat i degradační produkt parabenů, což se nepodařilo na PS-ZrO₂. Nejvýznamnějším faktorem, ovlivňujícím selektivitu na obou zirkoniových stacionárních fázích, bylo pH mobilní fáze. S rostoucím pH klesá retence karboxylových kyselin, protože se postupně začínají uplatňovat odpudivé síly mezi aniontem karboxylové kyseliny a negativním nábojem na povrchu ZrO₂. Tento efekt je patrnější na PS-ZrO₂.

Popsaná metoda je vhodná pro monitorování případného rozkladného procesu Ibu i parabenů a také pro jejich stanovení v lékové formě. Jako vhodný vnitřní standard pro stanovení byl zvolen butylparaben, viz Fig. 6 v textu publikace. Na chromatogramu - Fig. 7 v textu publikace - je záznam vzorku krému po expiraci. V malém množství byly detekovány degradační produkty ibuprofenu i parabenů.

Na tomto dalším praktickém příkladu byly demonstrovány možnosti využití zirkoniových stacionárních fází pro kontrolně-analytické účely.

- R. Kučera, M. Nobilis, L. Skálová, B. Szotáková, P. Císař, Th. Jira, J. Klimeš, V. Wsól, Use of chiral liquid chromatography for the evaluation of stereospecificity in the carbonyl reduction of potential benzo[*c*]fluorene antineoplastics benfluron and dimefluron in various species, *J.Pharm.Biomed. Anal.* 37 (2005) 1049–1057.

Studium metabolismu potenciálních léčiv náleží k základním úkolům výzkumu a vývoje nových aktivních látek. Mimo oxidativních procesů se u mnoha látek v jejich první fázi biotransformace uplatňují také redukční reakce. Redukce karbonylové skupiny je významným krokem v metabolismu řady aromatických, alicyklických i alifatických látek včetně farmak. V mnoha případech je tato redukce spojena s deaktivací léčiva jako např. u warfarinu, haloperidolu, daunorubicinu aj.

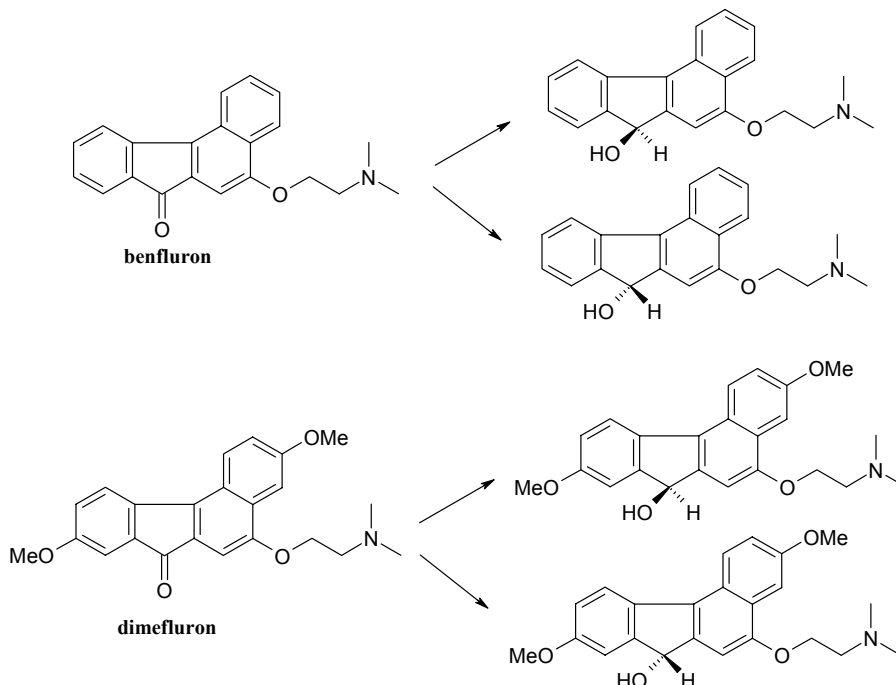
Benfluron (B) [5-(2-dimethylaminoethoxy)-7*H*-benzo[*c*]fluoren-7-on hydrochlorid], byl připraven ve Výzkumném ústavu pro farmacii a biochemii v Praze jako potenciální interkalační antineoplastikum, které vykazuje aktivitu proti širokému spektru experimentálních tumorů *in vitro* i *in vivo*. Benfluron však podléhá během první fáze biotransformace přeměně na neaktivní metabolity. Redukce karbonylu v poloze C₇ je jednou z jeho základních inaktivačních metabolických cest z několika důvodů. Jednak proto, že redukcí C₇-uhlíku se mění *sp*²-hydridizace (ν >C=O) na *sp*³-hydridizaci (ν >CH-OH), a tím dochází k narušení planarity benzo[*c*]fluorenového seskupení a tedy i snížení interkalačního efektu. Dalším důvodem je vyšší hydrofilita redukováných metabolitů v porovnání s parentní látkou a tím i rychlejší eliminace z organismu (ve formě redukováného metabolitu nebo jeho konjugátu např. s glukuronovou kyselinou).

Potlačení redukce karbonylu se zdá být nezbytné pro zachování interkalačního efektu benzo[*c*]fluorenových cytostatik. Jednou z možných cest k řešení tohoto problému je zavedení jiných biotransformovatelných funkčních skupin, které by umožňovaly alternativní cesty metabolických přeměn a následné eliminace benzo[*c*]fluorenových metabolitů z organismu. Dalším cílem modifikace bylo vylepšení některých negativních farmakokinetických vlastností - nízkého vstřebávání z GIT a silné vazby na tkáňové proteiny.

Dimefluron (D) [3,9-dimethoxy-5-(2-dimethylaminoethoxy)-7*H*-benzo[*c*]fluoren-7-on hydrochlorid], je derivát benfluronu, který se od původní struktury liší přítomností dvou methoxyskupin v poloze 3 a 9. U této látky převládá alternativní metabolická cesta (*O*-demethylace) nad redukcí karbonylu v poloze C₇, která je u této látky pouze minoritní metabolickou cestou. Díky odlišnému metabolismu se zdá být dimefluron perspektivnější látkou než jeho předchůdce. Studie zaměřené na možnosti využití dimefluronu v terapii v současné době probíhají. Zároveň jsou studovány enzymové systémy podílející se na redukcí karbonylu (karbonylreduktasy) [177,178,179] a možnosti případné inhibice těchto reduktas.

Redukcí prochirální karbonylové skupiny u parentních látek dochází ke vzniku redukovaného benfluronu (red-B), resp. redukovaného dimefluronu (red-D). Oba metabolity jsou díky asymetrickému centru v poloze C₇ opticky aktivní, viz obr. I.

Obr. I Redukce benfluronu a dimefluronu na opticky aktivní metabolity



Cílem naší práce bylo vyvinout HPLC metodu umožňující separaci obou chirálních látek a využít tuto metodu pro studium enantiospecificity příslušné karbonylreduktasy různých živočišných druhů (potkan, králík, prase, morče, koza a člověk) a doplnit již dříve získané poznatky o metabolismu těchto látek.

Vycházelo se z předpokladu, že pokud dochází k redukci benfluronu nebo dimefluronu synteticky (viz příprava redukovaných derivátů B a D, kapitola 2.2 v textu publikace), pak vzniká racemická směs, protože karbonyl je přístupný se stejnou pravděpodobností z obou stran planární molekuly. Pokud však dochází k redukci enzymaticky, je molekula B nebo D vázána na apoenzym a prochirální karbonyl je přístupný preferenčně z jedné strany molekuly, a proto může být enantiomerní poměr redukovaných derivátů posunut ve prospěch jednoho izomeru.

Separace red-B a red-D byla testována na různých typech chirálních stacionárních fází (polysacharidové, proteinové, Pirklovy a kalixarenové CSP) v reverzním i normálním módu, podrobné výsledky jsou uvedeny v textu publikace, viz Table 1 (red-B) a Table 2 (red-D).

Separace enantiomerů red-B

Z jedenácti testovaných CSP se podařilo separovat oba enantiomery pouze na dvou chirálních selektorech:

- tris(3,5-dimethylfenylkarbamátu) celulosy (kolona - Chiralcel-OD-R)

b) kyselém α_1 -glykoproteinu (kolona Chiral AGP).

Avšak separace na Chiral AGP byla pouze částečná a pík druhého enantiomeru byl značně asymetrický. Z hlediska dalšího zamýšleného použití byla tato CSP nevhodná (nedostatečná separace a malá kapacita) a bylo od ní upuštěno.

Separace byla optimalizována na koloně Chiralcel-OD-R (složení mobilní fáze, teplota). Jako vhodné podmínky pro studium biotransformace byly zvoleny následující parametry: mobilní fáze ACN–1M NaClO₄ (40:60, v/v), průtok mobilní fáze 0,5 ml·min⁻¹ a teplota na koloně 25°C. Chromatogram standardu viz Fig. 2 v textu publikace. Stejná stacionární fáze byla zkoušena i v normálním módu. Hlavní složkou mobilní fáze byl hexan a měnil se druh a poměr polárního modifikátoru (IPA a EtOH). Chirální separace však nebyla pozorována. Tento jev lze vysvětlit na základě odlišných interakcí mezi analytem a stacionární fází v reverzním a normálním módu. Pro chirální separaci red-B jsou určující interakce uplatňující se v reverzním módu.

Separace enantiomerů red-D

Modifikace struktury benfluronu dvěma methoxyskupinami v poloze 3 a 9 se z hlediska chirální separace projevila jako nežádoucí. Za stejných chromatografických podmínek, které byly použity pro separaci enantiomerů red-B, se nepodařilo separovat enantiomery red-D. I na ostatních testovaných CSP byl výsledek negativní.

Oba enantiomery se podařilo částečně separovat na koloně Chiralcel-OD-R teprve v případě, kdy byl ACN v mobilní fázi nahrazen alkoholem (MeOH, EtOH). Při použití MeOH, jako organické složky mobilní fáze, bylo dosaženo nejlepšího rozlišení. Na základě experimentu je možno konstatovat, že substituce základního struktury (benfluron) methoxyskupinami ovlivňuje negativně interakce mezi analytem a CSP v systému ACN-1M NaClO₄. Nicméně změnou organické složky dochází k zapojení další interakce do mechanismu chirální separace. Tato interakce byla v předchozí mobilní fázi minoritní nebo zcela chyběla. Vhodné podmínky pro studium biotransformace dimefluronu byly mobilní fáze MeOH–1M NaClO₄ (75:25, v/v), průtok mobilní fáze 0,5 ml·min⁻¹ a teplota kolonového prostoru 25°C. Chromatogram standardu viz Fig. 3 v textu publikace.

Optimalizované podmínky pro chirální separaci enantiomerů red-B a red-D byly použity pro studium biotransformace benfluronu a dimefluronu. Při analýze biologických vzorků byla chirální kolona chráněna předkolonou s C18 fází. Směr stáčení roviny polarizovaného světla byl určen pomocí polarimetrického detektoru Chiralyser.

Biotransformace B a D byly studovány v jaterních mikrosomálních frakcích (příprava viz kapitola 2.3–2.6 v textu publikace). Experimentální výsledky ukazují,

že existují jak mezidruhové rozdíly v biotransformaci benfluronu i dimefluronu, tak jsou patrné i rozdíly v metabolismu obou látek u stejného živočišného druhu.

Redukcí B vznikl u většiny živočišných druhů (+)-red-B. Pouze redukcí v mikrosomech potkana vznikl převážně (-)-red-B. Variabilita v biotransformaci dimefluronu byla o poznání vyšší. Redukcí D u tří živočišných druhů (potkan, morče a koza) vznikl převážně (+)-red-D. Naopak vznik (-)-red-D je preferován v králících a lidských mikrosomech. Redukce D v prasečích mikrosomech se nezdá být enantiospecifická, protože enantiomerní poměr obou isomerů odpovídal téměř ekvimolární směsi. Tento fenomén však nebyl pozorován v případě, pokud byl substrátem benfluron.

Výrazné rozdíly mezi metabolismem B a D byly pozorovány v mikrosomech následujících živočichů – krysa, prase, člověk a králík. V králících mikrosomech je rozdíl nejmarkantnější. Zatímco při redukcí B vzniká pouze (+)-red-B, tak redukcí D vzniká výhradně enantiomer, který stáčí rovinu polarizovaného světla v opačném směru, tedy (-)-red-D, viz Tables 3, 4 a Figs. 4, 5 v textu publikace.

Závěr – na základě testování mnoha druhů chirálních stacionárních fází byly nalezeny vhodné separační podmínky pro hodnocení a porovnání biotransformace obou studovaných látek v mikrosomálních frakcích různých živočišných druhů. Redukované metabolity B i D, viz obr. I, se podařilo separovat na jednom typu CSP-tris(3,5-dimethylfenylkarbamátu) celulosy, ale za použití rozdílných organických složek mobilní fáze pro red-B – acetonitril a pro red-D – methanol.

Byly pozorovány mezidruhové rozdíly i rozdíly v rámci jednoho druhu v biotransformaci obou látek. Tyto difference je možno vysvětlit na základě vlivu (a) sterických efektů, které se uplatňují při vazbě substrátu na apoenzym, nebo (b) přichází v úvahu možnost, že je karbonylová skupina obou látek redukována u různých species různými redukujícími enzymy (karbonylreduktasy, aldoketo-reduktasy, 11- β -hydroxysteroiddehydrogenasa typ 1 apod.).

4.3 Práce publikované formou posteru na konferencích a formou abstraktů v odborných časopisech

- R. Kučera, J. Sochor, J. Klimeš, Hodnocení ibuprofenu a 4-isobutylacetofenonu v topických přípravcích pomocí RP-HPLC. 32. konference „Syntéza a analýza léčiv“, Velké Karlovice, ČR, 16.-19.09.2003, Sborník konference str. 61, ISBN 80-900306-5-3.
- R. Kučera, M. Nobilis, L. Skálová, B. Szotáková, P. Císař, Th. Jira, J. Klimeš, V. Wsól, Use of chiral reversed-phase liquid chromatography for the evaluation of stereoselectivity in the carbonyl reduction of potential benzo[c]fluorene antineoplastics benfluron and dimefluron in various species. 15th International Symposium on Pharmaceutical and Biomedical Analysis, Florence, Italy, 02.-06.05.2004, Abstract Book p. 94.
- R. Kučera, K. Kořínková, J. Sochor, J. Klimeš, Chirální separace s využitím elektromigračních metod. 33. konferencia „Syntéza a analýza liečiv“, Nitra, Slovenská republika, 09.-11.09.2004; Farm. Obzor LXXIII – 2004, str. 246-247; ISSN 0014-8172.
- M. Nobilis, P. Císař, R. Kučera, J. Klimeš, M. Holčapek, L. Kolářová, HPLC determination of phase II dimefluron metabolites in rat urine and faeces using photodiode-array and mass spectrometric detection. 25th International Symposium on Chromatography; Paris, France, 04.-08.10.2004, Abstract Book p. 126.
- R. Kučera, J. Sochor, J. Klimeš, New approach to quality control of ibuprofen using discovery zirconia column. Jahrestagung - Joint Meeting 2004, Regensburg, Germany, 06.-09.10.2004, Book of Abstracts p. 116, ISBN 3-00-014723-3.
- R. Kučera, V. Žižkovský, J. Sochor, J. Klimeš, Comparative study of two zirconia stationary phases for utilization in pharmaceutical analysis. Pokroky v chromatografii a elektroforéze & Chiranal 2005, Olomouc, ČR, 07.-10.02.2005, Sborník konference str. 80, ISBN 80-244-0984-4.
- V. Žižkovský, R. Kučera, J. Sochor, J. Klimeš, Zirconia stationary phase as a perspective tool for stability indicating methods in drug control. Pokroky v chromatografii a elektroforéze & Chiranal 2005, Olomouc, ČR, 07.-10.02.2005, Sborník konference str. 102, ISBN 80-244-0984-4.
- R. Kučera, P. Císař, V. Žižkovský, J. Sochor, J. Klimeš, Zirconia-Based HPLC column as an Alternative in Drug Control. 11th International Symposium on Separation Science, Pardubice, ČR, 12.-14.09.2005, Book of Abstracts p. 138, ISBN 80-7194-771-7.

- V. Žižkovský, R. Kučera, A. Jedlička, J. Klimeš, HPLC Assay of Vitamin Complex in Pharmaceutical Preparation. 11th International Symposium on Separation Science, Pardubice, ČR, 12.-14.09.2005 Book of Abstracts p. 240, ISBN 80-7194-771-7.
- V. Žižkovský, R. Kučera, J. Sochor, J. Klimeš: Možnosti využití stacionárních fází na bázi ZrO₂ v kontrole léčiv. 5. Meziborové setkání mladých biologů, biochemiků a chemiků, 15.-18.06.2005, Devět skal - Žďárské vrchy; Chemické Listy, 99 (2005) 392-393.

5 SOUHRN

Vysokoúčinná kapalinová chromatografie doznala za dobu své existence velkého rozmachu. Moderní, počítačem řízená a uživatelsky přívětivá chromatografická instrumentace umožňuje provádět denně až několik desítek chromatografických analýz na jednom přístroji. Pomocí HPLC lze analyzovat velmi široké spektrum látek od silně nepolárních po polární a od nízkomolekulárních až po látky s vysokou molekulovou hmotností. Vhodnou volbou chromatografické kolony, mobilní fáze a detekční techniky lze analyzovat i značně komplikované směsi a získat informace jak kvalitativní, tak i kvantitativní. Pro tyto vlastnosti je HPLC široce využívána nejen ve farmaceutické analýze, ale stala se nepostradatelnou metodou např. v biologii, lékařských vědách, kontrole životního prostředí, průmyslových procesech a hodnocení jakosti různých výrobků.

Separční kolona je nejdůležitější součástí chromatografického systému. Dostupnost stabilních, vysokoúčinných chromatografických kolon je nezbytným předpokladem pro vývoj robustní a reprodukovatelné HPLC metody. Většina separací je dnes realizována na reverzních silikagelových stacionárních fázích. Tento fenomén je dán mnoha pozitivními vlastnostmi silikagelu (mechanická odolnost, dobře zvládnutá technologie výroby silikagelových částic, snadná modifikace povrchu, kompatibilita s vodnými mobilními fázemi, atd.). Za hlavní nevýhodou vázaných silikagelových stacionárních fází je možno považovat jejich nedostatečnou chemickou a tepelnou stabilitu. Ačkoliv zavedením nových výrobních postupů je dnes možné získat chemicky i tepelně odolnější silikagelové sorbenty než dříve, je stále potřeba vyvíjet nové odolné HPLC stacionární fáze.

Výzkum mapující možnosti uplatnění jiných než silikagelových stacionárních fází probíhá již řadu let. Pozornost je věnována mimo jiné i kolonám na bázi oxidu zirkoničitého, který se zdá být vhodnou alternativou silikagelu. Sorbenty na bázi ZrO_2 se liší od silikagelových v retenci i selektivitě. Tyto rozdíly, vyplývající z odlišných chemických vlastností obou materiálů, se mohou výrazně uplatnit při separačním procesu. K retenci analytu na zirkoniových stacionárních fázích přispívá současně více druhů interakcí (hydrofobní interakce, iontová výměna, výměna ligand). Jak se na retenci projeví jejich přítomnost, závisí na typu analytu, pH mobilní fáze, typu použitého pufru, jeho iontové síle i organické složce mobilní fáze. Efektivita zirkoniových kolon je výrazně vyšší, než dosahují polymerní stacionární fáze a v současnosti srovnatelná s SiO_2 kolonami. Navíc fáze na bázi ZrO_2 mají na rozdíl od silikagelových kolon značnou chemickou a tepelnou stabilitu.

Na základě velkého množství publikovaných prací a rychle pokračujícího výzkumu a vývoje těchto sorbentů je zřejmé, že zirkoniové stacionární fáze najdou širší uplatnění v analytické praxi. V budoucnu lze očekávat vývoj monolitických stacionárních fází, částic s menší velikostí pórů a větším povrchem, vhodných stacionárních fází pro spojení LC-MS a bezpochyby rozšíření palety chirálních stacionárních fází. Hlavní pozornost je dnes věnována vývoji stacionárních fází

s inaktivovanými skupinami typu Lewisových kyselin, které budou více podobné silikagelovým fázím, ale zachovají si svou stabilitu. Využití těchto kolon je pak možné např. v separaci proteinů a velkých peptidů, pro které zatím není k dispozici vhodná reverzní fáze. Dále je pozornost věnována vývoji amino-, kyano- a diolových fází, které mají být analogické k dostupným silikagelovým fázím.

Chiralita živých organismů se zásadně podepisuje na interakcích s biologicky aktivními látkami. V důsledku toho mohou být pro jednotlivé enantiomery rozdíly v biologické dostupnosti, distribuci, působení na receptory, metabolismu a eliminaci. Tyto rozdíly se mohou projevit jako nežádoucí toxicita, zesílená nebo rozdílná aktivita nebo nejsou pro účinek podstatné. Z tohoto důvodu musí být při studiu xenobiotik jako léčiv, agrochemikálií nebo potravinářských aditiv brán zřetel na prostorové uspořádání molekuly. Během posledních deseti let se zvýšila důležitost chiralit z důvodů vědeckých i ekonomických, přičemž hlavním hybnou silou je farmaceutický průmysl. Separace enantiomerů na chirálních stacionárních fázích pomocí kapalinové chromatografie se staly nezbytným nástrojem v mnoha oblastech moderního výzkumu.

Tato disertační práce se ve svém teoretickém úvodu krátce dotýká současného stavu HPLC instrumentace a hlavní část je věnována problematice stacionárních fází využívaných v současné analytické praxi. První část je zaměřena na vlastnosti široce užívaných silikagelových stacionárních fází a na jejich možné alternativy. Hlavní pozornost je pak věnována stacionárním fázím na bázi oxidu zirkoničitého - jako perspektivní alternativě pro HPLC. Druhá část disertační práce je zaměřena na problematiku chirálních stacionárních fází v HPLC. Disertační práce měla dva dílčí cíle 1) vyzkoušet možnosti využití zirkoniových stacionárních fází v kontrole léčiv a 2) vypracovat vhodnou chirální HPLC metodu pro hodnocení redukčního metabolismu potenciálního antineoplastika. Výsledky experimentální práce jsou shrnuty ve třech pracích publikovaných v zahraničních impaktovaných časopisech.

První dvě práce spolu tématicky souvisí a na dvou příkladech byly úspěšně demonstrovány možnosti využití zirkoniových stacionárních fází pro kontrolně-analytické účely.

- Separace ibuprofenu, jeho tří příbuzných látek a dvou rozkladných produktů byla úspěšně provedena na stacionární fázi modifikované polystyrenem - PS-ZrO₂. Ačkoliv má PS-ZrO₂ daleko menší obsah uhlíku než běžná C18 fáze, bylo dosaženo dostatečné retence a selektivity pro všechny analyty v podstatně kratším čase. Metoda je vhodná pro hodnocení přítomnosti studovaných nečistot v substanci ibuprofenu, pro sledování rozkladného procesu ibuprofenu a také pro jeho stanovení. Množství potřebných organických rozpouštědel během analýzy se podařilo výrazně zredukovat, což

má význam z ekonomického hlediska i z hlediska ochrany životního prostředí.

- V návazující práci byly studovány dvě stacionární fáze na bázi ZrO_2 (PS- ZrO_2 ; ZrCarbonC18) jako možné alternativy k běžně užívané silikagelové C18 fázi ve farmaceutické analýze. Byly pozorovány rozdíly v retenci mezi silikagelovou C18 kolonou a zirkoniovými kolonami. Obě zirkoniové fáze se vzájemně lišily v retenci i selektivitě. Pro hodnocení rozkladného procesu ibuprofenu a parabenů v topickém přípravku byla díky větší hydrofobicitě vhodnější ZrCarbonC18. Popsanou metodu lze také využít pro stanovení obsahu ibuprofenu a parabenů v topické lékové formě za použití butylparabenu jako vnitřního standardu.
- V současné době je připravována do tisku další publikace zabývající se využitím zirkoniových stacionárních fází ve farmaceutické analýze.

Třetí publikace je zaměřena na vývoj chirální separace pro srovnání redukčního metabolismu karbonylové skupiny u potenciálního antineoplastika dimefluronu a jeho strukturního předchůdce benfluronu.

- Na základě testování mnoha druhů chirálních stacionárních fází byly nalezeny vhodné separační podmínky pro hodnocení a porovnání biotransformace obou studovaných látek v mikrosomálních frakcích různých živočišných druhů. Redukované metabolity benfluronu i dimefluronu se podařilo separovat na jednom typu CSP – tris(3,5-dimethylfenylkarbamátu) celulosy, ale za použití rozdílných organických složek mobilní fáze - acetonitril pro redukovaný benfluron a methanol pro redukovaný dimefluron. V biotransformaci obou parentních látek byly pozorovány rozdíly mezidruhové i rozdíly v rámci jednoho živočišného druhu.

6 SUMMARY

High performance liquid chromatography achieved during its existence enormous boom. Modern, PC controlled and user-friendly chromatographic devices allow performing a number of tens analyses on one apparatus daily. There is possible to analyse wide spectrum of compounds from non-polar to polar and from low molecular to high molecular analytes. Appropriate choice of chromatographic column, mobile phase and detection technique makes the analysis of complicated mixtures possible and allow obtaining both qualitative and quantitative information. HPLC is due to these characteristics utilized not only in the field of pharmacy but also in other areas e.g. biology, medicine, industry, environment monitoring and quality control of various products.

Separation column is the most important part of the chromatographic system. The availability of stable, high performance chromatographic phases is the essential requirement for the development of a rugged and reproducible method. Nowadays, most HPLC separations have been done in the reversed-phase mode on the silica-based columns. This phenomenon is due to many positive properties of silica - mechanical strength, well mastered manufacture of silica particles, easy modification of silica surface, compatibility with water rich mobile phases etc. The insufficient chemical and thermal stability is considered to be the Achilles heel of silica-based stationary phases. Although new technologies have enhanced their stability there is still need for more durable columns. Improvements in stationary phase stability have been and remain a significant driving force for the development of new stationary phases.

The research, that explores non-silica-based supports, has been proceeding for some years. It is focused on, among other things, zirconia-based supports that appear to be suitable alternative to silica supports. Zirconia-based phases differ from siliceous materials in retention and also selectivity. These differences, based on distinction in chemical properties of both materials, can substantially influence the separation process. The retention of analytes on zirconia-based stationary phases is influenced by various interactions (reversed-phase, ion-exchange, ligand exchange). Their contribution to the retention depends on the nature of analyte, the mobile phase pH, the type of buffer, its ionic strength and also on the organic component of the mobile phase. The zirconia-based columns offer very high efficiency, which in contrast to polymeric materials is similar to the efficiency of silica. However, zirconia-based phases share the advantage of polymer based supports in that they are vastly superior to silica in terms of their chemical and thermal stability. The rising number of publications and quickly evolving research in this area reflect that the future of zirconia as stationary phases should be rich. The development of monolithic stationary phases, particles which have smaller pores and higher surface areas, the exploration of stationary phases in LC-MS and without doubts extended offer of chiral stationary phases can be expected. The development of coatings that cover

metal oxide surfaces and fully sequester the Lewis acids is the main stream in current research. Such modified zirconia would resemble silica phases more closely without compromising the stability. These phases could be employed in reversed-phase separations of proteins and large peptides for example, because there is not available a zirconia phase useful for these analytes to the date. Additional attention includes development of amino phases, cyano phases and diol phases to emulate the related materials on silica-based bonded phases.

The chiral nature of living systems has implications in biologically active compounds interacting with them. As a consequence, different responses can be often observed for a pair of enantiomers when comparing the chiral drug bioavailability, distribution, and interaction with receptor sites, metabolism and elimination. The differences can manifest themselves as undesirable toxicity, enhanced or different effects or are not significant for activity. Therefore, stereochemistry has to be considered when studying xenobiotics, such as drugs, agrochemicals or food additives. During the last decade chirality has attached increased attention due to scientific and economic reasons, especially in pharmaceutical industry. The liquid chromatographic separation of enantiomers using chiral stationary phases (CSP) has become an indispensable tool in many areas of modern research.

This dissertation touches briefly the current state of HPLC equipment in the beginning of the theoretical introduction and the main part is devoted to the stationary phases that have been used recently. The first chapters are focused on properties of widely used silica-based stationary phases and feasible alternatives. The essential attention is devoted to zirconia-based stationary phases for HPLC. The second part of theoretical introduction deals with HPLC chiral stationary phases. The dissertation had two partial aims 1) to test utilization of zirconia-based stationary phases in drug control and 2) to elaborate a chiral HPLC method enabling analysis of reduced metabolite of the potential antineoplastic agent. The experimental results are summarised in three papers published in the international impacted journals.

The first two papers interrelate and demonstrate the feasibility of using zirconia-based stationary phase on two examples in drug control.

- The zirconia-based stationary phase coated with polystyrene was successfully used for a HPLC separation of ibuprofen from three related compounds and its two decomposition products. Even though the carbon content of PS-ZrO₂ is much lower than that of conventional C18 phase, analytes exhibit sufficient retention and selectivity, but with substantially improved analysis time. The method is applicable for evaluation of studied impurities of ibuprofen in the raw material, for the monitoring of the degradation processes and for the assay of ibuprofen as well. The organic solvent consumption during analysis

has been reduced remarkably, which is not negligible from an economic as well as an environmental viewpoint.

- Two types of zirconia-based stationary phases (PS-ZrO₂; ZrCarbonC18) were tested as a possible alternative to commonly used silica C18 reversed phase in the pharmaceutical analysis. Considerable differences were observed in retention on zirconia stationary phases and on C18 silica stationary phase. The tested zirconia columns differ from each other in selectivity and retention as well. The ZrCarbonC18 column was more appropriate for simultaneous analysis of ibuprofen, parabens and their decomposition product in topical pharmaceuticals due to its higher hydrophobicity. The method can serve also for quantification of the active substance ibuprofen and parabens, using butylparaben as an internal standard.
- Currently, the next paper dealing with the applicability of zirconia-based stationary phases in the pharmaceutical analysis is being prepared.

The goal of the third paper was to develop a chiral HPLC method enabling comparison of carbonyl reduction metabolism of the potential antineoplastic agent dimefluron and its forerunner benfluron.

- Many types of chiral stationary phases were tested for evaluation of biotransformation of both substances in the microsomal fractions of liver homogenates prepared from various species. The best separation of both reduced metabolites were achieved finally on one type of chiral selector - cellulose tris(3,5-dimethylphenylcarbamate) but the mobile phases differ from each other in the organic modifier. Acetonitrile was used for enantio-separation of reduced benfluron and methanol was used for enantio-separation of reduced dimefluron. The intra- and interspecies differences in the biotransformation of both compounds were observed.

7 POUŽITÁ LITERATURA

- [1] J. Churáček a kol., *Nové trendy v teorii a instrumentaci vybraných analytických metod*. Academica, Praha 1993.
- [2] L. R. Snyder, J. J. Kirkland, J. L. Glajch, *Practical HPLC Method Development*, 2nd edition, Wiley-Interscience, 1997.
- [3] J. Klimeš a kol., *Kontrola léčiv I.*, Karolinum, Praha 2002.
- [4] W. A. Korfmacher, *Drug Discov. Today* 10 (2005) 1357-1367.
- [5] K. Albert, *J. Chromatogr. A*, 856 (1999) 199–211.
- [6] J. L. Wolfender, K. Ndjoko, K. Hostettmann, *J. Chromatogr. A* 1000 (2003) 437–455.
- [7] *Český lékopis 2005*, Grada Publishing, a.s., Praha 2005.
- [8] *The European Pharmacopoeia*, 5th. ed., Council of Europe, Directorate for the Quality of Medicines, Strasbourg, 2004.
- [9] *The United States Pharmacopoeia XXVIII*, The United States Pharmacopoeial Convention, Rockville, MD, USA, 2005.
- [10] N. M. Maier, P. Franco, W. Lindner, *J. Chromatogr. A* 906 (2001) 3–33.
- [11] M. Kuchař, *Chirální technologie v syntéze a analýze léčiv*, 2. Odborná konference VÚFB, Praha, 13.-14.11.2002, str. 7-13.
- [12] P. C. Sadek, *Troubleshooting HPLC systems*, John Willey & Sons. Inc., New York 2000.
- [13] *Basics of LC/MS*, Agilent Technologies, 2001
- [14] M. Holčapek, L. Kolářová (Eds.), *Sborník přednášek, 3. ročník Školy HPLC/MS*, Doubice, 29.8.-02.09.2005
- [15] M. Holčapek, *3. ročník Školy HPLC/MS*, Doubice, 29.8.-02.09.2005 [online] (2005) [cit. 2005-10-31]. Dostupné z: <<http://user.upce.cz/~holcapek/conferences.htm>>.
- [16] K. Hostettmann, *The importance of hyphanated techniques in the discovery of new compounds from nature*, 15th International Symposium on Pharmaceutical and Biomedical Analysis, Florencie, Itálie, 02.05.-06.05.2004.
- [17] A. Szilágyi, *Electromagnetic waves and circular dichroism: an animated tutorial* [online] (2005) [cit. 2005-11-03]. Dostupné z: <<http://www.enzim.hu/~szia/cddemo/edemo0.htm>>.
- [18] N. J. Greenfield, *Circular Dichroism* [online] (2004) [cit. 2005-11-03]. Dostupné z: <<http://www2.umdj.edu/cdrwjweb/handout.pdf>>.
- [19] *Cyberlipid Center, Light-Scattering Detector* [online] (2002) [cit. 2005-11-03]. Dostupné z: <<http://www.cyberlipid.org/elsd/elsd0001.htm>>.
- [20] R. P. W. Scott, *Library 4 Science* [online] (2005) [cit. 2005 -11-03]. Dostupné z: <<http://www.chromatography-online.org/HPLC-Detectors/Liquid-Light-Scattering/rs76.html>>.
- [21] J. Nawrocki, *J. Chromatogr. A* 779 (1997) 29-71.
- [22] J. Nawrocki, C. Dunlap, A. McCormick, P. W. Carr, *J. Chromatogr. A* 1028 (2004) 1–30.
- [23] N. B. Afeyan, N. F. Gordon, I. Mazsaroff, L. Verady, S. P. Fulton, Y. B. Yang, F. E. Regnier, *J. Chromatogr.* 519 (1990) 1-29.
- [24] J. Nawrocki, M. P. Rigney, A. McCormick, P. W. Carr, *J. Chromatogr. A* 657 (1993) 229–282.
- [25] J. Winkler, S. Marmé, *J. Chromatogr. A* 888 (2000) 51– 62.
- [26] J. J. Pesek, M. T. Matyska, *J. Chromatogr. A* 952 (2002) 1–11.
- [27] G. B. Cox, *J. Chromatogr. A* 656 (1993) 353-367.
- [28] J. Köhler, J. J. Kirkland, *J. Chromatogr.* 385 (1987) 125 -150.

- [29] J. Köhler, D. B. Chase, R. D. Farlee, A. J. Vega, J. J. Kirkland, *J. Chromatogr.* 352 (1986) 275-305.
- [30] G. B. Cox, R. W. Stout, *J. Chromatogr.* 384 (1987) 315-336.
- [31] J. Nawrocki, B. Buszewski, *J. Chromatogr.* 449 (1989) 1-24.
- [32] M. R. Buchmeiser, *J. Chromatogr. A* 918 (2001) 233-266.
- [33] D. V. McCalley, *J. Chromatogr. A* 902 (2000) 311-321.
- [34] J. J. Kirkland, M. A. van Straten, H. A. Claessens, *J. Chromatogr. A* 691 (1995) 3-19.
- [35] H. A. Claessens, M. A. van Straten, J. J. Kirkland, *J. Chromatogr. A* 728 (1996) 259-270.
- [36] R. W. Stout, J. J. DeStefano, *J. Chromatogr.* 326 (1985) 63-78.
- [37] J. E. Sandoval, J. J. Pesek, *Anal. Chem.* 63 (1991) 2634-2641.
- [38] J. J. Pesek, M. T. Matyska, G. Brent Dawson, A. Wilsdorf, P. Marc, M. Padki, *J. Chromatogr. A* 986 (2003) 253-262.
- [39] J. J. Pesek, M. T. Matyska, X. Pan, *J. Chromatogr. A* 992 (2003) 57-65.
- [40] MicroSolv, TYPE-C™ Silica Based HPLC References in the Literature [online] (2005) [cit. 2005-11-15]. Dostupné z: <http://www.microsolvttech.com/typec_bib.asp>.
- [41] MicroSolv, TYPE-C™ Silica Based HPLC Columns [online] (2005) [cit. 2005-11-15]. Dostupné z: <http://www.microsolvttech.com/hplc/app_typec.asp>.
- [42] R. W. P. Fairbank, Y. Xiang, M. J. Wirth, *Anal. Chem.* 67 (1995) 3879-3885.
- [43] M. J. Wirth, R. W. P. Fairbank, H. O. Fatunmbi, *Science* 275 (1997) 44-47.
- [44] R. W. P. Fairbank, M. J. Wirth, *J. Chromatogr. A* 830 (1999) 285-291.
- [45] M. J. Wirth, H. O. Fatunmbi, *Anal. Chem.* 65 (1993) 822-826.
- [46] M. J. Wirth, R. W. P. Fairbank, *J. Liq. Chromatogr. Rel. Technol.* 19 (1996) 2799-2810.
- [47] J. J. Kirkland, J. L. Glajch, R. D. Farlee, *Anal. Chem.* 61 (1989) 2-11.
- [48] J. J. Kirkland, J. B. Adams, M. A. van Straten, H. A. Claessens, *Anal. Chem.* 70 (1998) 4344-4352.
- [49] F. Gritti, G. Guiochon, *Anal. Chem.* 75 (2003) 5726-5738.
- [50] J. L. Glajch, J. J. Kirkland, US Patent 4,705,725 (1987).
- [51] J. L. Glajch, J. J. Kirkland, US Patent 4,847,159 (1989).
- [52] A. B. Scholten, H. A. Claessens, J. W. de Haan, C. A. Cramers, *J. Chromatogr. A* 759 (1997) 37-46.
- [53] J. J. Kirkland, J. W. Henderson, *J. Chromatogr. Sci.* 32 (1994) 473-480.
- [54] J. J. Kirkland, *J. Chromatogr. Sci.* 34 (1996) 309-313.
- [55] B. Trammell, L. Ma, H. Luo, D. Jin, M. A. Hillmayer, P. W. Carr, *Anal. Chem.* 74 (2002) 4634-4639.
- [56] J. J. Kirkland, J. W. Henderson, J. J. DeStefano, M. A. van Straten, H. A. Claessens, *J. Chromatogr. A* 762 (1997) 97-112.
- [57] J. J. Kirkland, M. A. van Straten, H. A. Claessens, *J. Chromatogr. A* 797 (1998) 111-120.
- [58] Y. F. Cheng, T. H. Walter, Z. Lu, P. Iraneta, C. Gendreau, U. D. Neue, J. M. Grassi, J. L. Carmody, J. E. O'Gara, R. P. Fisk, *LC-GC* 18 (2000) 1162-1172.
- [59] J. Li, F. F. Cantwell, *J. Chromatogr. A* 726 (1996) 37-44.
- [60] B. Ells, Y. Wang, F. F. Cantwell, *J. Chromatogr. A* 835 (1999) 3-18.
- [61] H. Zou, X. Huang, M. Ye, Q. Luo, *J. Chromatogr. A* 954 (2002) 5-32.
- [62] E. Forgács, T. Cserhádi, *Trac-Trends Anal. Chem.* 14 (1995) 23-29.
- [63] J. Nawrocki, C. Dunlap, J. Li, J. Zhao, C. V. McNeff, A. McCormick, P. W. Carr, *J. Chromatogr. A* 1028 (2004) 31-62.

- [64] ZirChrom, [online] (2005) [cit. 2005-11-15]. Dostupné z: <<http://www.zirchrom.com>>.
- [65] Y. Akama, H. Kanno, *Anal. Chim. Acta* 309 (1995) 153-156.
- [66] Y. Akama, *Talanta* 42 (1995) 1943-1946.
- [67] Z. T. Jiang, Y. M. Zuo, *Anal. Chem.* 73 (2001) 686-688.
- [68] M. Grün, A. A. Kurganov, S. Schacht, F. Schüth, K. K. Unger, *J.Chromatogr. A* 740 (1996) 1-9.
- [69] J. D. Thompson, J. S. Brown, P. W. Carr, *Anal. Chem.* 73 (2001) 3340-3347.
- [70] J. D. Thompson, P. W. Carr, *Anal. Chem.* 74 (2002) 1017-1023.
- [71] J. D. Thompson, P. W. Carr, *Anal. Chem.* 74 (2002) 4150-4159.
- [72] S. M. Fields, C. Q. Ye, D. D. Zhang, B. R. Branch, X. J. Zhang, N. Okafo, *J. Chromatogr. A* 913 (2001) 197-204.
- [73] L. R. Snyder, *J. Chromatogr. B* 689 (1997) 105-115.
- [74] M. Kawahara, H Nakamura, T. Najimata, *J. Chromatogr.* 515 (1990) 149-158.
- [75] M. P. Rigney, E. F. Fukenbusch, P. W. Carr, *J. Chromatogr.* 499 (1990) 291-304.
- [76] Y. Hu, X. Yang, P. W. Carr, *J. Chromatogr. A* 968 (2002) 17-29.
- [77] X. Yang, J. Dai, P. W. Carr, *J. Chromatogr. A* 996 (2003) 13-31.
- [78] J. Dai, X. Yang, P. W. Carr, *J. Chromatogr. A* 1005 (2003) 63-82.
- [79] J. A. Blackwell, P. W. Carr, *J. Chromatogr.* 549 (1991) 43-57.
- [80] J. A. Blackwell, P. W. Carr, *Anal. Chem.* 64 (1992) 863-872.
- [81] J. A. Blackwell, P. W. Carr, *Anal. Chem.* 64 (1992) 853-862.
- [82] A. Yucchi, Y. Mizuno, T. Yonemoto, *Anal. Chem.* 72 (2000) 3642-3645.
- [83] J. A. Blackwell, P. W. Carr, *J. Chromatogr.* 549 (1991) 59-75.
- [84] J. A. Blackwell, P. W. Carr, *J. Chromatogr.* 596 (1992) 27-41.
- [85] Y. Mao, P. W. Carr, *Anal. Chem.* 73 (2001), 4478-4485.
- [86] Method Development Guidelines, Bulletin Supelco 932, Sigma-Aldrich, 2002.
- [87] W. A. Schafer, P. W. Carr, E. F. Funkenbush, K. A. Parson, *J.Chromatogr.* 587 (1991) 137-147.
- [88] W. A. Schafer, P. W. Carr, *J. Chromatogr.* 587 (1991) 149-160.
- [89] A. Mullick, C. M. Grffith, M. C. Flickinger, *Biotechnol. Bioeng.* 60 (1998) 333-340.
- [90] A. M. Clausen, A. Subramanian, P. W. Carr, *J. Chromatogr. A* 831 (1999) 63-72.
- [91] A. M. Clausen, P. W. Carr, *Anal. Chem.* 70 (1998) 378-385.
- [92] A. Subramanian, P. W. Carr, C. V. McNeff, *J. Chromatogr. A* 890 (2000) 15-23.
- [93] J. Zhao, P. W. Carr, *Anal. Chem.* 71 (1999) 5217-5224.
- [94] J. Li, D. H. Reeder, A. V. McCormick, P. W. Carr, *J.Chromatogr. A* 791 (1997) 45-52.
- [95] High pH and High Temperature HPLC, Bulletin Supelco 931, Sigma-Aldrich, 2002.
- [96] M. P. Rigney, T. P. Weber, P. W. Carr, *J. Chromatogr.* 484 (1989) 273-291.
- [97] J. Li, P. W. Carr, *Anal. Chem.* 69 (1997) 837-843.
- [98] J. Li, Y. Hu, P. W. Carr, *Anal. Chem.* 69 (1997) 3884-3888.
- [99] J. Li, P. W. Carr, *Anal. Chem.* 69 (1997) 2202-2206.
- [100] A. Kurganov, V. Davankov, T. Isajeva, K. Unger, F. Eisenbeiss, *J.Chromatogr. A* 660 (1994) 97-111.
- [101] J. W. Li, P. W. Carr, *Anal. Chem.* 69 (1997) 2193-2201.
- [102] J. Li, P. W. Carr, *Anal. Chim. Acta* 334 (1996) 239-250.
- [103] J. Li, P. W. Carr, *Anal. Chem.* 68 (1996) 2857-2868.
- [104] X. Yang, J. Dai, P. W. Carr, *Anal. Chem.* 75 (2003) 3153-3160.

- [105] J. Zhao, P. W. Carr, *Anal. Chem.* 70 (1998) 3619-3628.
- [106] J. Zhao, P. W. Carr, *Anal. Chem.* 71 (1999) 5217-5224.
- [107] J. Zhao, P. W. Carr, *Anal. Chem.* 72 (2000) 302-309.
- [108] C. McNeff, Q. H. Zhao, P. W. Carr, *J. Chromatogr. A* 684 (1994) 201-211.
- [109] C. McNeff, P. W. Carr, *Anal. Chem.* 67 (1995) 2350-2353.
- [110] C. McNeff, P. W. Carr, *Anal. Chem.* 67 (1995) 3886-3892.
- [111] C. McNeff, Q. Zhao, E. Almlof, M. Flickinger, P. W. Carr, *Anal. Biochem.* 274 (1999) 181-187.
- [112] T. P. Weber, P. T. Jackson, P. W. Carr, *Anal. Chem.* 67 (1995) 3042-3050.
- [113] T. P. Weber, P. W. Carr, *Anal. Chem.* 62 (1990) 2620-2625.
- [114] P. T. Jackson, T. Y. Kim, P. W. Carr, *Anal. Chem.* 69 (1997) 5011-5017.
- [115] P. T. Jackson, M. R. Schure, T. P. Weber, P. W. Carr, *Anal. Chem.* 69 (1997) 416-425.
- [116] M. H. Chen, C. Horváth, *J. Chromatogr. A* 788 (1997) 51-61.
- [117] R. M. Smith, R. J. Burges, *J. Chromatogr. A* 785 (1997) 49-55.
- [118] Y. Yang, A. D. Jones, C. D. Eaton, *Anal. Chem.* 71 (1999) 3808-3813.
- [119] S. J. Marin, B. A. Jones, W. D. Felix, J. Clark, *J. Chromatogr. A* 1030 (2004) 255-262.
- [120] Y. Mao, P. W. Carr, *Anal. Chem.* 72 (2000) 110-118.
- [121] Y. Mao, P. W. Carr, *Anal. Chem.* 72 (2000) 2788-2796.
- [122] Y. Mao, P. W. Carr, *Anal. Chem.* 73 (2001) 1821-1830.
- [123] C. B. Castells, P. W. Carr, *Anal. Chem.* 71 (1999) 3013-3021.
- [124] C. B. Castells, P. W. Carr, *J. Chromatogr. A* 904 (2000) 17-33.
- [125] C. B. Castells, P. W. Carr, *Chromatographia*, 52 (2000) 535-542.
- [126] J. H. Park, J. K. Ryu, J. K. Park, C. V. McNeff, P. W. Carr, *Chromatographia*, 53 (2001) 405-408.
- [127] S. Y. Park, J. K. Park, J. H. Park, C. V. McNeff, P. W. Carr, *Microcol. J.* 70 (2001) 179-185.
- [128] H. Y. Aboul-Enein, I. Ali, *Farmaco* 57 (2002) 513-529.
- [129] G. Gübitz, M. G. Schmid, *Biopharm. Drug Dispos.* 22 (2001) 291-336.
- [130] G. Subramanian (ed.), *Chiral Separation Techniques – a Practical Approach*, 2nd edition, Wiley-VCH, 2001.
- [131] International Conference on Harmonisation, Q6A, CPMP/ICH/367/96, listopad 1999.
- [132] R. Vespalec, *Chirální technologie v syntéze a analýze léčiv*, 2. Odborná konference VÚFB, Praha, 13.11.-14.11.2002, str. 14-17.
- [133] J. Haginaka, *J. Chromatogr. A* 906 (2001) 253-273.
- [134] S. R. Narayanan, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 10 (1992) 251-262.
- [135] T. C. Pinkerton, W. J. Howe, E. L. Ulrich, J. P. Comiskey, *Anal. Chem.* 67 (1995) 2354-2367.
- [136] M. C. Millot, *J. Chromatogr. B* 797 (2003) 131-159.
- [137] *Users's Guide*, Application Note 13, ChromTech AB, Hägersten, 1994.
- [138] E. Domenici, C. Bertucci, P. Salvadori, G. F. I. Cahagne, S. Montellier, I. W. Wainer, *Chromatographia* 29 (1990) 170.
- [139] K. M. Kirkland, K. L. Neilson, D. A. McCombs, *J. Chromatogr.* 545 (1991) 43-58.
- [140] K. M. Kirkland, D. A. McCombs, *J. Chromatogr. A* 666 (1994) 211-219.
- [141] H. Y. Aboul-Enein, *J. Chromatogr. A* 906 (2001) 185-193.
- [142] E. Yashima, *J. Chromatogr. A* 906 (2001) 105-125.

- [143] Chiral Technologies Europe [online] (2005) [cit. 2005-11-30]. Dostupné z: <<http://www.chiral.fr/catalog/start.htm>>.
- [144] P. Franco, A. Senso, L. Oliveros, C. Minguillón, J. Chromatogr. A 906 (2001) 155–170.
- [145] T. Zhang, Ch. Kientzy, P. Franco, A. Ohnishi, Y. Kagamihara, H. Kurosawa, J. Chromatogr. A, 1075 (2005) 65-75.
- [146] Application Guide for Chiral column Selection, 2nd ed., Daicel Chemical Industries, 1994.
- [147] Y. Okamoto, Y. Kaida, J. Chromatogr. A 666 (1994) 403-419.
- [148] K. M. Kirkland, J. Chromatogr. A 718 (1995) 9-26.
- [149] M. Kazusaki, H. Kawabata, H. Matsukura, J. Liq. Chromatogr. Rel. Technol. 23 (2000) 2937–2946.
- [150] W. H. Pirkle, D. W. House, J. Org. Chem. 44 (1979) 1957-1960.
- [151] C. J. Welch, T. Szczerba, S. R. Perrin, J. Chromatogr. A 758 (1997) 93–98.
- [152] C. J. Welch, J. Chromatogr. A 666 (1994) 3–26.
- [153] F. Bressolle, M. Audran, T. N. Pham, J. J. Vallon, J. Chromatogr. B 687 (1996) 303-336.
- [154] J. Snopek, I. Jelínek, E. Smolková-Keulemansová, J. Chromatogr. 452 (1988) 571-590.
- [155] D. N. Heiger, High Performance Capillary Electrophoresis, Hewlett-Packard Company, 1992.
- [156] Cyclobond Handbook, Astec, Whippany, New Jersey, 1992.
- [157] S. C. Chang, G. L. Reid III, S. Chen, C. D. Chang, D. W. Armstrong, Trac-Trends Anal. Chem. 12 (1993) 144-153.
- [158] T. J. Ward, T. M. Oswald, J. Chromatogr. A 792 (1997) 309-325.
- [159] T. J. Ward, A. B. Farris III, J. Chromatogr. A 906 (2001) 73–89.
- [160] J. Lokajová, E. Tesařová, D. W. Armstrong, J. Chromatogr. A 1088 (2005) 57–66.
- [161] D. W. Armstrong, Y. B. Tang, S. S. Chen, Y. W. Zhou, C. Bagwill, J. R. Chen, Anal. Chem. 66 (1994) 1473–1484.
- [162] D. W. Armstrong, Y. Liu, K. H. Ekborg-Ott, Chirality 7 (1995) 474–497.
- [163] K. H. Ekborg-Ott, Y. Liu, D. W. Armstrong, Chirality 10 (1998) 434–483.
- [164] K. H. Ekborg-Ott, G. A. Zientara, J. M. Schneiderheinze, K. Gahm, D. W. Armstrong, Electrophoresis 20 (1999) 2438–2457.
- [165] A. Peter, G. Torok, D. W. Armstrong, J. Chromatogr. A 793 (1998) 283–296.
- [166] T. Shinbo, T. Yamaguchi, M. Sugiura, K. Nishimura, J. Chromatogr. 405 (1987) 145–153.
- [167] T. Nakano, J. Chromatogr. A 906 (2001) 205–225.
- [168] A. P. Foucault, J. Chromatogr. A 906 (2001) 365–378.
- [169] SUKL Praha: Mikroverze AISPL 2006.1 pro MS Windows.
- [170] B. G. Katzung, Základní a klinická farmakologie. H&H, Praha 1994.
- [171] A. I. Gasco-Lopez, R. Izquirdo-Hornilos, A. Jimenez, J. Pharm. Biomed. Anal. 21 (1999) 143–149.
- [172] G. Caviglioli, V. Posocco, V. Parodi, S. Cafaggi, A. Alzati, G. Bignardi, J. Pharm. Biomed. Anal. 30 (2002) 499–509.
- [173] J. D. Higgins, T. P. Gilmore, S. A. Martellucci, R. D. Bruce, Analytical Profiles of Drug Substances and Excipients, vol. 27, Academic Press, New York, 2001.
- [174] A. Kleeman, J. Engel, B. Kutcher, D. Reichert, Pharmaceutical Substances, Synthesis Patent Applications, 4th ed., Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 2000.

- [175] M. Chalabala et al., Technologie léků, Galén, Praha 1997.
- [176] R. Kučera., J. Sochor, J. Klimeš, Hodnocení ibuprofenu a 4-isobutylacetophenonu v topických přípravcích pomocí RP-HPLC. 32. konference “Syntéza a analýza léčiv”, Velké Karlovice, ČR, 16.-19.9.2003, Sborník konference str.61, ISBN 80-900306-5-3.
- [177] L. Skálová, M. Nobilis, B. Szotáková, V. Wsól, E. Kvasničková, Drug Metabol. Drug Interact. 14 (1998) 221–234.
- [178] L. Skálová, M. Nobilis, B. Szotáková, V. Wsól, E. Kvasničková, Drug Metabol. Drug Interact. 14 (1998) 235–250.
- [179] L. Skálová, M. Nobilis, B. Szotáková, E. Kondrová, M. Šavlík, V. Wsól, L.P. Garcia, E. Maser, Biochem. Pharmacol. 64 (2002) 297–305.