

Disertační práce Souhrn Vysokoučinná 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.

Separací kolona je nejdůležitější součástí chromatografického systému. Dostupnost stabilních, vysokoučinných 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 zachovávají 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 analýze 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.