

# UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra analytické chemie

Separace enantiomerů *cis*-ittrakonazolu pomocí HPLC s využitím  
polysacharidových stacionárních fází

## RIGORÓZNÍ PRÁCE

Autor práce: Mgr. Ondřej Kurka

Studijní obor: Analytická chemie

Vedoucí práce: doc. RNDr. Petr Bednář, Ph.D.

Datum odevzdání práce: 31. 8. 2015

## Shrnutí:

Předložená práce se zabývá chirální separací antifungálního léčiva *cis*-itraconazolu pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie s důrazem na možnosti semipreparativní purifikace všech stereoizomerů. Teoretická část se věnuje problematice antifungálních léčiv azolového typu, separacím na chirálních polysacharidových fázích a separaci itraconazolu. Náplní experimentální části práce je nalezení optimálních podmínek pro separaci čtyř stereoizomerů *cis*-itraconazolu v mobilních fázích tvořených směsí čistých rozpouštědel bez přídavku aditiv. *Cis*-itraconazol je možno v semipreparativním módu separovat ve dvou krocích použitím tris (3,5-dimethylfenylkarbamátu) celulózy a tris (4-methylbenzoátu) celulózy jako stacionárních fází.

Klíčová slova: itraconazol, antifungální léčiva, HPLC, enantiomery, stereoizomery, polysacharidové fáze, celulóza

## Summary:

Presented thesis deals with chiral separation of an antifungal drug - itraconazole - using high performance liquid chromatography with emphasis on possibilities of semipreparative purification of particular stereoisomers. Theoretical part discusses azole antifungal drugs, separations using chiral polysaccharide stationary phases and separations of itraconazole. Experimental part is devoted to finding the optimal conditions for separation of four *cis*-itraconazole stereoisomers using mobile phases comprising only pure solvents with no additives. Itraconazole can be separated in semipreparative mode in two steps using cellulose tris (3,5-dimethylphenylcarbamate) and cellulose tris (4-methylbenzoate) stationary phases.

Keywords: itraconazole, antifungal drugs, HPLC, enantiomers, stereoisomers, polysaccharide phases, cellulose

Prohlašuji, že jsem tuto práci vypracoval samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využil, jsou v seznamu použité literatury.

Souhlasím s tím, že práce je prezenčně zpřístupněna v knihovně Katedry analytické chemie Přírodovědecké Fakulty Univerzity Palackého v Olomouci.

V Olomouci dne .....

.....

Ondřej Kurka

Chtěl bych poděkovat doc. RNDr. Petru Bednářovi Ph.D. za cenné rady, rodině a přátelům za podporu a všem zaměstnancům a studentům katedry analytické chemie PŘF UP za ochotu a vstřícnost.

# Obsah

<b>1. Úvod.....</b>	<b>1</b>
<b>2. Teoretická část.....</b>	<b>2</b>
2.1 <i>Antimykotická léčiva</i> .....	2
2.1.1 Azolová antimykotika .....	2
2.1.1.1 Imidazoly.....	3
2.1.1.2 Triazoly .....	4
2.2 <i>Chirální separace na polysacharidových fázích</i> .....	9
2.2.1 Chirální separace .....	9
2.2.2 Polysacharidové fáze.....	10
2.2.3 Celulózové fáze .....	13
2.2.4 Amylózové fáze .....	14
2.2.5 Využití polysacharidových fází v enantioseparaci antifungálních azolů.....	15
2.3 <i>Separace itrakonazolu</i> .....	16
2.3.1 Vysokoučinná kapalinová chromatografie (HPLC) .....	16
2.3.2 Superkritická fluidní chromatografie (SFC).....	19
2.3.3 Kapilární elektroforéza.....	20
2.3.4 Detekční metody pro stanovení absolutní konfigurace stereoizomerů itrakonazolu .....	21
<b>3. Experimentální část .....</b>	<b>22</b>
3.1 <i>Chemikálie</i> .....	22
3.2 <i>Podmínky analýz</i> .....	22
3.2.1 Chromatografické analýzy .....	22
3.2.2 Stabilitní studie izolovaných stereoizomerů itrakonazolu .....	25
3.3 <i>Instrumentace:</i> .....	25
<b>4. Diskuze a výsledky: .....</b>	<b>26</b>
4.1 <i>Přístup k semipreparativní izolaci stereoizomerů itrakonazolu</i> .....	26
4.2 <i>Analytická separace racemátu itrakonazolu na koloně Lux Cellulose-1</i> .....	27
4.3 <i>Analytická separace racemátu itrakonazolu na koloně Lux Cellulose-3</i> .....	32
4.4 <i>Semipreparativní izolace racemátu itrakonazolu na koloně Lux Cellulose-1</i> .....	34
4.5 <i>Optimalizace separace směsi (+)-2R,4S,2'R a (+)-2R,4S,2'S diastereomerů itrakonazolu na koloně Lux Cellulose-3</i> .....	36
4.6 <i>Vývoj metody pro presepaci Frakce 1 na koloně Cellulose-1</i> .....	38
4.7 <i>Určení chirální čistoty a stability a optické otáčivosti izolovaných stereoizomerů</i> .....	40
4.8 <i>Identifikace stereoizomerů itrakonazolu</i> .....	41
<b>5. Závěr: .....</b>	<b>44</b>
<b>6. Literatura: .....</b>	<b>45</b>
<b>7. Použité zkratky: .....</b>	<b>52</b>

# 1. Úvod

Itrakonazol je širokospektrální triazolové antimykotikum, které blokuje syntézu ergosterolu, hlavní složky buněčné membrány hub. Jedná se o chirální sloučeninu a z farmakologického hlediska je užitečné zjistit mimo jiné aktivitu a toxicitu jednotlivých stereoizomerů. Separace racemátu *cis*-itrakonazolu na jednotlivé stereoizomery pomocí HPLC zatím nebyla v literatuře popsána, rozhodli jsme se proto nalézt optimální podmínky pro chirální semipreparativní analýzu této sloučeniny za účelem zisku čistých stereoizomerů v řádu jednotek miligramů, na kterých může být dále testována jejich biologická aktivita. Pro tento účel je potřebné zajistit, aby izolované stereoizomery neobsahovaly stopy aditiv běžných v kapalinové chromatografii, které by mohly měnit chování studovaných biologických systémů (např. buněčných kultur). Snahou proto byla optimalizace separace s využitím směsí rozpouštědel bez přídavku aditiv. Optimalizovaná metoda využívá izokratickou eluci, což umožňuje recyklaci mobilní fáze (s pozitivním dopadem na ekologii i ekonomiku provozu) i použití velmi jednoduchých chromatografických přístrojů.

## 2. Teoretická část

### 2.1 Antimykotická léčiva

Antimykotická léčiva jsou léky nasazovanými při onemocněních způsobených houbami a plísněmi. Zvýšenému riziku těchto onemocnění jsou vystaveni zejména pacienti s imunitními onemocněními (např. AIDS), nebo pacienti podstupující imunosupresivní léčbu po transplantacích orgánů. Nejčastějšími původci onemocnění jsou rody *Candida* a *Aspergillus*<sup>[1]</sup>. Novými rody, které vykazují nižší citlivost na dosud používaná léčiva, jsou pak např. rody *Fusarium* a *Scedosporium*<sup>[2]</sup>. Podle místa účinku se antimykotika dělí na systémová (účinkují v celém těle) a lokální (účinkují v místě onemocnění), podle chemické struktury pak na polyenová antimykotika, antimetabolity, azolová antimykotika, echinokandiny a ostatní antimykotika<sup>[1]</sup>. Výborným shrnutím účinků jednotlivých léčiv na různé druhy hub a plísní je review Espinel-Ingroffa<sup>[3]</sup>.

#### 2.1.1 Azolová antimykotika

Azoly jsou největší skupinou momentálně používaných antimykotik. Jedná se o čistě syntetické látky<sup>[4]</sup>. Jejich účinek spočívá v přerušení metabolické dráhy syntézy ergosterolu. Houby poté musí pro stavbu buněčné membrány využívat jiné steroly, což mění její vlastnosti (např. propustnost). Azoly interagují s cytochromy P450 - vážou se svým imidazolovým, popř. triazolovým kruhem na atom železa obsažený ve struktuře enzymu. Inhibují C14 demethylaci v procesu syntézy ergosterolu<sup>[2,5]</sup>. Jejich interakce se savčím cytochromem P450 může způsobit vedlejší účinky, mimo jiné v oblasti produkce hormonů (testosteron, glukokortikoidy)<sup>[4]</sup>.

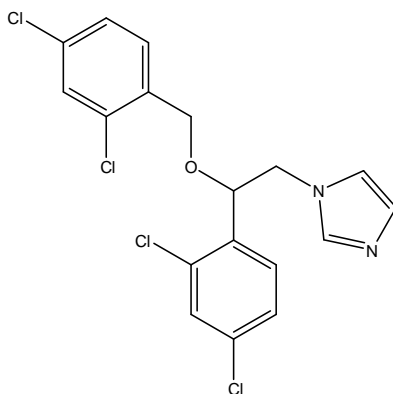
Biologická aktivita antifungálních azolů je způsobena jejich interakcí s cytochromem P450, jak již bylo zmíněno výše. Azolové inhibiči vybraných enzymů cytochromu P450 se věnovala studie Monostory a kol. Z ní vyplynulo, že ze zkoumaných léčiv je selektivním inhibitorem pouze ketokonazol a to vůči enzymu CYP3A4. Clotrimazol je selektivním inhibitorem stejného enzymu jen při nižších koncentracích, ve vyšších koncentracích ztrácí selektivitu - inhibuje i další sledované enzymy (CYP2A6 a CYP2C9, ne ale CYP2E1). Mikonazol, ekonazol a gifonazol inhibují CYP3A4, CYP2C9 a CYP2C19, u CYP2E1 pak všechny vykazují malou inhibiční aktivitu<sup>[6]</sup>.

V oblasti výzkumu se kromě běžných imidazolů a triazolů setkáváme také s různě substituovanými pyrazolovými deriváty, které vykazují antifungální aktivitu proti různým druhům plísní, zatím se však nejedná o schválená léčiva<sup>[7]</sup>. Podobně se v této souvislosti objevují i sloučeniny na bázi 1,2,4-triazol-3-thionů, z nichž některé jsou účinnější než zavedené léky, se kterými byly porovnávány. Většina látek účinkuje (nebo byla testována) proti omezenému spektru patogenů<sup>[8]</sup>. Citovaná práce v konkrétních případech také diskutuje strukturální motivy, které mohou být zodpovědné za antifungální aktivitu jednotlivých látek.

### 2.1.1.1 Imidazoly

Historicky staršími léky z této skupiny látek jsou imidazoly. Přehled těchto léčiv, z nichž většina byla v současnosti nahrazena modernějšími triazolovými léky, přináší studie R. Holta<sup>[9]</sup>.

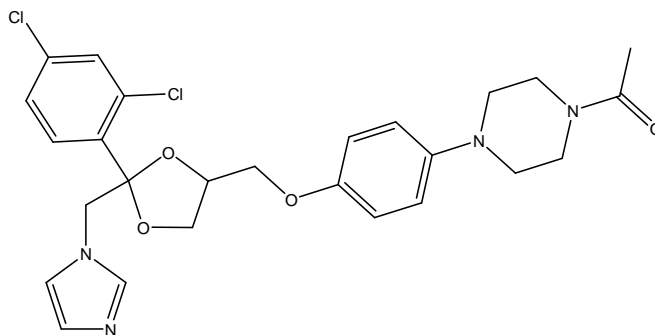
**Mikonazol** (obrázek 1) je širokospektrální imidazolové antimykotikum. Má vysokou účinnost např. u vaginálních mykóz<sup>[9]</sup>. Indikoval se především u systémových kandidóz, ale vzhledem k často závažným vedlejším účinkům byl postupně nahrazen novějšími léčivy. Jeho vedlejším účinkem je, že blokuje tromboxansyntetasu (tzn. působí protisrážlivě) a inhibuje některé funkce T-lymfocytů<sup>[1]</sup>.



Obrázek 1: Chemická struktura mikonazolu.

**Ketokonazol** (obrázek 2) také patří k systémovým imidazolovým antimykotikům. Významná je jeho akumulace v kůži (až 5 dní po ukončení léčby). Indikací jsou především fungální onemocnění kůže, vlasů a nehtů. Stejně jako mikonazol je však v současnosti nahrazován novějšími léčivy (flukonazol, itrakonazol)<sup>[1]</sup>.





Obrázek 2: Chemická struktura ketokonazolu.

Mezi lokální imidazolová antimykotika patří také např. **ekonazol**, **klotrimazol**, **fentikonazol**, **tioxonazol**, **oxikonazol** a **terkonazol**<sup>[1]</sup>.

Přestože nadějnější výsledky jsou v poslední době získávány v oblasti triazolů, diskutovaných níže, pokračuje se intenzivně i ve výzkumu imidazolů. Studie 26 substituovaných fenyl-imidazolů odhalila kromě antibioticky a antivirálně aktivních látek také novou sloučeninu s potenciálními fungicidními účinky<sup>[10]</sup>.

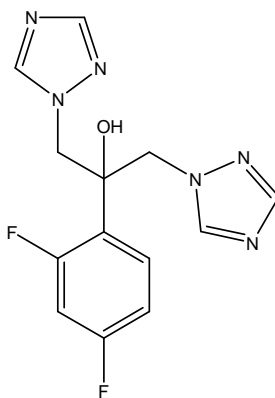
### 2.1.1.2 Triazoly

Nahrazením imidazolového kruhu v léčivech za triazolový byla zvýšena specifická vazba na cytochromy P450 hub a plísní. Triazolová léčiva (itrakonazol a flukonazol) také na rozdíl od imidazolových (klotrimazol, ekonazol a oxikonazol) nezvyšují propustnost buněčných membrán pro cytotoxické  $Zn^{2+}$  ionty<sup>[11]</sup>. U triazolů navíc došlo k zavedení nové methylové skupiny vedle centrálního chirálního uhlíku a tím rozšíření spektra citlivých druhů<sup>[5]</sup>, mimo jiné např. i na rod *Trichosporon*<sup>[4]</sup>. Triazoly mohou v lidském těle obecně působit řadou efektů (antibioticky, protizánětlivě, jako antidepresiva). Existuje studie věnující se právě různým účinkům nových syntetických triazolů včetně azolů s antifungální aktivitou<sup>[12]</sup>.

Diskutovaným tématem v oblasti léčiv je rovněž rezistence patogenů. Účinky níže diskutovaných léčiv vorikonazolu a itrakonazolu byly zkoumány na rodech *Aspergillus* a *Candida*. U prvního zmíněného rodu byly prokázány fungicidní účinky, u druhého pak pouze fungistatické. Pro srovnání byl studován i účinek antifungálního léčiva amfotericinu B, který vykazoval fungiciditu v obou případech<sup>[13]</sup>. Rezistence vůči triazolům může být v případě rodu *Candida* způsobena buď změnou prostorové struktury cílového enzymu (14- $\alpha$ -lanosteroldemethyláza), nebo zvýšením efluxu (tj.

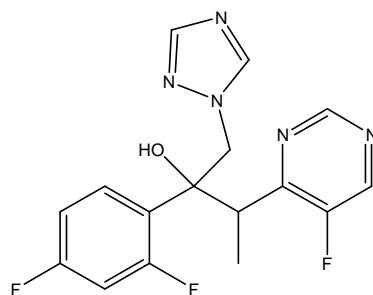
rychlosti vylučování) azolů z buňky mutací v ABC („ATP binding cassette“) a MFS („major facilitator superfamily“) buněčných pumpách. V případě rodu *Aspergillus* je rezistence způsobena zejména bodovými mutacemi na cílovém enzymu, 14- $\alpha$ -lanosteroldemethyláze, způsobující konformační změny, díky kterým má enzym menší afinitu k léčivu. V závislosti na druhu mutace může být organismus rezistentní pouze vůči některým azolům, nebo získat rezistenci zkříženou. Za viníka častějšího výskytu rezistencí je považována preventivní ochrana hospodářských plodin postřikem na bázi azolů a jejich dlouhodobé používání jako léčiv<sup>[2,14]</sup>.

**Flukonazol** (obrázek 3) je novější systémové triazolové antimykotikum. Podání je možné perorálně i parenterálně. Je hydrofilní a má nejméně nežádoucích účinků z používaných triazolů. Vykazuje také relativně nejméně interakcí s ostatními léky, přesto tyto interakce nejsou zanedbatelné. Používá se k profylaxi u rizikových pacientů. Dá se kombinovat s flucytosinem a mikonazolem - tyto kombinace vykazují synergický efekt<sup>[1]</sup>. Co se týče kombinace s amfotericinem B, literární prameny se v účincích rozcházejí<sup>[1,15]</sup>.



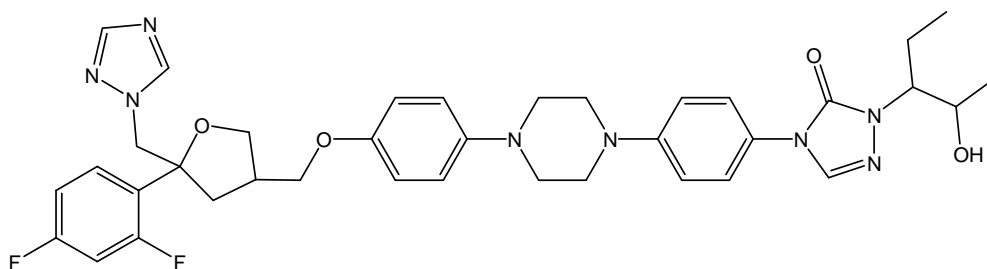
Obrázek 3: Chemická struktura flukonazolu

**Vorikonazol** (obrázek 4) je triazolové antimykotikum druhé generace. Má široké spektrum účinku, mimo jiné proti dříve zmiňovaným novým rodům *Fusarium* a *Scedosporium*. Vzhledem k tomu, že (stejně jako níže zmíněný posakonazol) významně interaguje s cytochromem P450 a tím pádem s celou řadou jiných léčiv, je třeba opatrnosti u pacientů, kteří užívají více léků současně<sup>[2,16]</sup>. V některých studiích tento lék vykazuje vyšší účinnost než amfotericin<sup>[16]</sup>. Používá se např. na léčbu infekcí způsobených kandidami rezistentními na flukonazol<sup>[1]</sup>.



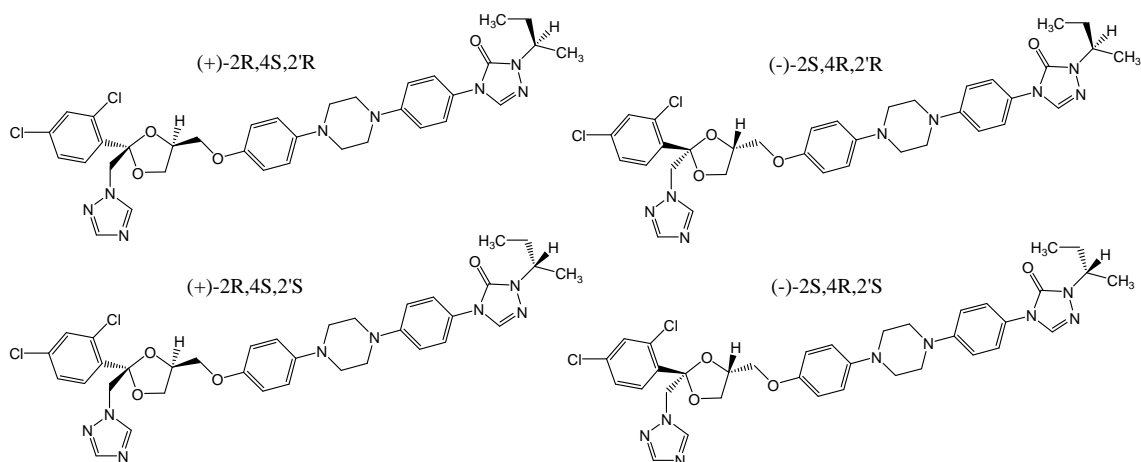
Obrázek 4: Chemická struktura vorikonazolu

**Posakonazol** (obrázek 5) vykazuje stejně jako itraconazol aktivitu vůči zygomycetám, proti nimž byl dříve jediným účinným lékem amfotericin B. Má také vyšší profylaktickou aktivitu než itraconazol i flukonazol. Jeho podávání je možné pouze orálně<sup>[16]</sup>. Kontraindikací k jeho podávání je užívání ergotových alkaloidů a některých dalších léků<sup>[17]</sup>.



Obrázek 5: Chemická struktura posakonazolu

**Itraconazol** (obrázek 6) je systémové triazolové antimykotikum určené k perorálnímu i parenterálnímu podávání. Poprvé byl syntetizován v roce 1984<sup>[18]</sup>. Obsahuje tři chirální centra, existuje tedy osm jeho stereoizomerů. V klinické praxi se používá racemická směs čtyř jeho *cis*-stereoizomerů<sup>[19]</sup>, která proto bude dále v této práci ve smyslu léčiva zmiňována pouze jako „itraconazol“.



Obrázek 6: Chemická struktura stereoisomerů *cis*-itraconazolu včetně konfigurací na chirálních centrech

Itrakonazol je použitelný k léčbě aspergilózy a zygomycózy<sup>[1]</sup>. Jedná se o lipofilní látku (přes 99% je ho v těle vázáno na proteiny), která má vysokou afinitu ke keratinizujícím tkáním. V nich je možné jej detekovat i po delší době<sup>[20-22]</sup>. Pro tyto vlastnosti je věnována zvýšená pozornost způsobu jeho podávání. Nejčastěji je podáván orálně ve formě cyklodextrinového komplexu<sup>[23]</sup>. V případě lokálních infekcí je možné podávat jej ve formě krému a oleje. Lepších účinků je však dosaženo při použití niosomů (neiontových povrchově aktivních vezikulů)<sup>[24]</sup>. Biodostupnost itraconazolu může být zvýšena také převedením z krystalické formy na amorfni. Spontánně však může docházet k jeho rekrystalizaci, proto je pak itraconazol připravován v binárních směsích s vhodnou pomocnou látkou (např. oktaacetylmaltóza), která rekrystalizaci zabraňuje<sup>[25]</sup>. Je možné jej aplikovat i intravenózně, což je účinné zejména při léčbě kandidózy<sup>[26]</sup>. Inovativní možností zvýšení jeho dostupnosti v organismu je využití HSES (vysokorychlostního elektrospinningu) pro přípravu nanovláknitých struktur s lepší rozpustností<sup>[27]</sup>. Možná je také inhalace itraconazolu v práškové formě<sup>[28]</sup>.

Itrakonazol je metabolizován v játrech enzymem CYP450 3A4 - pouze však jeho (+)-(2R,4S) izomery<sup>[29]</sup>.

Přestože výsledky studie, při které byl itraconazol podáván těhotným ženám, ukazují, že jeho užívání v těhotenství je bezpečné<sup>[30]</sup>, je prokázána jeho teratogenita u některých živočišných druhů (např. myši), a těhotenství je tak kontraindikací pro jeho podávání<sup>[20,31]</sup>. Používá se i ve veterinární praxi, kde je účinný mimo jiné i proti dermatofytům<sup>[22]</sup>.

Jedním z vážných vedlejších účinků itraconazolu je městnavá srdeční slabost<sup>[32,33]</sup>. Rizikem může být vzácně i vznik psychózy<sup>[34]</sup>, či deliria<sup>[35]</sup>. V případě pouze mírných vedlejších účinků je možné dosáhnout zlepšení pacientovy tolerance desenzitizací na lék realizovanou zavedením počáteční nízké dávky léku a jejím postupným zvyšováním<sup>[36]</sup>. Jak již bylo zmíněno výše, itraconazol interaguje s cytochromem P450 a tedy může ovlivňovat účinky některých jiných léků metabolizovaných touto skupinou enzymů<sup>[1]</sup>. Také není vhodné aplikovat jej současně s amfotericinem B<sup>[15]</sup>, naopak současné podávání s terbinafinem má synergický účinek<sup>[37]</sup>.

Toto léčivo se neuplatňuje pouze jako antimykotikum - využití našel itraconazol např. při léčbě leishmaniózy, onemocnění, jehož původcem jsou prvoci<sup>[38]</sup>. Spekuluje se o jeho protirakovinných účincích: blokuje signalizační kaskádu hedgehog a tím růst rakovinných buněk<sup>[39]</sup>. Zároveň bylo prokázáno, že indukuje expresi NAD(P)H:chinon oxidoreduktasy 1 - enzymu, který podporuje samočištění organismu od xenobiotik a karcinogenů<sup>[40]</sup>. Itraconazol má i antiangiogenní účinky (blokuje tvorbu kapilár vyživujících nádorové buňky)<sup>[41]</sup>. Nejnovější výzkum také ukazuje, že itraconazol vazbou na oxysterol-binding protein (OSBP) inhibuje RNA replikaci některých enterovirů<sup>[42]</sup>.

Většina studií na téma účinku itraconazolu se zabývá jeho racemátem. Existuje však i práce věnující se syntéze a studiu antifungální a antiangiogenní aktivity všech osmi stereoizomerů připravených stereoselektivní syntézou. Výsledkem studie je mimo jiné fakt, že komerčně používané *cis*-izomery mají vyšší antiangiogenní aktivitu než *trans*-izomery. Autoři studie zmiňují dva z *cis*-izomerů jako zvláště účinné. Zároveň je diskutováno, že antiangiogenní a antifungální vlastnosti azolů jsou pravděpodobně zapříčiněny rozdílnými mechanismy, protože aktivity v těchto dvou oblastech účinku pro zkoumané látky nekorelují<sup>[19]</sup>.

K dispozici jsou v současnosti i generika itraconazolu. V jejich používání je ale třeba jisté opatrnosti, protože se objevily případy, kdy po nahrazení léku generikem došlo ke zhoršení stavu pacientů. Jejich zdravotní stav se pak zlepšil opětovným nasazením původního (značkového) léku<sup>[43]</sup>.

Přestože byly objeveny účinnější triazoly, než itraconazol, výzkum neustává ani v oblasti jeho derivátů. Podařilo se připravit několik analog, kde je hlavním motivem

substituce benzenového jádra itrakonazolu pyridinovým. Tato analoga vykazují vyšší aktivitu, lepší rozpustnost a celkovou lepší biodostupnost než itrakonazol<sup>[44]</sup>.

## 2.2 Chirální separace na polysacharidových fázích

### 2.2.1 Chirální separace

Jako chirální označujeme separace, při kterých je cílem od sebe oddělit enantiomery chirálních sloučenin. Chirální sloučenina může existovat ve formě několika tzv. stereoizomerů - struktur lišících se prostorovým uspořádáním na stereogenních (chirálních) centrech. Pokud je chirálních center více, vybrané dvě struktury mohou být buď ve vztahu *enantiomerů* (= konfigurace na všech chirálních centrech je u obou izomerů přesně opačná), nebo *diastereomerů* (= některá centra mají stejnou konfiguraci, některá opačnou). Diastereomery vystupují jako látky s odlišnými fyzikálně-chemickými vlastnostmi a je tedy možné je dělit běžnými separačními technikami. Naproti tomu enantiomery se v achirálním (opticky neaktivním) prostředí jeví jako totožné. V chirálním prostředí se však jejich vlastnosti liší. To je základem separace optických izomerů chromatografickými a elektroforetickými technikami i měření optické otáčivosti s využitím polarizovaného světla. Podle stáčení roviny polarizovatelného světla pak rozlišujeme *pravotočivé* (+) stereoizomery (stáčejí rovinu polarizovaného světla ve směru hodinových ručiček) a *levotočivé* (-) stereoizomery (stáčejí rovinu polarizovaného světla proti směru hodinových ručiček)<sup>[45,46]</sup>.

Základem k separaci enantiomerů je vznik diastereomerního komplexu. Toho může být dosaženo např. derivatizací původních molekul. Vzniklé deriváty již nejsou enantiomery (jsou diastereomery) a dále s nimi můžeme pracovat - a separovat je - v achirálním prostředí. Tento způsob v minulosti převažoval<sup>[46]</sup>. Separaci po chirální derivatizaci označujeme jako *nepřímou separaci*.

*Přímá separace* zahrnuje vznik dočasněho komplexu a to jedním ze dvou způsobů: reakcí analytu s chirální stacionární fází, nebo reakcí analytu s tzv. chirálním selektorem (tj. chirálním aditivem v mobilní fázi).

Výhodou nepřímé separace je separace v achirálním prostředí (levnější, variabilnější) a možnost současného vnesení vhodné funkční skupiny pro následnou detekci vzniklého derivátu, nevýhodou je nutnost derivatizace, která může být pracná a dlouhá<sup>[45]</sup>.

Po chirální derivatizaci následuje konvenční HPLC na normálních nebo reverzních fázích. Používané derivatizace většinou vedou k esterům, amidům, karbamátům a derivátům močoviny<sup>[46,47]</sup>.

Přidávání chirálního aditiva (selektoru) do mobilní fáze je jednou z nejméně využívaných metod. Důvodem je vysoká cena chirálního selektoru, problémy s detekcí a často pozorovaný špatný tvar píků separovaných enantiomerů (nízké rozlišení)<sup>[46]</sup>.

V HPLC tak přibližně od roku 1980 převažují přímé chirální separace s využitím chirálních stacionárních fází. Těch existuje několik druhů a strukturně se jedná o polysacharidy, makrocyclická antibiotika, cyklodextriny, glykoproteiny, crown ethery, nebo čistě syntetické sloučeniny (např. Pirklovy fáze). Minoritní zastoupení mají fáze pro ligandovou výměnu<sup>[45,46]</sup>.

Separace chirálních látek lze realizovat v módu reverzních, polárně organických i normálních fází. Tyto módy se liší zejména druhy interakcí mezi analytem a stacionární fází. Použití různých mobilních fází přirozeně ovlivňuje i detekci. Typickým problémem je kompatibilita mobilních fází s hmotnostním spektrometrem. Selektivita chirální separace může být ovlivněna pH, polaritou a iontovou silou mobilní fáze. Dalšími parametry, které mohou mít vliv na kvalitu separace, jsou rychlost průtoku mobilní fáze a teplota kolony<sup>[45]</sup>.

Selektivita vzájemné separace dvou enantiomerů se označuje jako *enantioselektivita* a dvojice enantiomerů je považována za rozdělitelnou, pokud je separační faktor  $\alpha > 1,1$ . Kvalita separace také často souvisí s konfigurací molekuly - čím blíže je funkční skupina interagující se selektorem k chirálnímu centru, tím vyšší je šance úspěšného rozdělení<sup>[46]</sup>.

### 2.2.2 Polysacharidové fáze

Klíčovými vlastnostmi, díky kterým jsou polysacharidové fáze tak oblíbené pro chirální separace, jsou přítomnost několika stereogenních center na glukózových podjednotkách (molekulární chiralita), struktura polymeru (konformační chiralita) a uspořádání paralelních polymerových řetězců (supramolekulární chiralita)<sup>[48]</sup>. Nejčastěji využívanými polysacharidy jsou celulóza a amyulóza. Oba jsou tvořeny D-(+) glukosovými jednotkami, které jsou v případě celulózy spojeny  $\beta$ -1,4-glykosidickou vazbou a v případě amyulózy  $\alpha$ -1,4-glykosidickou vazbou. Optické izomery můžeme dělit i nativními polysacharidy - ty byly prvními chirálními stacionárními fázemi tohoto

druhu<sup>[49]</sup>. Nativní polysacharidy však mají nízkou selektivitu a proto jsou v současnosti využívány a komerčně produkovány jejich nejrůznější deriváty<sup>[50]</sup>. Mimo to mohou být využívány i jiné polysacharidy, např. xylan, dextran, chitin, chitosan a amylopektin. Obecně mají však horší vlastnosti než amyulóza a celulóza a nepoužívají se proto v takovém rozsahu<sup>[51]</sup>. Výhodou polysacharidových fází je možnost jejich využití v preparativní HPLC vzhledem k vysoké kapacitě fáze (cca 10-100 mg analytu/g fáze vs. cca 1-10 mg analytu/g fáze u ostatních druhů chirálních fází)<sup>[52]</sup>.

Derivatizované polysacharidy bývají nejčastěji navázány na vhodný silikagelový nosič. Mohou být navázány (imobilizovány) kovalentně, iontově, nebo je jimi nosič pouze pokryt (tzn. polysacharid je vázán pouze slabou interakcí). Pokrytí silikagelu polysacharidem přináší řadu pozitivních účinků na kvalitu stacionární fáze - dochází k lepšímu převodu hmoty (ve smyslu van Deemterovy rovnice), zvyšuje se tlaková odolnost fáze a její mechanická stabilita. Fáze připravené pokrýváním jsou však citlivé na přítomnost ketonů, etherů, esterů a halogenovaných rozpouštědel, které je mohou rozpouštět a způsobovat jejich bobtnání<sup>[53]</sup>. Návody ke komerčním kolonám tak často obsahují i varování, aby rozpouštědla jako aceton, chloroform, toluen, nebo tetrahydrofuran nebyla použita nejen v mobilní fázi, ale ani jako rozpouštědla vzorku<sup>[54]</sup>. Metoda pokrývání je důležitou částí procesu přípravy stacionární fáze - bylo prokázáno, že změna rozpouštědla použitého pro nanášení stacionární fáze může na výsledné fázi způsobit změnu elučního pořadí analytů<sup>[55]</sup>.

U kovalentně vázaných fází se k navázání využívají hydroxylové skupiny sacharidů, čímž je snížena jejich enantiosektivita<sup>[45,46]</sup>. Na druhou stranu umožňují kovalentně vázané fáze využití výše zmíněných „nestandardních“ mobilních fází a tím možnost nalezení selektivnější mobilní fáze a také zvýšení rozpustnosti analytu<sup>[56]</sup>. Možnosti imobilizace polysacharidu na nosič shrnuje ve svém review Franco<sup>[57]</sup>. Shen a kol. zmiňují i možnosti využití imobilizovaných fází a jejich srovnání s fázemi připravenými pokrýváním<sup>[58]</sup>.

Nejpoužívanějšími polysacharidovými fázemi jsou tris(3,5-dimethylfenylkarbamát) celulózy (komerčně dostupný např. jako Chiralcel OD), tris(4-methylbenzoát) celulózy (Chiralcel OJ), tris(3,5-dimethylfenylkarbamát) amyulózy (Chiralpak AD) a tris[(S)-1-methylbenzylkarbamát] amyulózy (Chiralpak AS), kterými je řešeno zhruba 84% analýz<sup>[59]</sup>. Neustále jsou však vyvíjeny nové fáze, které se často prokazují jako účinnější



než zavedené deriváty, např. celulóza tris(3-chlor-4-methylfenylkarbamát) a amylóza tris(2-chlor-5-methylfenylkarbamát)<sup>[60]</sup>.

Zajímavou variantou polysacharidových fází jsou tzv. regioselektivně heterosubstituované fáze (tj. fáze s různými substituenty na požadovaných pozicích v rámci jedné glukózové podjednotky). Jejich přehledu a využití se věnuje review G. Felixe<sup>[51]</sup>.

Nejdůležitějšími parametry pro optimalizaci HPLC enantioseparace jsou složení mobilní fáze, pH mobilní fáze, průtok mobilní fáze a teplota. Vlivu těchto proměnných na separaci s využitím polysacharidových fází se věnuje review Aboul-Eneina a Aliho. Při separaci na polysacharidech lze využít systém normálních i reverzních fází, častý je také přídavek malého množství kyseliny nebo báze (0,1-1,0%). Pokud je v systému reverzních fází potřeba udržovat konstantní pH, používá se jako mobilní fáze směs organického rozpouštědla s pufrů. Rozlišení je závislé na pH pro separaci jak v normálním, tak v reverzním módu. Pro kolony Chiralpak AD, AS a AR byla zkoumána závislost rozlišení na průtoku a bylo zjištěno, že nejlepšími výsledky v rozsahu průtoků 0,5-2 ml/min je dosaženo s průtokem 0,5 ml/min. Snižování průtoku pod tuto hranici však již k dalšímu zlepšení separace nevede. Teplota má na separaci rovněž vliv a bylo zjištěno, že zvýšení teploty v diskutovaných pracích vede ke zhoršení rozlišení. Kromě toho review zmiňuje i vliv jiných parametrů, jako je např. porozita silikagelového nosiče<sup>[50]</sup>.

Retence analytu závisí zejména na funkčních skupinách stacionární fáze, průměrné molekulové hmotnosti a distribuci polysacharidu a druhu nosiče<sup>[46]</sup>. Benzoáty separují na základě interakcí dipól-dipól a vodíkových vazeb, podobně i fenylylkarbamáty<sup>[46,61]</sup>. Pokud analyt nevykazuje interakci se stacionární fází, vhodnou volbou je obvykle jeho derivatizace (acylace, nebo karbamoylace)<sup>[46]</sup>. Díky kavitám ve struktuře polysacharidů mohou být separovány i některé alifatické uhlovodíky<sup>[62]</sup>. Rozdílná selektivita amylózy a celulózy souvisí s odlišným prostorovým uspořádáním těchto cukrů (šroubovitě pro amylózu a lineárně pro celulózu)<sup>[46,50,63]</sup>. Pro tris(3,5-dimethylfenylkarbamát) celulózy i amylózy byly pomocí vibračního cirkulárního dichroismu a DFT výpočtů zkoumány interakce analytu se stacionární fází. Bylo zjištěno, že tyto polysacharidy podléhají při různé polaritě mobilní fáze odlišným konformačním změnám. To vysvětluje autory pozorovanou změnu elučního pořadí pro dvojici enantiomerů na amylózové koloně se změnou polaritě mobilní fáze<sup>[64]</sup>.

Enantioseparací molekul s více chirálními centry pomocí polysacharidových fází se zabývá review Aboul-Eneina<sup>[59]</sup>. Autor shrnuje separace stereoizomerů nadololu, indenololu,  $\alpha$ -hydroxymetoprololu, diltiazemu a nebivololu. V práci jsou zmíněny i odkazy na práce zabývající se separací molekul s jediným chirálním centrem. Příklady novějších zajímavých enantioseparací shrnuje např. review Cavazziniho a kol.<sup>[53]</sup>.

Jelikož odhad podmínek, za kterých bude probíhat separace žádaného analytu, je v případě chirálních sloučenin často problematický a retenční chování analytu nepředvídatelné, mnoho studií je věnováno screeningu pro nalezení vhodné metody a optimalizaci podmínek chirálních separací s využitím pokrývaných i imobilizovaných fází<sup>[65-67]</sup>.

Separace na polysacharidových fázích mohou být realizovány také s využitím superkritické fluidní chromatografie (SFC). První práce v této oblasti vznikly již na přelomu 80. a 90. let minulého století<sup>[68,69]</sup>. SFC může poskytovat lepší rozlišení v kratším čase analýzy než HPLC, např. v analýze antifungálních léčiv<sup>[70,71]</sup>. Pokud pracujeme s imobilizovanými stacionárními fázemi, lze i v SFC jako aditiva do mobilní fáze úspěšně použít nejen běžně používaná organická rozpouštědla (alkoholy, acetonitril), ale i taková, která rozpouštějí pokrývané fáze (např. ethylacetát a tetrahydrofuran). Výhodou použití těchto rozpouštědel je, že jsou aprotická (což snižuje rychlost racemizace analytu a může zvýšit jeho rozpustnost) a také jejich odlišná selektivita<sup>[72]</sup>. Na čtyřech polysacharidových kolonách (tři celulózy a jedna amyložová) byl s využitím 59 chirálních látek testován vliv přídavku izopropylaminu, kyseliny trifluoroctové a obou látek současně do mobilní fáze. Výsledkem bylo, že současný přídavek obou aditiv synergicky zvyšuje enantioselektivitu<sup>[73]</sup>.

### 2.2.3 Celulózy

Jako jeden z prvních semisyntetických derivátů byl připraven mikrokrytalický triacetát celulózy. Vyrábí se heterogenní acetylací mikrokrytalické celulózy<sup>[74]</sup>. V minulosti byl tento polymer oblíbenou náplní chirálních kolon<sup>[75]</sup>. Jednou ze zásadních úprav bylo pak jeho nanesení na silikagel<sup>[76]</sup>. V návaznosti na triacetát byly následně zkoumány další deriváty celulózy<sup>[77]</sup>, které v současnosti z velké části triacetát nahradily.

Kromě triacetátu celulózy vyráběného komerčně např. firmou Daicel (Ósaka, Japonsko) jako Chiralcel OA je tak možné pro separace využít např. tribenzoát (Chiralcel OB,

Daicel), trisfenylkarbamát (Chiralcel OC, Daicel), tris(3,5-dimethylfenylkarbamát) (Chiralcel OD, Daicel, nebo Lux Cellulose-1, Phenomenex), tris(4-methylfenylkarbamát) (Chiralcel OG, Daicel), tris(4-methylbenzoát) (Chiralcel OJ, Daicel, nebo Lux Cellulose-3, Phenomenex), tricinnamát (Chiralcel OK, Daicel) a tris(4-*terc*-butylfenylkarbamát) celulózy<sup>[46,53,54,77,78]</sup>.

Ortogonalní účinnost často vykazují halogenované a nehalogenované deriváty (zpravidla karbamáty) celulózy. Příklady halogenované celulózy stacionární fáze mohou být celulóza tris(4-chlorfenylkarbamát) (Chiralcel OF, Daicel), celulóza tris(3-chlor-4-methylfenylkarbamát) (Chiralcel OZ, Daicel, nebo Lux<sup>TM</sup> Cellulose-2, Phenomenex) nebo celulóza tris(4-chlor-3-methylfenylkarbamát), na které bylo úspěšně chirálně rozděleno 13 léčiv<sup>[79-81]</sup>.

Některé z derivátů vykazují i zajímavé chromatografické vlastnosti. Celulóza tris(3,5-dimethylfenylkarbamát) umožňuje např. ve vhodné mobilní fázi (n-hexan:2-propanol, 92:8, v/v) změnu elučního pořadí 1,1'-bi-2-naftolu s teplotou<sup>[82]</sup>. Celulóza tris(4-methylbenzoát) vykazuje při separaci N-thiokarbamoyl-3-(4-fenoxy)-fenyl-5-fenyl-4,5-dihydro-(1H)-pyrazolu vysokou enantioselektivitu s velmi vysokým separačním faktorem  $\alpha = 138,5$ <sup>[83]</sup>.

#### 2.2.4 Amylózové fáze

Komerčně dostupnými deriváty amylózy jsou např. tricinnamát, tris(3,5-dimethylfenylkarbamát) (Chiralpak AD, Diacel), tris(5-chlor-2-methylfenylkarbamát) (Lux<sup>TM</sup> Amylose-2, Phenomenex) a tris[(S)-1-methylbenzylkarbamát] (Chiralpak AS, Diacel)<sup>[46,78]</sup>. Příkladem dosud nekomercializované stacionární fáze může být amylóza tris(5-chlor-2-methylfenylkarbamát), použitý v nano-LC<sup>[84]</sup>.

U tris(3,5-dimethylfenylkarbamátu) amylózy bylo pomocí HPLC provedeno experimentální stanovení počtu bazických katalytických míst ve stacionární fázi (s výsledkem  $5,9 \pm 0,5$   $\mu\text{mol NH}_2$  skupin/1 gram stacionární fáze). Tento parametr může ovlivnit kinetiku interkonverze analytu na stacionární fázi a může být využit při optimalizaci separačního systému<sup>[85]</sup>. Byla také zjištěna příčina paměťového efektu stejné stacionární fáze při použití kyselých a bazických mobilních fází a navržen vhodný způsob její regenerace pro minimalizování tohoto efektu<sup>[86]</sup>.

Ve studii porovnávající odpovídající amyložové a celulóžové stacionární fáze v reverzním módu bylo separováno 30 chirálních látek. Větší enantiosektivitu vykazovaly amyložové fáze<sup>[87]</sup>.

### 2.2.5 Využití polysacharidových fází v enantioseparaci antifungálních azolů

Pomocí SFC byly chirálně separovány vybrané imidazolové a triazolové deriváty na kolonách Chiralcel OD (celulóžová) a Chiralpak AD (amyložová). Obě kolony jsou derivatizovány stejně - nesou 3,5-dimethylfenylkarbamátovou skupinu a liší se pouze „nosným“ sacharidem. Závěrem studie je, že pro tyto látky je vhodnější použití celulóžové kolony<sup>[71]</sup>. 15 imidazolových derivátů bylo chirálně separováno v analytickém a semipreparativním módu také s využitím kolon Chiralcel OD a Chiralpak AD. Autoři byli schopni rozdělit s pomocí alespoň jedné z těchto kolon všech 15 látek a v práci je připomenuta dřívějšími studii zmiňovaná komplementarita obou kolon<sup>[88]</sup>.

Tři imidazolová léčiva (ekonazol, mikonazol, sulkonazol) byla separována pomocí HPLC na kolonách Chiralcel OB, OC, OD, OF, OJ a OK. Nejlepšího průměru rozlišení dosáhla kolona Chiralcel OF (tj. stacionární fáze tris-(4-chlorfenylkarbamát) celulózy)<sup>[89]</sup>. Stejný autorský kolektiv separoval tyto látky pomocí HPLC i na třech amyložových kolonách: Chiralpak AD, AR a AS. Nejlepšího průměru rozlišení bylo dosaženo na koloně Chiralpak AS, neboli tris(S-1-methylfenylkarbamátu) amyložy<sup>[90]</sup>. Ekonazol a mikonazol byly stejným týmem spolu s dalšími látkami chirálně separovány i na experimentální koloně tvořené tris-(3,5-dichlorfenylkarbamátem) celulózy naneseným na Daisogel SP-2000<sup>[91]</sup>. Ekonazol, mikonazol, sulkonazol a isokonazol byly chirálně separovány rovněž na koloně AmyCoat RP (Eka Chemicals, Bohus, Švédsko)<sup>[92]</sup>. Na amyložové koloně Chiralpak AD byly pomocí SFC separovány ekonazol, mikonazol, sulkonazol a itrakonazol. Imidazoly byly chirálně separovány v čase do 10 minut. Analýza itrakonazolu trvala 80 minut a nebylo při ní dosaženo dostatečného rozlišení všech stereoizomerů<sup>[70]</sup>. Pokud porovnáme všechny tyto práce zabývající se zmíněnou trojicí imidazolů, je nejlepších výsledků dosaženo na amyložových kolonách typu Chiralpak.

10 azolových léčiv bylo také chirálně separováno na kolonách Lux Cellulose 1-4 a Lux Amylose-2 (všechny Phenomenex, USA) a na experimentální koloně plněné tris-(3,5-

dimethylfenylkarbamátem) amylozy (ADMPC) (Enantiosep GmbH, Münster, Německo). Záměrem práce bylo zjistit, zda je změnou některého z parametrů separace (včetně použité stacionární fáze) možno dosáhnout změny elučního pořadí stereoizomerů daného léčiva. Požadovaného jevu bylo ve studii dosaženo a pro zkoumaná léčiva jsou v práci zmíněny příslušné podmínky<sup>[93]</sup>.

Závěrem této kapitoly je nutno říci, že se nepodařilo v literatuře najít ucelené review zabývající se srovnáním polysacharidových fází pro účely chirální separace antifungálních azolů. Sepsání takového review by bylo přínosem do problematiky těchto náročných separací.

## 2.3 Separace itrakonazolu

### 2.3.1 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC)

Itrakonazol je málo polární látka a vykazuje tak retenci v systému reverzních fází (RP). Pro jeho kontrolu ve farmaceutických produktech byla validována HPLC metoda na těchto fázích. Separace zde probíhá na koloně Supelcosil LC-18 (Supelco, EUA) o rozměrech 100 × 4,6 mm, velikost částic 5 μm. Mobilní fází byla směs acetonitrilu a 0,05% (v/v) roztoku diethylaminu<sup>[94]</sup>. Byla také validována metoda pro kvantifikaci itrakonazolu a stanovení nečistot v jeho lékových formách, založená rovněž na RP-HPLC, tentokrát s využitím kolony Zorbax Eclipse XDB-C18 (4,6 × 150 mm, 5 μm) (Agilent, USA) a mobilní fáze tvořené směsí acetonitrilu a vodného roztoku *o*-fosforečné kyseliny o pH = 2,5<sup>[95]</sup>. Sledovat výrobní nečistoty v itrakonazolu je možné i s využitím UPLC a to na koloně Zorbax Eclipse XDB C18 (150 × 4,6 mm, 1,8 μm) (Agilent, USA) binární gradientovou elucí se složkami mobilní fáze 0,08 mol/l hydrogensíranem tetrabutylammonia a acetonitrem<sup>[96]</sup>. Okrajovější aplikací je pak HPLC analýza transferosomů itrakonazolu prováděná opět v systému RP na koloně MN C18 (Macherey-Nagel GmbH & Co. KG) (150 × 4,6 mm, 5 μm)<sup>[97]</sup>.

Problémem reálných vzorků může být jeho matrice. Pomocí HPLC-MS/MS a UPLC-MS/MS byly studovány matricové efekty vzorků vod obsahujících léčiva, kde jedním z analytů byl itrakonazol. Výsledkem studie je, že HPLC analýzy studovaných vzorků jsou zatíženy matricovými efekty, které je při kvantifikaci potřeba kompenzovat použitím metody standardního přídávku. Naopak při UPLC analýzách je efekt matrice minimální a je možné využít metodu vnitřního standardu<sup>[98]</sup>.

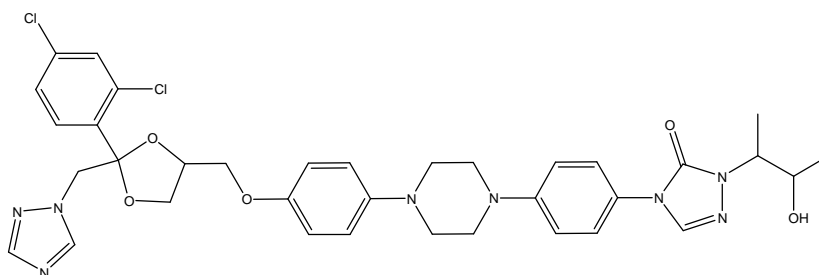
Itrakonazol byl rovněž použit jako modelový analyt při studiu vlastností C18-funkcionalizovaných feromagnetických mikročástic pro extrakci látek z krevní plazmy (autory nazvanou jako „in-flow magnetic particle extraction“, neboli *Flow-MaX*). Částice se zachyceným analytem byly nastříkovány přímo do HPLC systému, kde byly zadrženy ve spojovací kapiláře před kolonou pomocí magnetu, analyt vymyt na kolonu změnou eluční síly mobilní fáze a separován<sup>[99]</sup>.

Dále v této kapitole jsou popisovány postupy analýzy itraconazolu zejména s ohledem na jeho kontrolu v klinické praxi.

Racemát itraconazolu byl kvantifikován v heparinované krysí plazmě v systému LC-MS na reverzních fázích s detekcí jednoduchým kvadrupólem<sup>[100]</sup>. Itraconazol lze stanovit také v lidské plazmě vedle dalších azolových léčiv. Jednou z možností je HPLC-UV/VIS uspořádání s předpřípravou vzorku pomocí SPE extrakce. Samotná separace probíhá na koloně Gemini C6-Phenyl (Phenomenex, USA). Takto byl itraconazol stanoven vedle flukonazolu, posakonazolu, vorikonazolu, ketokonazolu a hydroxyitraconazolu<sup>[101]</sup>. Podobný přístup byl zvolen při separaci vorikonazolu, posakonazolu, isavukonazolu, itraconazolu a hydroxyitraconazolu v plazmě. Po extrakci kapalina-kapalina následovala UPLC-UV/VIS analýza na fenylové koloně ACQUITY UPLC BEH Phenyl Column (Waters, USA)<sup>[102]</sup>.

Jinou metodiku a instrumentaci zvolili Beste et al. při stanovení itraconazolu vedle flukonazolu, posakonazolu a vorikonazolu v krevní plazmě. Plazmatické proteiny byly vysráženy směsí methanolu a ZnSO<sub>4</sub> a azoly prekoncentrovány pomocí SPE. Extrakce tuhou fází byla provedena on-line v „back-flush“ módu (vzorek byl nadávkován na SPE kolonku, balastní látky byly selektivně vymyty a po přepnutí ventilu pak byl v opačném směru z SPE kolonky vymyt přečištěný analyt). Vlastní chromatografická separace byla provedena na koloně Allure PFP Propyl 50 × 2,1 mm, 5 μm (Restek, USA) při teplotě 60 °C. Jako mobilní fáze byl použit 2 mM mravenčan amonný ve směsi acetonitril:voda 80:20 (v/v). Jako detektor byl použit trojitý kvadrupól API 2000 (AB Sciex, USA). Výhodou je velmi rychlá analýza (3 minuty s paralelní kondicionací SPE kolony) a aplikovatelnost na reálné vzorky pacientů<sup>[103]</sup>.

Problémem, kterému se věnuje velká část publikovaných prací, je současné stanovení itraconazolu a jeho metabolitu hydroxyitraconazolu (Obrázek 7). Jednotlivé práce se většinou zabývají analýzou některé z tělních tekutin - krevní plazma, krevní sérum.



Obrázek 7: Chemická struktura hydroxyitraconazolu

Na toto téma byly publikovány postupy využívající SPE-LC/ESI-MS/MS metodu v systému reverzních fází a detekci s využitím trojitého kvadrupólu (sledování vhodných MRM přechodů)<sup>[104]</sup>, HPLC-UV/VIS v systému reverzních fází aplikované na reálné vzorky krevního séra<sup>[105-107]</sup>, či plazmy<sup>[108]</sup>, nebo LC-MS analýzu s předchozí extrakcí kapalina-kapalina (LLE) psí plazmy v systému reverzních fází s MS detekcí jednoduchým kvadrupólem<sup>[109]</sup>. Pro stanovení itraconazolu a hydroxyitraconazolu vedle sebe byla validována také LLE-UPLC-ESI-MSMS metoda<sup>[110]</sup>.

Stanovení itraconazolu v biologických a farmaceutických matricích shrnuje rovněž review Ekierta a kol.<sup>[111]</sup>.

V oblasti chirálních separací itraconazolu zmiňuje literatura pouze několik prací. Ve studii věnující se stereoselektivní metabolizaci itraconazolu jsou jeho čtyři *cis*-izomery nedokonale rozděleny na koloně Chiralpak AS-RH, přičemž izomery (+)-2R,4S koeluovaly a v rámci žádné z dvojic píků nebylo dosaženo rozlišení na základní linii<sup>[29]</sup>.

Nověji byl itraconazol v plazmě analyzován HPLC s fluorescenční detekcí na koloně Chiralcel OD. V práci popsaná metoda je schopná separovat dvojici levotočivých ((+)-2R,4S,2'R, (+)-2R,4S,2'S) a pravotočivých ((-)-2S,4R,2'R, (-)-2S,4R,2'S) izomerů itraconazolu s rozlišením  $R = 2,05$ . Neumožňuje však rozdělení všech čtyř stereoizomerů najednou. S využitím dvoukolonového zapojení s cyklodextrinovou kolonou Cyclobond I 2000 RSP, je možno vedle dvojic izomerů itraconazolu separovat

i dvojice izomerů hydroxyitakonazolu, které jsou 4 (oproti itakonazolu přibývá jedno nové chirální centrum)<sup>[112]</sup>.

Nejzajímavější studií tak zůstává nejstarší ze zde uvedené trojice prací, která se věnuje dělení enantiometrů ketokonazolu a itakonazolu na polysacharidových fázích pomocí LC a SFC<sup>[113]</sup>. Separace itakonazolu zde probíhá s využitím 6-(R-fenylethylkarbamát)-2,3-(3,5-dimethylfenylkarbamátu) amylozy jako stacionární fáze v systému normálních fází (10 mM kyselina oktanová ve směsi hexan:methanol:ethanol 75:12:13). Délka analýzy je cca 120 minut a ani zde nedochází ke kompletní separaci všech 4 stereoizomerů (druhý a třetí pík se překrývají). Zajímavé je eluční pořadí stereoizomerů „+, -, +, -“ v porovnání s ostatními pracemi<sup>[29,112]</sup>, kde pořadí stereoizomerů bylo „+, +, -, -“.

### 2.3.2 Superkritická fluidní chromatografie (SFC)

Superkritická fluidní chromatografie je zvláštním druhem kapalinové chromatografie, kdy se mobilní fáze nachází v superkritickém stavu (tzn. její tlak a teplota přesahují kritický bod). Změnou těchto parametrů (tlak, teplota) lze měnit hustotu fáze, s níž se zároveň mění i její eluční síla. Přes teoretické možnosti využití různých plynů se v naprosté většině případů používá jako mobilní fáze oxid uhličitý. Jeho výhodou je především cena a nejedovatost. Výhodou SFC oproti HPLC je nižší viskozita (tzn. možnost použití vyššího průtoku) a vyšší difuzní koeficient mobilní fáze<sup>[45]</sup>.

Pomocí superkritické fluidní chromatografie byly separovány stereoizomery tří imidazolů a jednoho triazolu - itakonazolu. Studie zkoumala vliv tlaku, druhu a obsahu organických modifikátorů v mobilní fázi na retenci a rozlišení analytů. Pro itakonazol nedošlo ani při retenčním čase 80 minut na koloně Chiralpak AD k úplnému rozlišení všech stereoizomerů. Nezanedbatelný vliv na selektivitu separace má poměr ethanolu a izopropanolu v mobilní fázi<sup>[70]</sup>.

Ve dříve zmíněné práci zaměřené na separaci ketokonazolu a itakonazolu na vybraných polysacharidových fázích se rovněž objevuje pokus o chirální separaci stereoizomerů itakonazolu pomocí SFC. Stejně jako při HPLC analýze došlo i zde k částečné koeluci druhého a třetího píku (absolutní konfigurace odpovídajících izomerů není v práci uvedena). V tomto případě byla mobilní fáze tvořená superkritickým oxidem uhličitým



modifikována 17% 10 mM oktanové kyseliny ve směsi methanol:ethanol, tlak je 35 MPa, teplota kolony 30 °C a průtok 2,5 ml/min<sup>[113]</sup>.

### 2.3.3 Kapilární elektroforéza

Separace itraconazolu pomocí kapilární elektroforézy ve vodném prostředí byly publikovány již v roce 1995. V této práci je achirálně separováno 6 bazických sloučenin. Selektivita separace je zvýšena přidavkem  $\beta$ -cyklodextrinu<sup>[114]</sup>. V jiné studii bylo pomocí kapilární zónové elektroforézy rozděleno 7 antifungálních léčiv včetně itraconazolu. Nejvyšší citlivosti a selektivity bylo dosaženo použitím fosfátového pufru o pH 2,3 jako základního elektrolytu. Nejrychlejších analýz bylo dosaženo použitím vodného roztoku kyseliny mravenčí o pH = 2,15<sup>[115]</sup>.

Kapilární elektroforéza umožňuje také separaci itraconazolu a hydroxyitraconazolu. Pro tento úkol byla využita micelární elektrokinetická chromatografie (MEKC). Základním elektrolytem byla směs tvořená 3,2% (m/m) dodecylsírany sodného, 20 % (m/m) izopropanolu, 7 % (m/m) *n*-butanolu a 69,8 % 25 mM fosfátového pufru o pH 2,2<sup>[116]</sup>. Později byla publikována chirální separace dvojic enantiomerů itraconazolu a hydroxyitraconazolu. Složení základního elektrolytu bylo následující: 34 % (v/v) methanol, 0,95 % (w/v) sulfatovaný  $\beta$ -cyklodextrin, 4,0 % (w/v) polyethylenglykol 4000 a 66% (v/v) 40 mM fosfátový pufr o pH 2. Délka kapiláry byla 47 cm, napětí -28 kV. K detekci byl použit UV detektor,  $\lambda = 214$  nm. Délka analýzy byla zhruba 20 minut, a byly detekovány 2 píky pro itraconazol a 4 píky pro jeho metabolit, hydroxyitraconazol. Píky jsou autory na základě srovnání s literaturou určeny jako směsi (+)-2R,4S, resp. (-)-2S,4R diastereomerů. Není však potvrzena optická otáčivost detekovaných píků (metoda využívá pouze UV detektor). Metoda byla aplikována také na vzorky pacientů<sup>[117]</sup>.

Čtyři stereoizomery *cis*-itraconazolu byly vedle sebe kvantifikovány pomocí elektrokinetické chromatografie (EKC). Nejlepších výsledků bylo dosaženo s použitím 30mM heptakis-2,3,6-tri-O-methyl- $\beta$ -cyklodextrinu ve 100 mM fosfátovém pufru o pH 2,5 při napětí +30 kV<sup>[118]</sup>.

Stereomery itraconazolu a dalších antifungálních azolů byly separovány s využitím tří různých iontových kapalin jako modifikátorů v kombinaci s hydroxypropyl- $\beta$ -cyklodextrinem. Úlohou iontové kapaliny je v tomto případě jednak změna

elektroosmotického toku, a také interakce s cyklodextrinem, které mohou měnit jeho schopnost tvorby komplexu s analyty. Jako nejvhodnější iontová kapalina pro separaci se ukázal dodecyltrimethylamonium chlorid<sup>[119]</sup>.

### **2.3.4 Detekční metody pro stanovení absolutní konfigurace stereoizomerů itrakonazolu**

Stanovení absolutní konfigurace chirálních látek je možné provádět ve spojení se separační technikou („on-line“) i bez něj („off-line“). V druhém případě je však nutné mít k dispozici čistý stereoizomer. Původní literatura na téma určování absolutní konfigurace je obsáhlá a proto jsou zde zmíněny odkazy na review zabývající se jednotlivými technikami. Nejvýznamějšími technikami jsou optická otáčivost a cirkulární dichroismus (CD)<sup>[120]</sup>, které mohou být kombinovány s teoretickými výpočty<sup>[121]</sup>, příp. vibrační cirkulární dichroismus (VCD)<sup>[122]</sup>, nebo měření vibrační optické aktivity (kombinace vibračního CD a Ramanovy optické aktivity)<sup>[123]</sup>. Dále je možno využít nukleární magnetickou rezonanci (NMR)<sup>[124,125]</sup> a krystalovou či práškovou rentgenovou difrakci<sup>[126,127]</sup>. V oblasti spojení těchto technik se separačními technikami převažují detektory polarimetrické a CD detektory<sup>[128]</sup>. Kombinaci (semi)preparativní chirální LC a stanovení absolutní konfigurace stereoizomerů se věnuje také review Roussela a kol.<sup>[129]</sup>.

Určení konfigurace stereoizomerů itrakonazolu není v literatuře detailně diskutováno. Absolutní konfigurace jednoho ze stereoizomerů byla s využitím vibračního cirkulárního dichroismu potvrzena v práci Dunmirea a kol.<sup>[130]</sup>. Pyrgaki a kol. separovali racemát itraconazolu na dvě frakce, lišící se optickou otáčivostí. Složení frakcí bylo určeno na základě srovnání s patentovou literaturou<sup>[112,131]</sup>. Thienpont a kol. ve své práci využili při chirální separaci itrakonazolu detektor optické otáčivosti a určili tak optickou otáčivost jednotlivých stereoizomerů, ne však jejich absolutní konfiguraci<sup>[113]</sup>. Kunze a kol. pak pro identifikaci stereoizomerů ve své HPLC metodě využili nástřik známých standardů stereoizomerů (poskytnutých autorům firmou Sepracor Inc. (Marlborough, USA))<sup>[29]</sup>.

## 3. Experimentální část

### 3.1 Chemikálie

Methanol (HPLC - gradient grade, VWR Chemicals, Francie), ethanol (UVAPUR, BC-Chemservis, Česká republika), acetonitril (HPLC - super gradient, VWR Chemicals, Francie), hexan (g.r., Lach-Ner, Česká republika), itrakonazol ( $\geq 98\%$ , Sigma-Aldrich, USA), hydrogenuhličitan amonný (p.a., Lach-Ner, Česká republika), Dulbecco's Modified Eagle's Medium - high glucose (DMEM) (D6546, Sigma-Aldrich, USA).

### 3.2 Podmínky analýz

#### 3.2.1 Chromatografické analýzy

##### **Analytická separace racemátu itrakonazolu:**

Mobilní fáze: methanol:acetonitril 9:1 (v/v)

Kolona: Lux Cellulose-1,  $250 \times 4,6$  mm,  $d_p = 5 \mu\text{m}$  (Phenomenex, Torrance, USA)

Průtok: 1 ml/min

Nástřik: 20  $\mu\text{l}$

Detekce: UV,  $\lambda = 274$  nm

##### **Semipreparativní izolace tří frakcí z racemátu itrakonazolu:**

Mobilní fáze: methanol:acetonitril 9:1 (v/v)

Kolona: Lux Cellulose-1,  $250 \times 4,6$  mm,  $d_p = 5 \mu\text{m}$  (Phenomenex, Torrance, USA)

Průtok: 5 ml/min

Nástřik: 1000  $\mu\text{l}$

Detekce: UV,  $\lambda = 274$  nm

##### **Analytická separace první frakce itrakonazolu:**

Mobilní fáze: methanol:acetonitril 5:1 (v/v)

Kolona: Lux Cellulose-1, 250 × 4,6 mm,  $d_p = 5 \mu\text{m}$  (Phenomenex, Torrance, USA)

Průtok: 2 ml/min

Nástřik: 20  $\mu\text{l}$

Detekce: UV,  $\lambda = 274 \text{ nm}$

#### **Semipreparativní izolace stereoizomerů z první frakce racemátu itrakonazolu:**

Mobilní fáze: methanol:acetonitril 10:1 (v/v)

Kolona: Lux Cellulose-1, 250 × 10 mm,  $d_p = 5 \mu\text{m}$  (Phenomenex, Torrance, USA)

Průtok: 5 ml/min

Nástřik: 1000  $\mu\text{l}$

Detekce: UV,  $\lambda = 274 \text{ nm}$

#### **Analytická presepence racemátu itrakonazolu na dvě frakce:**

Mobilní fáze: methanol:acetonitril 1:1 (v/v)

Kolona: Lux Cellulose-1, 250 × 4,6 mm,  $d_p = 5 \mu\text{m}$  (Phenomenex, Torrance, USA)

Průtok: 1 ml/min

Nástřik: 20  $\mu\text{l}$

Detekce: UV,  $\lambda = 274 \text{ nm}$

#### **Semipreparativní izolace dvou frakcí z racemátu itrakonazolu:**

Mobilní fáze: methanol:acetonitril 5:2 (v/v)

Kolona: Lux Cellulose-1, 250 × 10 mm,  $d_p = 5 \mu\text{m}$  (Phenomenex, Torrance, USA)

Průtok: 5 ml/min

Nástřik: 1000  $\mu\text{l}$

Detekce: UV,  $\lambda = 274 \text{ nm}$

#### **Analytická metoda pro stanovení absolutní konfigurace stereoizomerů itrakonazolu:**

Mobilní fáze: A: acetonitril, B: 5 mM vodný roztok octanu amonného

Gradient: 0-4 min: 30% A; 4-50 min: 30-70% A; 50-52 min: 70-80% A; 52-54 min: 80% A; 54-56 min: 80-30% A; 56-60 min: 30% A (ekvilibrace kolony)

Kolona: Chiralpak AS-RH, 250 × 4,6 mm,  $d_p = 5 \mu\text{m}$  (Daicel, Ósaka, Japonsko)

Průtok: 1 ml/min

Nástřík: 20  $\mu\text{l}$

Detekce: UV,  $\lambda = 274 \text{ nm}$

### **Upravená analytická metoda pro odlišení stereoizomerů (+)-2R,4S,2'R a (+)-2R,4S,2'S:**

Mobilní fáze: A: acetonitril, B: 5 mM vodný roztok octanu amonného

Gradient: počáteční: 30% A; 0-100 min: 30-80% A; 100-110 min: 80% A; 110-115 min: 80-30% A; 115-120 min: 30% A (ekvilibrace kolony)

Kolona: Chiralpak AS-RH, 250 × 4,6 mm,  $d_p = 5 \mu\text{m}$  (Daicel, Ósaka, Japonsko)

Průtok: 1 ml/min

Nástřík: 20  $\mu\text{l}$

Detekce: UV,  $\lambda = 274 \text{ nm}$

### **Analytická metoda pro stanovení optické otáčivosti jednotlivých stereoizomerů itrakonazolu:**

Mobilní fáze: methanol: acetonitril 2:1 (v/v)

Kolona: Lux Cellulose-3, 250 × 4,6 mm,  $d_p = 5 \mu\text{m}$  (Phenomenex, Torrance, USA)

Průtok: 1 ml/min

Nástřík: 20  $\mu\text{l}$

Detekce: UV,  $\lambda = 274 \text{ nm}$

Koncentrace vzorku se pohybovala mezi 100 a 200 mg/l pro analytickou separaci a semipreparativním uspořádání pak v rozmezí 830-2000 mg/l (detaily jsou uvedeny u příslušných chromatogramů v diskuzní části). Ve všech případech byl použit nástřík přeplněním smyčky odpovídajícího objemu.

Frakce v semipreparativním módu byly sbírány ručně.

### **3.2.2 Stabilitní studie izolovaných stereoizomerů itrakonazolu**

Izolované stereoizomery byly rozpuštěny v DMEM na koncentraci 1 mM. Roztoky stereoizomerů byly ponechány v termostatu vyhřívaném na 37 °C. Byl odebrán alikvot v čase 0 hod a poté další alikvoty v časech 24 hod a 48 hod. Alikvoty byly odpařeny do sucha, rozpuštěny v mobilní fázi, filtrovány přes PTFE mikrofiltr (0,22 µm) na očekávanou koncentraci 10 mM a ihned analyzovány.

### **3.3 Instrumentace:**

Pro chirální separace byl použit modulární HPLC systém Smartline (Knauer, Berlín, Německo) složený ze modulů Smartline Pump 1000, Smartline Manager 5000 a Smartline UV Detector 2600.

Pro určení optické otáčivosti separovaných stereoizomerů byl použit detektor Chiralyser-MP (IBZ Messtechnik GmbH, Springe, Německo). Citlivost přístroje „range“ byla nastavena na 4 milistupně, zbylé parametry byly ponechány v továrním nastavení („AVR“ = 0 s; „base offset“ = 500 mV).

Pro studium stability byla použita termostatová lázeň Haake B3 s ponorným oběhovým čerpadlem C1 (Haake, Karlsruhe, Německo).

## 4. Diskuze a výsledky:

### 4.1 Přístup k semipreparativní izolaci stereoizomerů itrakonazolu

Cílem práce bylo vyvinout metodu pro separaci čtyř stereoizomerů *cis*-itakonazolu pro analytické a zejména semipreparativní účely (získání čistých stereoizomerů v množství jednotek miligramů každého stereoizomeru). Vzhledem k tomu, že stereoizomery mají být dále testovány na biologickou aktivitu, bylo nutné izolovat analyty v čisté formě bez jakýchkoli aditiv (potenciálně škodlivých pro biologický systém, např. pro buněčné kultury). Významným parametrem, který byl při vývoji semipreparativních metod sledován, je spotřeba mobilní fáze a možnosti jejího snížení. Nejjednodušším přístupem je recyklace mobilní fáze. V časovém okně analýzy, kdy nedochází k eluci žádného analytu, můžeme mobilní fázi sbírat a použít pro další analýzu. Tento přístup má však dvě nevýhody. Jednak se mobilní fáze může kontaminovat, což v praxi vede ke změně retenčních časů a rozlišení a kontaminaci purifikovaných látek. Druhou nevýhodou je nemožnost použití gradientu, který ve většině aplikací vede ke zkrácení času separace.

Podstatná byla volba rozpouštědel. Pro preparativní chromatografii je výhodné použít těkavá rozpouštědla, která umožňují rychlé zakoncentrování sbíraného eluátu. Tím je snížena náročnost na skladování eluátu; rychlé odpaření do sucha zároveň zabraňuje racemizaci v roztoku a jiným možnostem degradace analytů (oxidace apod.). V případě itrakonazolu jsme také limitováni rozpustností této sloučeniny. Jeho rozpustnost je nízká. Pro rozpustnost ve vodě se uvádí rozmezí od 1,8  $\mu\text{g/ml}$ <sup>[132]</sup> po 5  $\mu\text{g/ml}$ <sup>[133]</sup>. V organických rozpouštědlech (dimethylsulfoxid, formamid) je rozpustnost vyšší, cca do 0,5  $\text{mg/ml}$ <sup>[47]</sup>. Rozpustnost itrakonazolu však může být zvýšena tvorbou disperzí s vybranými polymery - v takovém případě je možno dosáhnout rozpustnost itrakonazolu až 25  $\text{mg/ml}$  ve vodném roztoku s  $\text{pH} = 1$ <sup>[134]</sup>. V našem případě se podařilo připravit roztoky do koncentrace 2000  $\text{mg/l}$  (ve směsi methanol:acetonitril 5:2 (v/v) ). Rozdíly v rozpustnostech patrně souvisí s formou, ve které je itrakonazol dodáván - v práci Thienponta a kol.<sup>[113]</sup> je racemát itrakonazolu extrahován z tablet, naše laboratoř má k dispozici vysoce čistý standard.

Stereoizomery jsou v průběhu práce označovány podle konfigurace příslušných chirálních center (viz obrázek 6). Experimentální určení konfigurace stereoizomerů je obsahem kapitoly 4.8.

## 4.2 Analytická separace racemátu itrakonazolu na koloně Lux Cellulose-1

Prvním krokem ve vývoji metody byl pokus o separaci itrakonazolu na koloně Lux Cellulose-1. Tato kolona obsahuje silikagel o průměru 5  $\mu\text{m}$  pokrytý tris(3,5-dimethylkarbamátem) celulózy. Jedná se o generickou stacionární fázi odvozenou od fáze Chiralcel OD-H firmy Daicel. 3,5-dimethylkarbamátové kolony (celulózové i amyložové) jsou jedním z nejpoužívanějších typů při screeningu a následném vývoji separačních metod v chirální HPLC. Vzhledem k tomu, že Pyrgaki a kol. dosáhli na této koloně částečné separace itrakonazolu<sup>[112]</sup>, byla tato kolona naší první volbou.

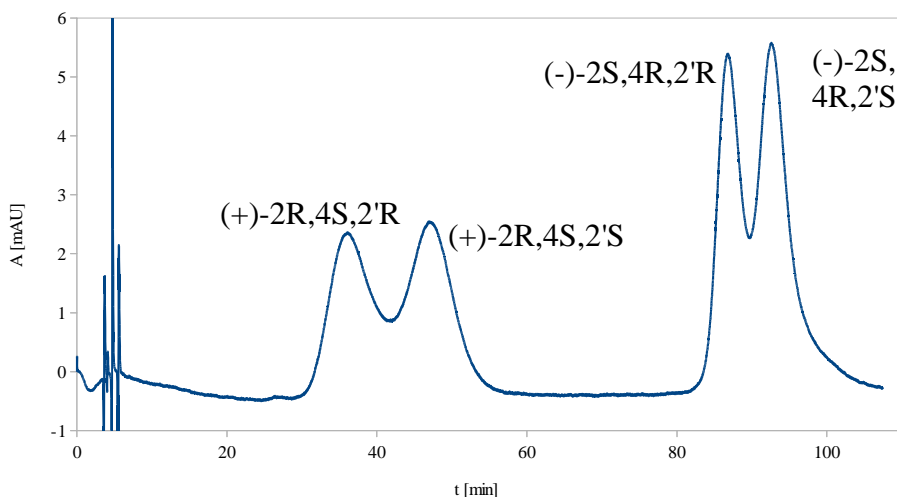
Výhodou polysacharidových kolon je možnost separace v módu normálních, reverzních i polárních organických fází, které obvykle nabízejí velmi rozdílnou enantioselektivitu. Separace enantiomerů *cis*-itrakonazolu byla proto studována na výše zmíněné koloně analytických rozměrů (250  $\times$  4,6 mm) s využitím všech těchto módů. Za žádných podmínek však nebylo dosaženo rozdělení všech čtyř stereoizomerů.

Vzhledem k tomu, že pro účely izolace látek v semipreparativním módu je vhodné použít jako mobilní fázi těkavá rozpouštědla, byl jako první testován mód normálních fází. Složení mobilní fáze vycházelo z práce Thienponta a kol.<sup>[113]</sup> a bylo dále optimalizováno. Nejlepšího výsledku při analýze racemátu bylo dosaženo při složení mobilní fáze hexan:ethanol 7:3 (v/v) (obrázek 8). Záměna ethanolu za polárnější alkohol (tj. methanol) má za následek snížení rozlišení - viz tabulka 1 (indexy 1-4 se vztahují k píkům jednotlivých stereoizomerů). Další zvyšování podílu hexanu (rozpuštědlo s menší eluční silou) v mobilní fázi pak vede k dlouhým časům analýzy nepoužitelným v praxi.



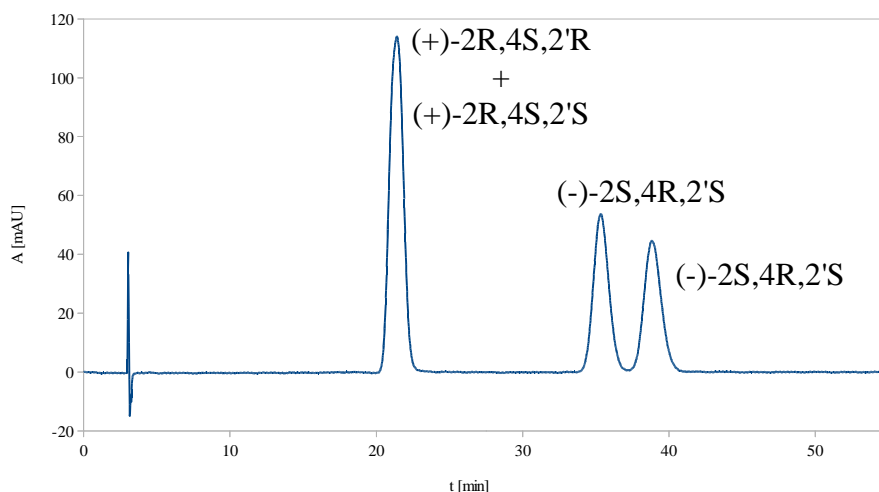
Tabulka 1: Vliv záměny ethanolu za methanol při analýze racemátu itrakonazolu na koloně Cellulose-1 v systému normálních fází:

složení mobilní fáze:	R(1,2)	R(3,4)	retenční čas posledního píku analýzy [min]
hexan:ethanol 7:3 (v/v)	0,890	0,805	92,58
hexan:ethanol:methanol 14:3:3 (v/v)	0,211	-	87,33



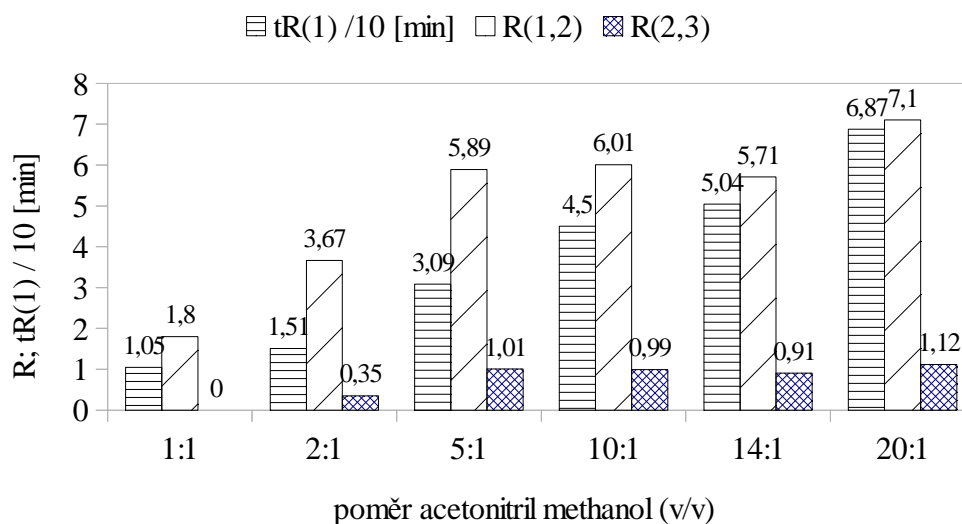
Obrázek 8: Analytická separace racemátu itrakonazolu v normálním módu. Mobilní fáze: hexan:ethanol 7:3 (v/v), průtok: 1 ml/min, nástřik: 20  $\mu$ l 100 mg/l racemátu rozpuštěného v mobilní fázi.

Dále byl testován polárně organický mód (kritériem pořadí testování byla těkavost rozpouštědel, těkavější rozpouštědla nabízí možnost rychlejšího odpaření mobilní fáze ze separovaných frakcí jednotlivých stereoizomerů). Ani zde nebylo dosaženo rozdělení racemátu na všechny 4 stereoizomery, racemát se však podařilo rozdělit na 3 frakce s poměry píků 2:1:1 (určeno interní normalizací), z nichž první je směsná (obsahuje diastereomery (+)-2R,4S,2'R a (+)-2R,4S,2'S) a zbylé dvě obsahují čisté diastereomery (-)-2S,4R,2'S, resp. (-)-2S,4R,2'R. Chromatogram je uveden na obrázku 9.



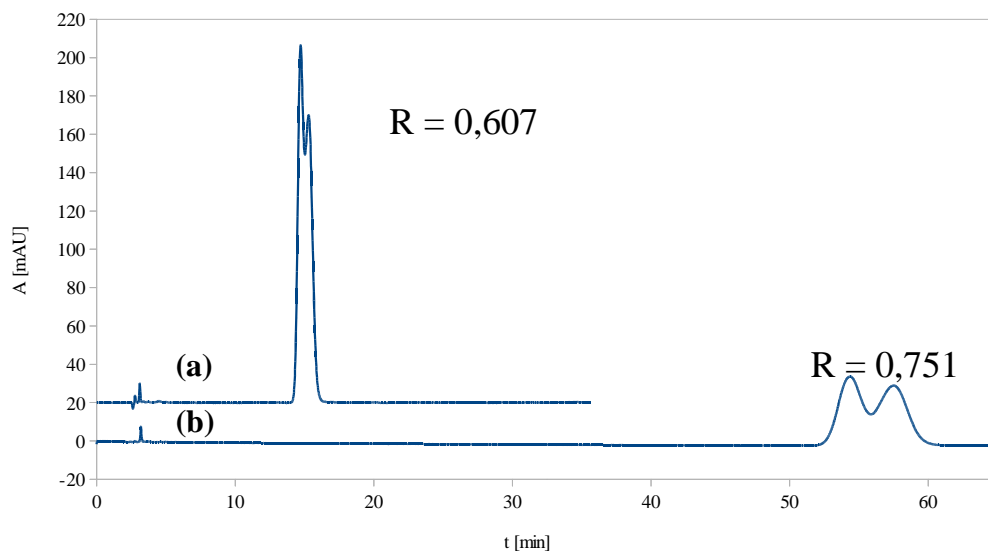
Obrázek 9: Analytická separace racemátu itraconazolu v polárně organickém módu. Mobilní fáze: methanol:acetonitril 9:1 (v/v), průtok: 1 ml/min, nástřik: 20  $\mu$ l 100 mg/l racemátu rozpuštěného v mobilní fázi.

V návaznosti na toto zjištění byl studován vliv poměru methanolu a acetonitrilu v mobilní fázi na retenční chování racemátu itraconazolu. Bylo zjištěno, že acetonitril působí jako rozpouštědlo s vyšší eluční silou. V níže uvedeném grafu (obrázek 10) je vidět retenční čas posledního píku analýzy a rozlišení s přidavkem methanolu do mobilní fáze. Je vidět, že při překročení poměru 10:1 již rozlišení druhého a třetího píku - R(2,3) - roste jen pozvolna za současného nárůstu času analýzy.

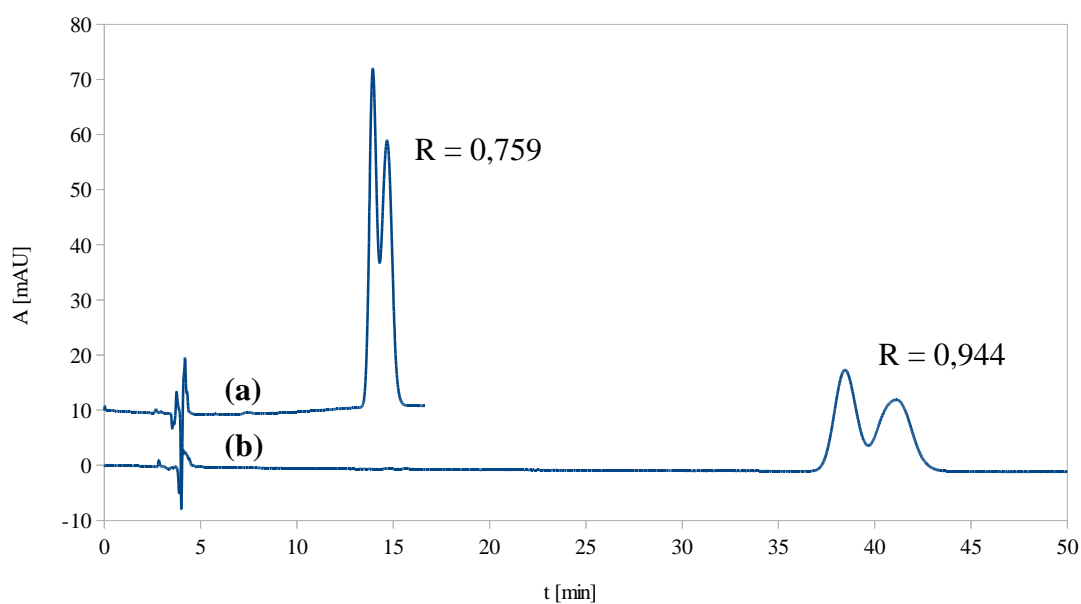


Obrázek 10: Vliv poměru methanol:acetonitril na retenci a rozlišení píků racemátu itraconazolu na koloně Lux Cellulose-1. R je rozlišení píků, tR je retenční čas, indexy píků odpovídají jejich pořadí podle obrázku 9.

Jako poslední byl testován mód reverzních fází. Voda zvyšuje retenci analytu na koloně a chování itraconazolu je podobné v kyselém i bazickém prostředí (obrázky 11 a 12). Itraconazol je separován na dvě směsné frakce, jejichž složení nebylo v rámci práce studováno. Separace analytu nedosahuje kvality separace v módu polárně organických fází a proto mód reverzních fází nebyl dále v průběhu vývoje metody uvažován. Vzhledem k obsahu vody v mobilní fázi je tento mód nejméně vhodný i z hlediska další manipulace se získanými frakcemi. Odstranění rozpouštědla ze separovaných frakcí jednoduchým odpařováním je při vyšším obsahu vody v mobilních fázích málo účinné a zdlouhavé a obvykle je třeba použít lyofilizaci.



Obrázek 11: Analytická separace racemátu itraconazolu v bazickém prostředí v reverzním módu. Průtok mobilní fáze: 1 ml/min; nástřik: 20  $\mu$ l 200 mg/l racemátu itraconazolu. Mobilní fáze: (a) 10 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  v  $\text{H}_2\text{O}$ :acetonitril 1:4 (v/v); (b) 10 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  v  $\text{H}_2\text{O}$ :acetonitril 2:3 (v/v). V chromatogramu jsou vyznačeny hodnoty rozlišení obou píků.

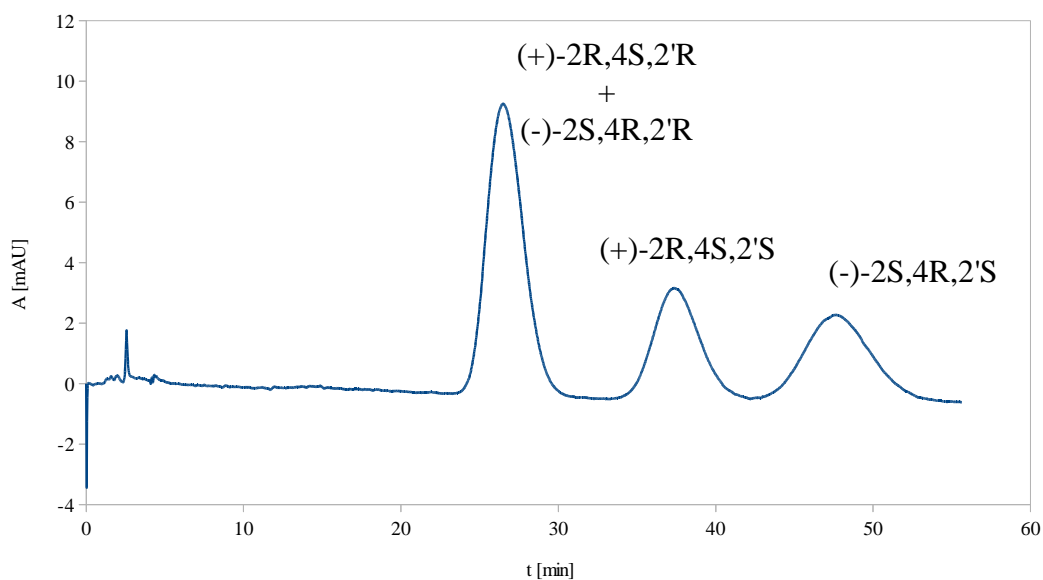


Obrázek 12: Analytická separace racemátu itraconazolu v kyselém prostředí v reverzním módu. Průtok mobilní fáze: 1 ml/min; nástřik: 20  $\mu$ l 100 mg/l racemátu itraconazolu. Mobilní fáze: (a) 0,1%  $\text{HCOOH}$  v  $\text{H}_2\text{O}$ :acetonitril 1:4 (v/v); (b) 0,1%  $\text{HCOOH}$  v  $\text{H}_2\text{O}$ :acetonitril 2:3 (v/v). V chromatogramu jsou vyznačeny hodnoty rozlišení obou píků.

Nejlepších výsledků na koloně Cellulose-1 tedy bylo dosaženo v módu polárně organických fází, kdy analýza trvala méně než 45 minut a racemát byl rozdělen na tři frakce, z nichž jedna je směsná (obsahuje 2 diastereomery) a zbylé dvě obsahují každá jeden čistý stereoizomer. Vzhledem k tomu, že ani jeden z testovaných módů neumožnil separaci racemátu itrakonazolu na 4 stereoizomery, byl racemát dále testován na koloně Lux Cellulose-3.

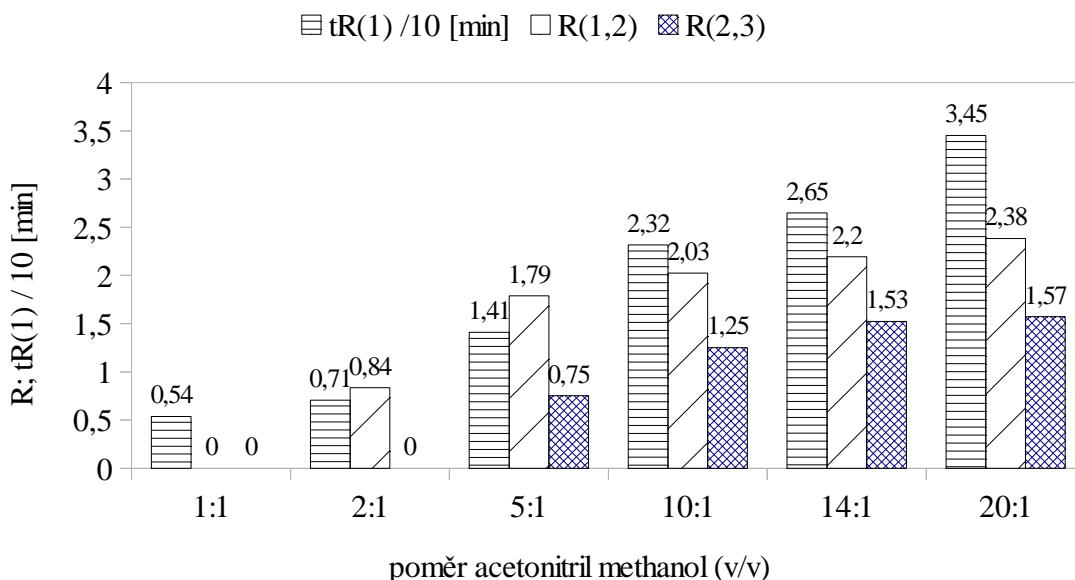
### 4.3 Analytická separace racemátu itrakonazolu na koloně Lux Cellulose-3

Kolona Lux-Cellulose-3 obsahuje jako stacionární fázi silikagel o průměru 5  $\mu\text{m}$  pokrytý tris(4-methylbenzoátem) celulózy. Jedná se o generikum kolony Chiralcel OJ-H a v literatuře je zmiňována jako komplementární k tris(3,5-dimethylkarbamátu) celulózy, tzn. kolonám typu Chiralcel OD a Lux Cellulose-1<sup>[135,136]</sup>. Vzhledem k tomu, že nejlepším módem pro separaci itrakonazolu na koloně Lux Cellulose-1 byl mód polárně organických fází, byl jako první testován tento mód. Nejlepší výsledek je uveden na obrázku 13.



Obrázek 13: Analytická separace racemátu itrakonazolu v polárně organickém módu. Mobilní fáze: methanol:acetonitril 14:1 (v/v), průtok: 1 ml/min, nástřik: 20  $\mu\text{l}$  100 mg/l racemátu rozpuštěného v mobilní fázi.

I zde byla provedena studie vlivu poměru acetonitrilu a methanolu v mobilní fázi na retenční chování itrakonazolu (obrázek 14). Ani v tomto případě nevede překročení určitého poměru methanolu a acetonitrilu (zde 14:1) ke zlepšení rozlišení, pouze nárůstu délky analýzy.



Obrázek 14: Vliv poměru methanol:acetonitril na retenci a rozlišení píků racemátu itrakonazolu na koloně Lux Cellulose-3. R je rozlišení píků, tR je retenční čas, indexy píků odpovídají jejich pořadí podle obrázku 13.

Ani na koloně Cellulose-3 se tedy nepodařilo separovat všechny stereoizomery itrakonazolu a bylo dosaženo srovnatelného výsledku jako v případě kolony Cellulose-1 (tj. separace racemátu na 3 frakce, z toho 1 je směsná). Bylo však zjištěno, že selektivita kolony je jiná a eluční pořadí stereoizomerů je zde změněno (izomer (-)-2S,4R,2'R koeluuje s izomerem (+)-2R,4S,2'R, naopak izomer (+)-2R,4S,2'S je separován).

Screening zbylých módů (normální a reverzní fáze) neprokázal stejně jako v případě kolony Lux Cellulose-1 schopnost kolony Cellulose-3 dělit racemát na 4 čisté stereoizomery - v módu normálních fází činí při složení mobilní fáze hexan:ethanol 1:1 (v/v) a průtoku 1 ml/min doba analýzy zhruba 180 minut (retenční čas posledního píku je 163,4 min) a rozlišení prvního páru píků R(1,2) = 0,5. Vzhledem k dlouhému času analýzy je tedy nepoužitelný. Mód reverzních fází pak stejně jako v případě kolony Cellulose-1 poskytuje pouze dvě směsné frakce (např. v mobilní fázi voda:acetonitril

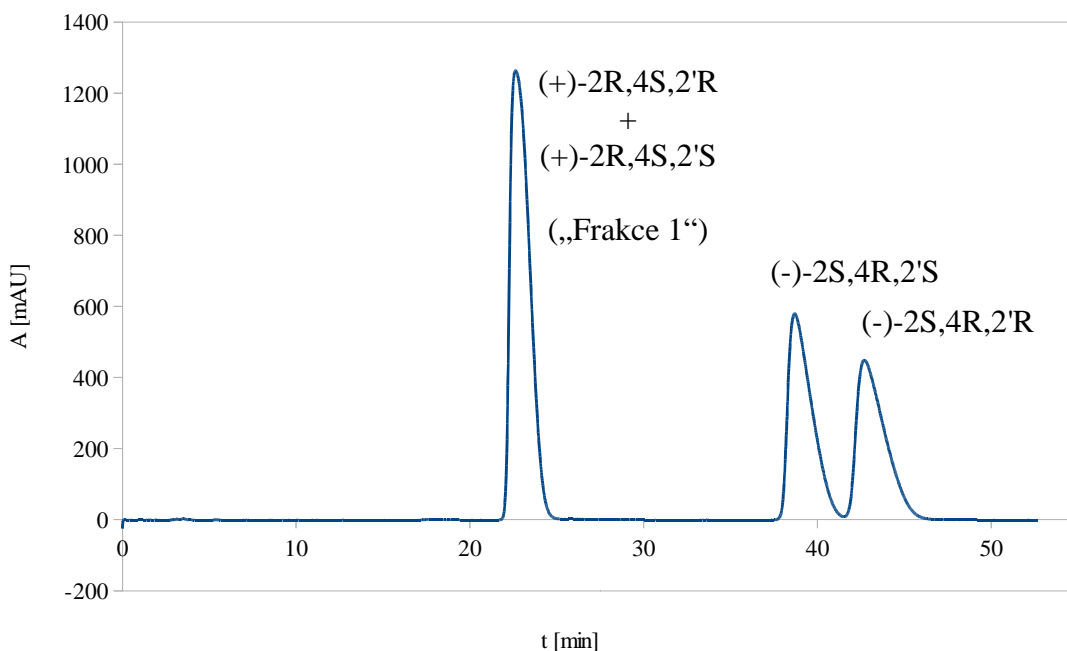
4:3 (v/v) je pro 20  $\mu$ l itrakonazolu o koncentraci 200 mg/l retenční čas druhého píku 18,5 min a rozlišení obou frakcí je rovno 1,45).

Na základě získaných poznatků jsme se rozhodli purifikační proces rozdělit na dva kroky, kdy v prvním kroku bude racemát rozdělen na 3 frakce na koloně Lux Cellulose-1 a směsná frakce z této kolony bude dále purifikována na koloně Lux Cellulose-3.

#### **4.4 Semipreparativní izolace racemátu itrakonazolu na koloně Lux Cellulose-1**

Analytická metoda pro separaci racemátu byla převedena do semipreparativního měřítka použitím kolony Lux Cellulose-1 o rozměrech 250  $\times$  10 mm (velikost částic 5  $\mu$ m) a změnou objemu smyčky z 20 na 1000  $\mu$ l. Zároveň byla změněna koncentrace itrakonazolu v nástřiku a to ze 100 mg/l na 830 mg/l. Tyto úpravy v souhrnu znamenají zhruba 400-násobné zvýšení hmotnosti nastříkovaného analytu při 4,73-násobném zvýšení objemu kolony. Celková zátěž kolony je tedy zhruba 90x vyšší. Průtok mobilní fáze byl zvýšen na 5 ml/min pro zajištění separace při délce analýzy srovnatelné s analýzou na koloně o rozměrech 250  $\times$  4,6 mm.

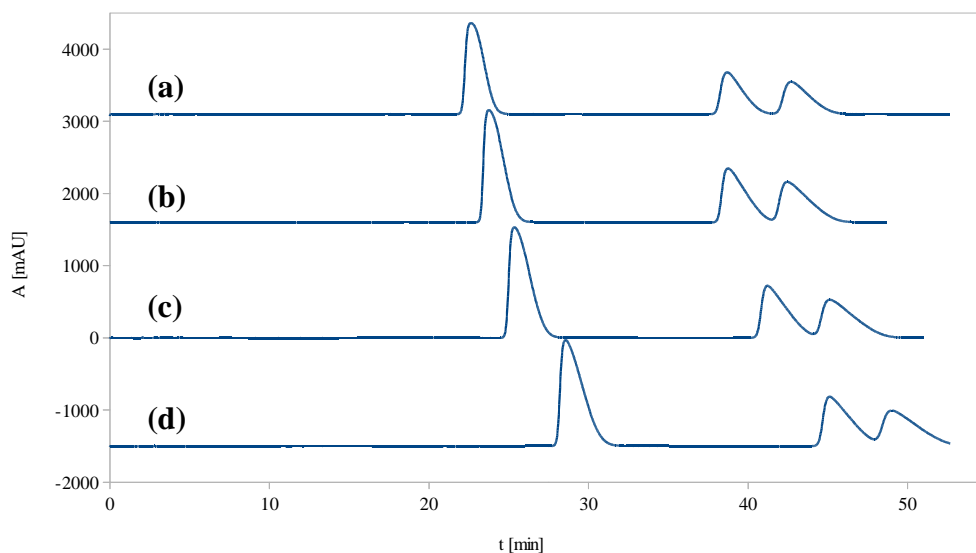
Se zvýšením zátěže kolony souvisí deformace píků pozorovaná při analýze (obrázek 15).



Obrázek 15: Analýza racemátu itraconazolu na semipreparativní koloně Lux Cellulose-1 (250 × 10 mm). Mobilní fáze: methanol:acetonitril 9:1 (v/v), průtok mobilní fáze: 5 ml/min, nástřik: 1000 µl racemátu itraconazolu o koncentraci 830 mg/l.

Při semipreparativních analýzách dochází k poměrně velké spotřebě mobilní fáze (cca 250 ml/analýza). Proto byla mobilní fáze v časech, kdy nedocházelo k eluci analytu, sbírána a použita pro další analýzy. Přes snahu o co nejmenší kontaminaci mobilní fáze byl při její recyklaci pozorován posun v retenčních časech a změna tvaru separovaných píků. Přesto bylo možné mobilní fázi až 3x recyklovat bez významné kontaminace izolovaných látek (jejich čistota je diskutována v kapitole 4.7) (obrázek 16).



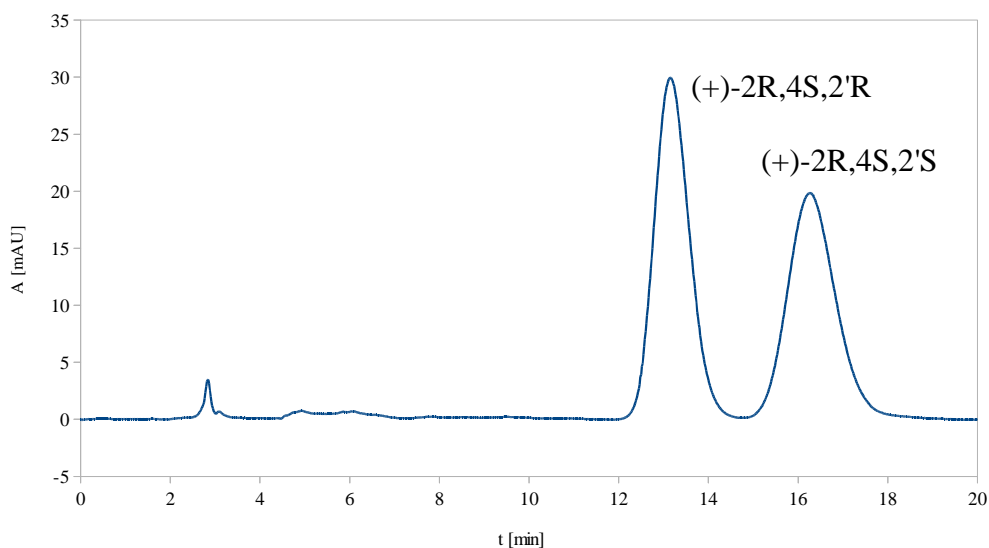


Obrázek 16: Porovnání chromatogramu separace racemátu itraconazolu na semipreparativní koloně Lux Cellulose-1 při použití (a) čistě; (b) 1x recyklované; (c) 2x recyklované; (d) 3x recyklované mobilní fáze.

Izolované frakce byly vysušeny za laboratorní teploty v proudu dusíku a uschovány v hlubokomrazicím boxu při 80°C.

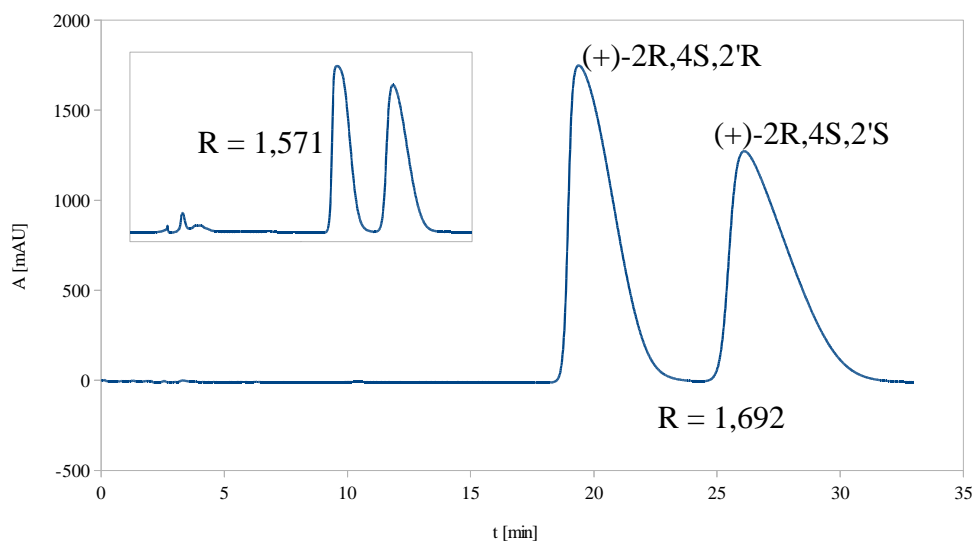
#### 4.5 Optimalizace separace směsi (+)-2R,4S,2'R a (+)-2R,4S,2'S diastereomerů itraconazolu na koloně Lux Cellulose-3

Po získání dostatečného množství Frakce 1 itraconazolu (směs diastereomerů (+)-2R,4S,2'R a (+)-2R,4S,2'S) na semipreparativní koloně Cellulose-1 (zhruba 25 mg) byla optimalizována separace této frakce na koloně Cellulose-3 v polárně organickém módu v analytickém měřítku. Vzhledem k dříve zjištěnému retenčnímu chování diastereomerů (+)-2R,4S,2'R a (+)-2R,4S,2'S na použité koloně bylo možné snížit obsah acetonitrilu v mobilní fázi oproti separaci racemátu na poměr methanol:acetonitril 5:1 (v/v) a zkrátit tak dobu analýzy. Výsledný chromatogram je znázorněn na obrázku 17.



Obrázek 17: Analytická separace Frakce 1 itrakonazolu v polárně organickém módu. Mobilní fáze: methanol:acetonitril 5:1 (v/v), průtok: 1 ml/min, nástřik: 20  $\mu$ l 100 mg/l Frakce 1 rozpuštěné v mobilní fázi.

Metoda na separaci Frakce 1 byla poté přenesena na semipreparativní verzi kolony Cellulose-3. Stejně jako u transferu metody pro izolaci racemátu byl změněn rozměr kolony na  $250 \times 10$  mm (velikost částic 5  $\mu$ m) a objem smyčky ze 20 na 1000  $\mu$ l. Průtok mobilní fáze byl zvýšen na 5 ml/min, aby bylo dosaženo porovnatelné délky analýzy jako na koloně analytických rozměrů. Koncentrace itrakonazolu v nástřiku byla zvýšena ze 100 mg/l na 1500 mg/l. Zátěž kolony byla tedy zvýšena zhruba 160x. Zvýšení zátěže kolony způsobilo deformaci separovaných píků, avšak obě látky bylo možné separovat. Pro snížení rizika možné křížové kontaminace byly separační podmínky dále upraveny změnou poměru methanolu a acetonitrilu v mobilní fázi z 5:1 na 10:1 (v/v). Tato úprava separačních podmínek umožnila separaci obou diastereomerů s rozlišením  $R = 1,7$  (obrázek 18).

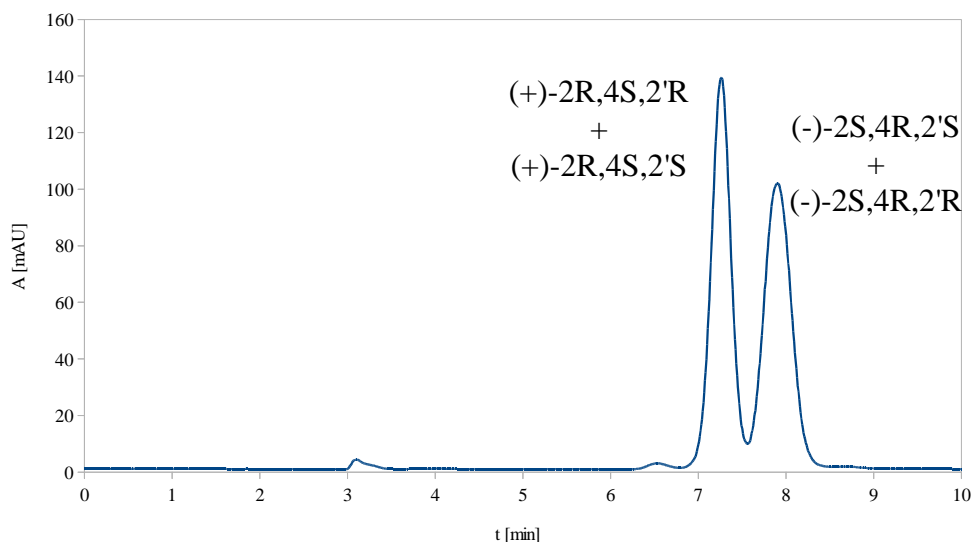


Obrázek 18: Analýza Frakce 1 itraconazolu na semipreparativní koloně Lux Cellulose-3 (250 × 10 mm). Mobilní fáze: methanol:acetonitril 10:1 (v/v), průtok mobilní fáze: 5 ml/min, nástřik: 1000 µl Frakce 1 o koncentraci 1500 mg/l. Do grafu je vložen výřez z analýzy s mobilní fází methanol:acetonitril 5:1 (v/v) o koncentraci itraconazolu 1000 mg/l (zbylé podmínky jsou shodné).

Také v tomto případě bylo možné mobilní fázi 3x recyklovat bez zásadního vlivu na čistotu izolovaných stereoizomerů a na délku analýzy.

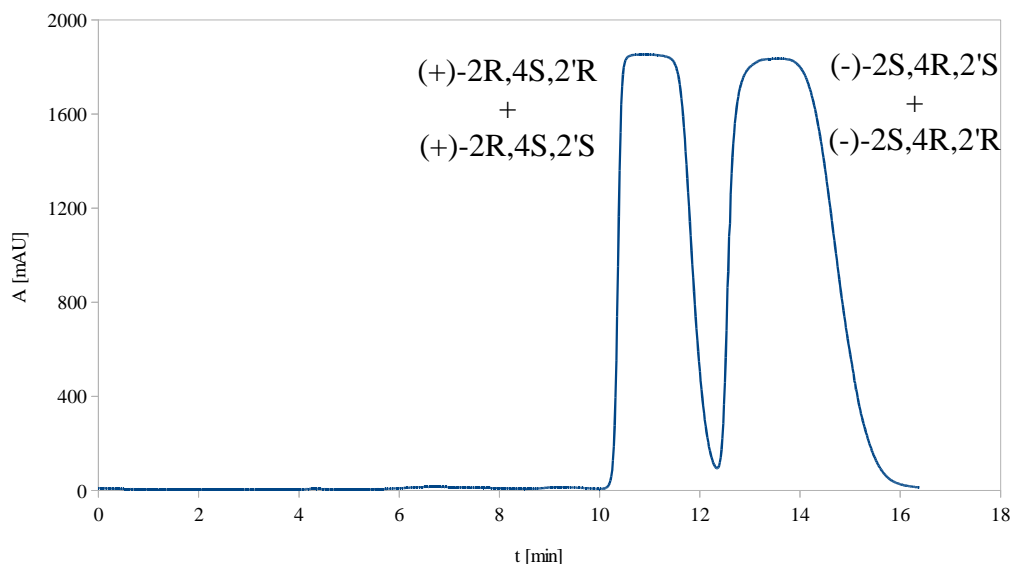
#### 4.6 Vývoj metody pro presepaci Frakce 1 na koloně Cellulose-1

Vzhledem k tomu, že při sběru frakcí dochází ke ztrátám materiálu při nástřiku, byly pro zvýšení produktivity práce při izolaci stereoizomerů (+)-2R,4S („Frakce 1“) studovány možnosti rychlé presepaci Frakce 1 z racemátu *cis*-itraconazolu. Možným řešením je zvýšení eluční síly mobilní fáze v prvním kroku, takže celá separace je rychlejší na úkor snížení rozlišení prvního a druhého píku (tj. Frakce 1 a stereoizomeru (-)-2S,4R,2'R) a ztráty separace druhého a třetího píku (diastereomery (-)-S,4R). Optimalizací složení mobilní fáze jsme došli ke složení mobilní fáze methanol:acetonitril 1:1 (v/v) a dobu presepaci se tak podařilo snížit z cca 45 minut na 10 minut (obrázek 19).



Obrázek 19: Analytická separace racemátu itraconazolu na 2 frakce na koloně Cellulose-1. Mobilní fáze: methanol/acetonitril 1:1 (v/v); průtok mobilní fáze: 1 ml/min; nástřik: 20  $\mu$ l 200 mg/l racemátu itraconazolu.

Poté byla metoda přenesena na semipreparativní kolonu o rozměrech 250  $\times$  10 mm, velikost částic 5  $\mu$ m. Objem smyčky byl zvýšen z 20 na 1000  $\mu$ l. Koncentrace Frakce 1 byla zvýšena ze 200 mg/l na 2000 mg/l. Průtok mobilní fáze byl zvýšen na 5 ml/min pro dosažení porovnatelného času analýzy jako v případě analytické separace. Zátěž kolony tak byla zvýšena cca 210x. Přetížení bylo nutno kompenzovat mírným snížením eluční síly mobilní fáze. V semipreparativním módu byla proto použita mobilní fáze o složení methanol:acetonitril 5:2 (v/v) (obrázek 20). V tomto případě byla mobilní fáze recyklována jedenkrát. Další recyklace způsobovala zhoršení separace obou frakcí.



Obrázek 20: Semipreparativní separace racemátu itrakonazolu na 2 frakce na koloně Cellulose-1. Mobilní fáze: methanol/acetonitril 5:2 (v/v); průtok mobilní fáze: 5 ml/min; nástřik: 1000  $\mu$ l racemátu itrakonazolu o koncentraci 2000 mg/l. Rozlišení R = 0,868.

#### 4.7 Určení chirální čistoty a stability a optické otáčivosti izolovaných stereoizomerů

Chirální čistota izolovaných stereoizomerů byla zjištěna pomocí dříve optimalizovaných separačních metod na analytických kolonách Lux Cellulose-1 a Lux Cellulose-3. Pro stanovení chirální čistoty stereoizomerů (-)-2S,4R,2'S a (-)-2S,4R,2'R byla využita separace na koloně Lux Cellulose-1 (elují jako druhý, resp. třetí pík, tzn. odděleně od ostatních). Pro stanovení čistoty stereoizomeru (+)-2R,4S,2'S byla využita separace na koloně Lux Cellulose-3 (eluje odděleně jako druhý pík). Pro stanovení čistoty stereoizomeru (+)-2R,4S,2'R bylo vzhledem k faktu, že v obou případech koeluuje s jiným stereoizomerem, nutné provést analýzu na obou kolonách. Chirální čistota všech stereoizomerů byla vyšší než 98%.

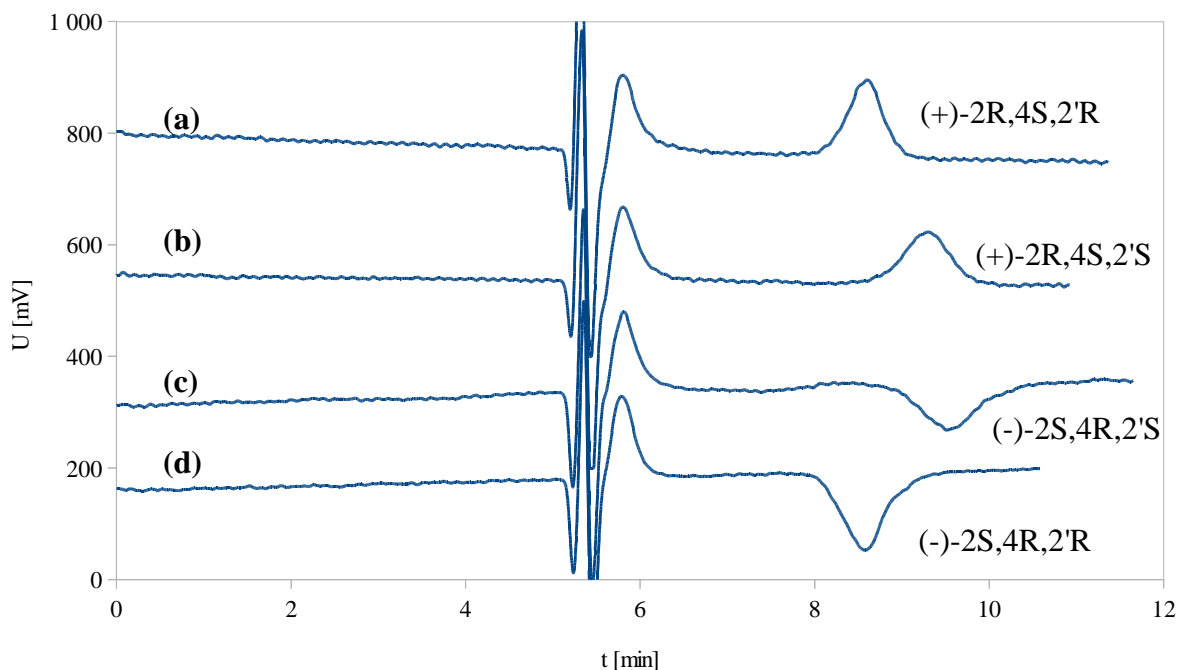
Metabolické studie biologicky aktivních látek většinou probíhají za fyziologických podmínek (důležité je zejména pH, teplota a složení živného roztoku). Pro úspěšnou studii chirálního metabolismu je důležité, aby byl izomer byl v reakčním prostředí odolný vůči racemizaci. Dalším krokem v kontrole izolovaných stereoizomerů byla proto kontrola jejich stability za podmínek používaných v metabolických studiích.

Stereoizomery byly zředěny na koncentraci 1 mM živným roztokem DMEM a ponechány v termostatu vyhřívaném na 37 °C. Na počátku experimentu (tzn. v čase 0 hod) a dále po 24 a 48 hodinách byla odebrána část roztoku k analýze. Všechny odebrané vzorky byly kontrolovány stejným způsobem jako při výše zmíněné kontrole čistoty. Stereoizomery nepodléhaly za výše uvedených podmínek významné racemizaci a nebyly pozorovány ani jiné degradační procesy. Výsledky z měření stability shrnuje Tabulka 2.

Tabulka 2: Chirální čistota jednotlivých stereoizomerů itraconazolu v průběhu stabilitní studie

enantiomer\čas	0 hod.	24 hod.	48 hod.
(+)-2R,4S,2'R	99,80%	99,90%	99,68%
(+)-2R,4S,2'S	99,00%	98,90%	99,20%
(-)-2S,4R,2'S	98,60%	97,70%	98,60%
(-)-2S,4R,2'R	98,40%	98,40%	98,00%

Po určení čistoty stereoizomerů byla s pomocí detektoru optické otáčivosti Chiralysen-MP (IBZ Messtechnik, Německo) určena optická otáčivost jednotlivých stereoizomerů. Čisté stereoizomery byly dávkovány na kolonu Cellulose-3 (250 × 4,6 mm) a eluovány mobilní fází o složení methanol:acetonitril 2:1 (v/v). Detektor byl připojen do série za UV/VIS detektor a nastaven na nejvyšší citlivost („RANGE“ = 4 mdeg). Chromatogramy jednotlivých stereoizomerů zaznamenané detektorem optické otáčivosti ukazuje obrázek 21. Relativní polohy píků odpovídají pořadí stereoizomerů na koloně Cellulose-3 v systému fází methanol:acetonitril (obrázek 13, kapitola 4.3).



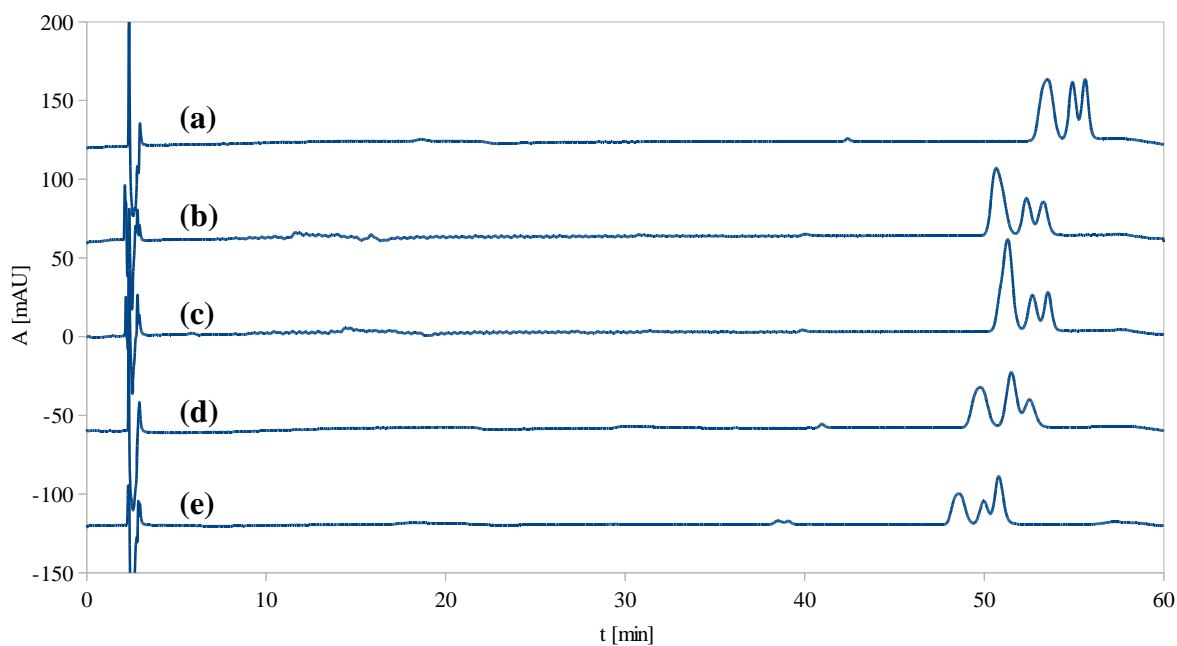
Obrázek 21: Optická otáčivost stereoizomerů *cis*-itrakonazolu. (a) stereoizomer (+)-2R,4S,2'R; (b) stereoizomer (+)-2R,4S,2'S; (c) stereoizomer (-)-2S,4R,2'S; (d) stereoizomer (-)-2S,4R,2'R. Mobilní fáze: methanol:acetonitril 2:1 (v/v); průtok mobilní fáze: 1 ml/min; nástřik: 20  $\mu$ l 1000 mg/l každého ze stereoizomerů.

#### 4.8 Identifikace stereoizomerů itrakonazolu

Stanovení absolutní konfigurace izolovaných stereoizomerů itrakonazolu bylo provedeno s využitím metody popsané v práci Kunzeho a kol.<sup>[29]</sup>. Tito autoři ve své metodě určili eluční pořadí jednotlivých stereoizomerů nástřikem standardů čistých stereoizomerů (poskytnutých autorům firmou Sepracor Inc. (Marlborough, USA)).

Racemát byl analyzován na koloně Chiralpak AS-RH (Daicel, Ósaka, Japonsko) (150  $\times$  4,6 mm, 5  $\mu$ m) gradientovou elucí acetonitrem a 5 mM vodným roztokem octanu amonného. Byl použit gradient z literatury, který byl pouze doplněn o krátký úsek eluce 80% mobilní fáze A (acetonitril) a následnou ekvilibraci kolony (snížení procenta mobilní fáze A na počáteční podmínky a krátké promytí kolony za těchto podmínek - viz část 3.2.1). Pro připsání absolutní konfigurace jednotlivým píkům a identifikaci jednotlivých stereoizomerů byl nástřiknut racemát a následně racemát obohacený jednotlivými stereoizomery v poměru racemát:stereoizomer 4:1 (v/v) (s výjimkou stereoizomeru (-)-2S,4R,2'R, který byl smíchán v poměru 1:1 z důvodu slabší odezvy tohoto stereoizomeru při poměru 4:1). Tento přístup eliminuje rozdíly v retenčních

časech, které by při gradientové eluci mohly vzniknout při oddělených analýzách racemátu a stereoizomerů. Na obrázku 22 jsou znázorněny chromatogramy racemátu a racemátů s přidavky stereoizomerů. I přes velmi malé rozlišení prvních dvou eluujících stereoizomerů je možno na základě porovnání s výsledky práce Kunzeho a kol.<sup>[29]</sup> ze tvarů píků ve spikovaných racemátech připsat absolutní konfiguraci jednotlivým eluujícím stereoizomerům.



Obrázek 22: Separace itrakonazolu gradientovou elucí na koloně Chiralpak AS-RH. (a) čistý racemát; (b) racemát spikovaný stereoizomerem (+)-2R,4S,2'S; (c) racemát spikovaný stereoizomerem (+)-2R,4S,2'R; (d) racemát spikovaný stereoizomerem (-)-2S,4R,2'S; (e) racemát spikovaný stereoizomerem (-)-2S,4R,2'R. Celková koncentrace itrakonazolu činila ve všech případech 100 mg/l.

Touto metodou byla určena absolutní konfigurace všech izolovaných stereoizomerů a zpětně tak byly identifikovány píky v dříve naměřených chromatogramech.



## 5. Závěr:

Pro semipreparativní izolaci stereoizomerů *cis*-ittrakonazolu byla vyvinuta dvoustupňová HPLC metoda s využitím dvou různých chirálních stacionárních fází - tris(3,5-dimethylfenylkarbamátu) celulózy a tris(4-methylbenzoátu) celulózy. Použité mobilní fáze jsou pouze směsi čistých organických rozpouštědel (methanol a acetonitril) bez přídavku dalších aditiv, která by mohla představovat potenciální problém pro biologický systém, ve kterém budou stereoizomery dále testovány. Podle našich znalostí se jedná o první práci, která umožňuje pomocí chirální kapalinové chromatografie separaci *cis*-ittrakonazolu na všechny čtyři stereoizomery a jejich izolaci. Izolované látky byly testovány na stabilitu v živném roztoku za fyziologických podmínek, byla určena jejich optická otáčivost a srovnáním s dříve publikovanou prací byla určena jejich absolutní konfigurace. Nalezená metoda bude využita pro izolaci stereoizomerů ittrakonazolu, které budou postoupeny k biologickým zkouškám.

## 6. Literatura:

- [1] - D. Lincová, H. Farghali et al., *Základní aplikovaná farmakologie*, kapitola 16, 2007, Galén, Praha.
- [2] - F. C. Odds, A. J. P. Brown, N. A.R. Gow, *Trends Microbiol* **11** (2003), 272.
- [3] - Ana Espinel-Ingroff, *Rev. Iberoam. Micol.* **20** (2003), 121.
- [4] - Nafsika H. Georgopapadakou, *Curr. Opin. Microbiol.* **1** (1998), 547.
- [5] - F. C. Odds, *Mycologist* **17** (2003), 51.
- [6] - K. Monostory, E. Hazai, L. Vereczkey, *Chem.-Biol. Interact.* **147** (2004), 331.
- [7] - S. G. Küçükgülzel, S. Senkardes, *Eur. J. Med. Chem.* **97** (2015), 786.
- [8] - S. G. Küçükgülzel, P. Çıkla-Süzgün, *Eur. J. Med. Chem.* **97** (2015) 830.
- [9] - Richard J. Holt, *J. Cutan. Pathol.* **3**, (1976), 45.
- [10] - D. Sharma, B. Narasimhan, P. Kumar, V. Judge, R. Narang, E. De Clercq, J. Balzarini, *Eur. J. Med. Chem.* **44** (2009), 2347.
- [11] - H. Matsui, Y. Sakanashi, T. M. Oyama, Y. Oyama, S. Yokota, S. Ishida, Y. Okano, T. B. Oyama, Y. Nishimura, *Toxicology* **248** (2008), 142.
- [12] - J. K. Sahu, S. Ganguly, A. Kaushik, *Chin. J. Nat. Med.* **11** (2013), 456.
- [13] - E. K. Manavathu, J. L. Cutright, P. H. Chandrasekar, *Antimicrob. Agents Ch.* **42**, (1998), 3018.
- [14] - M. Cuenca-Estrella, *Clin. Microbiol. Infect.* **20** (2014), 54.
- [15] - A. M. Sugar, *Drug Resist. Update.* **1**, (1998), 89.
- [16] - P. Shao, L. Huang, P. Hsueh, *Int. J. Antimicrob. Ag.* **30** (2007), 487.
- [17] - A. Bansal, A. Pande, *Journal of Patient Safety & Infection Control* **1** (2013), 25.
- [18] - J. Heeres, L. J. J. Backx, J. Van Cutsem, *J. Med. Chem.* **27**, (1984), 894.
- [19] - W. Shi, B. A. Nacev, S. Bhat, J. O. Liu, *ACS Med. Chem. Lett.* **1**, (2010), 155.
- [20] - James Leyden, *J. Am. Acad. Dermatol.* **38** (1998), 42.
- [21] - M. Schäfer-Korting, H. C. Korrting, F. Amann, R. Peuser, A. Lukacs, *Antimicrob. Agents Chemother.* **35** (1991), 2053.
- [22] - R. F. Hector, *Clin. Tech. Small Anim. Pract.* **20** (2005), 240.
- [23] - C. H. W. Koks, P. L. Meenhorst, A. Bult, J. H. Beijnen, *Pharmacol. Res.* **46** (2002), 195.
- [24] - N. Kumar, S. Goindi, *Int. J. Pharm.* **472** (2014), 224.

- [25] - E. Kaminska, M. Tarnacka, K. Kolodziejczyk, M. Dulski, D. Zakowiecki, L. Hawelek, K. Adrjanowicz, M. Zych, G. Garbacz, K. Kaminski, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **88** (2014), 1094.
- [26] - Y. Takesue, S. Oda, S. Fujishima, H. Mikamo, N. Aikawa, *J. Infect. Chemother.* **18** (2012), 515.
- [27] - Z. K. Nagy, A. Balogh, B. Démuth, H. Pataki, T. Vigh, B. Szabó, K. Molnár, B. T. Schmidt, P. Horák, G. Marosi, G. Verreck, I. Van Assche, M. E. Brewster, *Int. J. Pharm.* **480** (2015), 137.
- [28] - C. Duret, N. Wauthoz, T. Sebti, F. Vanderbist, K. Amighi, *Int. J. Pharm.* **428** (2012), 103.
- [29] - K. L. Kunze, W. L. Nelson, E. D. Kharasch, K. E. Thummel, N. Isoherranen, *Drug Metab. Dispos.* **34** (2006), 583.
- [30] - B. Bar-Oz, M. E. Moretti, R. Bishai, G. Mareels, T. Van Tittelboom, J. Verspeelt, G. Koren, *Am. J. Obstet. Gynecol.* **183** (2000), 617.
- [31] - G. M. Tiboni, F. Marotta, A. Del Corso, F. Giampietro, *Toxicol. Lett.* **167** (2006), 8.
- [32] - S. R. Ahmad, S. J. Singer, B. G. Leissa, *Lancet* **357** (2001), 1766.
- [33] - R. Vollenbroich, M. T. Maeder, D. Weilenmann, *Int. J. Cardiol.* **172** (2014), 170.
- [34] - A. Mohandas, B. Bhuwan Roy, A. Sapara, *Eur. Psychiat.* **28** (2013), 2178 (Supplement 1).
- [35] - D. Mittal, j. Wikaitis, *Psychosomatics* **44** (2003), 260.
- [36] - D. B. Bittleman, J. Stapleton, T. B. Casale, *J. Allergy Clin. Immunol.* **94** (1994), 270.
- [37] - F. S. C. Biancalana, L. Lyra, M. L. Moretti, A. Z. Schreiber, *Diagn. Micr. Infec. Dis.* **71** (2011), 378.
- [38] - J. Dogra, N. Aneja, *Int. J. Antimicrob. Ag.* **4** (1994), 309.
- [39] - J. Kim, J. Y. Tang, R. Gong, J. Kim, J. J. Lee, K. V. Clemons, C. R. Chong, K. S. Chang, M. Fereshteh, D. Gardner, T. Reya, J. O. Liu, E. H. Epstein, D. A. Stevens, P. A. Beachy, *Cancer Cell* **17** (2010), 388.
- [40] - H. M. Korashy, D. R. Brocks, A. O. S. El-Kadi, *Cancer Lett.* **258** (2007), 135.
- [41] - C. R. Chong, J. Xu, J. Lu, S. Bhat, D. J. Sullivan Jr., J. O. Liu, *ACS Chem. Biol.* **2** (2007), 263.
- [42] - J. R.P.M. Strating, L. van der Linden, L. Albuлесcu, J. Bigay, M. Arita, L. Delang, P. Leyssen, H. M. van der Schaar, K. H.W. Lanke, H. J. Thibaut, R.

- Ulferts, G. Drin, N. Schlinck, R. W. Wubbolts, N. Sever, S. A. Head, J. O. Liu, P. A. Beachy, M. A. De Matteis, M. D. Shair, V. M. Olkkonen, J. Neyts, F. J. M. van Kuppeveld, *Cell Reports* **10** (2015), 600.
- [43] - A. C. Pasqualotto, D. W. Denning, *Int. J. Antimicrob. Ag.* **30** (2007), 93.
- [44] - Y. Liu, Z. Liu, X. Cao, X. Liu, H. He, Y. Yang, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **21** (2011), 4779.
- [45] - L. Nováková, M. Douša a kol., *Moderní HPLC separace v teorii a praxi I.*, kapitola 4, 2013, Europrint a.s., Praha.
- [46] - L. R. Snyder, J. J. Kirkland, J. L. Glajch, *Practical HPLC Method Development, second edition*, kapitola 12, 1197, John Wiley & Sons, Inc., Hoboken.
- [47] - Itraconazole, Item No. 13288, Product Information, Cayman Chemical, Ann Arbor, USA, 2013.
- [48] - M. Lämmerhofer, *J. Chromatogr. A*, **1217** (2010), 814.
- [49] - C. E. Dalgliesh, *J. Chem. Soc.* **137** (1952), 3940.
- [50] - H. Y. Aboul-Enein, I. Ali, *Il Farmaco* **57** (2002), 513.
- [51] - G. Felix, *J. Chromatogr. A*, **906** (2001), 171.
- [52] - E. R. Francotte, *J. Chromatogr. A* **906** (2001), 379.
- [53] - A. Cavazzini, L. Pasti, A. Massi, N. Marchetti, F. Dondi, *Anal. Chim. Acta* **706** (2011), 205.
- [54] - HPLC Column Protection Guide, Version 0212, Phenomenex, Torrance, USA, 2012.
- [55] - E. Francotte, T. Zhang, *J. Chromatogr. A*, **718** (1995), 257.
- [56] - L. Thunberg, J. Hashemi, S. Andersson, *J. Chromatogr. B* **875** (2008), 72.
- [57] - P. Franco, A. Senso, L. Oliveros, C. Minguillón, *J. Chromatogr. A* **906** (2001) 155.
- [58] - J. Shen, T. Ikai, Y. Okamoto, *J. Chromatogr. A* **1363** (2014), 51.
- [59] - H. Y. Aboul-Enein, *J. Chromatogr. A* **906** (2001), 185.
- [60] - L. Peng, S. Jayapalan, B. Chankvetadze, T. Farkas, *J. Chromatogr. A* **1217** (2010), 6942.
- [61] - I. W. Wainer, M. C. Alembik, *J. Chromatogr. A* **358** (1986), 85.
- [62] - R. Isaksson, J. Roschester, J. Sandström, L.-G. Wistrand, *J. Am. Chem. Soc.* **107** (1985), 4074.
- [63] - J. P. McCarthy, *J. Chromatogr. A* **685** (1994), 349.

- [64] - S. Ma, S. Shen, H. Lee, M. Eriksson, X. Zeng, J. Xu, K. Fandrick, N. Yee, C. Senanayake, N. Grinberg, *J. Chromatogr. A* **1216** (2009), 3784.
- [65] - P. Franco, T. Zhang, *J. Chromatogr. B* **875** (2008), 48.
- [66] - K. Tachibana, A. Ohnishi, *J. Chromatogr. A* **906** (2001), 127.
- [67] - T. Zhang, D. Nguyen, P. Franco, *J. Chromatogr. A* **1217** (2010), 1048.
- [68] - P. Macaudière, M. Caude, R. Rosset, A. Tambuté, *J. Chromatogr. Sci.* **27** (1989), 583.
- [69] - C. R. Lee, J. P. Porziemsky, M. C. Aubert, A. M. Krstulovic, *J. Chromatogr. A* **539** (1991), 55.
- [70] - L. Toribio, M. J. del Nozal, J. L. Bernal, C. Alonso, J. J. Jiménez, *J. Chromatogr. A* **1144** (2007), 255.
- [71] - J. L. Bernal, L. Toribio, M. J. del Nozal, E. M. Nieto, M. I. Montequi, *J. Biochem. Biophys. Methods* **54** (2002), 245.
- [72] - J. Lee, J. T. Lee, W. L. Watts, J. Barendt, T. Q. Yan, Y. Huang, F. Riley, M. Hardink, J. Bradow, P. Franco, *J. Chromatogr. A* **1374** (2014), 238.
- [73] - K. De Klerck, D. Mangelings, D. Clicq, F. De Boever, Y. Vander Heyden, *J. Chromatogr. A* **1234** (2012), 72.
- [74] - G. Hesse, R. Hagel, *Chromatographia*, **6** (1973), 277.
- [75] - E. Francotte, *J. Chromatogr. A* **666** (1994), 565.
- [76] - Y. Okamoto, M. Kawashima, K. Yamamoto, K. Hatada, *Chem. Lett.* **13** (1984), 739.
- [77] - Y. Okamoto, M. Kawashima, K. Hatada, *J. Chromatogr. A* **363** (1986), 173.
- [78] - Y. Okamoto, Y. Kaida, *J. Chromatogr. A* **666** (1994), 403.
- [79] - J. Putnam, G. Guiochon, *J. Chromatogr. A*, **1216** (2009), 8488.
- [80] - B. Chankvetadze, L. Chankvetadze, Sh. Sidamonidze, E. Yashima, Y. Okamoto, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **14** (1996), 1295.
- [81] - B. Chankvetadze, E. Yashima, Y. Okamoto, *J. Chromatogr. A* **670** (1994), 39.
- [82] - B. Yao, F. Zhan, G. Yu, Z. Chen, W. Fan, X. Zeng, Q. Zeng, W. Weng, *J. Chromatogr. A* **1216** (2009), 5429.
- [83] - R. Cirilli, S. Alcaro, R. Fioravanti, D. Secci, S. Fiore, F. La Torre, F. Ortuso, *J. Chromatogr. A* **1216** (2009), 4673.
- [84] - S. Fanali, G. D'Orazio, K. Lomsadze, S. Samakashvili, B. Chankvetadze, *J. Chromatogr. A* **1217** (2010), 1166.

- [85] - R. Cirilli, R. Costi, R. Di Santo, F. La Torre, M. Pierini, G. Siani, *Anal. Chem.* **81** (2009), 3560.
- [86] - K. S. S. Dossou, P. Chiap, B. Chankvetadze, A. C. Servais, M. Fillet, J. Crommen, *J. Chromatogr. A* **1216** (2009), 7450.
- [87] - R. Geryk, K. Kalíková, J. Vozka, D. Plecítá, M. G. Schmid, E. Tesařová, *J. Chromatogr. A* **1363** (2014), 155.
- [88] - R. Cirilli, R. Costi, R. Di Santo, R. Ferretti, F. La Torre, L. Angiolella, M. Micocci, *J. Chromatogr. A* **942** (2002), 107.
- [89] - H. Y. Aboul-Enein, I. Ali, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **27** (2002), 441.
- [90] - H. Y. Aboul-Enein, I. Ali, *Fresen. J. Anal. Chem.* **370** (2001), 951.
- [91] - I. Ali, H. Y. Aboul-Enein, *Biomed. Chromatogr.* **17** (2003), 113.
- [92] - I. Ali, H. Y. Aboul-Enein, V. D. Gaitonde, P. Singh, M. S. M. Rawat, B. Sharma, *Chromatographia* **70** (2009), 223.
- [93] - A. Mskhiladze, M. Karchkhadze, A. Dadianidze, S. Fanali, T. Farkas, B. Chankvetadze, *Chromatographia* **76** (2013), 1449.
- [94] - E. C. Laignier Cazedey, R. de Cássia Pimentel Azevedo, É. de Fátima Silva e Magali Benjamim de Araújo, *Quim. Nova* **30** (2007), 774.
- [95] - I. Kasagić Vujanović, A. Malenović, M. Jovanović, T. Rakić, B. Jančić Stojanović, D. Ivanović, *Acta Pharm.* **63** (2013), 159.
- [96] - M. Wharton, M. Geary, P. Sweetman, L. Curtin, N. O'Connor, *J. Chromatogr. Sci.* **52** (2014), 187.
- [97] - W. Zheng, X. Fang, L. Wang, Y. Zhang, *Int. J. Pharm.* **436** (2012), 291.
- [98] - J. C. Van De Steene, W. E. Lambert, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **19** (2008), 713.
- [99] - M. Vogeser, A. Geiger, R. Herrmann, U. Kobold, *Clin. Biochem.* **42** (2009), 915.
- [100] - M. Yao, L. Chen, N. R. Srinivas, *J. Chromatogr. B* **752** (2001), 9.
- [101] - J.-B. Gordien, A. Pigneux, S. Vigouroux, R. Tabrizi, I. Accoceberry, J.-M. Bernadou, A. Rouault, M.-C. Saux, D. Breilh, *J. Pharmaceutic. Biomed.* **50** (2009), 932.
- [102] - C. P. W. G. M. Verweij-van Wissen, D. M. Burger, P. E. Verweij, R. E. Aarnoutse, R. J. M. Brüggemann, *J. Chromatogr. B* **887–888** (2012), 79.
- [103] - K. Y. Beste, O. Burkhardt, V. Kaever, *Clin. Chim. Acta* **413** (2012), 240.
- [104] - D. V. Bharathi, K. K. Hotha, P. V. V. Sagar, S. S. Kumar, P. R. Reddy, A. Naidu, R. Mullangi, *J. Chromatogr. B* **868** (2008), 70.

- [105] - E. Cendejas-Bueno, M. Cuenca-Estrella, A. Gomez-Lopez, *Diagn. Micr. Infec. Dis.* **76** (2013), 314.
- [106] - D. Compas, D. J. Touw, P. N. F. C. de Goede, *J. Chromatogr. B* **687** (1996), 453.
- [107] - P. O. Gubbins, B. J. Gurley, J. Bowman, *J. Pharm. Biomed.* **16** (1998), 1005.
- [108] - S. K. Cox, S. Orosz, J. Burnette, D. Frazier, *J. Chromatogr. B* **702** (1997), 175.
- [109] - A. Carrier, J. Parent, *J. Chromatogr. B* **745** (2000), 413.
- [110] - A. Dwivedi, B. Singh, S. Sharma, R. S. Lokhandae, N. Dubey, *J. Pharmaceut. Anal.* **4** (2014), 316.
- [111] - R. J. Ekiert, J. Krzek, P. Talik, *Talanta* **82** (2010), 1080.
- [112] - C. Pyrgaki, S. J. Bannister, L. Gera, J. G. Gerber, J. Gal, *Chirality* **23** (2011), 495.
- [113] - A. Thienpont, J. Gal, C. Aeschlimann, G. Félix, *Analisis* **27**, (1999), 713.
- [114] - C.-X. Zhang, F. von Heeren, W. Thormann, *Anal. Chem.* **67** (1995), 2070.
- [115] - A. L. Crego, M. L. Marina, J. L. Lavandera *J. Chromatogr. A* **917** (2001), 337.
- [116] - M. C. Breadmore, A. Procházková, R. Theurillat, W. Thormann, *J. Chromatogr. A* **1014** (2003), 57.
- [117] - M. C. Breadmore, W. Thormann, *Electrophoresis* **24** (2003), 2588.
- [118] - M. Castro-Puyana, A. L. Crego, M. L. Marina, *Electrophoresis* **27** (2006), 887.
- [119] - M. Zhao, Y. Cui, J. Yu, S. Xu, X. Guo, *J. Sep. Sci.* **37** (2014), 151.
- [120] - C. Bertucci, D. Tedesco, *J. Chromatogr. A* **1269** (2012), 69.
- [121] - A. E. Nugroho, H. Morita, *J. Nat. Med.* **68** (2014), 1.
- [122] - G. Yang, Y. Xu, *Top. Curr. Chem.* **298** (2011), 189.
- [123] - Y. He, B. Wang, R. K. Dukor, *Appl. Spectrosc.* **65** (2011), 699.
- [124] - N. Harada, *Chirality* **20** (2008), 691.
- [125] - T. J. Wenzel, J. D. Wilcox, *Chirality* **15** (2003), 256.
- [126] - H. D. Flack, G. Bernardinelli, *Acta Cryst.* **A55** (1999), 908.
- [127] - H. D. Flack, G. Bernardinelli, *Chirality* **20** (2008), 681.
- [128] - N. Vanthuyne, C. Roussel, *Top. Curr. Chem.* **340** (2013), 107.
- [129] - C. Roussel, A. Del Rio, J. Pierrot-Sanders, P. Piras, N. Vanthuyne, *J. J. Chromatogr. A* **1037** (2004), 311.
- [130] - D. Dunmire, T. B. Freedman, L. A. Nafie, C. Aeschlimann, J. G. Gerber, J. Gal, *Chirality* **17** (2005), 101.

- [131] - Heeres J., Mesens J. L., Peeters J., *Itraconazole and stereoisomers*, U.S. Patent. 5,998,413, December 7, 1999.
- [132] - J.-Y. Jung, S. D. Yoo, S.-H. Lee, K.-H. Kim, D.-S. Yoon, K.-H. Lee, *Int. J. Pharm.* **187** (1999), 209.
- [133] - A. Shete, S. Murthy, S. Korpale, A. Yadav, S. Sajane, S. Sakhare, R. Doijad, *J. Drug Deliv. Sci. Tec.* **28** (2015), 46.
- [134] - K. Six, G. Verreck, J. Peeters, M. Brewster, G. van den Mooter, *J. Pharm. Sci.* **93** (2004), 124.
- [135] - A. A. Younes, D. Mangelings, Y. Vander Heyden, *J. Pharm. Biomed.* **55** (2011), 414.
- [136] - A. Patti, S. Pedotii, C. Sanfilippo, *Chirality* **19** (2007), 344-351.



## 7. Použité zkratky:

ABC - ATP binding cassette

ATP - adenosintrifosfát

CD - cirkulární dichroismus

DMEM - Dulbecco/Vogt modified Eagle's minimal essential medium

EKC - elektrokinetická chromatografie

HPLC - vysokoúčinná kapalinová chromatografie

HSES - high speed electrospinning (vysokorychlostní elektrospinning)

LC - kapalinová chromatografie

LLE - extrakce kapalina-kapalina

MEKC - micelární elektrokinetická chromatografie

MFS - major facilitator superfamily

MS - hmotnostní spektrometrie

NMR - nukleární magnetická rezonance

OSBP - oxysterol-binding protein

PFP - pentafluorfenyl

PTFE - polytetrafluorethylen

RNA - ribonukleová kyselina (ribonucleic acid)

RP - reverzní fáze

SFC - superkritická fluidní chromatografie

SPE - extrakce pevnou fází

VCD - vibrační cirkulární dichroismus