

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Fakulta přírodovědecká
Katedra analytické chemie

**CHIRÁLNÍ SEPARACE *R,S*-METHOXYTOLTERODINU
A *R,S*-TOLTERODINU KAPILÁRNÍ ELEKTROFORÉZOU**

DIPLOMOVÁ PRÁCE

2011

ADAM PŘIBYLKA

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI

Fakulta přírodovědecká
Katedra analytické chemie

CHIRÁLNÍ SEPARACE *R,S*-METHOXYTOLTERODINU A *R,S*-TOLTERODINU KAPILÁRNÍ ELEKTROFORÉZOU

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Autor práce:

Bc. Adam Příbylka

Studijní obor:

Analytická chemie

Vedoucí diplomové práce:

RNDr. Vítězslav Maier, Ph.D.

Olomouc 2011

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

.....
Podpis

Poděkování

Především bych chtěl poděkovat své rodině a všem mým přátelům a spolužákům za podporu při náročném studiu.

Rád bych poděkoval RNDr. Vítězslavu Maierovi, Ph.D. za důležité rady a informace nezbytné k vypracování teoretické i experimentální části diplomové práce.

V neposlední řadě chci poděkovat zaměstnancům laboratoře elektromigračních technik katedry analytické chemie UP, bez kterých by práce vůbec nevznikla.

Souhrn

Diplomová práce se zabývá studiem separace enantiomerů *R,S*-methoxytolterodinu a *R,S*-tolterodinu kapilární elektroforézou s využitím fosfatovaného γ -cyklodextrinu jako chirálního selektoru.

V teoretické části jsou popsány nejpoužívanější elektromigrační techniky a jejich aplikace v analýze chirálních látek. Podrobněji jsou vysvětleny základní elektroforetické děje a jejich vliv na průběh separace. Teoretická část dále obsahuje přehled nejpoužívanějších chirálních selektorů a speciálně se zaměřuje na cyklodextriny a jejich deriváty.

Praktická část se věnuje studiu vlivu složení a koncentrace separačního elektrolytu o různém pH s přídavkem fosfatovaného γ -cyklodextrinu na enantiomerní separaci *R,S*-methoxytolterodinu a *R,S*-tolterodinu. Tabelována byla závislost rozlišení a elektroforetických mobilit enantiomerů na změnách pracovního elektrolytu. Pro obě látky bylo studováno působení rostoucí teploty na průběh separace. Enantiomerní separace *R,S*-tolterodinu byla provedena vybranou metodou v matrici (moči a krevním séru) a reálném vzorku farmakologických přípravků Uroflow a Detrusitol.

Summary

This diploma thesis deals with the separation of enantiomers of *R,S*-methoxytolterodine and *R,S*-tolterodine by capillary electrophoresis using phosphated γ -cyclodextrin as a chiral selector.

The theoretical part describes the most common electromigration techniques and their application in the analysis of chiral compounds. The basic electrophoretic phenomena and their influence on a process of separation are explained in a great detail. The theoretical part also contains an overview of the most frequently used chiral selectors and specifically focuses on cyclodextrins and their derivatives.

The practical part is devoted to study an influence of composition and concentration of a separation electrolyte of different pH with an addition of phosphated γ -cyclodextrin for enantiomeric separation of *R,S*-methoxytolterodine and *R,S*-tolterodine. The dependence of electrophoretic mobilities and resolution of enantiomers on changes of working electrolyte was tabulated. For both compounds was studied effect of growing temperature on the process of separation. Enantiomeric separation of *R,S*-tolterodine was performed by selected method in a matrix (urine and blood serum) and a real sample of pharmacological products Uroflow and Detrusitol.

Obsah

1 ÚVOD	- 8 -
2 TEORETICKÁ ČÁST	- 10 -
2.1 Elektromigrační techniky	- 10 -
2.1.1 Kapilární izotachoforéza	- 11 -
2.1.2 Kapilární izoelektrická fokusace.....	- 12 -
2.1.3 Kapilární gelová elektroforéza.....	- 12 -
2.1.4 Micelární elektrokinetická chromatografie	- 13 -
2.1.5 Kapilární elektrochromatografie	- 15 -
2.2 Princip kapilární elektroforézy.....	- 15 -
2.2.1 Iontová mobilita	- 16 -
2.2.2 Efektivní mobilita	- 17 -
2.2.3 Zdánlivá mobilita	- 17 -
2.2.4 Elektrická dvojvrstva	- 18 -
2.2.4.1 Helmholtzova teorie.....	- 19 -
2.2.4.2 Gouyova-Chapmanova teorie.....	- 19 -
2.2.4.3 Sternova teorie	- 19 -
2.2.4.4 Elektrokinetický potenciál	- 20 -
2.2.5 Elektroosmotický tok	- 21 -
2.3 Separace opticky aktivních látek.....	- 22 -
2.3.1 Nepřímá chirální separace.....	- 23 -
2.3.2 Přímá chirální separace	- 24 -
2.3.3 Partial filling a counter-current technika.....	- 25 -
2.3.4 Pořadí migrace enantiomerů v CE	- 28 -
2.4 Chirální selektory	- 28 -
2.4.1 Makrocyclická antibiotika	- 29 -
2.4.1.1 Ansamyciny	- 29 -
2.4.1.2 Glykopeptidy.....	- 30 -
2.4.2 Chirální crown ethery.....	- 32 -
2.5 Cyklodextriny.....	- 33 -
2.5.1 Struktura a vlastnosti.....	- 33 -
2.5.2 Neutrální cyklodextriny	- 36 -
2.5.3 Nabité cyklodextriny.....	- 37 -
2.5.3.1 Fosfatované cyklodextriny	- 38 -
2.6 Tolterodin.....	- 39 -
3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	- 42 -
3.1 Instrumentální vybavení.....	- 42 -
3.2 Chemikálie a analyzované vzorky	- 42 -
4 VÝSLEDKY A DISKUZE	- 44 -
4.1 Chirální separace <i>R,S</i> -methoxytolterodinu.....	- 44 -
4.1.1 Vliv složení pracovního elektrolytu a koncentrace selektoru na rozlišení <i>R,S</i> -methoxytolterodinu.....	- 44 -
4.1.1.1 Separace ve fosfátu sodném	- 44 -
4.1.1.2 Separace ve fosfátu tris	- 52 -
4.1.2 Vliv teploty na separaci <i>R,S</i> -methoxytolterodinu	- 59 -
4.2 Chirální separace <i>R,S</i> -tolterodinu.....	- 61 -
4.2.1 Vliv koncentrace fosfatovaného γ -CD	- 61 -
4.2.2 Vliv koncentrace pracovního elektrolytu	- 65 -
4.2.3 Vliv pH pracovního elektrolytu	- 69 -
4.2.4 Analytické parametry stanovení <i>R,S</i> -tolterodinu	- 70 -
4.2.5 Vliv teploty na separaci <i>R,S</i> -tolterodinu	- 70 -

4.2.6	Chirální separace <i>R,S</i> -tolterodinu v moči.....	- 72 -
4.2.7	Chirální separace <i>R,S</i> -tolterodinu v krevním séru.....	- 74 -
4.3	Chirální separace <i>R,S</i> -tolterodinu v tabletce Uroflow.....	- 76 -
4.4	Chirální separace <i>R,S</i> -tolterodinu v tabletce Detrusitol	- 77 -
4.5	Fesoterodín.....	- 79 -
4.5.1	Chirální separace <i>R,S</i> -fesoterodinu v tabletce Toviaz.....	- 79 -
5	ZÁVĚR.....	- 82 -
6	LITERATURA.....	- 83 -
7	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ.....	- 87 -
8	PŘÍLOHY.....	- 89 -
8.1	Elektroferogramy chirální separace <i>R,S</i> -methoxytolterodinu v elektrolytu fosfátu sodného...-	89 -
8.2	Elektroferogramy chirální separace <i>R,S</i> -methoxytolterodinu v elektrolytu fosfátu tris.....-	101 -

1 Úvod

Plynová chromatografie (GC), vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC) a kapilární elektroforéza (CE) patří dnes k nejpoužívanějším analytickým separačním technikám. Ačkoliv se chromatografie a elektroforéza v mechanismu separace značně liší, obě metody spojuje široké uplatnění v řadě chemických oborů. Schopnost izolovat anorganické i organické látky je důvodem, proč je alespoň jedna z těchto separačních technik nedílnou součástí každé moderní analytické laboratoře.

Elektromigrační metody stojí oproti chromatografickým poněkud v pozadí, hlavní příčinou je bezesporu rozsáhlé pole působnosti GC a HPLC, které ve spojení s hmotnostním spektrometrem (MS) dokážou stanovit širokou škálu nám dnes známých látek. CE však v některých oblastech laboratorní praxe zdatně konkuruje chromatografii, dokonce lze říci, že v několika případech dosahuje kvalitnějších výsledků. Separace opticky aktivních (chirálních) látek je odvětví, ve kterém CE díky rychlosti analýzy, dobré reprodukovatelnosti, vysoké účinnosti a nižším finančním nákladům dokáže chromatografii předčit.

Většina organických látek se vyskytuje ve formě dvou konstitučně identických molekul (enantiomerů) mající až na směr stáčení roviny polarizovaného světla a interakce s chirálním prostředím totožné fyzikálně - chemické vlastnosti. Hlavním důvodem studia chirálních látek jsou různé chemické, biochemické a farmakologické vlastnosti obou enantiomerů. Tyto rozdíly jsou způsobeny odlišnými interakcemi enantiomerů na proteinových receptorech. V některých případech jsou tyto diference značné, jeden izomer může najít uplatnění např. jako medikament, zatímco druhý izomer vykazuje toxické, karcinogenní či teratogenní účinky¹. Proto je důležité sledovat tzv. enantiomerní čistotu farmaceutických přípravků. Dále se chirální separace značně uplatňují při analýze složek potravin a pesticidů v životním prostředí.

Kapilární zónová elektroforéza (CZE) je nejběžnější mód CE, při kterém lze pomocí správné volby parametrů separovat kationty i anionty jednou analýzou. Separace je založena na rozdílné velikosti analyzovaných iontů a jejich nábojích. Chirální látky se v opticky inaktivním prostředí (pracovním elektrolytu) v těchto vlastnostech neliší. Tento problém se řeší přidáním chirálního selektoru (opticky čisté látky) do separačního pufru. Reakcí selektoru s analytem krátkodobě vzniká tzv. tranzitní diastereomerní komplex, na jehož vzniku se podílí výhradně nekovalentní vazebné interakce (např. vodíkové můstky, elektrostatické interakce,

vazby dipól-dipól atd.). Dvojici diastereomerů již není těžké odseparovat, vznikající komplexy totiž mohou vykazovat odlišné fyzikálně – chemické vlastnosti (hodnoty mobilit).

2 Teoretická část

2.1 Elektromigrační techniky

Elektromigrační metody patří mezi nerovnovážné separační techniky, které jsou založeny na rozdílné rychlosti transportu částí analytu (např. filtrace, sedimentace, atd.), nikoliv na rovnovážné distribuci složek mezi dvěma nemísitelnými fázemi jako je tomu u technik rovnovážných (např. chromatografické metody, destilace, extrakce atd.). Migrace nabitých částic v prostředí elektrolytu je indukována vložením vnějšího stejnosměrného napětí, tím se začnou nabitě složky analytu pohybovat směrem k opačně nabitě elektrodě. Elektromigrační techniky dělíme na kapilární a plošné, které se podstatně liší v instrumentálním uspořádání. Princip separace je shodný, je zde však řada odlišností (Tab. I).

Tabulka I: Srovnání základních parametrů kapilárních a plošných technik²

Kapilární techniky	Plošné techniky
separace v kapiláře o průměru 25–100 µm	separace na papíru nebo v gelu vytvořeném mezi dvěma deskami
vysoké vložené napětí mezi elektrodami (až 30 kV)	podstatně nižší vložené napětí (0-200 V)
separace malých iontů i makromolekul	možnost separovat jen makromolekuly
dobrá účinnost separace a snadná detekce	nižší účinnost a složitá off-line detekce

Elektroforéza v plošném uspořádání se používá převážně v biochemických laboratořích pro separace fragmentů peptidů, bílkovin, enzymů a nukleových kyselin. Praktické uplatnění kapilárních elektromigračních technik je daleko větší, a to nejen díky schopnosti izolovat malé ionty i molekuly s vysokou molární hmotností. Nemalou výhodou tohoto uspořádání je možnost využít mnoho separačních módů založených na různých principech při stejné instrumentaci³. Kromě CZE, která je bezesporu nejpoužívanějším módem a bývá často synonymem pro CE, zahrnují elektromigrační techniky⁴ i metody kapilární izotachoforézy (CITP), kapilární izoelektrické fokusace (CIEF), kapilární gelové

elektroforézy (CGE), micelární elektrokinetické chromatografie (MEKC) a kapilární elektrochromatografie (CEC). K separaci opticky aktivních látek neboli k chirální separaci se převážně používá CZE, lze však využít i ostatní metody, např. CITP, CGE, MEKC a CEC.

2.1.1 Kapilární izotachoforéza

Princip CITP se od ostatních elektroforetických technik odlišuje uspořádáním elektrolytů. Používají se dva různé elektrolyty, vedoucí (leading) a koncový (terminating). Oba obsahují ion shodného náboje jako separované ionty, přičemž vedoucí ion má největší efektivní pohyblivost (mobilitu) a koncový ion naopak nejmenší mobilitu. Z toho vyplývá, že izotachoforézou nelze zároveň separovat anionty i kationty. CITP pracuje za konstantního proudu, což má za následek vzrůstající intenzitu elektrického pole od zóny vedoucího ke koncovému elektrolytu. Jelikož se všechny separované molekuly pohybují konstantní rychlostí, mobilita částic je nepřímo úměrná intenzitě elektrického pole. Důsledkem toho analyty migrují v ostře ohraničených zónách, aniž by docházelo ke vzájemné difúzi. Pokud ion vnikne vlivem difúze do vedlejší zóny, změní se jeho migrační rychlost působením elektrického pole o jiné intenzitě. Tento jev se nazývá samozaostřující efekt. Značnou výhodou CITP je přizpůsobení šířky zóny podle koncentrace k vedoucímu elektrolytu. Zóny o vyšší koncentraci než má leading se rozšíří a naopak zóny s nižší koncentrací se zúží (tzv. zakoncentrování iontů). Proto je izotachoforéza výbornou on-line prekoncentrační technikou, v praxi používanou ve spojení s CZE⁵, kde dokáže zlepšit limit detekce (LOD) až o tři řády.

Kapilární izotachoforéza byla druhou elektroforetickou technikou aplikovanou k chirální separaci a u CITP byly cyklodextriny poprvé použity jako chirální selektor⁶. Mnoho poznatků, které nyní máme o separaci chirálních látek pomocí CD metodou CZE (CD-CZE), bylo poprvé objeveno právě při studiu CD-CITP. Podobně jako u chirální separace pomocí CZE, i u CITP se nejvíce používají deriváty β -CD. Uplatnit lze i α - a γ -CD⁷, které ovšem ve většině případů nedosahují takové účinnosti a rozlišení jako β -CD. Chirální selektor se přidává do vedoucího elektrolytu, interakce mezi molekulou analyzované látky a CS je stejná jako u CZE (Kap. 2.3).

2.1.2 Kapilární izoelektrická fokusace

CIEF našla uplatnění zejména v biochemických analýzách k separaci a stanovení hodnot izoelektrických bodů (pI) peptidů a proteinů. Princip separace je založen na vytvoření pH gradientu podél kapiláry pomocí směsi amfolytů, které spolu se vzorkem po aplikaci stejnosměrného napětí migrují roztokem mezi katodou ponořenou v bazickém katolytu a anodou ponořenou v kyselém anolytu do zóny mající pH, které odpovídá hodnotě jejich izoelektrických bodů. V těchto zónách dochází k zakoncentrování neboli fokusaci, neboť jejich výsledný náboj je nulový a v elektrickém poli se již dále nepohybují⁸. Po fokusaci je třeba odseparované zóny vytlačit k detektoru. Hydrodynamická mobilizace využívá tlaku vytvořeného pumpou, nelze však použít u kapilár vyplněných gelem. V takových případech se výlučně aplikuje mobilizace elektroforetická, která je založena na porušení pH gradientu záměnou jednoho z elektrolytů za stejný jako je u druhé elektrody. Důležitou podmínkou této metody je kovalentní nebo dynamické pokrytí vnitřní stěny kapiláry, čímž dojde k potlačení elektroosmotického toku (EOF), který fokusaci analytu do zón znemožní. Výhodou CIEF je možnost nadávkovat vzorek do celého objemu kapiláry a tím analyzovat látky o velmi nízkých koncentracích, pro chirální separace ji ovšem využít nelze.

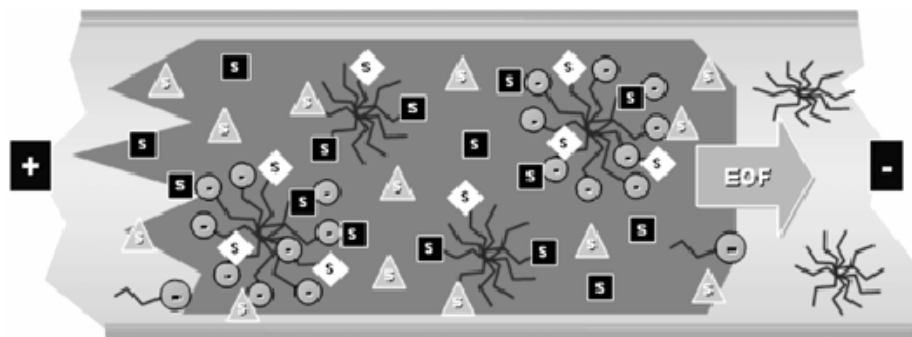
2.1.3 Kapilární gelová elektroforéza

Separace látek v CGE je dána rozdílnou rychlostí migrace složek analytu v křemenné kapiláře vyplněné elektrolytem s přídavkem gelotvorné látky tvořící molekulární síto. Molekuly se dělí především na základě rozdílné velikosti, tj. na schopnosti migrovat přes póry v gelu. Uplatnění CGE je zejména při separaci makromolekul (peptidy, nukleové kyseliny, polysacharidy atd.). Kapilára musí mít kovalentně pokrytou vnitřní stěnu, protože EOF by gel vytlačil. Nejčastěji používaným gelem je polyakrylamid a agarosový gel. CGE kombinuje výhody kapilární elektroforézy a tradiční gelové elektroforézy v plošném uspořádání. Předností kapilární techniky je využití vyššího elektrického pole, čímž dosáhneme větší separační účinnosti a podstatně zkrátíme dobu analýzy. Další výhodou je automatizace metody a pohodlná on-line detekce⁹.

Použití CGE při chirální analýze je minimální. Využívá se většinou CD jako chirálního selektoru, který je začleněn do póru převážně polyakrylamidového gelu. Nejpoužívanějším selektorem je β -CD, využít lze však i α - a γ -CD. CGE nepatří mezi techniky vhodné k separaci chirálních látek.

2.1.4 Micelární elektrokinetická chromatografie

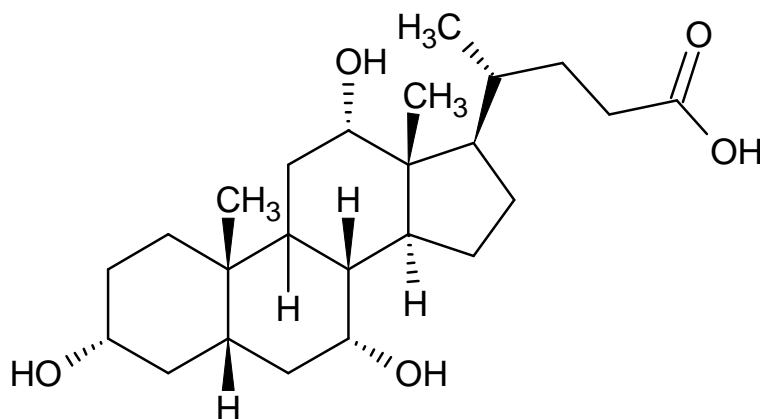
MEKC kombinuje princip elektromigračních a chromatografických technik, čímž umožňuje, na rozdíl od CZE, separaci neutrálních látek. Pracovní elektrolyt obsahuje přídavek povrchově aktivní látky (tenzidu) o tzv. kritické micelární koncentraci (CMC), což je za daných podmínek minimální koncentrace tenzidu nutná k vytvoření micel v elektrolytu. Tenzid se skládá z hydrofobní (nepolární) a hydrofilní (polární) části. Pro separace neionogenních látek je nejvyužívanějším tenzidem dodecylsírán sodný (SDS). Tenzidy dělíme podle jejich struktury na iontové (aniontové a kationtové), neiontové, makromolekulární, chirální a další¹⁰. Micely složené z molekul tenzidů plní úlohu tzv. pseudostacionární fáze, která díky aplikaci vnějšího elektrického pole migruje k příslušné elektrodě vlastní rychlostí¹¹. Migraci neutrálních složek analytu směrem k detektoru zajistíme použitím mírně alkalického elektrolytu o pH 7-9, který v křemenné kapiláře vyvolá přítomnost silného EOF. Analyt během této cesty střídavě vstupuje a vystupuje z dutiny micel, vzájemná separace neutrálních látek je docílena rozdílnou afinitou k micelám (Obr. 1). V MEKC můžeme nahradit micely mikroemulzí, pak mluvíme o mikroemulzní elektrokinetické chromatografii (MEEKC)¹³.



Obrázek 1: Separace neutrálních látek micelární elektrokinetickou chromatografií¹²

Různorodé neutrální analyty (S) migrující vlivem elektroosmotického toku (EOF) k detektoru na katodickém konci kapiláry se separují na základě rozdílné afinity k vytvořeným micelám.

Výhodou MEKC je její uplatnění při separaci chirálních látek. Toho lze dosáhnout hned třemi nejpoužívanějšími metodami¹⁴. Prvním z nich je přidavek syntetických chirálních tenzidů s achirálním tenzidem, který umožní vznik micely kombinující oba tenzidy¹⁵. Mezi oběma tenzidy vzniká dynamická rovnováha, která může mít negativní efekt na interakci vzniklé kombinované micely s analytem. Polymerací micel¹⁶ zvýšíme stabilitu a zároveň kontrolujeme jejich velikost, neboť mezi micelami se uplatňují výhradně kovalentní vazby. Nemalou výhodou polymerovaných micel je možnost jejich použití v nízké koncentraci, neboť pro ně neplatí podmínka CMC. Druhou možností je chirální separace pomocí cyklodextriny modifikované MEKC (CD-MEKC). Metoda je vhodná pro analýzu vysoce hydrofobních, elektricky neutrálních látek, které vnikají do dutin micel a CD. Migrace CD je shodná se směrem EOF, naproti tomu molekuly micel migrují směrem opačným. Princip separace je založen na distribuci látek mezi micely a CD¹⁷. Použitím chirálního tenzidu v CD-MEKC lze, díky přítomnosti dvou chirálních selektorů (CS) v pracovním elektrolytu, dosáhnout lepšího rozlišení. Poslední metodou chirální separace pomocí MEKC je přidavek žlučových kyselin, což jsou přírodní aniontové tenzidy s unikátní strukturou (Obr. 2). Molekuly žlučových kyselin vykazují optickou aktivitu, proto se dají využít jako chirální selektory¹⁸. Použití MEKC k separaci chirálních látek je oproti CZE spíše okrajovou záležitostí a hlavní uplatnění našla především při separaci neutrálních látek, které CZE od sebe oddělit nedokáže.



Obrázek 2: Struktura kyseliny cholové jako zástupce žlučových kyselin

2.1.5 Kapilární elektrochromatografie

CEC je metoda kombinující elektromigrační techniky s kapalinovou chromatografií (LC). Mechanismus separace je založen na rozdělení analytu mezi mobilní a stacionární fázi (chromatografický princip). Pohyb mobilní fáze v kapiláře není zajištěn vysokotlakou pumpou jako u HPLC, ale EOF vyvolaným migrací nabitých látek. Na vytvoření EOF se podílí náboj na vnitřní stěně kapiláry i na povrchu stacionární fáze. Výhodou CEC oproti LC je nelaminární (plošný) profil průtoku mobilní fáze, tím se zvýší separační účinnost. Instrumentální vybavení je stejné jako u CZE, akorát křemenná kapilára obsahuje stacionární fázi¹⁹ (většinou reverzní fázi C₈ a C₁₈) podobně jako u kapalinové chromatografie. Používáme dva základní druhy kapilár, náplňové a povrchově modifikované²⁰. U chirální separace je selektor kovalentně navázan na stacionární fázi²¹ (chirální stacionární fáze) nebo přidán do mobilní fáze²² (pufry). Spolu s CZE a částečně MEKC patří mezi nejpoužívanější elektromigrační metody při separaci chirálních látek.

2.2 Princip kapilární elektroforézy

Separace volných elektricky nabitých částic je založena na rozdílné rychlosti a směru migrace v elektrickém poli. Rychlost jejich pohybu v je přímo úměrná intenzitě elektrického pole E , která je funkcí vkládaného napětí U a celkové délky kapiláry L .

$$v = \mu_e \cdot E = \mu_e \frac{U}{L} \quad (1)$$

Elektroforetická pohyblivost (mobilita) μ_e pak popisuje rychlost pohybu iontu v jednotkovém elektrickém poli a udává se v $\text{m}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$. Ion migruje příslušným směrem působením elektrické síly F_E , kde q je iontový náboj.

$$F_E = q \cdot E \quad (2)$$

V prostředí elektrolytu působí proti směru pohybu iontu třecí síla F_F daná Stokesovým zákonem,

$$F_F = -6 \cdot \pi \cdot \eta \cdot r \cdot v \quad (3)$$

kde η je viskozita prostředí, r je iontový poloměr a v je iontová rychlost. Během elektroforézy přechází systém do ustáleného stavu, kdy se obě síly vyrovnají. Řešením obou rovnic dostaneme vztah pro mobilitu iontu v daném elektrolytu.

$$\mu = \frac{q}{6 \cdot \pi \cdot \eta \cdot r} \quad (4)$$

Z rovnice vyplývá, že mobilita (rychlost migrace) je přímo úměrná náboji částic a nepřímo úměrná jejich velikosti, takže rozdílné složky analyzované látky se pohybují ve vodném elektrolytu různými rychlostmi³.

2.2.1 Iontová mobilita

Iontová (limitní) pohyblivost μ_0 je fyzikální konstanta závislá pouze na teplotě a typu rozpouštědla a její hodnoty jsou proto tabelovány (většinou pro teplotu 25 °C). Iontová mobilita se s rostoucí teplotou zvětšuje, o 2 % s každým 1 °C.

$$\mu_T = \mu_{T_0} [1 + 0,02(T - T_0)] \quad (5)$$

kde T_0 je standardní teplota (25 °C) a T je teplota pracovní. Hodnoty limitní mobility získáme extrapolací koncentrační závislosti elektroforetické mobility na nulovou iontovou sílu při 100% disociaci/protonizaci analytu. Podle dohody náleží aniontům záporné hodnoty pohyblivosti a kationtům hodnoty kladné. Oxoniové (H_3O^+) a hydroxidové (OH^-) ionty mají o řád větší pohyblivost než ostatní ionty, příčinou je pouhý přenos náboje vyvolaný změnou uspořádání kovalentních a vodíkových vazeb, který je rychlejší než migrace celých iontů.

2.2.2 Efektivní mobilita

Efektivní mobilita μ_{ef} je definovaná pro slabé elektrolyty podléhající neúplné disociaci. Tyto látky se budou vlivem přítomnosti podílu nenabitých částic pohybovat v elektrickém poli pomaleji. Ustanovení disociační rovnováhy je ve srovnání s elektromigrací dostatečně rychlé, proto budou migrovat neutrální částice spolu s ionizovanou formou v jedné zóně. Výsledná rychlost migrace je závislá na stupni disociace, maximální je pro 100 % disociované/protonizované látky. Hodnoty μ_{ef} nelze tabelovat, protože se jedná o mobility látek za definovaných podmínek (teplota, složení a koncentrace pracovního elektrolytu, vedlejší asociační a komplexační rovnováhy, atd.).

2.2.3 Zdánlivá mobilita

Hodnotu zdánlivé mobility μ_{av} vypočítáme z migračního času analytu t_m , který je experimentálně změřenou veličinou.

$$\mu_{av} = \frac{l \cdot L}{t_m \cdot U} \quad (6)$$

kde l je efektivní délka kapiláry, L je celková délka kapiláry a U je vložené napětí. Z toho vyplývá, že μ_{av} započítává příspěvek elektroosmotického toku (Kap. 2.2.5), jehož mobilita je dána vztahem:

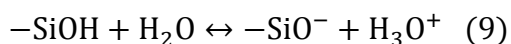
$$\mu_{EOF} = \frac{l \cdot L}{t_{EOF} \cdot U} \quad (7)$$

kde t_{EOF} je migrační čas elektroosmotického toku. Zdánlivou mobilitu můžeme matematicky zapsat jako součet efektivní a elektroosmotické pohyblivosti.

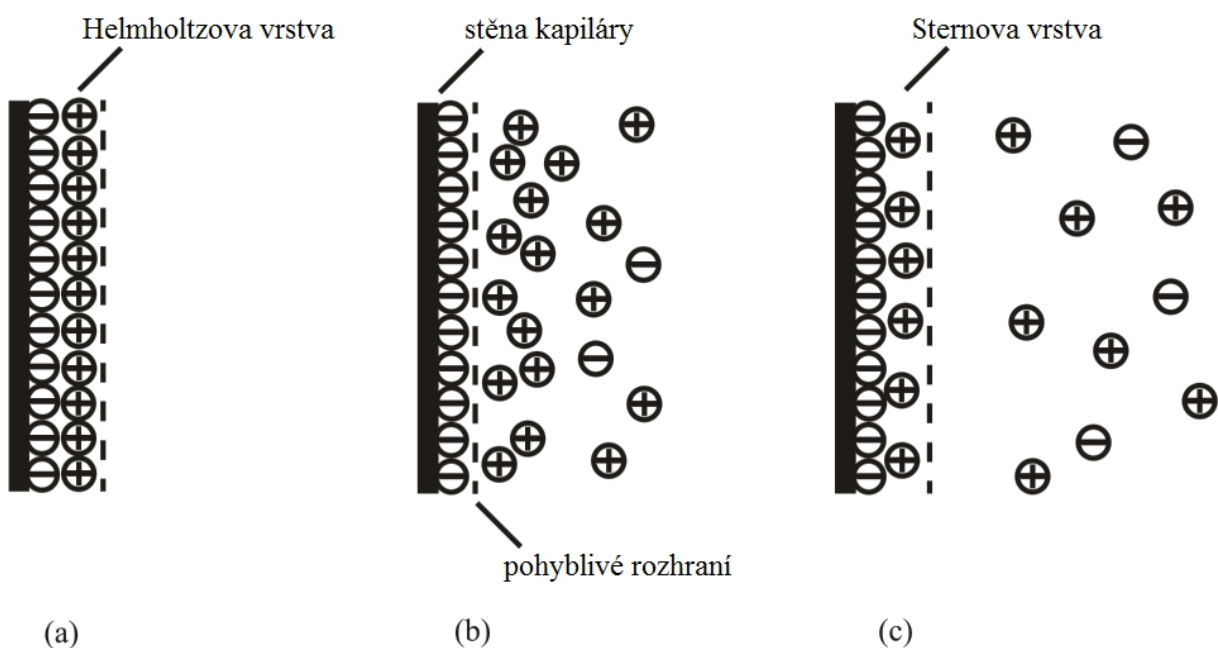
$$\mu_{av} = \mu_{ef} + \mu_{EOF} \quad (8)$$

2.2.4 Elektrická dvojrstva

Aplikací elektrického pole se na rozhraní pevné fáze a pohyblivé kapalně fáze vždy objevuje tzv. elektroosmotický jev²³. V CZE se většinou používají křemenné kapiláry, jejichž vnitřní stěna se ve vodném prostředí stává záporně nabitou vlivem disociace silanolových skupin.



Použitím kapilár z nepolárních materiálů (např. teflon) se místo disociace uplatňuje adsorpce iontů na povrch kapiláry. V obou případech se na stěně vytváří záporný náboj, který je kompenzován kationty v pracovním elektrolytu, čímž dochází k vzniku tzv. elektrické dvojrstvy³. Nejznámější teorie popisující její strukturu jsou Helmholtzova, Gouyova-Chapmanova a Sternova (Obr. 3).



Obrázek 3: Model elektrické dvojrstvy (a) Helmholtzův, (b) Gouyův-Chapmanův, (c) Sternův

2.2.4.1 Helmholtzova teorie

Helmholtzův model elektrické dvojvrstvy vychází z představy, že záporný náboj vnitřní vrstvy je zcela kompenzován kladným nábojem těsně přiléhající vnější vrstvy. Obě vrstvy obsahují pouze ionty souhlasného náboje a jejich plošné hustoty se sobě rovnají (analogie deskového kondenzátoru). Mezi pevnou a kapalnou fází se vytváří potenciálový spád, tzv. fázový potenciál ε (etha potenciál), který silně závisí na koncentraci iontů v roztoku. Helmholtzova teorie předpokládá existenci pouze výše popsané jednoduché dvojvrstvy, která v systému jako jediná uskutečňuje pokles fázového potenciálu, který je proto stejný jako tzv. elektrokinetický potenciál ζ (Kap. 2.2.4.4). Tato teorie popisuje krajní případ, kdy koncentrace elektrolytu v systému dosahuje vysokých hodnot.

2.2.4.2 Gouyova-Chapmanova teorie

K rozdělení iontů v elektrické dvojvrstvě dochází účinkem dvou protikladných sil. Ve vytvořeném rovnovážném stavu působí na rozhraní vrstev síly elektrostatické přitahující opačně nabitě ionty a síly vyvolané tepelným pohybem iontů zapříčiňující difuzi vnější vrstvy. Na povrchu kapiláry vzniká vnitřní vrstva tvořená anionty a vnější difuzní vrstva, ve které koncentrace iontů plynule klesá s rostoucí vzdáleností od nabitého povrchu kapiláry. Vnější vrstva se pohybuje spolu s kapalinou na rozdíl od vnitřní vrstvy, která je pevně připoutaná elektrostatickými silami na stěnu kapiláry. Kapalina se proto nepohybuje po stěně, ale po vnitřní vrstvě elektrické dvojvrstvy. G-Ch teorie platí pro velmi zředěné roztoky, protože zcela zanedbává vlastní velikost iontů a hodnotu odpudivých sil, které mezi nimi působí.

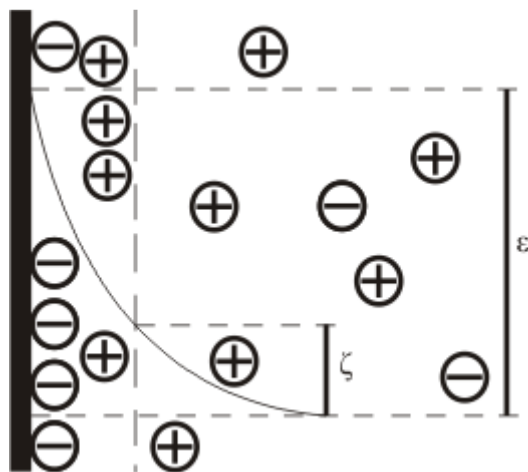
2.2.4.3 Sternova teorie

Sternův model započítává příspěvek adsorpčních sil, které mají oproti silám elektrostatickým kratší dosah. Uplatňují se mezi vnitřní vrstvou, která je pevně vázána na stěnu kapiláry, a na ni těsně přiléhající tzv. Sternovou vrstvou. Druhou částí vnější vrstvy

je elektrostatickými silami tvořená difuzní vrstva (označovaná jako Gouyova-Chapmanova vrstva), která svým nábojem neutralizuje vrstvu vnitřní. Důležitým faktorem je koncentrace elektrolytu (iontová síla) neboť s její rostoucí hodnotou se více uplatňují adsorpční síly (Helmholtzova teorie) oproti silám elektrostatickým a naopak (G-Ch teorie). Sternova teorie se nejvíce blíží experimentálně zjištěným hodnotám zvláště u středně koncentrovaných elektrolytů.

2.2.4.4 Elektrokinetický potenciál

Elektrokinetický neboli zeta potenciál ζ je částí celkového fázového potenciálu připisovaného elektrické dvojvrstvě. Na ionty nepohyblivé vrstvy je vázána určitá část etha potenciálu, zbytek tvořený difuzní pohyblivou vrstvou se nazývá zeta potenciál, který charakterizuje potenciálový spád mezi nepohyblivou vrstvou a okolní kapalinou (Obr. 4). Elektrokinetický potenciál je stanoven povrchovou hustotou náboje elektrické dvojvrstvy a nezávisí na vodivosti pevné fáze.



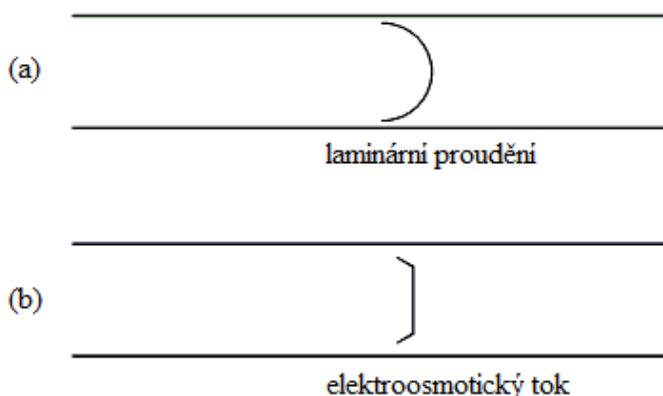
Obrázek 4: Znázornění fázového a elektrokinetického potenciálu ve Sternově modelu elektrické dvojvrstvy

2.2.5 Elektroosmotický tok

Vložení vnějšího stejnosměrného napětí na kapiláru dochází k pohybu kationtů a jejich solvatačních obalů směrem ke katodě, čímž strhává okolní roztok v kapiláře a vytváří makroskopický tok kapaliny zvaný elektroosmotický tok³. Jeho rychlost je vyjádřena vztahem:

$$v_{EOF} = \frac{\varepsilon \cdot \zeta}{\eta} E \quad (10)$$

kde v_{EOF} je rychlost EOF a ε je relativní permitivita prostředí. Unikátní vlastností EOF oproti laminárnímu toku, který se uplatňuje například u kapalinové chromatografie, je plošný profil způsobený třením kapaliny o stěnu kapiláry pouze v úzké vrstvě (Obr. 5).



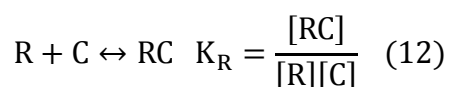
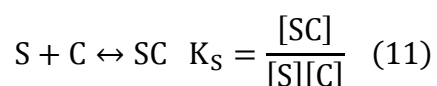
Obrázek 5: Zobrazení (a) profilu laminárního proudění a (b) plošného profilu elektroosmotického toku²⁴

Plošný profil toku omezuje rozšiřování zón a zvyšuje tím separační účinnost. Může být porušen při použití kapilár s vnitřním průměrem větším než 200 μm . Elektroosmotický tok není konstanta, ale závisí na pracovních podmínkách jako je intenzita elektrického pole, iontová síla a pH elektrolytu, teplota a různá aditiva. Modifikací vnitřní stěny kapiláry polymerem, který potlačuje vznik elektrické dvojvrstvy, můžeme EOF kontrolovat. Tento způsob pozměnění kapiláry se nazývá kovalentní pokrytí. Druhou možností jak potlačit vliv EOF je tzv. dynamické pokrytí, které nevyžaduje přípravu chemicky modifikovaných kapilár, ale stačí přidávek neutrálního aditiva do pracovního elektrolytu²⁵.

2.3 Separace opticky aktivních látek

K separaci enantiomerů se využívá jejich schopnost interagovat s chirálním prostředím, a tím vytvářet tranzitní diastereomerní komplexy. Vznikající komplex musí splňovat pravidlo tzv. tříbodové interakce²⁶. Selektor interaguje s enantiomerem třemi různými interakcemi současně, přičemž alespoň jedna z nich je stereoselektivní. Vhodným místem interakce jsou funkční skupiny, proto se snáze separují mnohočetně substituované analyty. Na vazbě se podílí přitažlivé i odpudivé interakce, zejména elektrostatické síly, vodíkové můstky, sterické a dipólové interakce.

Termodynamická rovnováha přechodného diastereomeru vznikajícího mezi dvojicí enantiomerů (*S*- a *R*-) a komplexotvorným reagentem (C) je charakterizována konstantou stability K_S a K_R , která odráží míru selektivity chirálního selektoru (Kap. 2.4) k enantiomeru.



Hodnotu efektivní mobility určují komplexy selektor - analyt i volné enantiomery (nevázané v komplexu).

$$\mu_{ef}^S = f \cdot \mu_f + (1 - f)\mu_{[SC]} \quad (13)$$

kde f je podíl enantiomerů v nevázané formě, μ_f je jejich mobilita a $\mu_{[SC]}$ je mobilita diastereomerního komplexu. Efektivní mobilita se může vyjádřit i pomocí konstanty stability komplexu a koncentrace selektoru $[C]$.

$$\mu_{ef}^S = \frac{\mu_f + \mu_{[SC]}K_S[C]}{1 + K_S[C]} \quad (14)$$

Analogické vztahy platí i pro *R*-izomer. Podmínkou separace je rozdílná hodnota efektivních mobilit obou enantiomerů ($\mu_{ef}^S \neq \mu_{ef}^R$).

$$\Delta\mu = \mu_{ef}^S - \mu_{ef}^R = \frac{\mu_f + \mu_{[SC]}K_S[C]}{1 + K_S[C]} - \frac{\mu_f + \mu_{[RC]}K_R[C]}{1 + K_R[C]} \quad (15)$$

Rozdíl mobilit přechodných diastereomerních komplexů lze vysvětlit jejich různým sterickým uspořádáním, enantiomer tvořící se selektorem prostorově menší komplex může migrovat větší rychlostí. Další příčinou difference mobilit diastereomerů je získaný celkový náboj, který je daný hodnotou disociační konstanty komplexu.

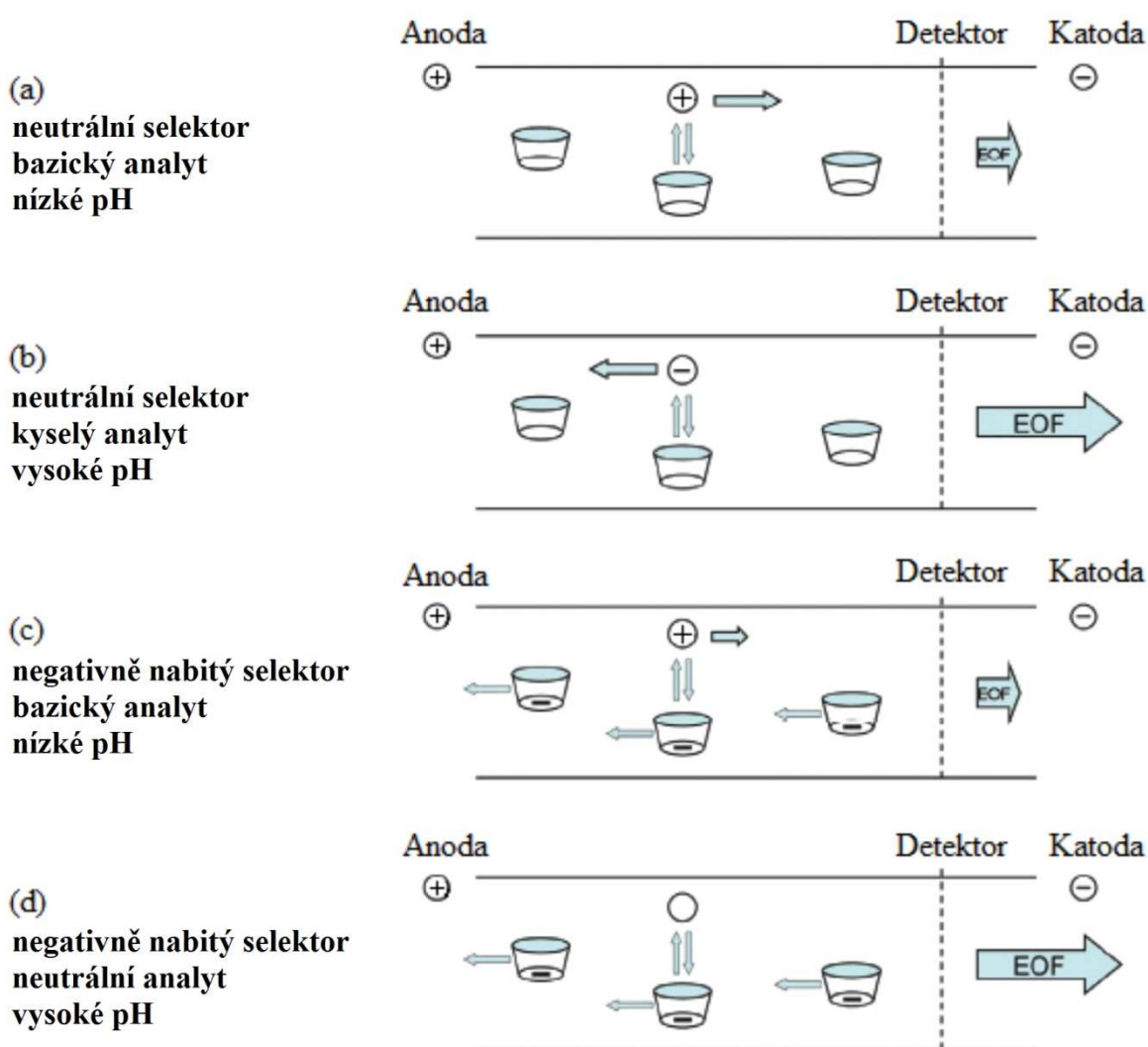
Konstanty stability diastereomerních komplexů a hodnoty jejich mobilit jsou dva základní parametry chirální separace v CE, které mohou navzájem kooperovat nebo mít protichůdný efekt a separaci neumožnit. Principem chirální separace není elektroforetický děj, jako je tomu u klasické CE, ale spíše děj chromatografický, založený na afinitě enantiomeru k selektoru, který je možné pokládat za pseudostacionární fázi. Proto je podle IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry) pro chirální separace metodou CE doporučen termín elektrokinetická kapilární chromatografie (ECC)²⁷.

2.3.1 Nepřímá chirální separace

Metoda je založena na tvorbě diastereomerů derivatizací analytu enantiomerně čistým činidlem před analýzou, která pak probíhá v achirálním prostředí. Činidlo musí mít velmi vysokou stereochemickou čistotu, neboť případné enantiomerní nečistoty mohou potlačit tvorbu komplexu. Mezi nejčastěji používané činidla patří 9-fluorenyl ethyl chloroformiát (FLEC), 2,3,4,6-tetra-O-acetyl- β -D-glukopyranosylisokyanát (GITC) a 1-fluoro-2,4-dinitrofenyl-5-L-alaninamid (Marfyo činidlo). Nepřímou metodou mohou vznikat deriváty se silnou UV absorpcí nebo fluorescencí, což v důsledku může vést ke zlepšení hodnoty LOD.

2.3.2 Přímá chirální separace

Podstatným rozdílem oproti nepřímé metodě je přidavek chirálního selektoru do pracovního elektrolytu. Přechodné diastereomerní komplexy se tvoří v kapiláře během separace. Přímá separace je v praxi používána mnohem častěji, důvodem je menší požadavek na stereochemickou čistotu selektoru a především schopnost nabitých CS migrovat směrem k příslušné elektrodě vlastní elektroforetickou mobilitou (Obr. 6), což u chromatografických metod není možné.



Obrázek 6: Schéma nejčastěji používaných migračních módů v CE metodou přímé chirální separace s použitím CD jako chirálního selektoru²⁸

K separaci bazických analytů lze použít neutrální selektory. Volbou pracovního elektrolytu (BGE) o kyselém pH dojde k protonizaci analytu, který migruje směrem ke katodickému konci kapiláry. Vlivem nízkého pH elektrolytu protéká kapilárou slabý EOF, který unáší neutrální selektor spolu s analytem k detektoru (Obr. 6a). Rychlost migrace enantiomerů je větší než rychlost CS, proto enantiomer, který je silněji vázaný v komplexu, je detekován jako druhý. Bazické analyty lze při stejných podmínkách separovat i negativně nabitými selektory (Obr. 6c). Pro tento případ platí naprosto stejný mechanismus separace, jediným rozdílem je směr migrace CS (k anodě), což umožní použít selektor o nižší koncentraci, a navíc může být dosaženo většího rozlišení²⁹. Enantiomer, který je silněji vázaný v komplexu, je opět detekován jako druhý. Může být však vázán tak silně, že bude migrovat spolu se selektorem k anodě. V tomto případě se aplikuje systém s opačnou polaritou a detekce analytu probíhá na anodickém konci kapiláry, čímž enantiomery eluují v obráceném pořadí. Těmito dvěma mechanismy lze chirálně separovat i neutrální analyty.

Kyselé analyty v BGE o vysokém pH získají záporný náboj, a proto migrují směrem k anodě. Vlivem silného EOF jsou transportovány spolu s neutrálním selektorem k detektoru na katodickém konci kapiláry (Obr. 6b). Jako první bude detekován enantiomer silněji vázaný v komplexu. Podobně se budou separovat kyselé analyty i s kladně nabitým selektorem.

Neutrální analyty se obvykle separují v elektrolytu o vysokém pH, přičemž migrují k detektoru pouze vlivem silného elektroosmotického toku. Aniontový selektor migruje opačným směrem (k anodě) a zpomaluje pohyb enantiomerů ke katodě (Obr. 6d). První na detektor migruje enantiomer, který má menší afinitu k CS a je slaběji vázán v komplexu.

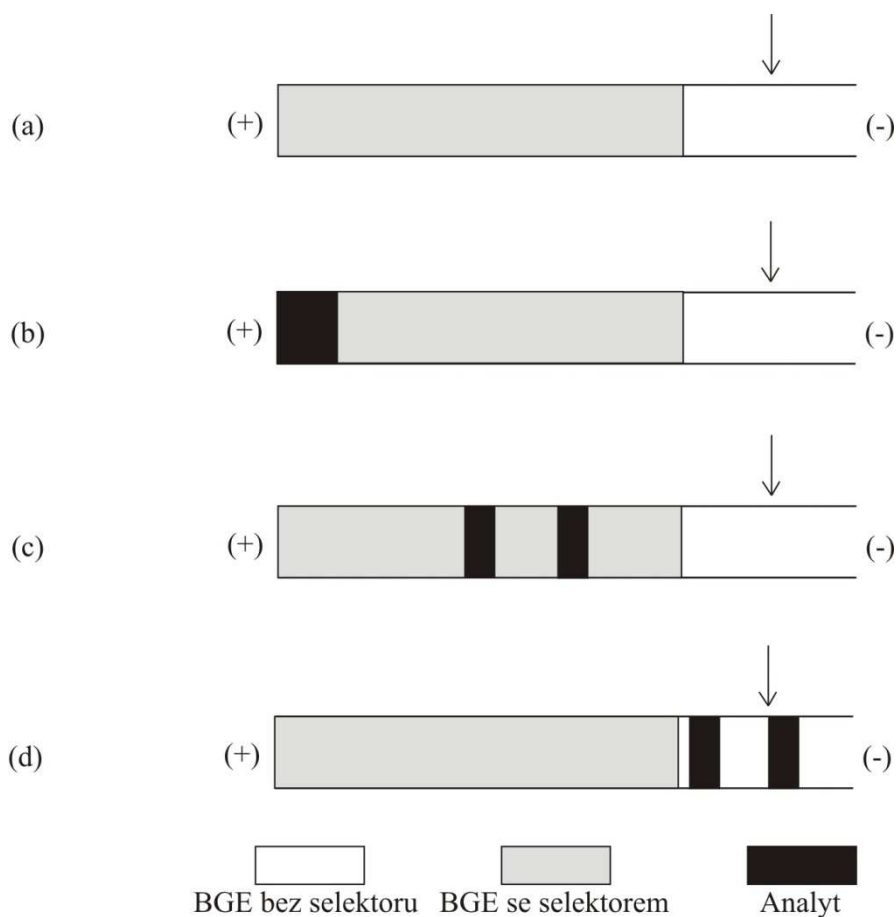
Neutrální selektory se používají pro separace bazických i kyselých analytů, nutnou podmínkou je úprava separačního prostředí. Negativně nabitě selektory separují látky neutrální a bazické. K chirální separaci neutrálních a kyselých analytů se využívají selektory kladně nabitě.

2.3.3 Partial filling a counter-current technika

Tyto techniky jsou vhodné pro separační systémy s chirálním selektorem, který silně absorbuje v UV oblasti, interferuje s UV zářením nebo se při spojení CE-MS může akumulovat v iontovém zdroji, a tím snížit účinnost ionizace. Hlavní výhodou je potlačení

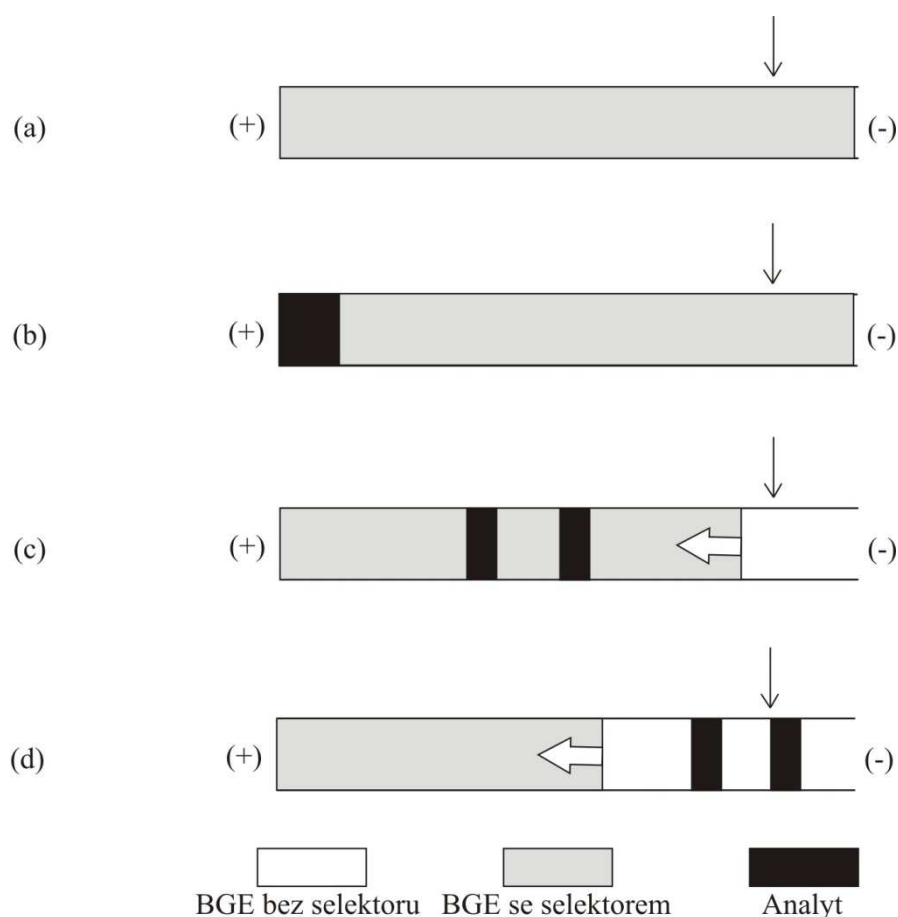
absorpce BGE, čímž se zabrání snížení citlivosti detekce. Navíc je spotřeba CS daleko menší, což může být u velmi drahých selektorů významný parametr.

Při technice partial filling (částečného plnění) se pouze část kapiláry (kratší než je její efektivní délka) naplní BGE s chirálním selektorem. Zbývající část kapiláry, včetně oblasti s detektorem, je vyplněna elektrolytem bez selektoru. Po nadávkování analytu a aplikaci napětí začne vzorek migrovat skrz oblast s CS, ve které dochází k separaci. Nakonec analyt dojde do zóny bez CS kde je detekován (Obr. 7). Zóna se selektorem nesmí migrovat, aby nevyplnila i část kapiláry vedoucí přes detektor. Ideální řešení je potlačení EOF pokrytím vnitřní stěny kapiláry, toto není nutné u analytů, které mají vysokou migrační rychlost a dostanou se na detektor dřív než zóna obsahující CS.



Obrázek 7: Schéma partial filling techniky, (a) naplnění kapiláry BGE se selektorem po detektor, (b) nadávkování analytu a aplikace napětí, (c) separace analytu v zóně BGE se selektorem, (d) detekce odseparovaných enantiomerů v zóně bez selektoru³⁰

Technika counter-current se používá pro analyty s kladným nábojem, které migrují zónou BGE s negativně nabitým selektorem migrujícím opačným směrem. Elektrolytem se vyplní celá délka kapiláry a po nadávkování vzorku se na oba konce aplikuje napětí, přičemž na katodickém konci je rezervoár s BGE bez selektoru a na anodickém konci může být rezervoár BGE s i bez selektoru. Negativně nabitý CS migruje k anodě, a tím opustí detekční zónu kapiláry. Odseparované enantiomery jsou pak detekovány v zóně BGE bez chirálního selektoru (Obr. 8). Pro pomaleji migrující CS (např. vankomycin) se používá tzv. zpožděné dávkování, při kterém nedochází ke změnám migračních časů ani výsledného rozlišení enantiomerů. Techniky counter-current a partial filling lze pro negativně nabitě CS kombinovat.



Obrázek 8: Schéma counter-current techniky; (a) naplnění celé kapiláry BGE se selektorem, (b) nadávkování vzorku a aplikace napětí, (c) separace analytu v zóně BGE s CS migrující opačným směrem, (d) detekce enantiomerů v zóně BGE bez selektoru³¹

2.3.4 Pořadí migrace enantiomerů v CE

Kvantifikace minoritního enantiomeru v neracemické chirální směsi je kvůli negaussovského profilu píku (obvykle chvostujícího, výjimečně frontujícího) obtížná, pokud migruje jako druhý. V takových případech je výhodné obrátit pořadí eluce enantiomerů, ne vždy je to však možné. Pořadí migrace enantiomerů v CE závisí hned na několika faktorech: (a) na síle vazby mezi analytem a CS; (b) směru a velikosti mobility chirálního selektoru³², volného analytu³³, komplexu selektor - analyt a EOF³⁴; (c) koncentraci chirálního selektoru³⁵.

Nejčastěji používanou metodou jak obrátit pořadí migrace enantiomerů je změna chirálního selektoru. Prakticky se více uplatňuje u synteticky připravených CS, které jsou běžně dostupné v obou enantiomerních formách, na rozdíl od přírodních CS (např. žlučové soli, cyklodextriny, makrocyclické antibiotika aj.), které jsou k dispozici pouze v jedné enantiomerní formě. Obrácení pořadí migrace je založeno na schopnosti obou enantiomerů CS preferovat interakci s jiným enantiomerem³⁶.

Méně používanou metodou je obrácení polaroty zdroje napětí. Enantiomer, který byl detekován jako první, neboť měl vyšší elektroforetickou mobilitu než jeho optický antipod, má i v systému s obrácenou fází větší mobilitu, ale migruje směrem od detektoru, proto je detekován jako druhý. Nutností je optimalizovat separační podmínky, zvláště sílu EOF.

2.4 Chirální selektory

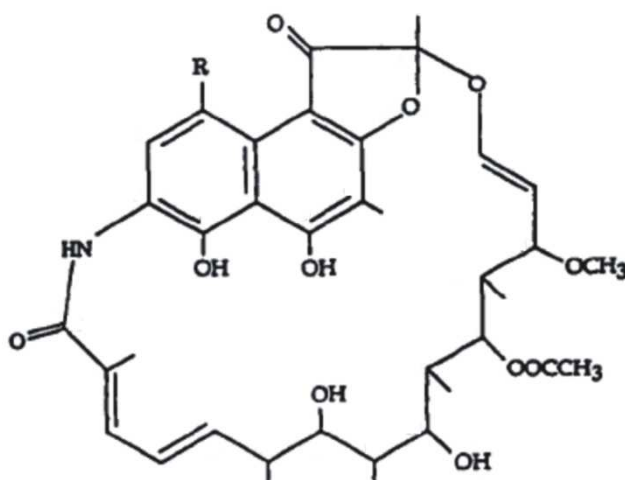
Základem úspěšné separace opticky aktivních látek metodou CZE je správná volba CS. Selektorem může být jakákoli chirální látka tvořící s molekulou analytu přechodný diastereomerní komplex, přičemž rychlost tvorby diastereomerů musí být dostatečně velká. Důležitou vlastností CS je jeho přítomnost pouze v jedné optické izomerní formě, tzv. optická čistota. Selektor volíme na základě analyzované látky a použitého pracovního elektrolytu. Chirální selektor musí s oběma enantiomery interagovat, být v pracovním elektrolytu rozpustný a také vůči němu inertní. Mezi nejpoužívanější CS patří cyklodextriny a jejich deriváty (Kap. 2.5), makrocyclická antibiotika, chirální crown ethery a chirální tenzidy (Kap. 2.1.4).

2.4.1 Makrocyclická antibiotika

Makrocyclická antibiotika našla uplatnění jako chirální selektory v HPLC³⁷, tenkovrstevné chromatografii³⁸ (TLC) a kapilární elektroforéze. Termín makrocyclická antibiotika zahrnuje velké množství sloučenin s různou strukturou, ale jen malé množství z nich se prakticky aplikuje k separaci enantiomerů metodou CE. Ansa sloučeniny rifamycin B a rifamycin SV a makrocyclické glykopeptidy vankomycin, teicoplanin a ristocetin A patří mezi ty nejpoužívanější.

2.4.1.1 Ansamyciny

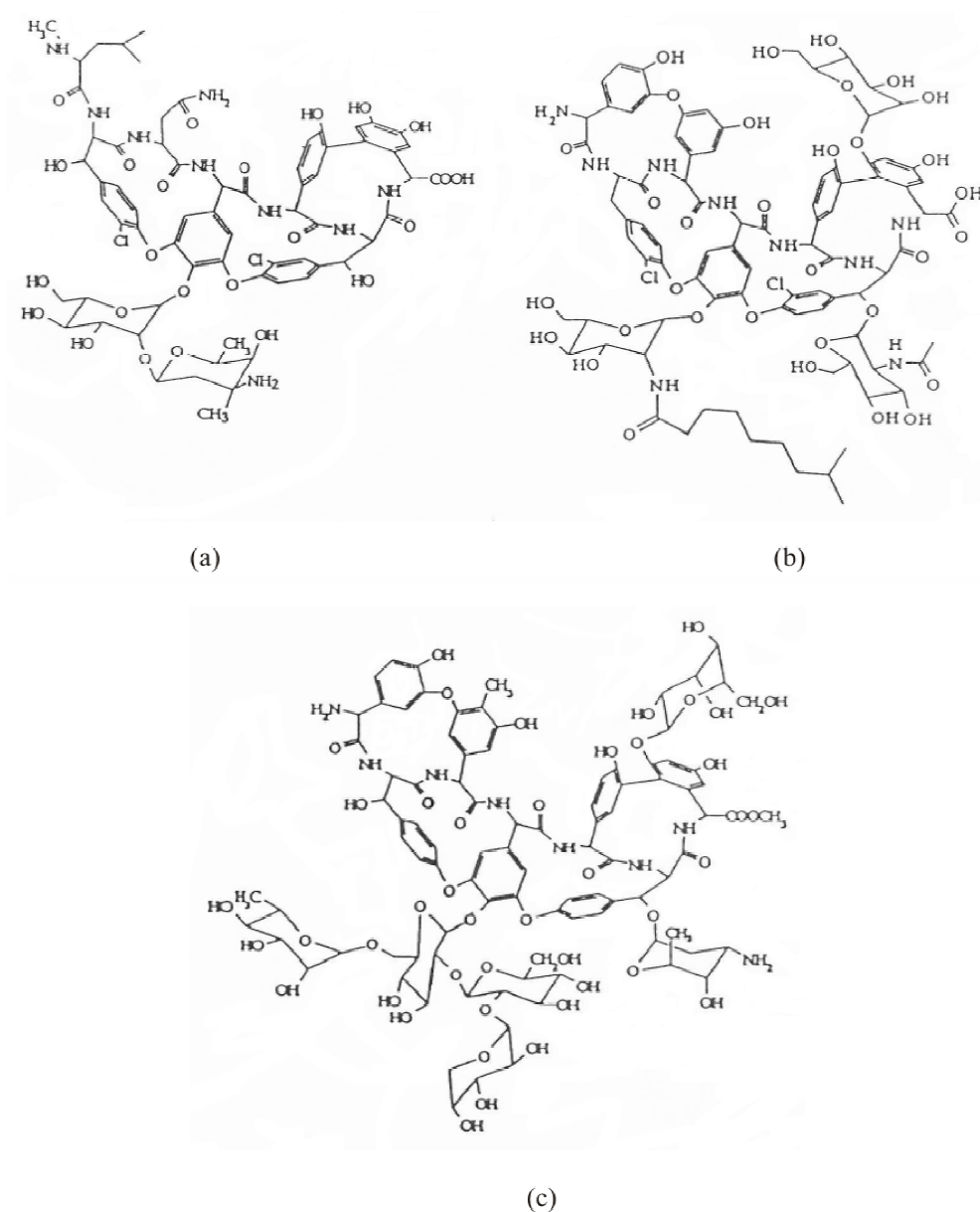
Rifamycin vzniká fermentačním procesem bakterie *Nocardia mediterranei* a od ostatních makrocyclických antibiotik se liší svou strukturou. Molekula má tvar prstence, jehož část tvoří různě substituovaný alifatický řetězec. Interakci rifamycinu s molekulou analyzované látky umožňují karboxylové, karboxymethylové, hydroxidové a amidové skupiny. Rifamycin B a SV se od sebe liší substituentem na naftohydrochinonové části kruhu (Obr. 9). Oba jsou dobře rozpustné ve vodě, nižších alkoholech a acetonu³⁹. Jako aniontová sloučenina se rifamycin B používá k chirální separaci bazických látek, zvláště pak aminoalkoholů⁴⁰. Nevýhodou rifamycinu B je silná absorpce UV záření, proto je nutné použít nepřímou detekci, což znemožňuje analyzovat vzorky o nízkých koncentracích.



Obrázek 9: Struktura rifamycinu B (R = OCH₂COOH) a SV (R = OH)⁴¹

2.4.1.2 Glykopeptidy

Tyto sloučeniny charakterizuje tvar molekuly připomínající semirigidní koš spojený třemi nebo čtyřmi makrocyclickými kruhy peptidickou vazbou (Obr. 10). Na interakci s analytem se podílí hlavně vodíkové vazby, elektrostatické síly a π - π interakce vyvolané řadou nasubstituovaných funkčních skupin na peptidický řetězec. Glykopeptidy se používají především při analýze negativně nabitých látek, například aminokyselin, nesteroidních anti-zánětlivých sloučenin, antineoplastik, herbicidů a dalších⁴².



Obrázek 10: Struktura (a) vankomycinu, (b) teikoplaninu a (c) ristocetinu A⁴³⁻⁴⁵

Všechny glykopeptidy se vážou na vnitřní stěnu kapiláry, čímž zpomalují elektroosmotický tok a prodlužují dobu analýzy. Důvodem jsou volné aminoskupiny, které se v pracovním elektrolytu o pH 5-7 (typické pH pro glykopeptidy) protonizují. Tento efekt lze potlačit kovalentním pokrytím kapiláry, což také umožní separovat v systému s opačnou polaritou. Nevýhodou je vysoká absorpce UV záření pod 250 nm, nezbytností je proto separovat technikou partial filling nebo counter-current (Kap. 2.3.3). Zatímco v nevodném prostředí jsou glykopeptidy stabilní, ve vodném roztoku dochází při pokojové teplotě k degradaci vankomycinu během 2-4 dnů a teikoplaninu za dva až tři týdny (Tab. II).

Tabulka II: Srovnání základních charakteristik vankomycinu, teikoplaninu a ristocetinu A⁴²

	vankomycin	teikoplanin	ristocetin A
molekulová hmotnost	1449	1877	2066
počet stereogenních center	18	23	38
počet makrocyclů	3	4	4
počet monomerních cukerných složek	2	3	6
izoelektrický bod pI	7,2	4,2-6,5	7,5
relativní stabilita při 4 °C (týdny)	1-2	2-3	3-4

Díky svému rozsahu aplikovatelnosti a relativně nízké ceně je vankomycin nejpoužívanějším chirálním selektorem v CE ze všech glykopeptidů. Vankomycin je produktem půdní bakterie *Streptomyces orientalis*. Jeho struktura má typický tvar koše s dvěma postraními řetězci. Na interakci s molekulou analytu se podílí hydroxylové skupiny, aminoskupiny a 18 stereogenních center. Vankomycin je dobře rozpustný ve vodě a některých polárních rozpouštědlech, např. dimethylformamidu nebo dimethylsulfoxidu. Problém se stabilitou vodného roztoku vankomycinu se řeší jeho uskladněním v chladu (4 °C), kde vydrží přibližně jeden týden. Vankomycin se používá i jako chirální selektor v micelární elektrokinetické chromatografii, kde jeho přidavek do elektrolytu obsahující micely dodecylsírany sodného zvýší separační účinnost neutrálních sloučenin⁴⁶. Micely, vytvořené smíšením vankomycinu a SDS, lze využít k obrácení pořadí eluce enantiomerů, což umožňuje kvantifikaci stopového množství minoritního izomeru⁴⁷.

Fermentačním procesem bakterie *Actinoplanes teichomyceticus* se získává další látka patřící do skupiny makrocyclických antibiotik, teikoplanin. Jeho struktura je podobná vankomycinu a ristocetinu A, na rozdíl od nich obsahuje sacharid D-glukosaminu

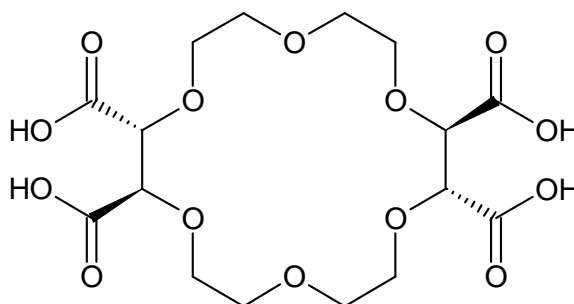
a D-manosy a hydrofobní řetězec tvořený mastnou kyselinou C₁₀-C₁₁ umožňující teikoplaninu vytvářet micely⁴⁸. Tato schopnost agregovat ve vodném prostředí způsobuje menší interakci s vnitřní stěnou kapiláry. Přidáním SDS do pracovního pufru obsahující teikoplanin dochází k tvorbě micel ve větší míře než u ostatních glykopeptidů. Navíc, stejně jako v případě vankomycinu, eluují enantiomery v obráceném pořadí, zkracuje se doba analýzy a zvyšuje se separační účinnost⁴⁹. Teikoplanin je vhodným chirálním selektorem k separaci aniontových a neutrálních sloučenin, především derivátů kyseliny mandlové a mléčné⁴⁴.

Ristocetin A je fermentačním produktem bakterie *Nocardia lurida*. Jeho strukturu tvoří čtyři makrocyclické kruhy, na které jsou kovalentně navázány cukerné jednotky. Ristocetin A je rozpustný v kyselých vodných roztocích a některých polárních rozpouštědlech. Výhodou ristocetinu A je delší stabilita vodného roztoku (až 4 týdny při teplotě 4 °C) a větší míra tvorby smíšených micel s SDS než u vankomycinu. Stejně jako ostatní glykopeptidy se používá k separaci aniontových sloučenin, např. herbicidů odvozených od kyseliny propionové a derivátů kyseliny mandlové a máselné⁴⁵. Ristocetin A, podobně jako vankomycin a teikoplanin, silně absorbuje v UV oblasti. Značnou nevýhodou je příliš vysoká cena⁴².

2.4.2 Chirální crown ethery

Crown ethery jsou početnou skupinou cyklických polyetherů, avšak pouze kyselina 18-crown-6-tetrakarboxylová (18C6H4) se používá jako chirální selektor v kapilární elektroforéze. Molekula 18C6H4 má tvar prstence s nasubstituovanými karboxylovými skupinami (Obr. 11), které jsou kolmo k rovině kruhu. 18C6H4 vytváří inkluzní komplexy s anorganickými i organickými kationty, zejména se sloučeninami obsahující primární aminoskupinu, např. dipeptidy, aminokyseliny a jejich deriváty a alkylaminy⁵⁰. Důvodem je kyselé pH pracovního elektrolytu (většinou pH 2,1-2,5), kde má vlivem karboxylových skupin částečně záporný náboj, a proto se nejvíce uplatňuje při separaci kladně nabitých sloučenin. Separační mechanismus je založen na iontové interakci mezi kyslíkem karboxylové skupiny a protonizované aminoskupiny analytu prostřednictvím vodíkových můstků. Kolmo navázané karboxyly vytváří chirální bariéru, která rozděluje prostor dutiny etheru na dvě části použitelné k tvorbě diastereomerních komplexů s různou konstantou stability. Enantiomery se

separují podle prostorového uspořádání funkčních skupin analytu, navázaných na chirálním uhlíku, v obou vzniklých kavitách⁵¹. Pořadí eluce enantiomerů s 18C6H4 je stejné jako u α -CD (*S*-izomer před *R*-izomerem). Migrační čas je kratší než v případě α -CD, ale s menší separační účinností. Nevýhodou 18C6H4 je relativně vysoká cena, proto je nepraktický pro většinu rutinních analýz.



Obrázek 11: Struktura kyseliny 18-crown-6-tetrakarboxylové⁵²

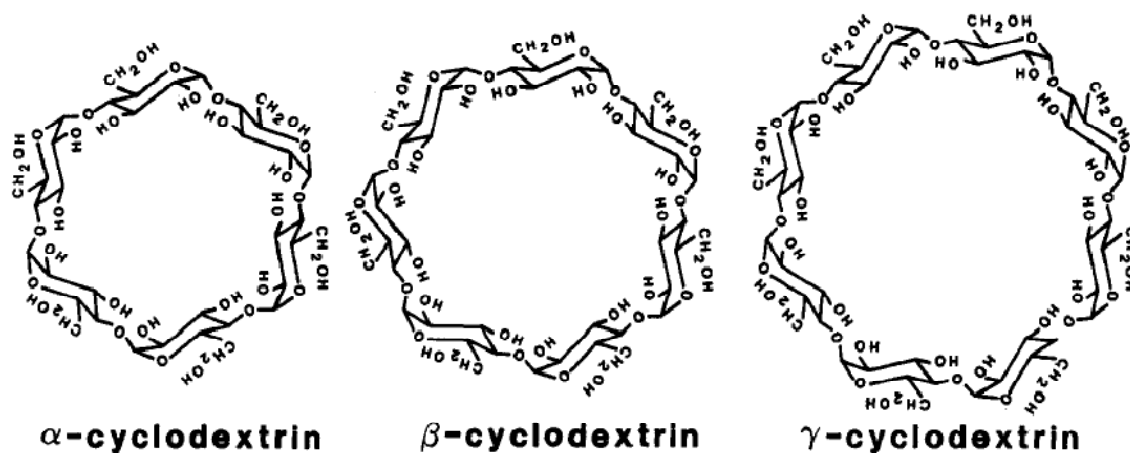
2.5 Cyklodextriny

Nativní (přírodní) cyklodextriny (CD) jsou cyklické oligosacharidy, vznikající jako produkt enzymatické degradace škrobu působením amylas bakterie *Bacillus macerans*. Dnes se k degradaci škrobu používá geneticky připravovaný enzym cyklodextrin-glukosyltransferasa⁵³. CD byly objeveny již v roce 1891 A. Villiersem a první publikace o přípravě a izolaci cyklodextrinů vyšla v roce 1903, jejím autorem je Franz Schardinger. Komerčně jsou dostupné převážně ve formě pravotočivého enantiomeru.

2.5.1 Struktura a vlastnosti

CD jsou složeny z D-glukosových jednotek spojených pomocí α -1,4 glykosidických vazeb⁵⁴. V praxi se výhradně používají α -, β - a γ -CD, které se od sebe navzájem liší počtem glukosových jednotek. Nejmenší počet jednotek obsahuje α -CD (šest jednotek), β -CD (Obr. 12) je složen ze sedmi jednotek a γ -CD z osmi. Pomocí chromatografických metod byly identifikovány i cyklodextriny obsahující 10 až 14 jednotek, které však nemají praktické

uplatnění jako již zmíněné CD. Největší cyklodextrin, jehož krystalová struktura byla dostatečně prostudována, obsahuje 26 glukosových jednotek tvořící dvě levotočivé šroubovice stabilizované vodíkovými můstky. Cyklodextriny s menším počtem glukosových jednotek než 6 není možné kvůli sterickým zábranám připravit.



Obrázek 12: Struktury nesubstituovaných α -, β - a γ -CD⁵⁵

Molekula CD ve vodném rozpouštědle připomíná svým tvarem zkrácený dutý kornout s hydrofobní strukturou na vnitřním povrchu a na vnějším povrchu se strukturou hydrofilní. Celá molekula CD je stabilizována pomocí vodíkových vazeb mezi atomy kyslíku dvou sousedních glukosových molekul. S větším počtem glukosových jednotek v molekule cyklodextrinu se zmenšuje vzdálenost mezi těmito hydroxylovými skupinami, tím pádem roste pevnost vodíkových vazeb a celé makromolekuly. U větších CD (počínaje δ -CD, který obsahuje devět glukosových jednotek) roste pnutí v makromolekule, které je již tak velké, že nemůže být dostatečně vykompenzováno pásem vodíkových vazeb a dochází k deformacím struktury (δ -CD již nemá kruhový tvar, ale jeho struktura spíše připomíná elipsu). S počtem jednotek souvisí i velikost dutiny molekuly CD, přičemž její velikost roste od α -CD k γ -CD. Primární 6-hydroxylová skupina na užším kruhu a sekundární 2- a 3-hydroxylové skupiny na širším kruhu mohou být nahrazené jinými atomy nebo skupinou atomů⁵⁶, čímž dochází k tvorbě neutrálních a kladně či záporně nabitých cyklodextrinů. Nahrazen může být jen atom vodíku na primární a sekundární hydroxylové skupině nebo se substituují celé hydroxylové skupiny. Dochází rovněž k eliminaci vodíkových atomů na CH_2OH skupinách, které se můžou oxidovat až na karboxyly.

S rozdílnou strukturou CD souvisí jejich fyzikální a chemické vlastnosti (Tab. III). Spektroskopické studie prokázaly, že struktura CD ve vodném rozpouštědle je identická se strukturou v krystalickém stavu, což usnadňuje studium dějů probíhajících při tvorbě inkluzních komplexů⁵⁷. Stabilita CD je značně závislá na vnějším (pracovním) prostředí, převážně na teplotě a pH. V alkalickém prostředí jsou CD stabilní, v kyselém prostředí však dochází k hydrolyze za vzniku glukosy a řady acyklických maltosacharidů. Za normálních experimentálních podmínek (teplota pod 60°C a pH nad 3,5) lze považovat CD za stabilní.

Tabulka III: Fyzikální a chemické vlastnosti α -, β - a γ -CD⁵⁵

	α -CD	β -CD	γ -CD
počet glukosových jednotek	6	7	8
molekulová hmotnost	972	1135	1297
rozpuštnost ve vodě (g/100 ml)	14,5	1,85	23,2
vnitřní průměr kavity (Å)	4,7-5,3	6,0-6,5	7,5-8,3
hloubka kavity (Å)	8,0	8,0	8,0
disociační konstanta pK _A	12,33	12,20	12,08
optická rotace α_D (°)	+150,5	+162,5	+177,4

Nejdůležitější charakteristickou vlastností CD je jejich schopnost tvorby inkluzních komplexů s velkou škálou organických a anorganických, neutrálních i nabitých molekul. Vznikajícího komplexu je dosaženo uzavřením analyzované (hostující) molekuly do dutiny (kavity) cyklodextrinu, čímž dochází k ustanovení dynamické rovnováhy. Stabilita vytvořeného inkluzního komplexu je popsána pomocí konstanty stability (Kap. 2.3). Na vzniku komplexu se podílí vazby mezi analytem a cyklodextrinem zprostředkované pomocí van der Waalsových sil a vodíkové můstky mezi polární funkční skupinou analytu a hydroxylovou skupinou CD. Stabilita komplexu je značně ovlivněna několika faktory, mezi nejdůležitější z nich patří prostorové uspořádání a polarita analyzované molekuly, vlastnosti pracovního prostředí (pufry) a teplota.

O tom, která molekula je schopna proniknout do kavity CD a vytvořit inkluzní komplex rozhoduje spíše geometrie vstupující molekuly než její chemické vlastnosti. Příliš malé molekuly snadno vnikají do dutiny CD, vazby v komplexu jsou však příliš slabé a vzniklý komplex je vysoce nestabilním. V případě, že molekula je větší než kavita CD,

vzniká komplex inkluzí pouze určité části nebo postranního řetězce analyzované molekuly. Stabilita komplexu silně závisí na polaritě analytu, přičemž pouze molekuly méně polární než voda mohou vytvářet inkluzní komplexy. Důležitým faktorem, který ovlivňuje stálost vznikajícího komplexu, je použitý solvent. Komplex nejčastěji vzniká ve vodném roztoku, v organickém rozpouštědle se vytváří také, ale analyzovaná molekula je jen velmi slabě vázána k cyklodextrinu. Neméně důležitým faktorem je teplota, s rostoucí teplotou klesá hodnota stability komplexu, čímž dochází k oslabování vazeb mezi molekulou a CD.

Díky svým vlastnostem se cyklodextriny využívají ve farmaceutickém, potravinářském a chemickém průmyslu⁵⁸. Ve farmacii se CD a jejich deriváty používají jako pomocné aditiva, např. jako rozpouštědla, ředidla, přípravky zlepšující fyzikální a chemické vlastnosti. Nejen v potravinářském, ale i v kosmetickém a dokonce v tabákovém průmyslu slouží CD jako stabilizátory chutí a vůní nebo naopak jako prostředky k eliminaci nežádoucích příchutí a mikrobiologických složek. V chemickém průmyslu se CD nejčastěji používají jako katalyzátory zvyšující selektivitu reakcí a jako látky vhodné k čištění produktů průmyslové výroby. Největší uplatnění však našly při analýze chirálních látek pomocí techniky kapilární elektroforézy, kapalinové a plynové chromatografie. Hlavní předností CD oproti ostatním chirálním selektorům je jejich komerční dostupnost, využitelnost pro UV detekci, dobrá rozpustnost ve vodě, nízká cena a navíc nabízí širokou škálu různě chemicky modifikovaných derivátů. Cyklodextriny lze rovněž použít k separaci achirálních (opticky neaktivních) látek jako jsou například cis a trans izomery⁵⁹.

2.5.2 Neutrální cyklodextriny

V obvyklém rozsahu pH používaném v kapilární elektroforéze nemají nativní CD náboj, proto je rychlost jejich migrace dána pouze silou EOF. Tento fakt umožňuje aplikaci nativních cyklodextrinů k separaci kladně i záporně nabitých analytů (Kap. 2.3.2). Substitucí hydroxylových skupin CD za jiné neutrální skupiny lze změnit jejich vlastnosti, přičemž schopnost separovat nabitě analyty zůstane zachována. Komerčně dostupné a nejčastěji používané neutrální deriváty CD se připravují nahrazením hydroxylové skupiny methylem a hydroxypropylem, které mohou být substituované do náhodných nebo přesně daných pozic (Tab. IV). Neutrální deriváty CD, stejně jako nabitě deriváty, jsou směs substituovaných

a nativních CD, jejich vlastnosti závisí na tom, do jaké míry jsou derivatizovány (látky s rozdílným stupněm substituce).

Tabulka IV: Příklady komerčně dostupných neutrálních derivátů CD²⁸

neutrální deriváty CD	substituent
methyl- α -cyklodextrin	náhodně substituovaný -CH ₃
methyl- β - cyklodextrin	náhodně substituovaný -CH ₃
heptakis-2,6-dimethyl- β - cyklodextrin	-CH ₃ v pozici 2 a 6
heptakis-2,3,6-trimethyl- β - cyklodextrin	-CH ₃ v pozici 2, 3 a 6
hydroxypropyl- α - cyklodextrin	náhodně substituovaný -CH ₂ -(CH ₂) ₂ -OH
hydroxypropyl- β - cyklodextrin	náhodně substituovaný -CH ₂ -(CH ₂) ₂ -OH
hydroxypropyl- γ - cyklodextrin	náhodně substituovaný -CH ₂ -(CH ₂) ₂ -OH

Důvodem derivatizace nativních cyklodextrinů je změna parametrů důležitých při tvorbě inkluzních komplexů. Substitucí neutrálních skupin na strukturu CD se mění jeho rozpustnost (obvykle se zvýší ve vodě a některých organických rozpouštědlech), velikost a tvar kavity, polarita a roste schopnost vytvářet s analytem vodíkové můstky. Rozhodnutí zda použít nativní CD nebo jejich neutrální deriváty zaleží výhradně na struktuře a vlastnostech analytu. Nejdůležitějšími parametry, které mají vliv na průběh a výsledek separace, jsou koncentrace CD⁶⁰⁻⁶², pH pracovního elektrolytu^{63,64} a případná achirální aditiva (např. methanol⁶⁵⁻⁶⁷, acetonitril⁶⁸, cyklohexanol⁶⁹ aj.) v pracovním elektrolytu ovlivňující dynamické a termodynamické vlastnosti separačního systému (např. vliv EOF, rozpustnost analytu a selektoru atd.).

2.5.3 Nabité cyklodextriny

Nejdůležitější rozdíl mezi nabitými a neutrálními cyklodextriny je vlastní elektroforetická mobilita nabitých CD, což umožní účinněji separovat neutrální analyty. Nejčastěji používané aniontové deriváty CD jsou karboxymethylové, sulfatované, fosfatované aj. cyklodextriny (Tab. V). I když nejsou tak početně zastoupeny jako kationtové deriváty CD, mezi které patří celá řada amino a amoniových CD, komerčně dostupné jsou ve větším počtu

spíš aniontové CD. Proto se jim při chirální separaci dává přednost. Dalším důvodem je výhoda separovat analyt v kyselém prostředí, čímž se potlačí účinek EOF a analyt vlivem získaného kladného náboje migruje směrem k detektoru na katodickém konci kapiláry. Při těchto separačních podmínkách dosahují aniontové deriváty CD lepší účinnosti než neutrální a kationtové CD díky silnější vazbě s opačně nabitým analytem. Navíc migrací proti pohybu kladně nabitého analytu (counter-current technika) je spotřeba použitého selektoru velmi malá. Nevýhoda obou nabitých derivátů CD je zvýšená vodivost elektrolytu spojená s tvorbou Joulova tepla a různý stupeň substituce³².

Tabulka V: Příklady komerčně dostupných aniontových derivátů CD²⁸

negativně nabitě deriváty CD	substituent
karboxymethyl- β -cyklodextrin	náhodně substituovaný -CH ₂ -COONa
sulfatovaný- α -cyklodextrin	náhodně substituovaná -SO ₃ Na
sulfatovaný- β -cyklodextrin	náhodně substituovaná -SO ₃ Na
sulfatovaný- γ -cyklodextrin	náhodně substituovaná -SO ₃ Na
sulfobutyl- β -cyklodextrin	náhodně substituovaná -CH ₂ -(CH ₂) ₂ -SO ₃
heptakis-6-sulfo- β -cyklodextrin	-SO ₃ Na v pozici 6
heptakis-(2,3-diacetyl-6-sulfo)- β -cyklodextrin	-CH ₃ CO v pozici 2 a 3, -SO ₃ Na v pozici 6
heptakis-(2,3-methyl-6-sulfo)- β -cyklodextrin	-CH ₃ v pozici 2 a 3, -SO ₃ Na v pozici 6

Pro separaci záporně nabitých analytů lze použít i aniontové deriváty CD⁷⁰, přičemž tvorba inkluzního komplexu je kvůli odpuzivým elektrostatickým interakcím ztížena (stejný případ nastává u kladně nabitých analytů a kationových derivátů CD), proto se v těchto případech využívají jen výjimečně.

2.5.3.1 Fosfatované cyklodextriny

Substitucí -H₂PO₃ na hydroxylové skupiny na uhlících C₂ a C₆ vznikají fosfatované cyklodextriny, patřící mezi aniontové CD. Ačkoliv nejsou tak hojně používané jako např. sulfatované CD, díky svým unikátním vlastnostem dosahují v některých případech lepších výsledků než ostatní aniontové cyklodextriny⁷¹⁻⁷³. Mezi nesporné výhody fosfatovaných CD

patří dobrá rozpustnost ve vodě a schopnost mít záporný náboj v široké oblasti pH, čehož se využívá při separaci pozitivně nabitých látek. S rostoucí hodnotou pH byl zaznamenán pokles elektroforetické mobility daný silnější interakcí analytu s fosfatovaným CD, která je způsobena zvýšenou ionizací cyklodextrinu⁷⁴. Jako výhodu lze v některých případech považovat schopnost fosfatovaného γ -CD (P- γ -CD) vytvářet silnější komplex s *R*-izomerem analyzované látky, což při detekci na katodickém konci kapiláry, která je u fosfatovaných CD výlučná, na rozdíl např. od sulfatovaných CD, u kterých je možná i anodická detekce⁷⁵, má za následek migraci *S*-izomeru analytu před *R*-izomerem⁷⁶.

Aplikace fosfatovaných CD má i jistá omezení: (a) nevýhodou je adsorpce na vnitřní stěnu kapiláry⁷⁷, která se však dá eliminovat změnou koncentrace CD nebo zvýšením pH pracovního elektrolytu⁷⁶. (b) Různý stupeň substituce nemusí být nutně nevýhodou, způsobuje sice chvostování píků, které lze odstranit přidávkem nenabitého CD do BGE⁷⁸, a směs cyklodextrinu má vlivem různých vodivostních koeficientů vyšší elektrodisperzi, která vede k asymetrickému rozmývání píků. Na druhou stranu mají i široké spektrum selektivity^{76,79}. (c) Fosfatované CD nelze používat v příliš vysokých koncentracích, vznikají totiž vícenásobně nabitě cyklodextriny, které mají vysokou vodivost, se kterou je spojena vyšší tvorba elektrického proudu, který narušuje plošný profil toku⁷⁴.

2.6 Tolterodin

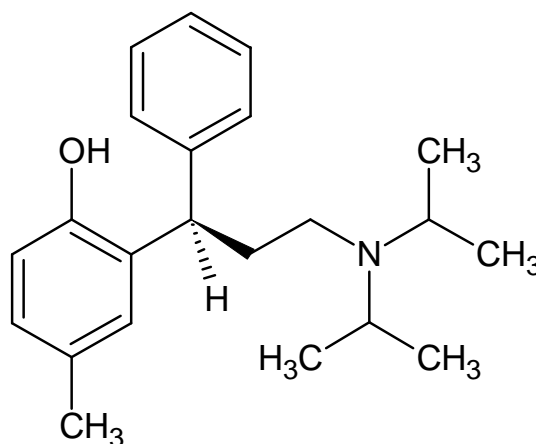
Tolterodin je selektivním antagonistou muskarinových receptorů, proto patří do skupiny tzv. antimuskarinových léčiv. Muskarinové receptory se vyskytují v různých částech organismu, např. mozku, oku, slinných žlázách, močovém měchýři. Rozdělují se do 5 subtypů podle toho, kterou oblast ovlivňují (Tab. VI). Tolterodin má vyšší afinitu k subtypům M_2 a M_3 , které mají vliv na funkci močového měchýře. Působením dochází k relaxaci svaloviny detrusoru, čímž se zvětšuje kapacita močového měchýře, a tím je možné zadržet moč po delší dobu. Proto se tolterodin používá při léčbě nemoci zvané hyperaktivní močový měchýř s projevy urgentní mikce až inkontinence. Tolterodin je v játrech metabolizován na 5-methyltolterodin a následně polymorfním enzymem CYP2D6 oxidován 5-hydroxymethyltolterodin, který je farmakologicky aktivní a srovnatelný s tolterodinem⁸⁰. Tyto popsané léčebné účinky má pouze netoxický izomer *R*-tolterodinu. Komerčně je

tolterodin dostupný pod názvem Detrusitol od firmy Pfizer nebo Uroflow od firmy Zentiva ve formě tolterodin tartrátu, což je směs tolterodinu se solí kyseliny vinné v poměru 1:1.

Tabulka VI: Distribuce muskarinových receptorů v organismu⁸⁰

Subtyp	Rozdělení	Ovlivňuje
M ₁	kortex, hippocampus, sympatická ganglia, slinné žlázy	CNS
M ₂	myokard, močový měchýř	kardiovaskulární systém
M ₃	močový měchýř, slinné žlázy, GIT	močový měchýř
M ₄	bazální ganglia	není známo
M ₅	střední mozek-substantia nigra (černá substance), oči	vizus, akomodace

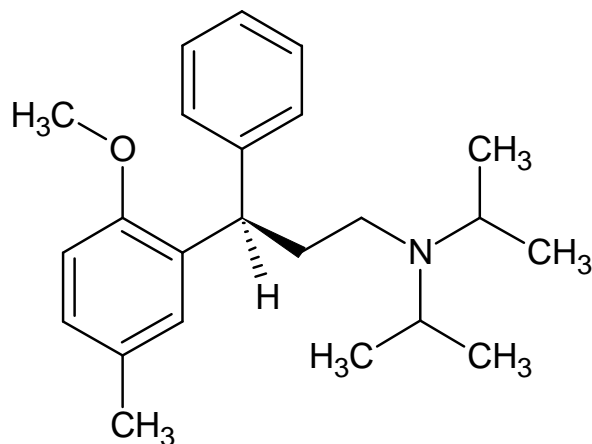
Systematický název tolterodinu podle organizace IUPAC je 2-[(1*S*)-3-(diisopropylamino)-1-fenylpropyl]-4-methylfenol se sumárním vzorcem C₂₂H₃₁NO a molekulovou hmotností 325,48 g.mol⁻¹. Tolterodin má jednu protonizovatelnou aminoskupinu (Obr. 13), hodnota disociační konstanty pK_a je 9,9. Za normálních podmínek je tolterodin bílý krystalický prášek rozpustný ve vodě (12 g.l⁻¹ při laboratorní teplotě), methanolu a ethanolu. Prakticky nerozpustný je v toluenu⁸¹.



Obrázek 13: Struktura tolterodinu s jedním stereogenním centrem

Základním prekurzorem při průmyslové výrobě tolterodinu je látka methoxytolterodin (2-methoxy-5-methyl-N,N-diisopropyl-3-fenylbenzen propanamin), který je stejně jako

tolterodin opticky aktivní (Obr. 14). Methoxytolterodin je za normálních podmínek bílý krystalický prášek dobře rozpustný ve vodě a methanolu.



Obrázek 14: Struktura molekuly methoxytolterodinu

Tolterodin byl stanoven v plazmě, séru a moči metodou GC-MS⁸², HPLC-DAD⁸³ a HPLC-ESI-MS⁸⁴. V tabulce VII je souhrn publikovaných metod chirální separace *R,S*-tolterodinu.

Tabulka VII: Přehled publikovaných prací zabývajících se chirální separací *R,S*-tolterodinu.

Metoda	Poznámka	Citace
CE	Separace v nepokryté kapiláře s využitím HP- β -CD ve fosfátovém pufru o pH 3	85
HPLC-DAD	Použita kolona Chiralpak AD-H (250 mm x 4,6 mm) obsahující tris-(3,5-dimethylfenylkarbamát) amylosy	86
Kapilární EKC	Využití 5 % vysoce sulfatovaného γ -CD k separaci tří farmaceutických přípravků	87
Isokratická HPLC	Použita kolona Chiralcel OD-H (250 mm x 4,6 mm) s mobilní fází n-hexan a isopropyl alkohol v poměru 980:20 (v/v) s přidavkem 1 ml diethylaminu a 0,6 ml trifluoroctové kyseliny	88

3 Experimentální část

3.1 Instrumentální vybavení

Všechny analýzy byly provedeny kapilární elektroforézou HP 3D Agilent (Waldbronn, Germany) vybavenou UV-Vis detektorem diodového pole, v nepokryté křemenné kapiláře o vnitřním průměru 50 μm , celkové délce 48,5 cm a efektivní délce 40 cm (MicroSolv Technology Eatontown, NJ, USA), která byla termostatována na teplotu 25 °C. Na začátku každého pracovního dne byla kapilára promyta 15 minut 0,1 M NaOH, 15 minut deionizovanou vodou a nakonec 15 minut pracovním elektrolytem. Detekční vlnová délka byla nastavena na 200 nm, vzorek byl dávkován tlakem 50 mbar po dobu 5 vteřin a na kapiláru bylo vloženo napětí +20 kV.

3.2 Chemikálie a analyzované vzorky

Kyselina fosforečná (85%), hydroxid sodný, tris(hydroxymethyl)aminomethan (TRIS), methanol, fosfatovaný γ -cyklodextrin od firmy Sigma (St. Louis, MO, USA), racemická směs *R,S*-methoxytolterodinu, standardy *R*- a *S*-tolterodinu. Všechny použité látky byly čistoty p. a.

Pracovní elektrolyty byly připraveny rozpuštěním odpovídajícího množství kyseliny fosforečné v deionizované vodě a požadovaného pH bylo dosaženo titrací 5 M NaOH, resp. tris bází. Fosfatovaný γ -cyklodextrin byl do elektrolytu přidán až po úpravě pH. Z ekonomických důvodů byl elektrolyt obsahující selektor dávkován technikou partial filling (Kap. 2.3.3), kdy je chirální selektor pouze v kapiláře, a v nádobkách na anodickém (inlet) a katodickém (outlet) konci kapiláry je základní elektrolyt bez selektoru.

Vzorek methoxytolterodinu byl připraven rozpuštěním 1 mg racemické směsi v 1 ml methanolu a následným zředěním deionizovanou vodou na koncentraci 0,1 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$. Identický postup byl použit i pro vzorek tolterodinu. Analyzované tabletky léčiv Detrusitol a Uroflow jsou špatně rozpustné ve vodě, proto byla použita směs 2 ml deionizované vody a 2 ml methanolu. Z důvodu velmi špatné rozpustnosti tabletky Toviaz ve vodě, byla v tomto případě

použita směs 2 ml deionizované vody a 6 ml methanolu. Vzorke byly následně při laboratorní teplotě 30 minut sonifikovány na ultrazvukové lázni a filtrovány přes mikrofiltr o velikosti pórů 0,45 μm .

4 Výsledky a diskuze

4.1 Chirální separace *R,S*-methoxytolterodinu

Použitím pufru o kyselém pH jako pracovního elektrolytu dojde k protonizaci aminoskupiny, čímž molekula methoxytolterodinu získá kladný náboj a v separačním systému se chová jako kation. Kapilárou migruje stejným směrem jako elektroosmotický tok (od anody ke katodě), který je vlivem nízkého pH velmi slabý (Obr. 6c). Separace byla provedena ve dvou pufrch, fosfátu sodném a fosfátu tris, o koncentracích 25-100 mmol.l⁻¹ a pH 2-3. Jako chirální selektor byl vybrán P- γ -CD, který byl do pufru přidáván v koncentracích 0,1-1 hmotnostních %.

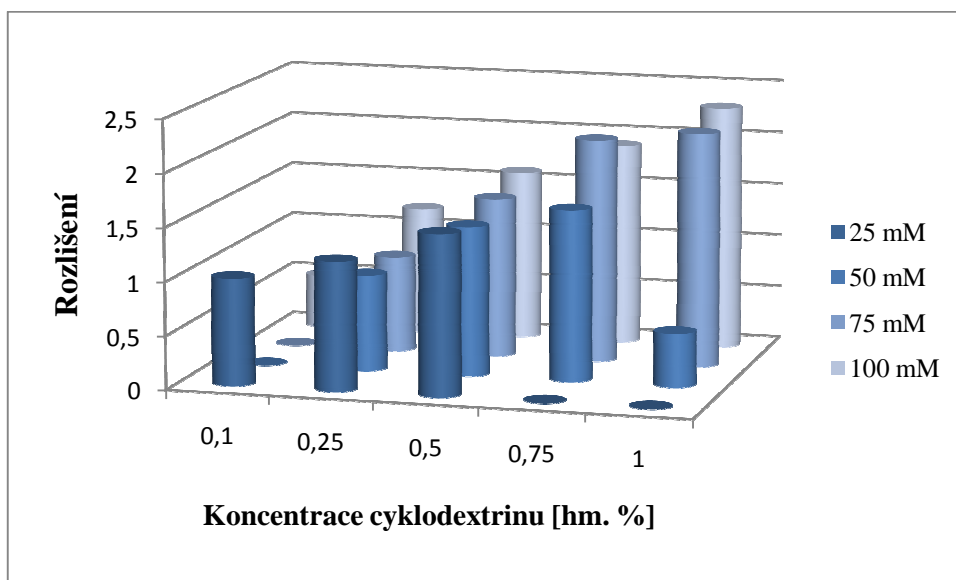
4.1.1 Vliv složení pracovního elektrolytu a koncentrace selektoru na rozlišení *R,S*-methoxytolterodinu

4.1.1.1 Separace ve fosfátu sodném

Sodný kation má oproti TRIS⁺ menší schopnost sorbovat na vnitřní stěnu kapiláry, čímž dochází ke kompenzaci záporného náboje vytvořeného disociací silanolových skupin a následného potlačení vlivu EOF. Důležitým faktorem je rovněž iontová síla BGE, která je spojena s tvorbou Joulova tepla, které vyvolává laminární profil proudění a snižuje separační účinnost. Na druhou stranu může vyšší iontová síla snížit adsorpci analytu na vnitřní stěnu kapiláry, která vede k rozmývání zón.

Vliv množství P- γ -CD na rozlišení *R,S*-methoxytolterodinu v elektrolytech o různých koncentracích fosfátu sodného (25, 50, 75 a 100 mmol.l⁻¹) o pH 2 je na obr. 40a-d (příloha 1). Se vzrůstajícím množstvím selektoru v BGE dochází ke zvyšování rozlišení, výjimku tvoří pouze elektrolyty o koncentraci 25 a 50 mmol.l⁻¹, kde maximální rozlišení bylo dosaženo již při přidávku 0,5 % P- γ -CD pro 25 mM fosfát sodný a 0,75 % P- γ -CD pro 50 mM fosfát sodný

(Obr. 15). U zmiňovaných elektrolytů další přidavek P- γ -CD vedl ke snižování hodnoty rozlišení.



Obrázek 15: Závislost rozlišení na koncentraci P- γ -CD v pracovním elektrolytu fosfátu sodného o pH 2

Může to být způsobeno nadbytkem CD v pracovním elektrolytu, což má za následek tvorbu komplexu analytu a cyklodextrinu v poměru 1:2. Při nízké koncentraci protiiontu (sodný ion), který je schopný konkurenční reakce se záporně nabitou molekulou CD, produkce těchto komplexů převažuje. Vlivem rozdílné rychlosti migrace komplexu analytu s CD v poměru 1:1 a 1:2 dochází k rozmývání zón, čímž může nastat deformace gaussovského profilu píku (Obr. 40a, příloha 1) nebo ke snížení hodnoty rozlišení vlivem překrytí obou píků (Obr. 40b, příloha 1). S rostoucí koncentrací P- γ -CD se prodlužuje migrační čas enantiomerů a klesá hodnota jejich mobilit (Tab. VIII).

Tabulka VIII: Separační charakteristiky enantiomerní separace *R,S*-methoxytolterodinu ve fosfátu sodném o pH 2 v závislosti na koncentraci P- γ -CD

25 mM					
Konc. P- γ -CD [hm. %]	Rozlišení	$\mu_I \times 10^{-9}$ [m ² /V.s]	RSD _I [%]	$\mu_{II} \times 10^{-9}$ [m ² /V.s]	RSD _{II} [%]
0,1	1,0	19,45	4,59	19,10	4,93
0,25	1,5	18,25	5,00	17,90	5,14

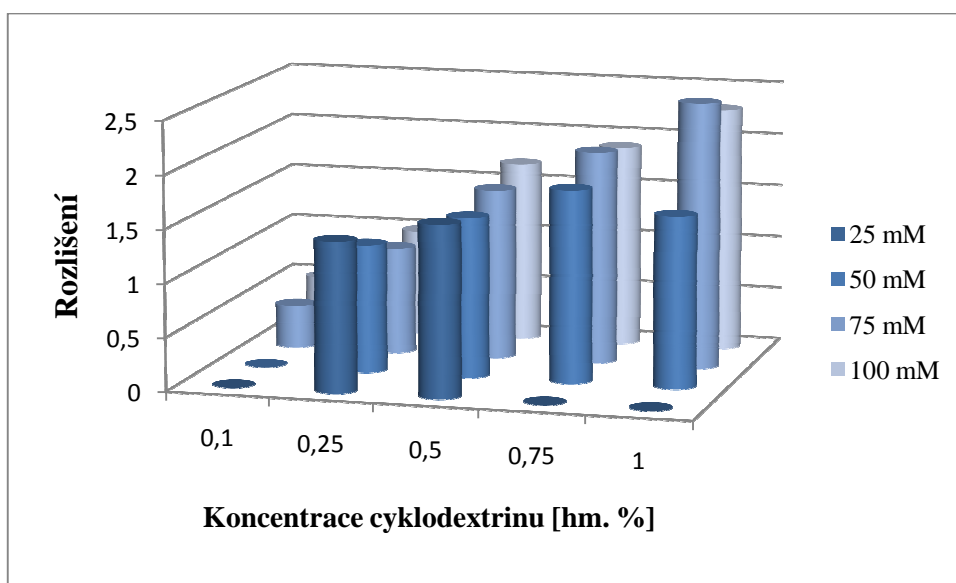
Tabulka VIII: Separační charakteristiky enantiomerní separace *R,S*-methoxytolterodinu ve fosfátu sodném o pH 2 v závislosti na koncentraci P- γ -CD

25 mM					
Konc. P- γ -CD [hm. %]	Rozlišení	$\mu_I \times 10^{-9}$ [m ² /V.s]	RSD _I [%]	$\mu_{II} \times 10^{-9}$ [m ² /V.s]	RSD _{II} [%]
0,5	1,2	15,09	0,84	14,84	0,95
0,75	-	-	-	-	-
1	-	-	-	-	-
50 mM					
Konc. P- γ -CD [hm. %]	Rozlišení	$\mu_I \times 10^{-9}$ [m ² /V.s]	RSD _I [%]	$\mu_{II} \times 10^{-9}$ [m ² /V.s]	RSD _{II} [%]
0,1	-	22,93	3,43	-	-
0,25	0,9	19,65	0,67	19,37	0,70
0,5	1,4	16,54	0,28	16,18	0,30
0,75	1,6	14,69	0,22	14,37	0,24
1	0,5	13,75	0,21	13,69	0,22
75 mM					
Konc. P- γ -CD [hm. %]	Rozlišení	$\mu_I \times 10^{-9}$ [m ² /V.s]	RSD _I [%]	$\mu_{II} \times 10^{-9}$ [m ² /V.s]	RSD _{II} [%]
0,1	-	18,93	4,04	-	-
0,25	0,9	18,03	1,56	18,12	1,61
0,5	1,5	14,86	2,50	14,57	2,52
0,75	2,1	13,69	0,72	13,27	1,20
1	2,2	12,23	3,06	11,96	3,08
100 mM					
Konc. P- γ -CD [hm. %]	Rozlišení	$\mu_I \times 10^{-9}$ [m ² /V.s]	RSD _I [%]	$\mu_{II} \times 10^{-9}$ [m ² /V.s]	RSD _{II} [%]
0,1	0,5	19,87	2,36	19,77	2,45
0,25	1,2	17,16	2,88	16,96	2,93
0,5	1,6	15,68	1,72	15,41	1,74
0,75	1,9	13,40	3,47	13,07	3,52
1	2,3	13,36	1,40	13,06	1,51

Kromě hodnoty rozlišení a množství cyklodextrinu potřebného k enantiomerní separaci je neméně důležitým faktorem účinnosti i symetrie píku a doba analýzy. Ve fosfátu sodném

o pH 2 tyto parametry nejlépe splňuje pracovní elektrolyt o koncentraci 100 mmol.l^{-1} s přídavkem 0,75 % P- γ -CD.

Ve fosfátu sodném o pH 2,5 je v nepokryté křemenné kapiláře působení EOF větší, rozdíl v rychlosti EOF však není významný, proto by neměl mít na separaci zásadní vliv. Elektroferogramy enantiomerní separace racemátu *R,S*-methoxytolterodinu ve fosfátu sodném o pH 2,5 a koncentraci 25 až 100 mM s přídavky P- γ -CD jsou na obr. 41a-d (příloha 1). Separace ve 25 mM fosfátu sodném o pH 2,5 (Obr. 41a, příloha 1) je do značné míry podobná separaci v pufru o pH 2 (Obr. 40a, příloha 1), kde lze pozorovat změnu symetrie píků při koncentraci 0,75 % P- γ -CD a vyšší. Podobnost potvrzuje zanedbatelný nárůst doby analýzy a malý vliv větší iontové síly na separační účinnost. Rozdílný průběh separace oproti předchozím podmínkám (Obr. 40b, příloha 1) je zřetelný u 50 mM fosfátu sodném o pH 2,5 s 1 % P- γ -CD (Obr. 41b, příloha 1). Z elektroferogramu (Obr. 41c, d; příloha 1) je evidentní závislost mezi vzrůstající koncentrací P- γ -CD a rozlišením (Obr. 16) a navíc dochází k nárůstu migračních časů enantiomerů (Tab. IX). Největší hodnoty rozlišení bylo dosaženo v 75 mmol.l^{-1} fosfátu sodném o pH 2,5 s 1 % P- γ -CD.

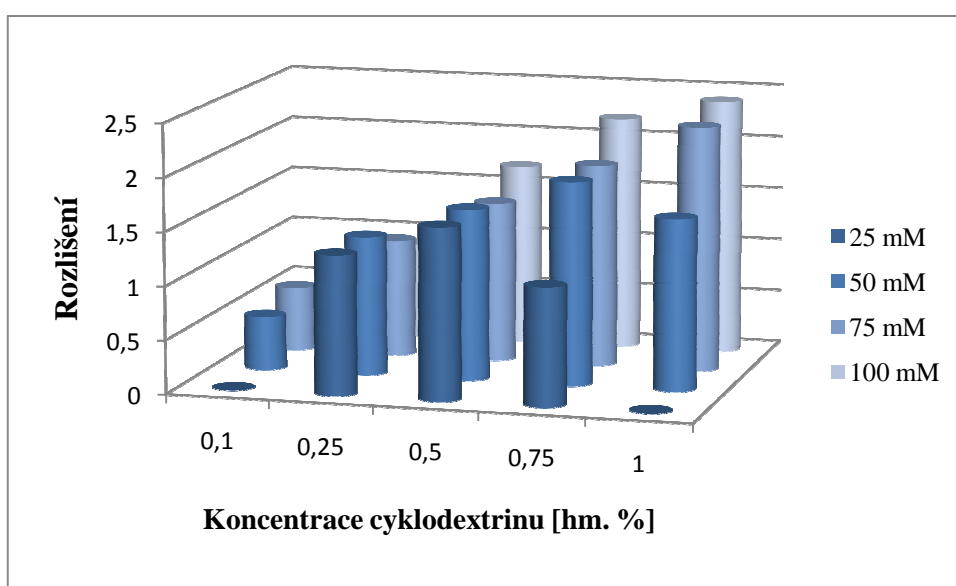


Obrázek 16: Závislost rozlišení na koncentraci P- γ -CD v pracovním elektrolytu fosfátu sodného o pH 2,5

Tabulka IX: Separační charakteristiky enantiomerní separace *R,S*-methoxytolterodinu ve fosfátu sodném o pH 2,5 v závislosti na koncentraci P- γ -CD

25 mM					
Konc. P- γ -CD [hm. %]	Rozlišení	$\mu_I \times 10^{-9}$ [m ² /V.s]	RSD _I [%]	$\mu_{II} \times 10^{-9}$ [m ² /V.s]	RSD _{II} [%]
0,1	-	21,15	3,26	-	-
0,25	1,4	15,62	4,62	15,33	5,71
0,5	1,6	14,10	0,80	13,75	0,73
0,75	-	-	-	-	-
1	-	-	-	-	-
50 mM					
Konc. P- γ -CD [hm. %]	Rozlišení	$\mu_I \times 10^{-9}$ [m ² /V.s]	RSD _I [%]	$\mu_{II} \times 10^{-9}$ [m ² /V.s]	RSD _{II} [%]
0,1	-	19,97	0,47	-	-
0,25	1,2	17,91	0,12	17,66	0,13
0,5	1,5	15,67	2,40	15,11	0,04
0,75	1,8	13,77	1,26	13,39	1,22
1	1,6	12,79	0,03	12,59	0,02
75 mM					
Konc. P- γ -CD [hm. %]	Rozlišení	$\mu_I \times 10^{-9}$ [m ² /V.s]	RSD _I [%]	$\mu_{II} \times 10^{-9}$ [m ² /V.s]	RSD _{II} [%]
0,1	0,4	18,22	0,06	18,15	0,06
0,25	1,0	17,07	0,72	16,86	0,63
0,5	1,6	15,33	2,06	15,03	2,09
0,75	2,0	14,00	1,57	13,65	1,65
1	2,5	12,65	4,82	12,28	4,89
100 mM					
Konc. P- γ -CD [hm. %]	Rozlišení	$\mu_I \times 10^{-9}$ [m ² /V.s]	RSD _I [%]	$\mu_{II} \times 10^{-9}$ [m ² /V.s]	RSD _{II} [%]
0,1	0,5	17,80	1,01	17,65	1,03
0,25	1,0	16,98	2,33	16,82	2,31
0,5	1,7	15,06	2,15	14,8	2,13
0,75	1,9	13,48	0,31	13,2	0,26
1	2,3	12,82	4,62	12,45	5,01

Předchozí výsledky naznačují, že změna pH základního elektrolytu a s tím spojená rychlost EOF nemá na průběh separace za daných podmínek (fosfát sodný o koncentraci 25-100 mM) podstatný vliv. Přesto lze zaznamenat s rostoucí iontovou silou, která je částečně závislá na pH, získání lepšího rozlišení a separační účinnosti (Obr. 17). Průběh separace v elektrolytech o různých koncentracích fosfátu sodného o pH 3 se nijak výrazně neodlišuje od předešlých, je možné však pozorovat menší rozmytí zón a tím lepší symetrii píků (Obr. 42a-d, příloha 1). Přehled nejdůležitějších separačních vlastností je opět shrnut v tabulce X.



Obrázek 17: Závislost rozlišení na koncentraci P- γ -CD v pracovním elektrolytu fosfátu sodného o pH 3

Tabulka X: Vybrané separační charakteristiky enantiomerní separace *R,S*-methoxytolterodinu ve fosfátu sodném o pH 3 v závislosti na koncentraci P- γ -CD

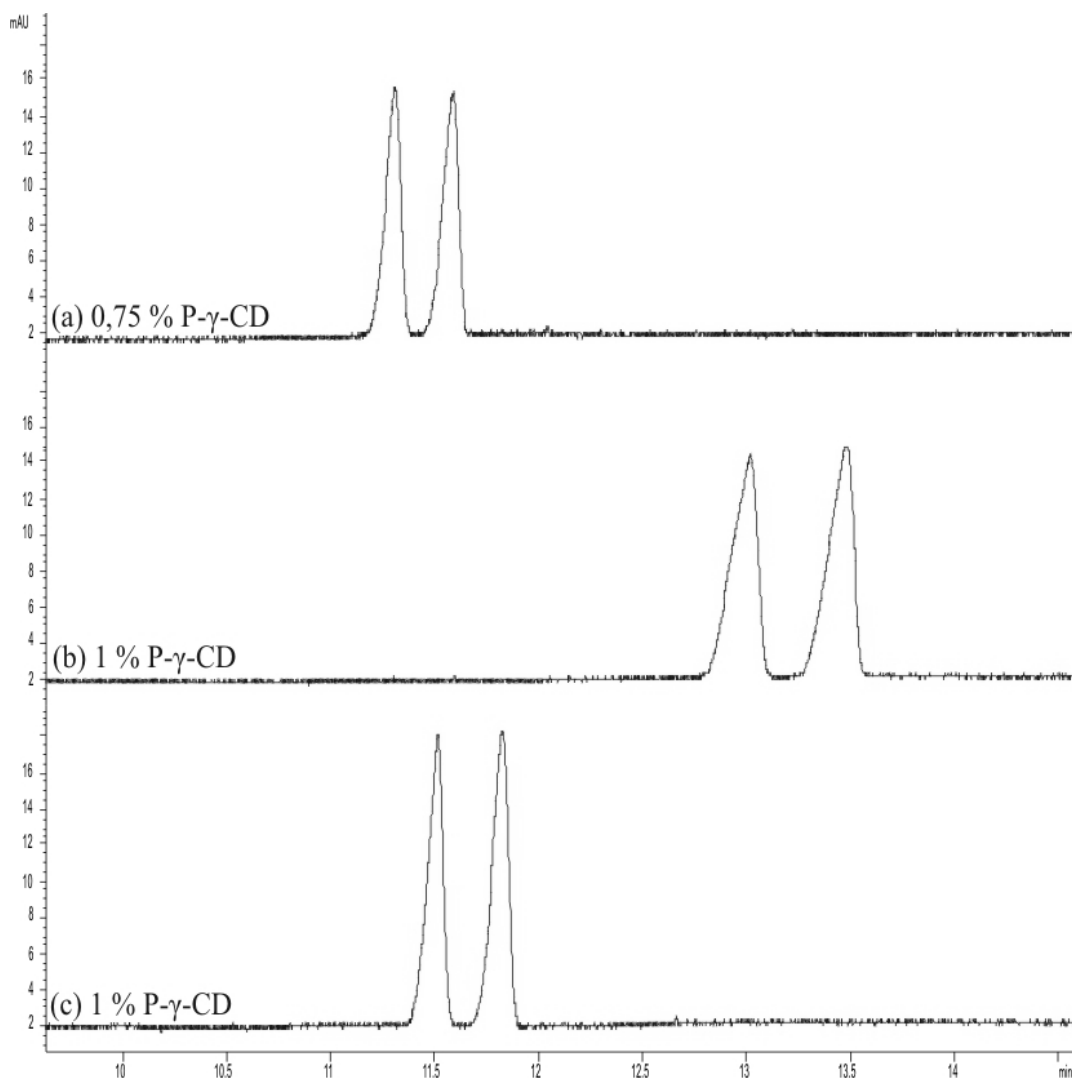
25 mM					
Konc. P- γ -CD [hm. %]	Rozlišení	$\mu_I \times 10^{-9}$ [m ² /V.s]	RSD _I [%]	$\mu_{II} \times 10^{-9}$ [m ² /V.s]	RSD _{II} [%]
0,1	-	20,56	2,19	-	-
0,25	1,3	16,45	1,09	16,12	1,19
0,5	1,6	14,69	0,25	14,29	0,27
0,75	1,1	13,27	0,63	13,10	0,67
1	-	-	-	-	-

Tabulka X: Vybrané separační charakteristiky enantiomerní separace *R,S*-methoxytolterodinu ve fosfátu sodném o pH 3 v závislosti na koncentraci P- γ -CD

50 mM					
Konc. P- γ -CD [hm. %]	Rozlišení	$\mu_I \times 10^{-9}$ [m ² /V.s]	RSD _I [%]	$\mu_{II} \times 10^{-9}$ [m ² /V.s]	RSD _{II} [%]
0,1	0,5	18,71	0,06	18,61	0,08
0,25	1,3	16,71	0,03	16,46	0,04
0,5	1,6	14,74	0,07	14,41	0,08
0,75	1,9	13,39	0,41	13,01	0,40
1	1,6	12,81	0,04	12,63	0,08
75 mM					
Konc. P- γ -CD [hm. %]	Rozlišení	$\mu_I \times 10^{-9}$ [m ² /V.s]	RSD _I [%]	$\mu_{II} \times 10^{-9}$ [m ² /V.s]	RSD _{II} [%]
0,1	0,6	17,74	0,67	17,64	0,77
0,25	1,1	16,24	0,74	16,06	0,74
0,5	1,5	14,51	1,28	14,29	1,58
0,75	1,9	14,29	1,20	13,97	1,24
1	2,3	13,47	1,75	13,11	1,73
100 mM					
Konc. P- γ -CD [hm. %]	Rozlišení	$\mu_I \times 10^{-9}$ [m ² /V.s]	RSD _I [%]	$\mu_{II} \times 10^{-9}$ [m ² /V.s]	RSD _{II} [%]
0,1	-	18,17	0,30	-	-
0,25	0,9	16,69	3,57	16,53	3,57
0,5	1,7	15,14	1,93	14,89	1,91
0,75	2,2	14,06	1,09	13,70	0,70
1	2,4	14,18	1,07	13,82	1,15

V pracovním elektrolytu o pH 3 dosáhl nejlepších výsledků 100 mmol.l⁻¹ fosfát sodný s přídavkem 1 % P- γ -CD, získané rozlišení má hodnotu 2,4 a oba píky mají symetrii vhodnou ke kvantifikaci.

Z předcházejících závěrů vyplývá, že nejlepší pracovní podmínky pro enantiomerní separaci *R,S*-methoxytolterodinu ve fosfátu sodném o pH 2-3 s přídavkem P- γ -CD jako chirálního selektoru jsou v pufru o koncentraci 75 mmol.l⁻¹ a pH 2,5 a pufru o koncentraci 100 mmol.l⁻¹ a pH 2 a 3 (Obr. 18). Přehledné srovnání hodnot rozlišení a mobilit u těchto tří vybraných analýz jsou v tabulce XI.



Obrázek 18: Srovnání elektroferogramů separace *R,S*-methoxytolterodinu v 100 mM fosfátu sodném (a) o pH 2 a (c) pH 3, a v (b) 75 mM fosfátu sodném o pH 2,5 s přidavkem P- γ -CD

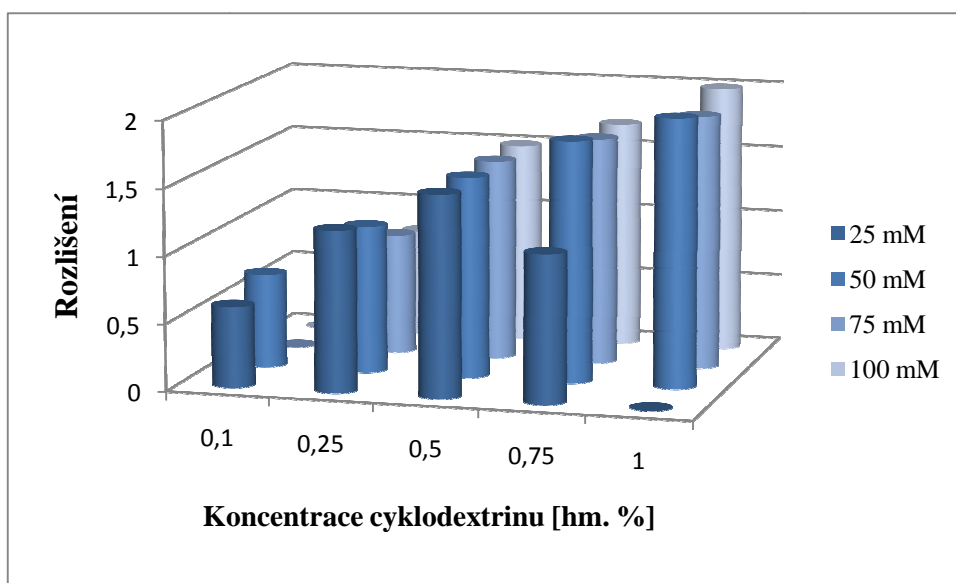
Tabulka XI: Základní separační charakteristiky enantiomerní separace *R,S*-methoxytolterodinu vybraných analýz ve fosfátu sodném

pH pufru	Konc. pufru [mM]	Konc. P- γ -CD [hm. %]	Rozlišení	$\mu_1 \times 10^{-9}$ [m ² /V.s]	$\mu_2 \times 10^{-9}$ [m ² /V.s]
2	100	0,75	1,9	13,40	13,07
2,5	75	1	2,5	12,65	12,28
3	100	1	2,4	14,18	13,82

4.1.1.2 Separace ve fosfátu tris

Jak již bylo zmíněno, hlavní rozdíl mezi fosfátem tris a fosfátem sodným je schopnost TRIS^+ silnější sorpce na vnitřní stěnu kapiláry, potlačuje tím adsorpci analytu na stěnu kapiláry, čímž zabraňuje rozmývání píků.

Vliv koncentrace fosfátovaného γ -CD na průběh separace v elektrolytech o různých koncentracích fosfátu tris o pH 2 je patrný z elektroferogramů (Obr. 43a-d, příloha 2). Hodnoty rozlišení jsou přímo závislé na rostoucí koncentraci P- γ -CD, výjimkou je pouze separace v elektrolytu o koncentraci 25 mmol.l^{-1} , u které je dosaženo maximálního rozlišení při přidavku P- γ -CD o koncentraci 0,5 hm. % (Obr. 19). Oproti separaci ve fosfátu sodném o totožném pH nedochází k deformacím profilu píků, což potvrzuje pozitivní vliv TRIS^+ na separaci. Z hodnot elektroforetických mobilit (Tab. XII) vyplývá, že pokles rychlosti EOF oproti separaci ve fosfátu sodném je minimální a doba analýzy se výrazně neprodlužuje.



Obrázek 19: Závislost rozlišení na koncentraci P- γ -CD v pracovním elektrolytu fosfátu tris o pH 2

Tabulka XII: Separační charakteristiky enantiomerní separace *R,S*-methoxytolterodinu ve fosfátu tris o pH 2 v závislosti na koncentraci P- γ -CD

25 mM					
Konc. P- γ -CD [hm. %]	Rozlišení	$\mu_I \times 10^{-9}$ [m ² /V.s]	RSD _I [%]	$\mu_{II} \times 10^{-9}$ [m ² /V.s]	RSD _{II} [%]
0,1	0,6	19,94	1,22	19,78	1,37
0,25	1,2	17,16	3,53	16,84	3,75
0,5	1,5	14,14	3,29	13,79	2,99
0,75	1,1	13,20	0,42	13,07	0,35
1	-	-	-	-	-
50 mM					
Konc. P- γ -CD [hm. %]	Rozlišení	$\mu_I \times 10^{-9}$ [m ² /V.s]	RSD _I [%]	$\mu_{II} \times 10^{-9}$ [m ² /V.s]	RSD _{II} [%]
0,1	0,7	18,99	2,76	18,81	3,00
0,25	1,1	17,79	0,39	17,52	0,24
0,5	1,5	15,56	0,02	15,22	0,03
0,75	1,8	13,52	0,98	13,16	1,02
1	2,0	12,40	0,50	12,09	0,51
75 mM					
Konc. P- γ -CD [hm. %]	Rozlišení	$\mu_I \times 10^{-9}$ [m ² /V.s]	RSD _I [%]	$\mu_{II} \times 10^{-9}$ [m ² /V.s]	RSD _{II} [%]
0,1	-	18,05	1,01	-	-
0,25	0,9	17,38	0,57	17,19	0,61
0,5	1,5	15,07	0,40	14,77	0,42
0,75	1,7	14,28	1,20	13,95	0,33
1	1,9	13,18	0,22	12,83	0,23
100 mM					
Konc. P- γ -CD [hm. %]	Rozlišení	$\mu_I \times 10^{-9}$ [m ² /V.s]	RSD _I [%]	$\mu_{II} \times 10^{-9}$ [m ² /V.s]	RSD _{II} [%]
0,1	-	18,11	0,37	-	-
0,25	0,8	17,06	0,22	16,90	0,21
0,5	1,5	14,97	0,54	14,71	0,53
0,75	1,7	13,52	0,98	13,16	1,02
1	2,0	14,31	9,02	13,13	1,55

Separace s největším rozlišením a symetrií píků bylo docíleno v elektrolytu o koncentraci 50 mmol.l⁻¹ s přidavkem 1 % fosfatovaného γ -CD.

S rostoucí hodnotou pH roste i vliv iontové síly na separaci, změna je však tak malá, že průběh separace bude podobný jako u předchozího pH. Tento fakt potvrzují elektroferogramy enantiomerní separace *R,S*-methoxytolterodinu na obrázku 44a-d (příloha 2). Stejně jako u fosfátu sodného lze pozorovat malé zlepšení rozlišení spojené s mírným nárůstem migračních časů (Tab XIII).

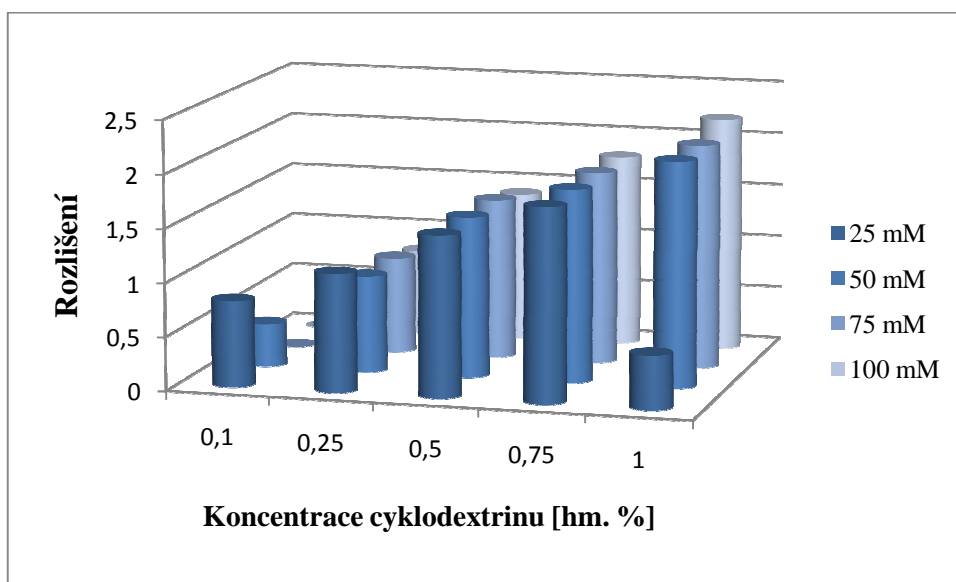
Tabulka XIII: Separační charakteristiky enantiomerní separace *R,S*-methoxytolterodinu ve fosfátu tris o pH 2,5 v závislosti na koncentraci P- γ -CD

25 mM					
Konc. P- γ -CD [hm. %]	Rozlišení	$\mu_I \times 10^{-9}$ [m ² /V.s]	RSD _I [%]	$\mu_{II} \times 10^{-9}$ [m ² /V.s]	RSD _{II} [%]
0,1	0,8	17,36	2,19	17,18	2,08
0,25	1,1	15,75	2,03	15,47	2,07
0,5	1,5	14,01	0,62	13,65	0,65
0,75	1,8	12,50	0,10	12,15	0,12
1	0,5	11,65	0,04	11,60	0,04
50 mM					
Konc. P- γ -CD [hm. %]	Rozlišení	$\mu_I \times 10^{-9}$ [m ² /V.s]	RSD _I [%]	$\mu_{II} \times 10^{-9}$ [m ² /V.s]	RSD _{II} [%]
0,1	0,4	17,08	0,47	16,99	0,54
0,25	0,9	16,01	0,25	15,81	0,25
0,5	1,5	14,27	0,14	13,96	0,15
0,75	1,8	13,22	0,11	12,88	0,11
1	2,1	11,88	0,14	11,52	0,16
75 mM					
Konc. P- γ -CD [hm. %]	Rozlišení	$\mu_I \times 10^{-9}$ [m ² /V.s]	RSD _I [%]	$\mu_{II} \times 10^{-9}$ [m ² /V.s]	RSD _{II} [%]
0,1	-	16,67	0,39	-	-
0,25	0,9	15,52	0,13	15,35	0,13
0,5	1,5	14,11	0,20	13,85	0,20
0,75	1,8	13,13	0,22	12,82	0,22
1	2,1	12,01	0,04	11,68	0,05

Tabulka XIII: Separační charakteristiky enantiomerní separace *R,S*-methoxytolterodinu ve fosfátu tris o pH 2,5 v závislosti na koncentraci P- γ -CD

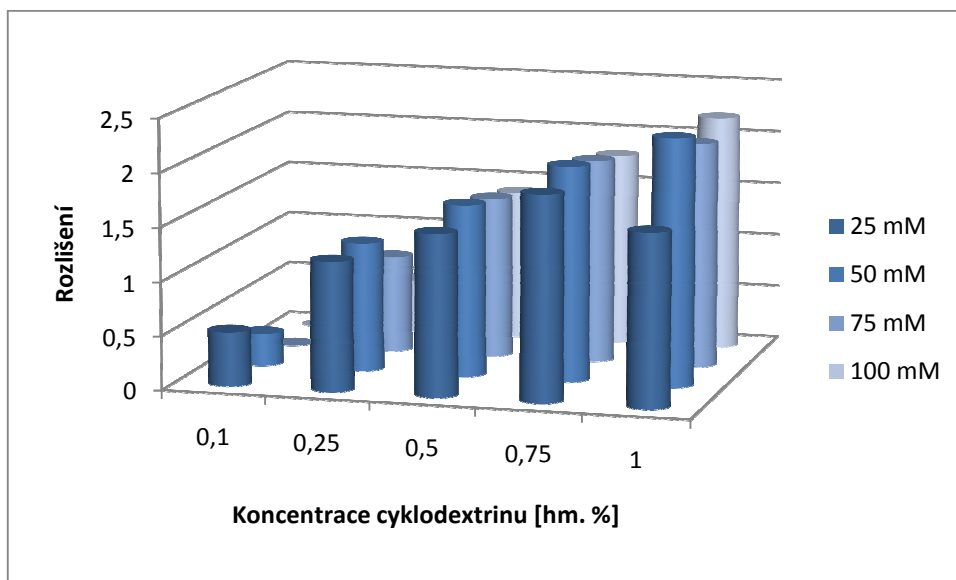
100 mM					
Konc. P- γ -CD [hm. %]	Rozlišení	$\mu_I \times 10^{-9}$ [m ² /V.s]	RSD _I [%]	$\mu_{II} \times 10^{-9}$ [m ² /V.s]	RSD _{II} [%]
0,1	-	16,53	0,29	-	-
0,25	0,8	16,08	0,07	15,95	0,07
0,5	1,4	14,86	0,04	14,64	0,04
0,75	1,8	13,66	0,24	13,39	0,24
1	2,2	12,24	0,06	11,94	0,04

Srovnáním separace ve 25 mM fosfátu tris o pH 2 (Obr. 43a, příloha 2), kde maximálního rozlišení bylo dosaženo použitím 0,5 % P- γ -CD, a separace ve 25 mM fosfátu tris o pH 2,5, kde k docílení největšího rozlišení bylo potřeba 0,75 % P- γ -CD (Obr. 20), lze potvrdit konkurenční reakce protiiontu základního elektrolytu se záporně nabitou molekulou cyklodextrinu. Ve zvoleném elektrolytu fosfátu tris o pH 2,5 má nejlepší hodnotu rozlišení a přijatelnou dobu analýzy pufr o koncentraci 100 mmol.l⁻¹ s přidavkem 1 % P- γ -CD jako chirálního selektoru.



Obrázek 20: Závislost rozlišení na koncentraci P- γ -CD v pracovním elektrolytu fosfátu tris o pH 2,5

Průběh separace v elektrolytech o různých koncentracích fosfátu tris o pH 3 lze pozorovat na elektroferogramech (Obr. 45a-d, příloha 2) a závislost rozlišení na koncentraci P- γ -CD pro všechny koncentrace pufru je zobrazena na obr. 21.



Obrázek 21: Závislost rozlišení na koncentraci P- γ -CD v pracovním elektrolytu fosfátu tris o pH 3

Vybrané separační parametry pro enantiomerní separaci *R,S*-methoxytolterodinu jsou v tabulce XIV.

Tabulka XIV: Separační charakteristiky enantiomerní separace racemátu *R,S*-methoxytolterodinu ve fosfátu tris o pH 3

25 mM					
Konc. P- γ -CD [hm. %]	Rozlišení	$\mu_1 \times 10^{-9}$ [m ² /V.s]	RSD _I [%]	$\mu_{II} \times 10^{-9}$ [m ² /V.s]	RSD _{II} [%]
0,1	0,5	17,61	0,26	17,49	0,29
0,25	1,2	15,75	0,04	15,48	0,04
0,5	1,5	13,83	0,21	13,47	0,23
0,75	1,9	12,43	0,11	12,03	0,09
1	1,6	11,59	0,79	11,40	0,82

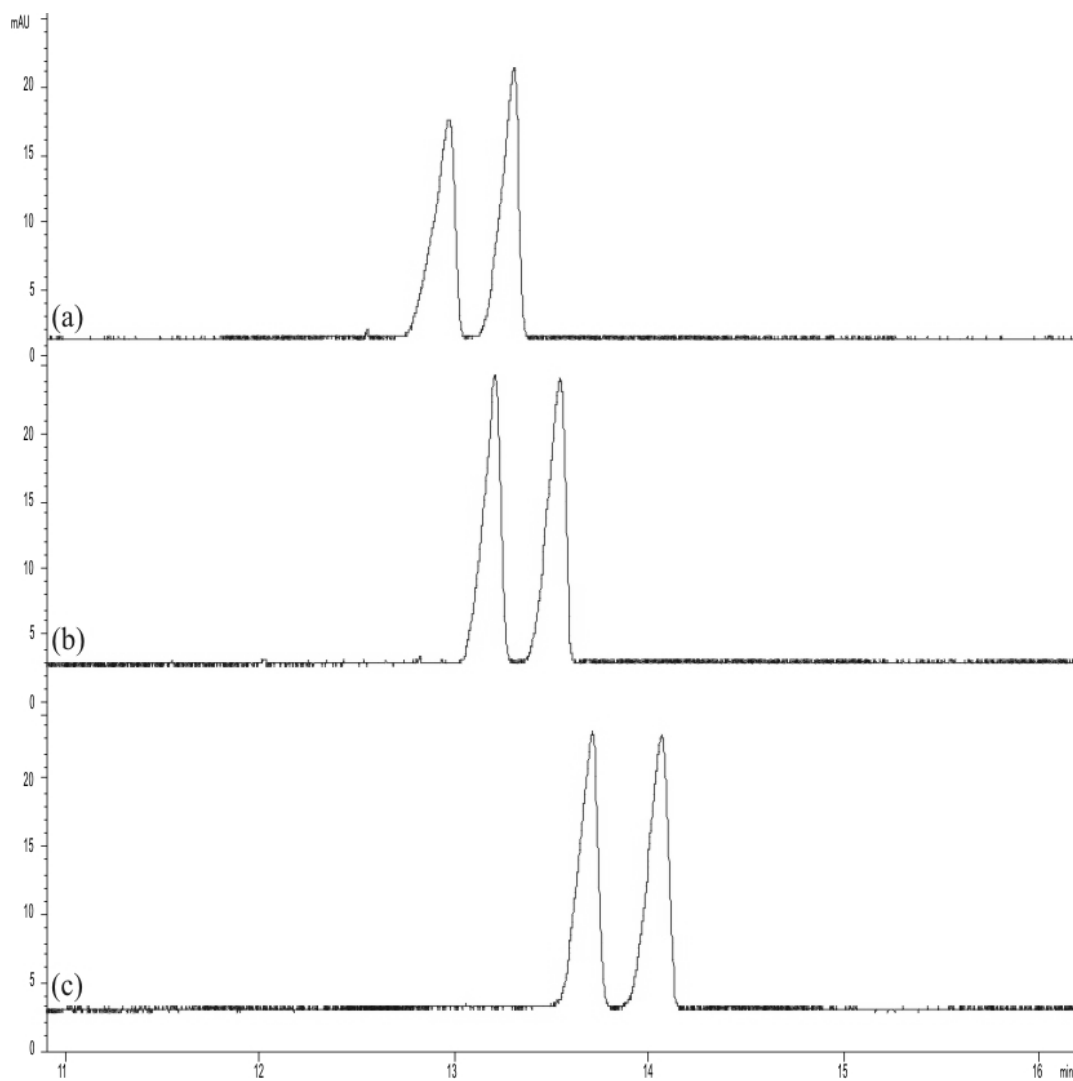
Tabulka XIV: Separační charakteristiky enantiomerní separace racemátu *R,S*-methoxytolterodinu ve fosfátu tris o pH 3

50 mM					
Konc. P- γ -CD [hm. %]	Rozlišení	$\mu_I \times 10^{-9}$ [m ² /V.s]	RSD _I [%]	$\mu_{II} \times 10^{-9}$ [m ² /V.s]	RSD _{II} [%]
0,1	0,3	16,40	0,09	16,33	0,05
0,25	1,2	15,09	0,05	14,90	0,06
0,5	1,6	13,87	0,04	13,59	0,03
0,75	2,0	12,01	0,18	11,68	0,18
1	2,3	11,69	0,74	11,33	0,73
75 mM					
Konc. P- γ -CD [hm. %]	Rozlišení	$\mu_I \times 10^{-9}$ [m ² /V.s]	RSD _I [%]	$\mu_{II} \times 10^{-9}$ [m ² /V.s]	RSD _{II} [%]
0,1	-	16,11	0,17	-	-
0,25	0,9	15,20	0,11	15,06	0,11
0,5	1,5	13,83	0,02	13,60	0,02
0,75	1,9	12,83	0,48	12,59	0,47
1	2,1	12,31	0,07	11,98	0,07
100 mM					
Konc. P- γ -CD [hm. %]	Rozlišení	$\mu_I \times 10^{-9}$ [m ² /V.s]	RSD _I [%]	$\mu_{II} \times 10^{-9}$ [m ² /V.s]	RSD _{II} [%]
0,1	-	16,40	0,02	-	-
0,25	0,5	15,18	0,37	15,07	0,36
0,5	1,4	13,96	0,75	13,77	0,73
0,75	1,8	12,72	1,54	12,48	1,57
1	2,2	11,88	0,96	11,59	1,10

Na základě elektroferogramů a tabulky základních charakteristik separace je nejlepším pracovním elektrolytem k separaci *R,S*-methoxytolterodinu 100 mmol.l⁻¹ fosfát tris o pH 3 s přídavkem 1 % P- γ -CD.

Separace v elektrolytu fosfátu tris dosahují srovnatelného rozlišení jako ve fosfátu sodném, navíc mají píky vlivem menší sorpce analytu na vnitřní stěnu kapiláry a pomalejšího EOF vhodnější profil ke kvantifikaci. Tento fakt je způsoben rozdílnými vlastnostmi sodného a TRIS⁺ iontu. Jako nejlepší separační podmínky byly vybrány fosfát tris o koncentraci 50 mmol.l⁻¹ s přídavkem 1 % fosfatovaného γ -CD a pH 2 a koncentraci 100 mmol.l⁻¹ s 1 %

P- γ -CD pro pH 2,5 a 3 (Obr. 22). Srovnání hodnot rozlišení a mobilit pro tyto tři analýzy je v tabulce XV.



Obrázek 22: Srovnání elektroferogramů separace *R,S*-methoxytolterodinu v (a) 50 mM fosfátu tris o pH 2 a v 100 mM fosfátu tris (b) o pH 2,5 a (c) pH 3 s využitím 1 % P- γ -CD jako chirálního selektoru

Tabulka XV: Základní separační charakteristiky enantiomerní separace racemátu *R,S*-methoxytolterodinu tří vybraných analýz ve fosfátu tris

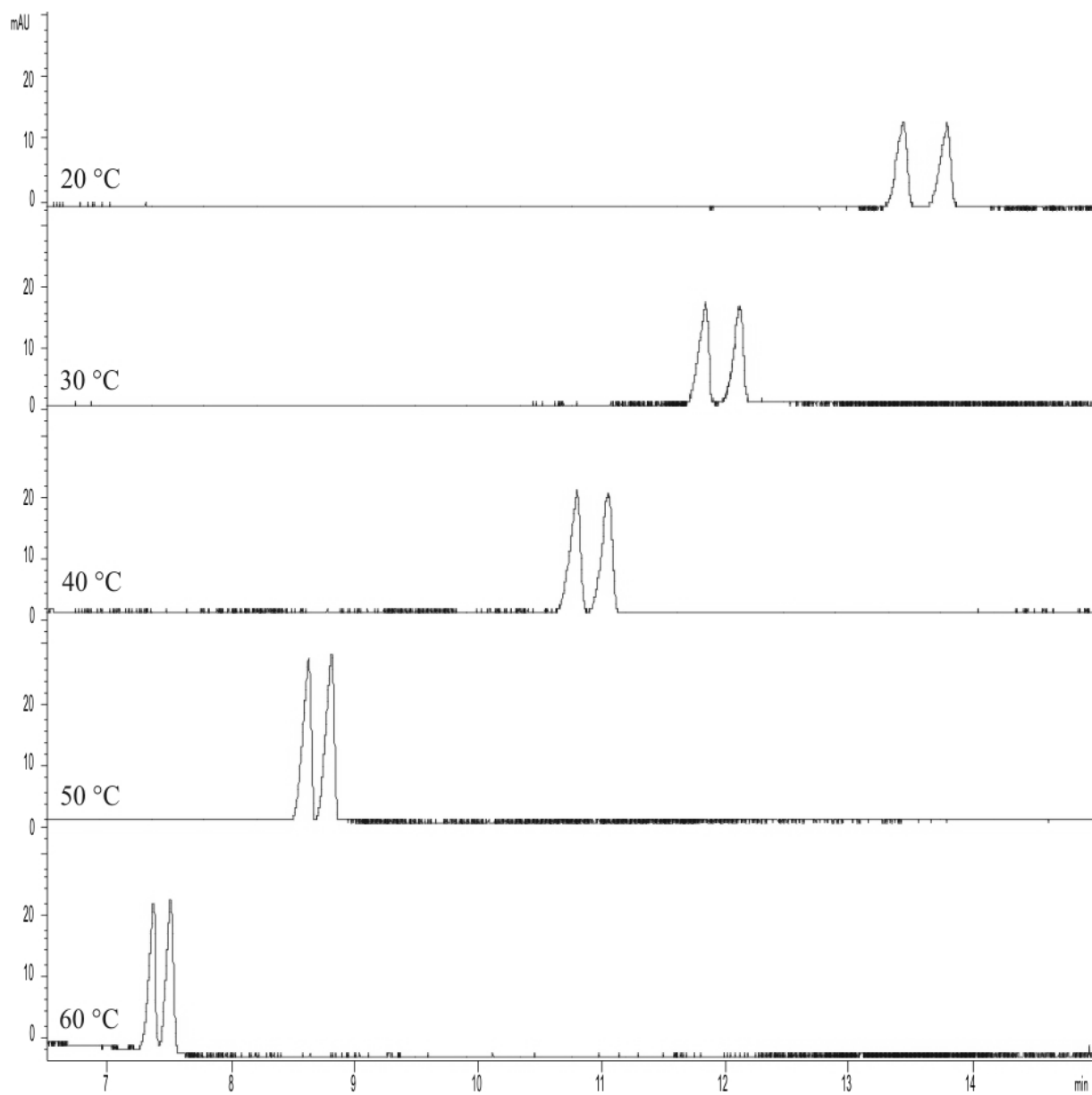
pH pufru	Konc. pufru [mM]	Konc. P- γ -CD [hm. %]	Rozlišení	$\mu_I \times 10^{-9}$ [m ² /V.s]	$\mu_{II} \times 10^{-9}$ [m ² /V.s]
2	50	1	2,0	12,40	12,09
2,5	100	1	2,2	12,24	11,94
3	100	1	2,2	11,88	11,59

4.1.2 Vliv teploty na separaci *R,S*-methoxytolterodinu

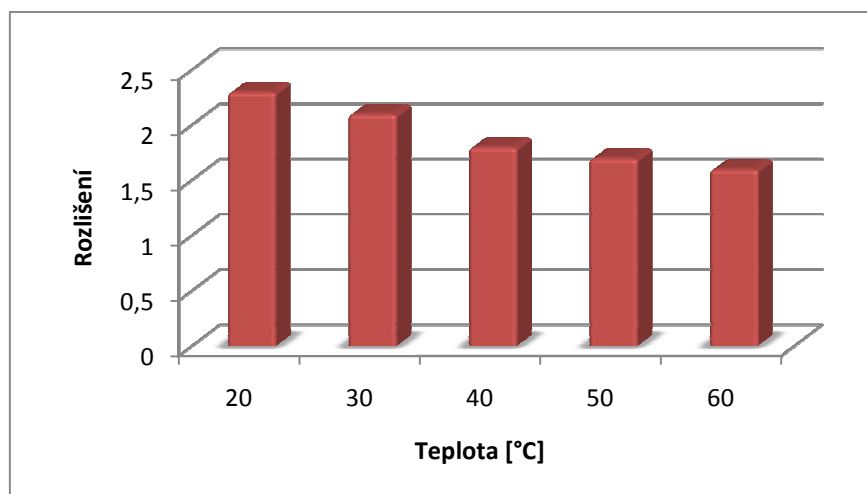
Teplota může mít negativní vliv na průběh separace. S rostoucí teplotou totiž roste i rychlost elektroosmotického toku, což má za následek zkrácení doby analýzy a především zhoršení rozlišení až úplné překrytí obou píků. Vliv teploty na chirální separaci methoxytolterodinu byl studován v 100 mM fosfátu tris o pH 2,5 s 1 % P- γ -CD v rozmezí teplot 20 až 60 °C. Hodnoty elektroforetických mobilit obou enantiomerů a získaného rozlišení jsou v tabulce XVI. Z elektroferogramů (Obr. 23) je evidentní zkrácení doby analýz a zhoršování rozlišení (Obr. 24).

Tabulka XVI: Hodnoty rozlišení a elektroforetických mobilit separace *R,S*-methoxytolterodinu v teplotním rozmezí 20-60 °C

Teplota [°C]	Rozlišení	$\mu_I \times 10^{-9}$ [m ² /V.s]	RSD _I [%]	$\mu_{II} \times 10^{-9}$ [m ² /V.s]	RSD _{II} [%]
20	2,3	11,75	3,34	11,45	3,32
30	2,1	13,66	2,95	13,33	2,84
40	1,8	15,65	6,21	15,29	6,23
50	1,7	18,90	1,13	18,50	1,15
60	1,6	21,50	2,93	21,03	3,32



Obrázek 23: Elektroferogramy chirální separace methoxytolterodinu v 100 mM fosfátu tris o pH 2,5 s přidavkem 1 % P- γ -CD v rozmezí teplot 20-60 °C



Obrázek 24: Závislost rozlišení na rostoucí teplotě separace *R,S*-methoxytolterodinu

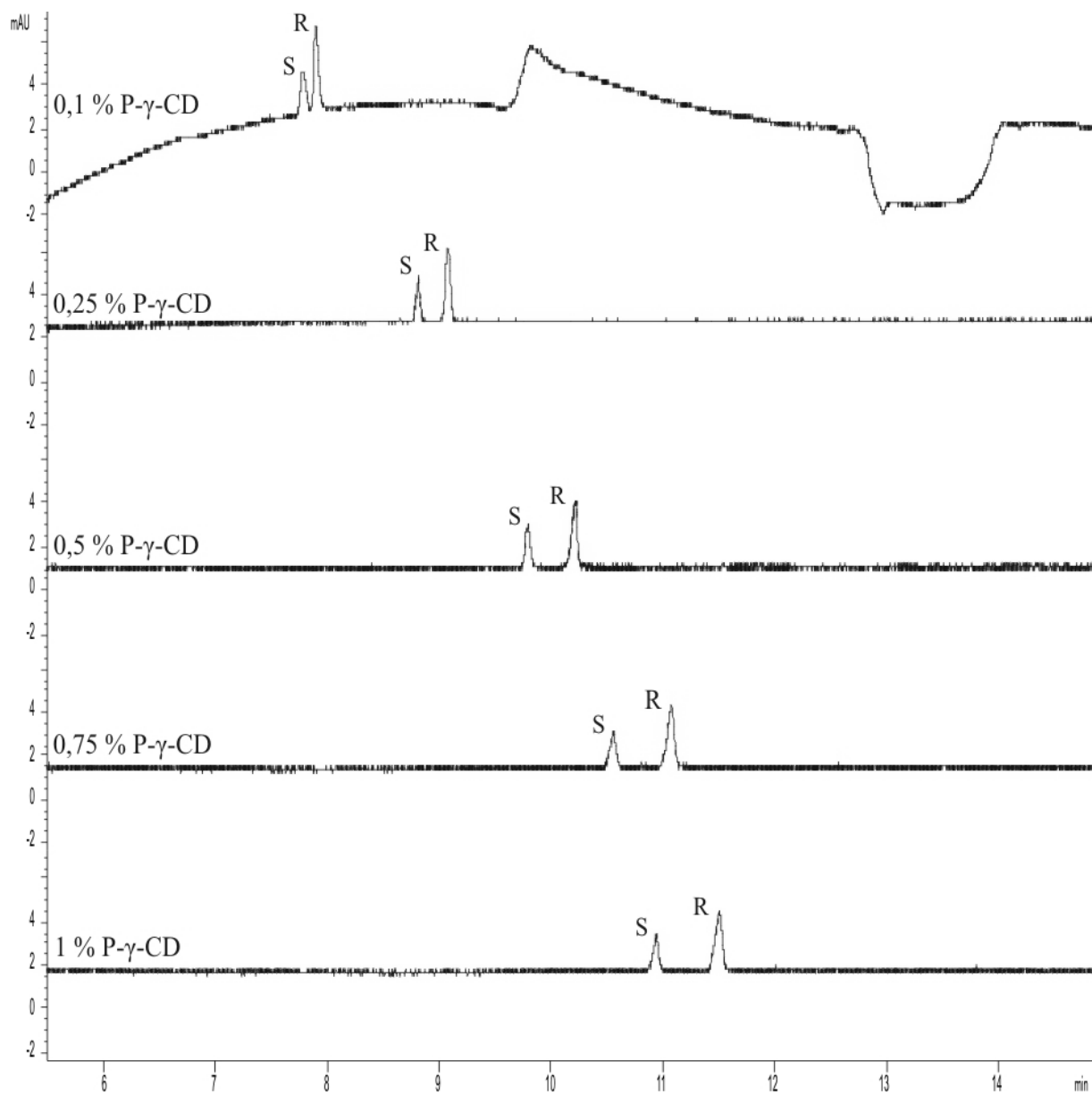
Pro enantiomerní separaci methoxytolterodinu má vzrůstající teplota negativní vliv, což je v souladu s teorií.

4.2 Chirální separace *R,S*-tolterodinu

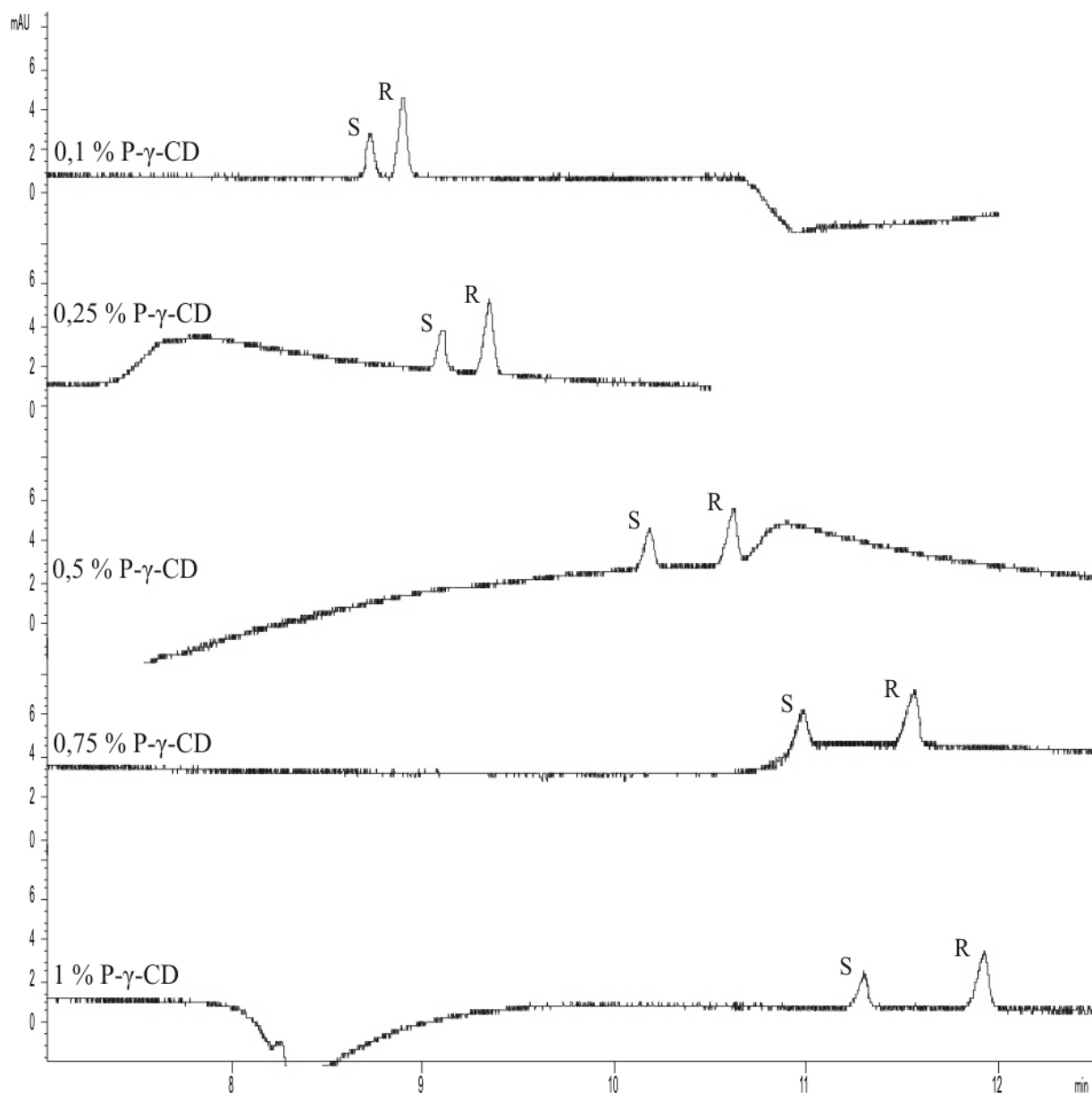
Na základě podobné struktury tolterodinu a methoxytolterodinu (Obr. 13, 14) lze předpovídat chování analytu v námi zvolených separačních podmínkách, proto není potřeba znovu proměřovat všechny koncentrace a pH obou pufrů, ale pouze optimalizovat separační podmínky. Hydroxylová skupina tolterodinu může, na rozdíl od methylové skupiny methoxytolterodinu, snadno vytvářet vodíkové vazby s cyklodextrinem, a tím mohou vznikat diastereomerní komplexy s vyššími konstantami stability.

4.2.1 Vliv koncentrace fosfatovaného γ -CD

Nejdřív je potřeba ověřit závěry získané enantiomerní separací *R,S*-methoxytolterodinu o vlivu koncentrace P- γ -CD na rozlišení. Jako pracovní elektrolyt byl vybrán fosfát sodný a fosfát tris o koncentraci 50 mmol.l⁻¹ a pH 2,5 s přidavkem P- γ -CD o koncentraci 0,1-1 hm. % (Obr. 25a, b).



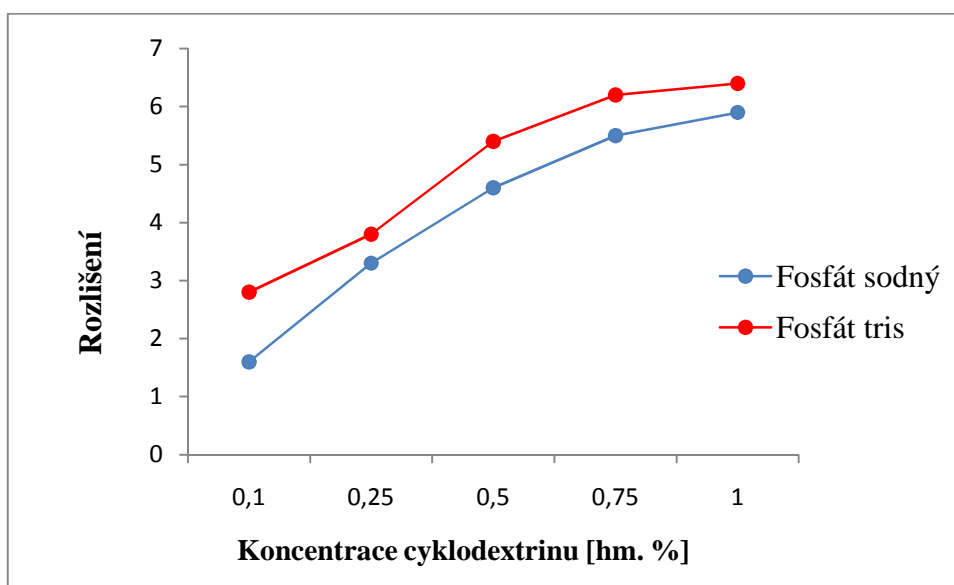
Obrázek 25a: Elektroferogramy enantiomerní separace *R,S*-tolterodinu v 50 mM fosfátu sodném o pH 2,5 s přidavkem 0,1-1 % P- γ -CD



Obrázek 25b: Elektroferogramy enantiomerní separace *R,S*-tolterodinu v 50 mM fosfátu tris o pH 2,5 s přidavkem 0,1-1 % P- γ -CD

Ze srovnání analýz methoxytolterodinu (Obr. 41b, 44b, příloha 1 a 2) a tolterodinu v 50 mM fosfátu sodném a fosfátu tris o pH 2,5 vyplývá, že schopnost tolterodinu tvorby stabilnějších diastereomerních komplexů hraje při separaci klíčovou roli. Již přidavek 0,1 % P- γ -CD stačí k separaci tolterodinu s rozlišením 1,6 pro fosfát sodný a pro fosfát tris je získané rozlišení

dokonce 2,8 (Obr. 26), navíc je doba analýzy srovnatelná se separací methoxytolterodinu (Tab. XVII). Hodnoty mobilit a rozlišení poukazují na rozdílné chování (sorpční schopnosti) TRIS⁺ a sodného iontu v separačním systému v nepokryté křemenné kapiláře. Zásadním faktem je migrace *S*-izomeru před *R*-izomerem, což je v případě nutnosti kvantifikovat *S*-izomer jako minoritní složku ve vzorku značná výhoda. V obráceném pořadí migrace enantiomerů může dojít v případě chvostujících píků k překrytí menšího z nich, čímž je jeho kvantifikace znemožněna⁸⁹.



Obrázek 26: Závislost rozlišení na koncentraci P- γ -CD v pracovním elektrolytu 50 mM fosfátu sodného a fosfátu tris o pH 2,5

Tabulka XVII: Hodnoty rozlišení a elektroforetických mobilit separace tolterodinu ve fosfátu sodném a fosfátu tris s využitím P- γ -CD

50 mM fosfát sodný o pH 2,5					
Konc. P- γ -CD [hm. %]	Rozlišení	$\mu_S \times 10^{-9}$ [m ² /V.s]	RSD _S [%]	$\mu_R \times 10^{-9}$ [m ² /V.s]	RSD _R [%]
0,1	1,6	20,79	0,24	20,49	0,36
0,25	3,3	18,37	0,30	17,81	0,37
0,5	4,6	16,51	0,38	15,85	0,44
0,75	5,5	15,30	0,10	14,57	0,13
1	5,9	14,77	0,06	14,05	0,06

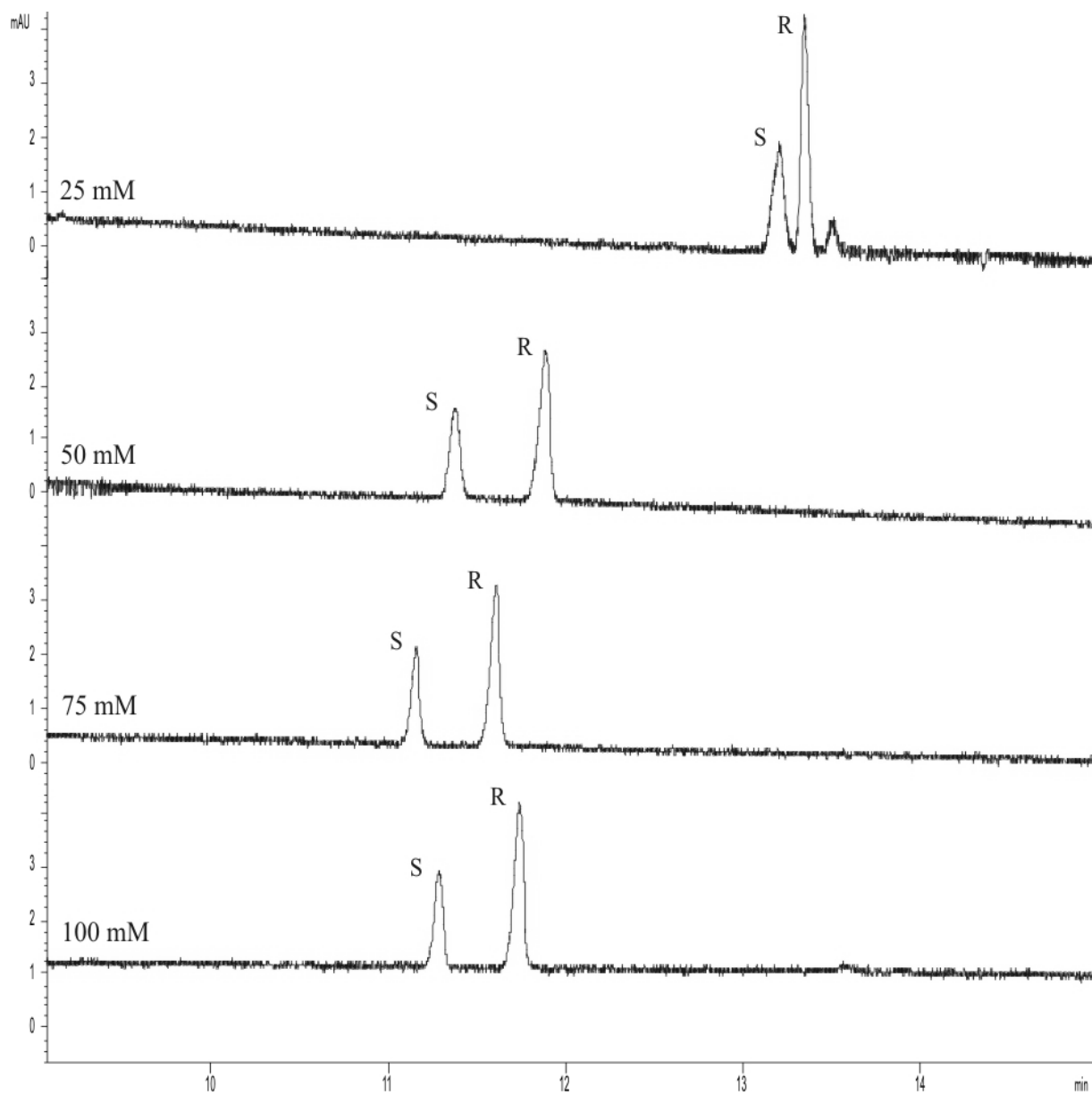
Tabulka XVII: Hodnoty rozlišení a elektroforetických mobilit separace tolterodinu ve fosfátu sodném a fosfátu tris s využitím P- γ -CD

50 mM fosfát tris o pH 2,5					
Konc. P- γ -CD [hm. %]	Rozlišení	$\mu_S \times 10^{-9}$ [m ² /V.s]	RSD _S [%]	$\mu_R \times 10^{-9}$ [m ² /V.s]	RSD _R [%]
0,1	2,8	18,49	2,45	18,14	2,74
0,25	3,8	17,76	0,56	17,29	0,66
0,5	5,4	15,68	1,22	15,02	1,40
0,75	6,2	14,77	0,49	14,04	0,52
1	6,4	14,31	0,05	13,56	0,09

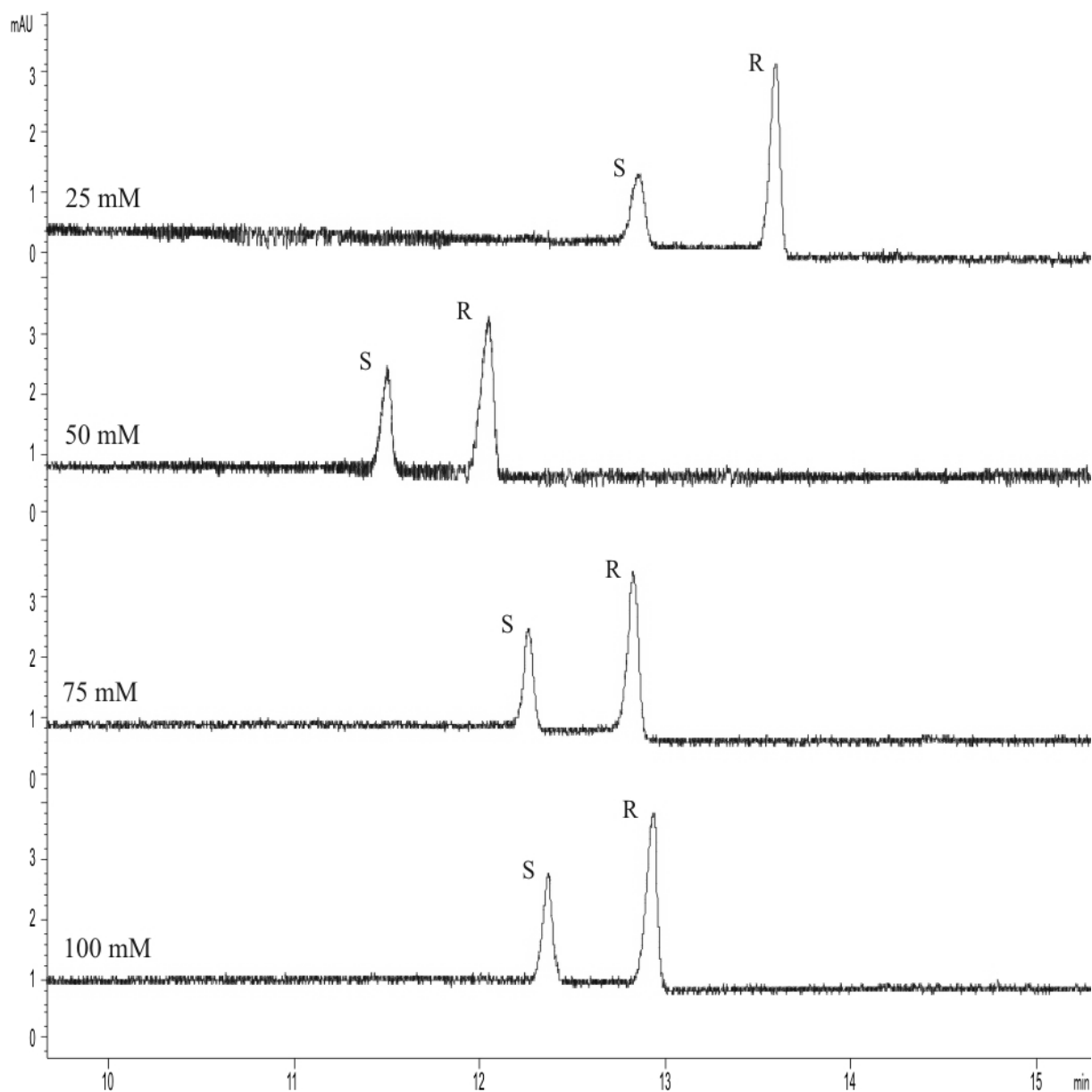
Záměrem této práce je aplikovat metodu enantiomerní separace *R,S*-tolterodinu na reálné vzorky v rozličných matricích. Proto je optimalizace separačních podmínek zaměřena na získání maximálního rozlišení i za cenu větší spotřeby chirálního selektoru, která je však pořád oproti dosavadním publikovaným metodám využívající cyklodextriny několikanásobně menší. Nejvyšší hodnoty rozlišení bylo u obou elektrolytů dosaženo přidáním 1 % P- γ -CD.

4.2.2 Vliv koncentrace pracovního elektrolytu

Dalším důležitým faktorem je koncentrace elektrolytu, pomocí které můžeme ovlivnit průběh separace prostřednictvím iontové síly. Rozsah koncentrací byl zvolen stejně jako při analýze methoxytolterodinu, a to v rozmezí 25 až 100 mmol.l⁻¹ fosfátu sodného a fosfátu tris o pH 2,5 (Obr. 27a, b).



Obrázek 27a: Elektroferogramy chirální separace *R,S*-tolterodinu ve fosfátu sodném o koncentracích 25-100 mM a pH 2,5 s přidavkem 1 % P- γ -CD



Obrázek 27b: Elektroferogramy chirální separace *R,S*-tolterodinu ve fosfátu tris o koncentracích 25-100 mM a pH 2,5 s přidavkem 1 % P- γ -CD

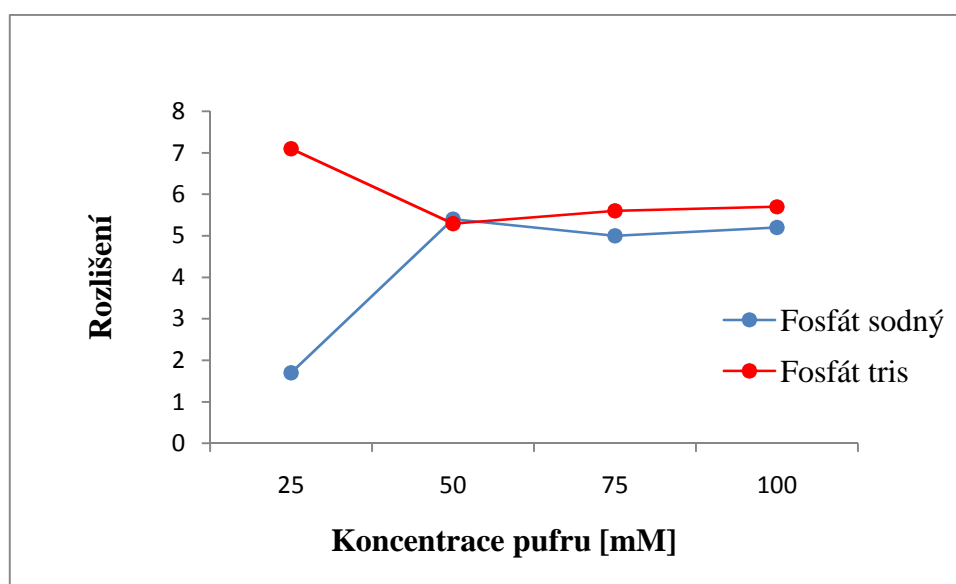
U obou elektrolytů dochází při koncentraci 25 mM k výraznému prodloužení doby migrace enantiomerů (Tab. XVIII) vlivem sorpce analytu na stěnu kapiláry a malé iontové síly. Rovněž je viditelný rozdíl mezi schopností TRIS⁺ a sodného iontu potlačovat sorpci analytu, zatím co ve 25 mM fosfátu sodném má rozlišení hodnotu 1,7; v případě 25 mM fosfátu tris je

získané rozlišení dokonce 7,1 (Obr. 28). V tomto případě je však značnou nevýhodou rozmývání zón, které při nízké koncentraci *S*-izomeru neumožní jeho kvantifikaci.

Tabulka XVIII: Hodnoty rozlišení a elektroforetických mobilit separace *R,S*-tolterodinu ve fosfátu sodném a fosfátu tris o pH 2,5 s přidavkem 1 % P- γ -CD

fosfát sodný o pH 2,5 s 1 % P- γ -CD					
Konc. elektrolytu [mM]	Rozlišení	$\mu_S \times 10^{-9}$ [m ² /V.s]	RSD _S [%]	$\mu_R \times 10^{-9}$ [m ² /V.s]	RSD _R [%]
25	1,7	12,13	0,61	12,00	0,63
50	5,4	14,11	0,54	13,50	0,51
75	5,0	14,46	0,39	13,90	0,36
100	5,2	14,30	0,28	13,74	0,29

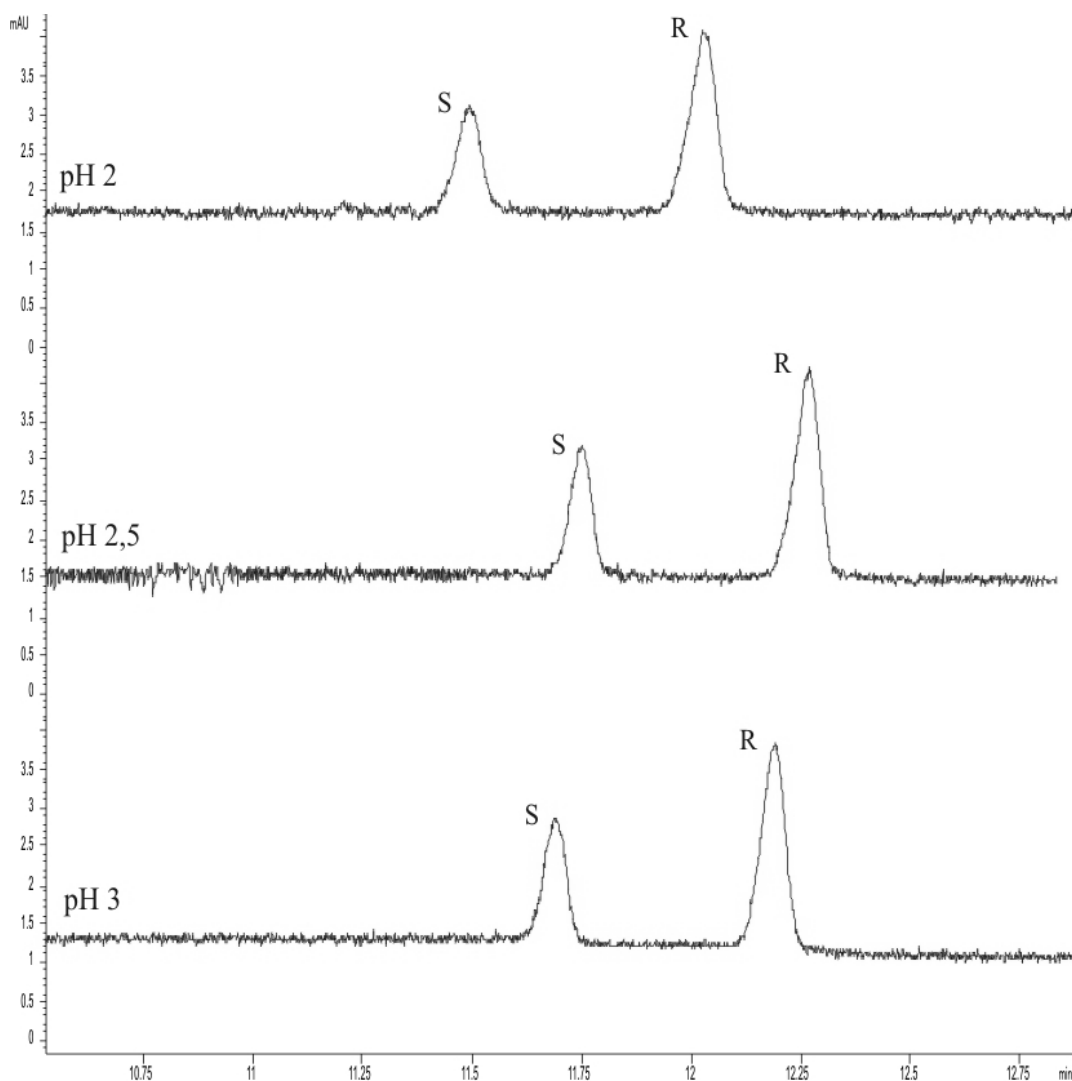
fosfát tris o pH 2,5 s 1 % P- γ -CD					
Konc. elektrolytu [mM]	Rozlišení	$\mu_S \times 10^{-9}$ [m ² /V.s]	RSD _S [%]	$\mu_R \times 10^{-9}$ [m ² /V.s]	RSD _R [%]
25	7,1	12,49	0,93	11,81	0,97
50	5,3	14,00	0,39	13,36	0,43
75	5,6	13,16	0,28	12,58	0,28
100	5,7	13,11	0,26	12,54	0,28



Obrázek 28: Závislost rozlišení na koncentraci fosfátu sodného a fosfátu tris o pH 2,5 s přidavkem 1 % P- γ -CD

4.2.3 Vliv pH pracovního elektrolytu

Z předcházejících výsledků vyplývá, že nejlepších hodnot rozlišení a symetrie píků při krátké době analýzy dosahuje separace *R,S*-tolterodinu v 100 mM fosfátu tris s přídavkem 1 % P- γ -CD. Posledním faktorem, který je potřeba optimalizovat, je pH elektrolytu, které na chirální separaci *R,S*-methoxytolterodinu (v rozmezí 2-3) velký vliv nemělo. Stejně tak je tomu i v případě separace *R,S*-tolterodinu (Obr. 29).



Obrázek 29: Elektroferogramy chirální separace *R,S*-tolterodinu v 100 mM fosfátu tris o pH 2-3 s přídavkem 1 % P- γ -CD

Již z elektroferogramů je patrné, že rozdíly mezi hodnotami rozlišení a migračními časy enantiomerů (Tab. XIX) jsou ve zvolené oblasti minimální.

Tabulka XIX: Hodnoty rozlišení a elektroforetických mobilit enantiomerní separace *R,S*-tolterodinu v 100 mM fosfátu tris o pH 2-3 s přidavkem 1 % P- γ -CD

pH elektrolytu	Rozlišení	$\mu_S \times 10^{-9}$ [m ² /V.s]	RSD _S [%]	$\mu_R \times 10^{-9}$ [m ² /V.s]	RSD _R [%]
2	5,5	13,94	0,75	13,33	0,74
2,5	5,6	13,75	0,24	13,17	0,26
3	5,5	13,88	0,35	13,31	0,35

Ačkoliv jsou difference rozlišení zanedbatelné, lze považovat 100 mM fosfát tris o pH 2,5 s přidavkem 1 % P- γ -CD za nejlepší pracovní podmínky pro chirální separaci *R,S*-tolterodinu.

4.2.4 Analytické parametry stanovení *R,S*-tolterodinu

Výsledky vybraných analytických parametrů stanovení *R*- a *S*-tolterodinu jsou shrnuty v tabulce XX. Pro oba enantiomery byla linearita studována v rozmezí 3 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ až 1,5 mmol.l^{-1} . Opakovatelnost migračních časů t_m a ploch píků *A* byla počítána pro 6 analýz.

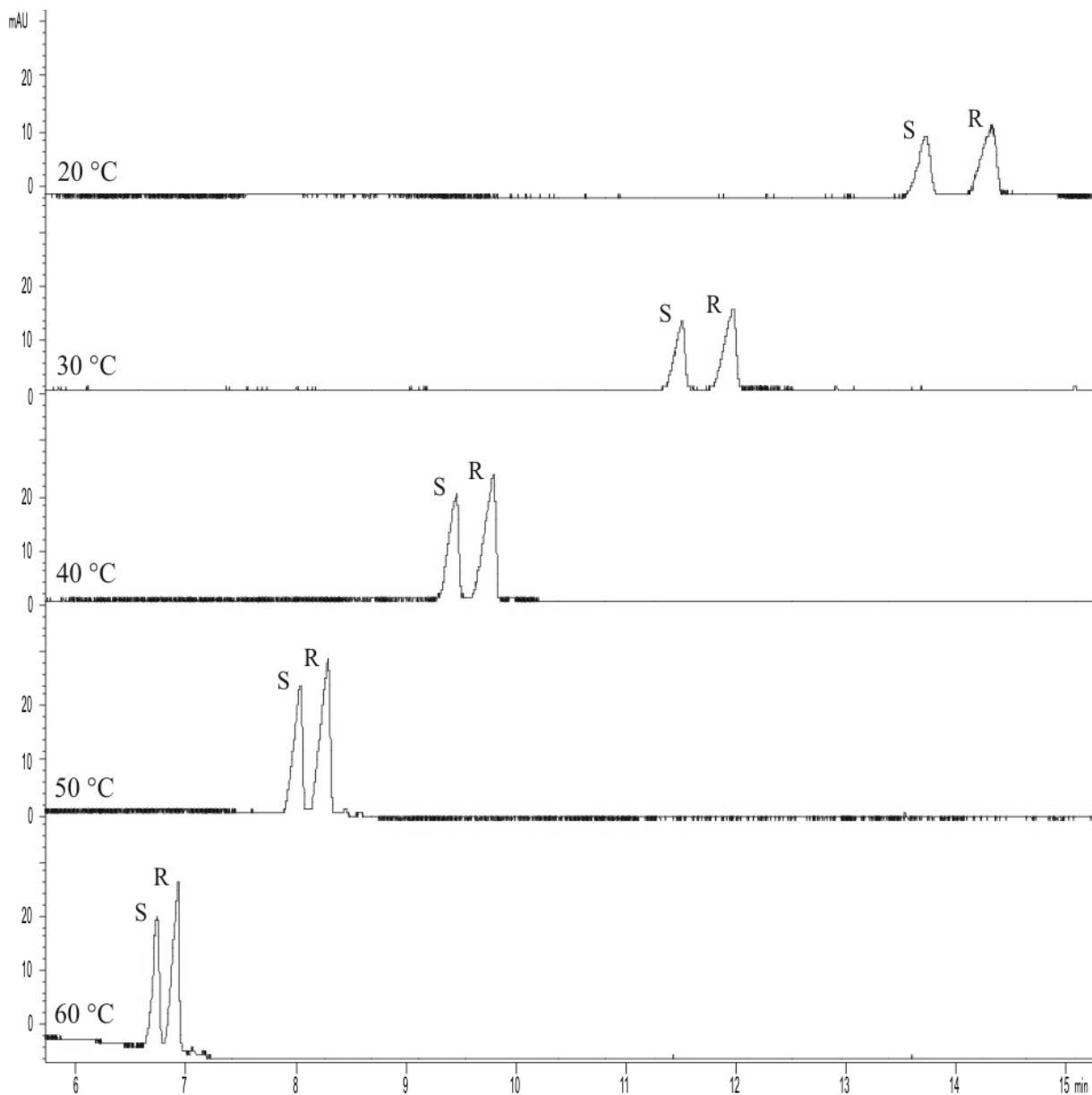
Tabulka XX: Vybrané analytické parametry stanovení *R*- a *S*-tolterodinu

Enantiomer	Opakovatelnost t_m [%]	Opakovatelnost <i>A</i> [%]	Limit detekce [$\mu\text{mol.l}^{-1}$]	Limit stanovitelnosti [$\mu\text{mol.l}^{-1}$]
<i>R</i> -tolterodin	3,48	4,61	10,4	15,3
<i>S</i> -tolterodin	2,45	5,42	13,1	19,4

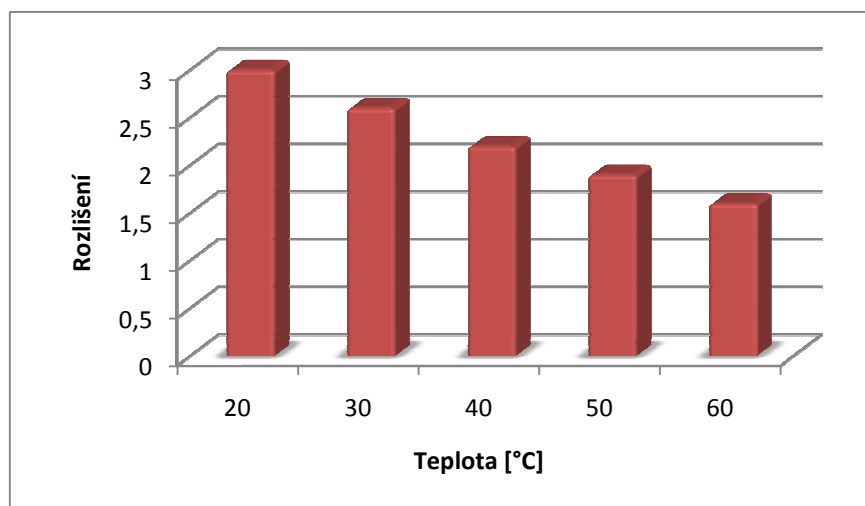
4.2.5 Vliv teploty na separaci *R,S*-tolterodinu

Průběh chirální separace tolterodinu v elektrolytu 100 mM fosfátu tris o pH 2,5 s rostoucí teplotou je podobný jako u separace methoxytolterodinu. Vlivem zvýšené rychlosti

elektroosmotického toku se doba analýz viditelně zmenšuje (Obr. 30), což má za následek ztrátu rozlišení (Obr. 31). Vybrané separační charakteristiky jsou shrnuty v tabulce XXI.



Obrázek 30: Elektroferogramy chirální separace tolterodinu v 100 mM fosfátu tris o pH 2,5 s přídavkem 1 % P- γ -CD v rozmezí teplot 20-60 °C



Obrázek 31: Závislost rozlišení na rostoucí teplotě separace *R,S*-tolterodinu

Tabulka XXI: Hodnoty rozlišení a elektroforetických mobilit separace *R,S*-tolterodinu v teplotním rozmezí 20-60 °C

Teplota [°C]	Rozlišení	$\mu_S \times 10^{-9}$ [m ² /V.s]	RSDs [%]	$\mu_R \times 10^{-9}$ [m ² /V.s]	RSD _R [%]
20	3,0	11,77	0,10	11,29	0,38
30	2,6	13,89	1,59	13,36	1,52
40	2,2	17,20	0,85	16,62	0,87
50	1,9	20,15	0,19	19,54	0,21
60	1,6	23,84	0,94	23,20	0,97

Stejně jako na separaci *R,S*-methoxytolterodinu má vyšší teplota negativní vliv i na separaci *R,S*-tolterodinu. Důležitý je však fakt, že i při maximální zkoumané teplotě 60 °C je získaná hodnota rozlišení pro obě látky $\geq 1,5$.

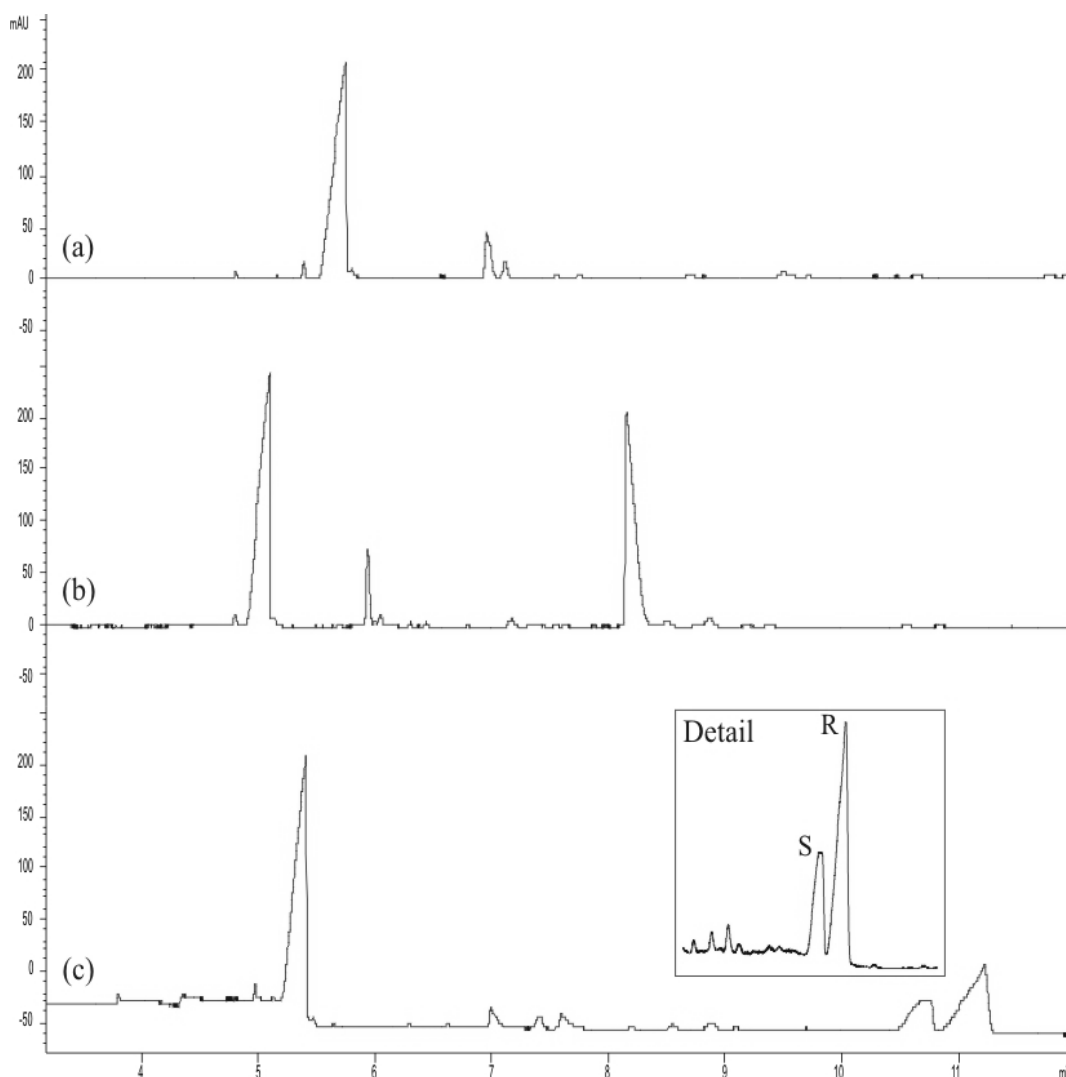
4.2.6 Chirální separace *R,S*-tolterodinu v moči

Na rozdíl od chirální separace standardů tolterodinu v deionizované vodě, ve které zóny separovaných enantiomerů s ničím neinterferují, je moč složitá matrice obsahující širokou škálu iontů a rozličných metabolitů. Velké množství iontů v moči způsobuje

podstatný nárůst iontové síly, která významně ovlivňuje rychlost EOF, čímž má negativní vliv na průběh separace.

Pro částečné potlačení iontové síly byla směs standardů *R*- a *S*-tolterodinu o koncentraci 1 mg.ml^{-1} (v poměru 6:4 pro snadné určení pořadí migrace izomerů) rozpuštěna v moči a následně zředěna deionizovanou vodou v poměru 1:1. Takto připravený vzorek byl hydrodynamicky dávkován tlakem 50 mbar po dobu 5 sekund. Pracovním elektrolytem byl 100 mmol.l^{-1} fosfát tris o pH 2,5 s přídatkem 1 % P- γ -CD.

Nejdřív bylo potřeba kvůli korekcím pozadí změřit vzorek zředěné moči bez standardů (Obr. 32a). Následně byla analyzována moč se standardy tolterodinu v elektrolytu bez chirálního selektoru, důvodem je zjištění migračního času tolterodinu v separačním prostředí (Obr. 32b). Přidáním 1% P- γ -CD do pracovního elektrolytu 100 mM fosfátu tris o pH 2,5 získáme separaci s rozlišením 1,7. Pořadí migrace enantiomerů je stejné jako v případě analýzy *R,S*-tolterodinu v deionizované vodě, takže *S*-izomer migruje jako první (Obr. 32c).

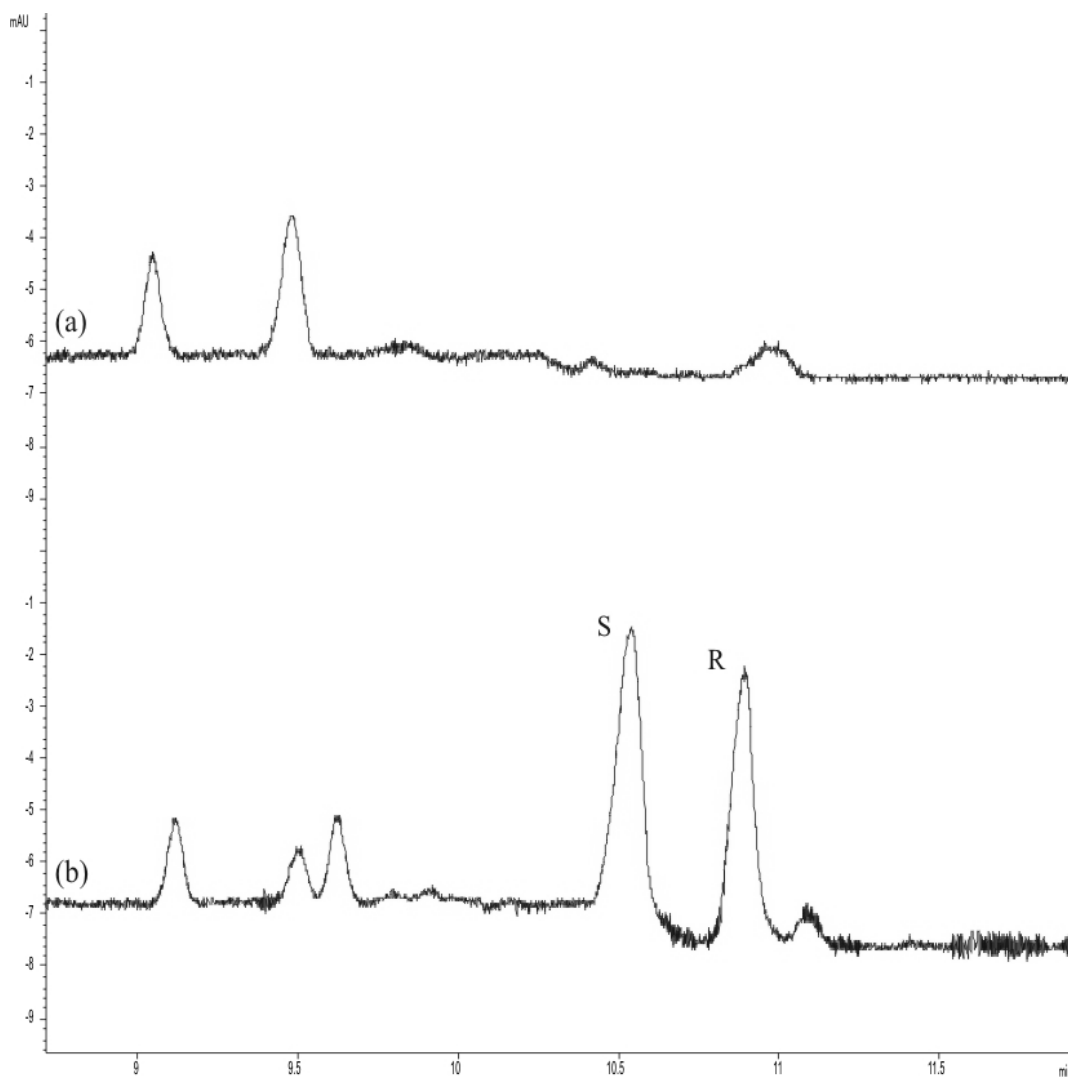


Obrázek 32: Elektroferogramy enantiomerní separace *R,S*-tolterodinu v moči: (a) pozadí bez vzorku, (b) vzorek v elektrolytu bez chirálního selektoru, (c) vzorek standardu *R,S*-tolterodinu v 100 mM fosfátu tris o pH 2,5 s 1 % P- γ -CD

4.2.7 Chirální separace *R,S*-tolterodinu v krevním séru

Krevní sérum je složitá matrice obsahující především plazmatické bílkoviny, enzymy, vitamíny a anorganické soli. Úprava vzorku před analýzou byla proto mnohem složitější než v případě moči. Do 200 μ l krevního séra bylo přidáno 0 μ l (blank – slepý pokus) popřípadě 2 μ l směsi *R*- a *S*-tolterodinu a následně doplněno methanolem na objem 400 μ l. Vzorky byly 10 minut sonifikovány na ultrazvukové lázni a posléze 10 minut centrifugovány při 7000

otáčkách za minutu. Vysrážené bílkoviny se usadily na dně a z horní vrstvy bylo odebráno 200 μl vzorku, který byl dále odpařen do sucha. Odparek byl rozpuštěn ve směsi 10 μl methanolu a 40 μl deionizované vody. Pracovním elektrolytem byl 100 mM fosfát tris o pH 2,5 s 1 % P- γ -CD, vzorek byl hydrodynamicky dávkován tlakem 50 mbar po dobu 5 sekund a použité napětí bylo +20 kV (Obr. 33a,b). Hodnota získaného rozlišení je 2,2.

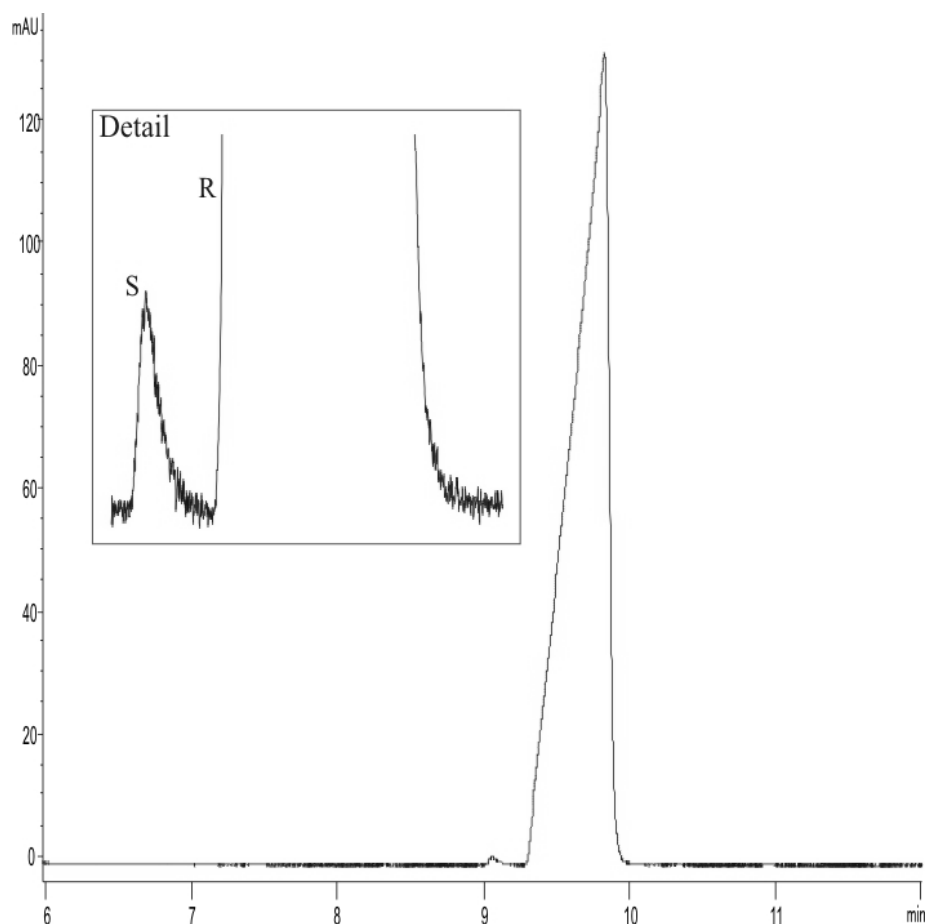


Obrázek 33: Elektroferogramy enantiomerní separace *R,S*-tolterodinu v krevním séru: (a) blank, (b) vzorek standardu *R,S*-tolterodinu v 100 mM fosfátu tris o pH 2,5 s 1 % P- γ -CD

4.3 Chirální separace *R,S*-tolterodinu v tabletce Uroflow

Přípravek Uroflow vyrábí firma Zentiva k.s. a k dostání je v podobě tablet obsahující 1 nebo 2 mg účinné látky tolterodin hydrogentartrátu. Preparát je určen k léčbě hyperaktivního močového měchýře se symptomy naléhavého a častého močení nebo inkontinence.

Tabletka Uroflow obsahující 2 mg tolterodinu byla separována v 100 mmol.l⁻¹ fosfátu tris o pH 2,5 s 1 % P- γ -CD (Obr. 34). Hodnota získaného rozlišení a elektroforetické mobility obou enantiomerů jsou v tabulce XXII. Obsah minoritního *S*-enantiomeru v tabletě Uroflow je 0,2%.



Obrázek 34: Elektroferogram chirální separace *R,S*-tolterodinu v tabletě Uroflow

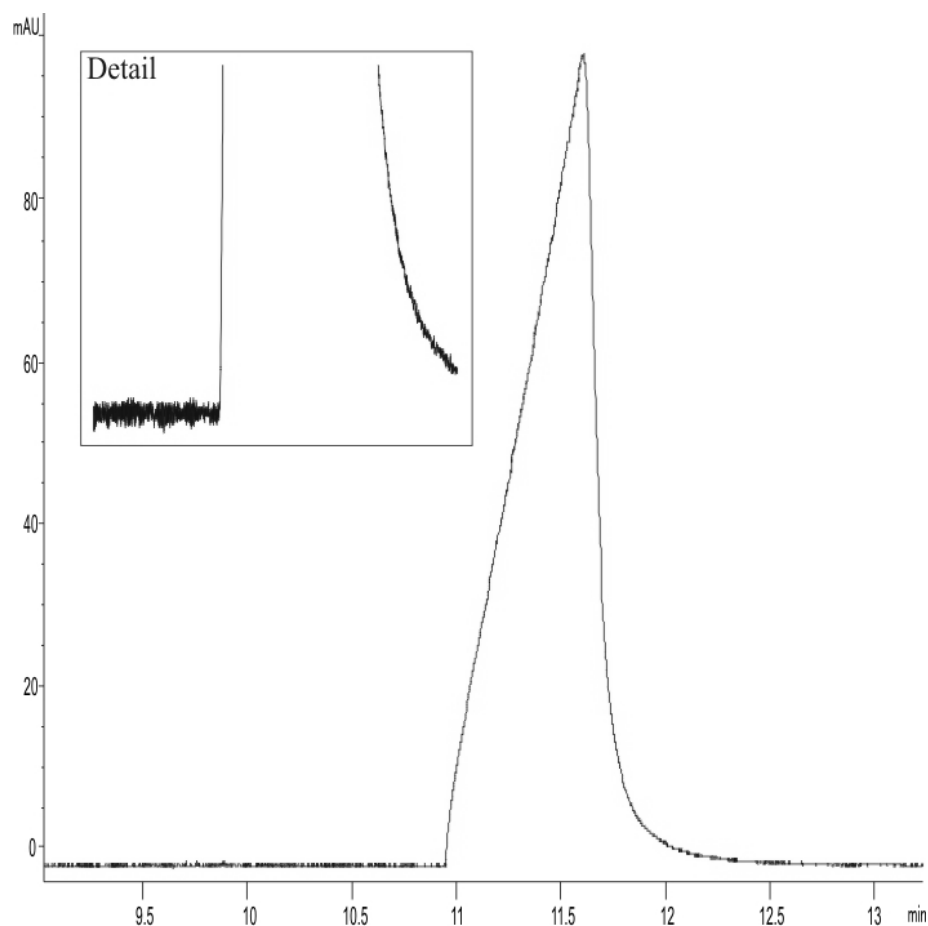
Tabulka XXII: Separační charakteristiky separace *R,S*-tolterodinu v tabletce Uroflow

Rozlišení	$\mu_S \times 10^{-9}$ [m ² /V.s]	RSDs [%]	$\mu_R \times 10^{-9}$ [m ² /V.s]	RSD _R [%]
3,0	16,67	6,64	15,37	6,59

4.4 Chirální separace *R,S*-tolterodinu v tabletce Detrusitol

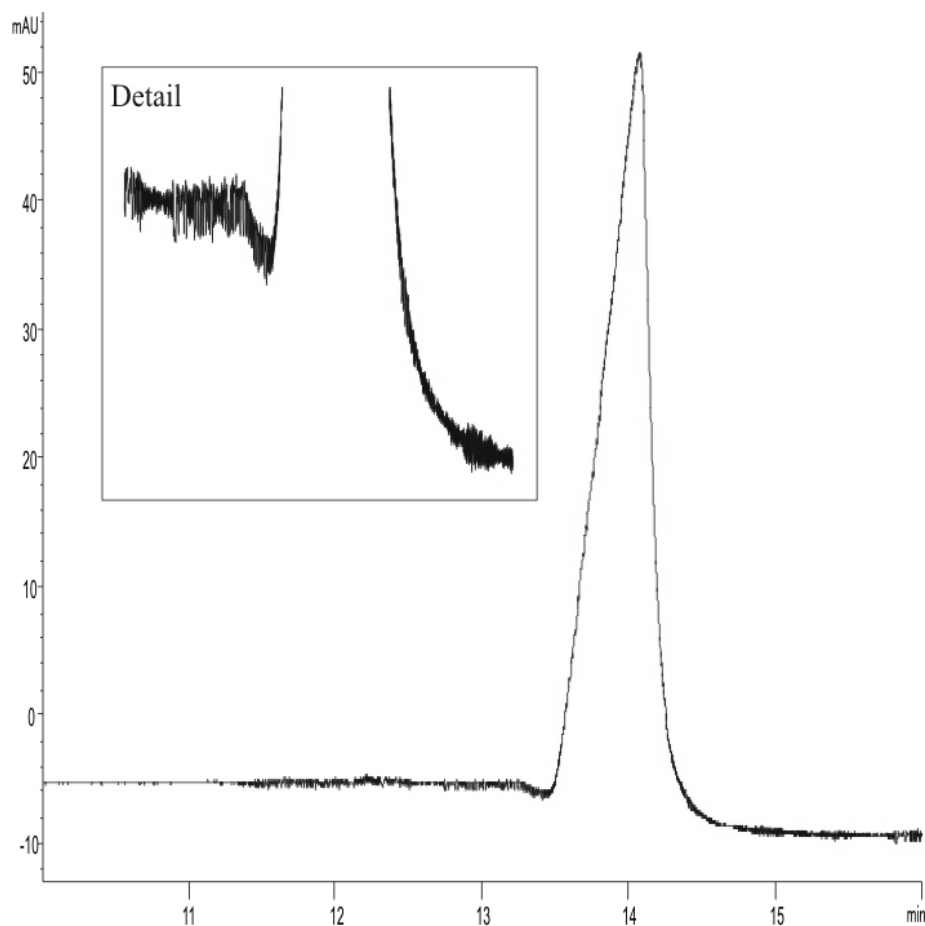
Přípravek Detrusitol vyrábí firma Pfizer s.r.o a na trhu je v podobě tablet s obsahem 4 mg tolterodin hydrogentartrátu. Terapeutické účinky jsou stejné jako u přípravku Uroflow.

K enantiomerní separaci *R,S*-tolterodinu v tabletce Detrusitol byly použity stejné separační podmínky jako u tabletky Uroflow. U obou přípravků měli vzorky koncentraci 1 mg.ml⁻¹ a doba hydrodynamického dávkování byla 5 sekund (Obr. 35).



Obrázek 35: Elektroferogram chirální separace *R,S*-tolterodinu v tabletě Detrusitol o koncentraci vzorku 1 mg.ml⁻¹ v 100 mM fosfátu tris o pH 2,5 s přidavkem 1 % P- γ -CD

Z elektroferogramu je patrný frontující profil píku *R*-enantiomeru, který tak může překrývat signál *S*-enantiomeru migrující jako první. Vzorek byl proto zředěn deionizovanou vodou na koncentraci $0,5 \text{ mg.ml}^{-1}$ a doba dávkování zůstala stejná (Obr. 36).

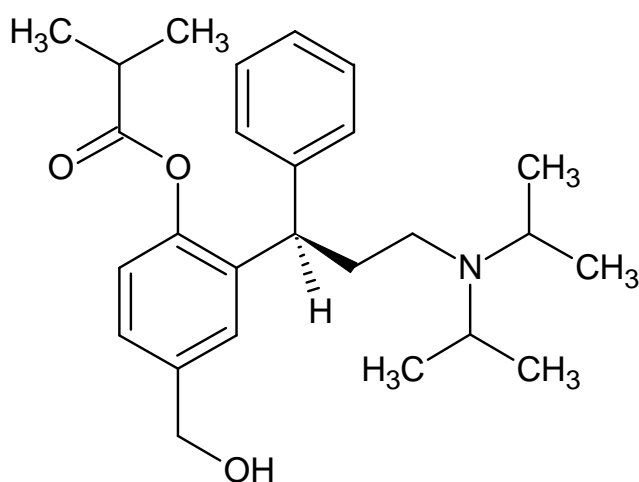


Obrázek 36: Elektroferogram chirální separace *R,S*-tolterodinu v tabletě Detrusitol o koncentraci vzorku $0,5 \text{ mg.ml}^{-1}$ v 100 mM fosfátu tris o pH 2,5 s přidavkem 1 % P- γ -CD

Ani snížení koncentrace vzorku tabletky nepomohlo k separaci *R,S*-tolterodinu, který je ve formě *S*-izomeru přítomný v menším množství než je limit detekce metody.

4.5 Fesoterodin

Fesoterodin je derivát tolterodinu s podobnou strukturou (Obr. 37) mající chirální vlastnosti. Stejně jako tolterodin je kompetitivní, specifický antagonist muskarinových receptorů. Je však v těle rychleji hydrolyzován nescifickými plazmatickými esterázami na 5-hydroxymethyltolterodin, což je primární aktivní metabolit mající hlavní farmakologické účinky. Práce zabývající se chirální separací fesoterodinu metodou kapilární elektroforézy nebyla doposud publikována.

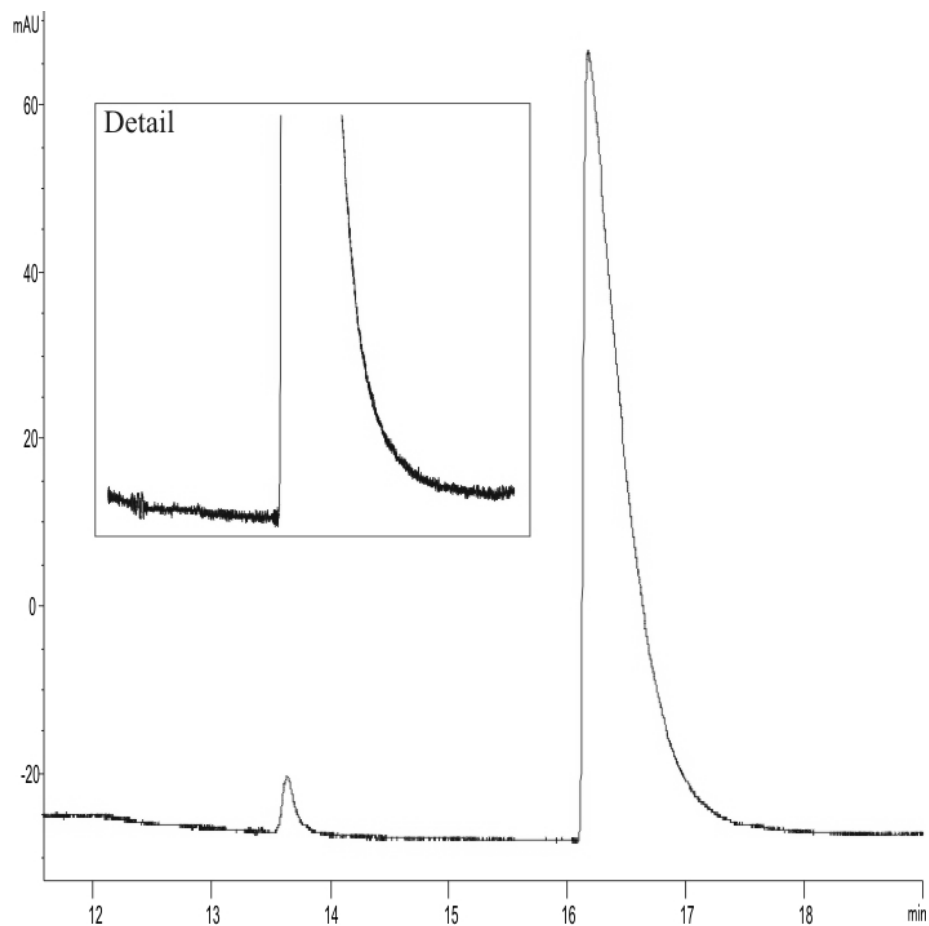


Obrázek 37: Struktura *R,S*-fesoterodinu

4.5.1 Chirální separace *R,S*-fesoterodinu v tabletce Toviaz

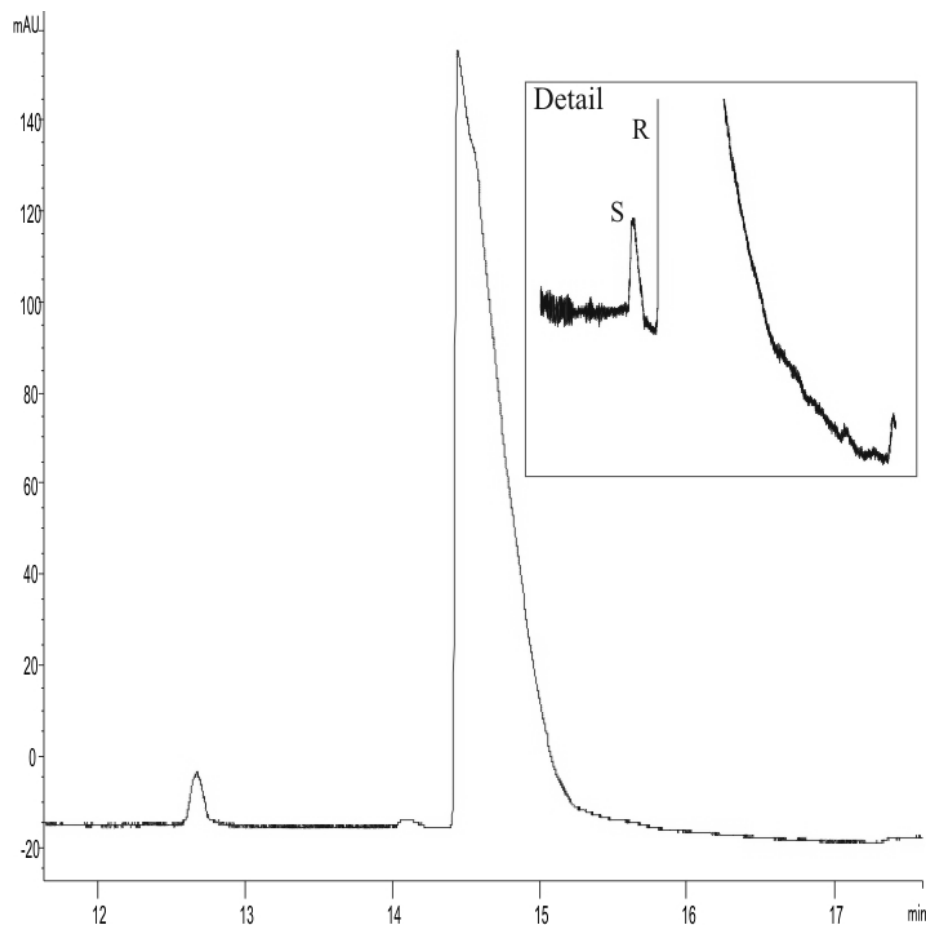
Toviaz je novým lékem při léčbě nemoci hyperaktivního močového měchýře. Výrobcem je firma Pfizer s.r.o a postupně z trhu vytlačuje přípravky Uroflow a Detrusitol. Tabletky obsahují 4 nebo 8 mg účinné látky fesoterodin fumarátu.

Analyzovaná tabletky obsahovala 4 mg *R,S*-fesoterodinu a kvůli špatné rozpustnosti ve vodě byla koncentrace vzorku upravena na hodnotu $0,5 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$. I v tomto případě byl použit 100 mM fosfát tris o pH 2,5 s přidávkem 1 % P- γ -CD (Obr. 38) a vzorek byl dávkován po dobu 5 sekund.



Obrázek 38: Elektroferogram chirální separace *R,S*-fesoterodinu v tabletě Toviaz o koncentraci vzorku $0,5 \text{ mg.ml}^{-1}$ v 100 mM fosfátu tris o pH 2,5 s přídavkem 1 % P- γ -CD s dobou dávkování 5 sekund

Prodloužením doby hydrodynamického dávkování na 20 sekund zvýšíme koncentraci analytu nad limit detekce (Obr. 39). Analýza trvala necelých 16 minut a získané rozlišení má hodnotu 2,1. Zjištěný obsah *S*-enantiomeru fesoterodinu v tabletě Toviaz je 0,35 %.



Obrázek 39: Elektroferogram chirální separace *R,S*-fesoterodinu v tabletě Toviaz o koncentraci vzorku $0,5 \text{ mg.ml}^{-1}$ v 100 mM fosfátu tris o pH 2,5 s přidavkem 1 % P- γ -CD s dobou dávkování 20 sekund

5 Závěr

V práci je prostudován průběh chirální separace *R,S*-methoxytolterodinu v elektrolytech o koncentracích 25 až 100 mmol.l⁻¹ fosfátu sodného a fosfátu tris o pH 2-3 s přídavkem fosfatovaného γ -cyklodextrinu o různých koncentracích. Maximální hodnota získaného rozlišení pro fosfát sodný je 2,5 a pro fosfát tris 2,2. Zároveň byl pozorován negativní vliv narůstající teploty kapiláry na enantiomerní separaci.

Pro chirální separaci *R,S*-tolterodinu je vhodným pracovním elektrolytem 100 mmol.l⁻¹ fosfát tris o pH 2,5 s přídavkem 1 hm. % P- γ -CD jako chirálního selektoru. Doba analýzy *R,S*-tolterodinu byla kolem 14 minut a *S*-enantiomer migroval jako první. Vybrané analytické parametry, včetně hodnot LOD a LOQ, stanovení *R*- a *S*-tolterodinu byly tabelovány. Stejně jako v případě separace enantiomerů methoxytolterodinu má rostoucí teplota negativní vliv na separaci, příčinou je větší rychlost EOF. Vyvinutá metoda separace *R,S*-tolterodinu byla použita k analýze *R,S*-tolterodinem obohacené moči a krevního séra. Další oblastí aplikace metody byly reálné vzorky léčiv. V případě tabletky Uroflow byla hodnota rozlišení 3 a stanovená koncentrace *S*-enantiomeru 0,2 %. Tabletka Detrusitol obsahuje menší množství *S*-tolterodinu než je limit detekce.

Posledním předmětem studia byla aplikace metody na tabletku Tolviaz obsahující účinnou látku fesoterodin. *R,S*-fesoterodin je derivát tolterodinu, který je v těle snadněji hydrolyzován na hlavní aktivní metabolit 5-hydroxymethyltolterodin. Stanovená koncentrace minoritního enantiomeru fesoterodinu v tablete léku Tolviaz byla 0,35 %.

Metoda využívající fosfatovaný γ -cyklodextrin jako chirální selektor v elektrolytu o nízkém pH je vhodná pro separaci *R,S*-tolterodinu a jeho derivátů v běžných matricích a farmaceutických preparátech.

6 Literatura

1. Tseng S., Pak G., Washenik K., Keltz M., Shupack J. L.: *J. Am. Acad. Dermatol* 35, 969-979 (1996).
2. Lauer H. H., Rozing G. P.: *High Performace Capillary Electrophoresis*, Agilent Technologies 2011.
3. Příbylka A.: *Separace enantiomerů kapilární elektroforézou*. Bakalářská práce, Univerzita Palackého, Olomouc 2009.
4. Weinberger R.: *Practical Capillary Electrophoresis*. Elsevier, Amsterdam 2000.
5. Křivánková L., Boček P.: *J. Chromatogr.* 689, 13-34 (1997).
6. Jelínek I., Snopek J., Smolková-Keulemansová E.: *J. Chromatogr.* 405, 379-384 (1987).
7. Snopek J., Jelínek I., Smolková-Keulemansová E.: *J. Chromatogr.* 411, 153-159 (1987).
8. Righetti P. G.: *Isoelectric focusing theory, methodology and applications*. Elsevier, Amsterdam 1983.
9. Baba Y., Tsuchiko M.: *Trends Anal. Chem.* 11, 280-287 (1992).
10. Muijselaar P. G., Otsuka K., Terabe S.: *J. Chromatogr.* 780, 41-61 (1997).
11. Quirino J. P., Terabe S.: *J. Chromatogr.* 856, 465-482 (1999).
12. Lancas F. M.: *J. Braz. Chem. Soc.* 14, 183-197 (2003).
13. Terabe S., Matsubara N., Ishihama Y., Okada Y.: *J. Chromatogr.* 608, 23-29 (1992).
14. Otsuka K., Terabe S.: *Trends Anal. Chem.* 12, 125-130 (1993).
15. Terabe S.: *J. Pharm. Biomed. Anal.* 10, 705-715 (1992).
16. Wang J., Warner I. M.: *Anal. Chem.* 66, 3773-3776 (1994).
17. Terabe S., Miyashita Y., Shibata O., Barnhart E. R., Alexander L. R., Patterson D. G., Karger B. L., Hosoya K., Tanaka N.: *J. Chromatogr.* 516, 23-31 (1990).
18. Cole R. O., Sepaniak M. J., Hinze W. L., Gorse J., Oldiges K.: *J. Chromatogr.* 557, 113-123 (1991).
19. Kvasničková L., Glatz Z., Kahle V.: *Chem. Listy* 97, 86-92 (2003).
20. Wistuba D., Schurig V.: *J. Chromatogr.* 875, 255-276 (2000).
21. Otsuka K., Mikami Ch., Terabe S.: *J. Chromatogr.* 887, 457-463 (2000).
22. Juvancz Z., Szejtli J.: *Trends Anal. Chem.* 21, 379-388 (2002).
23. Levine S., Outhwaite C. W., Bhuiyan L. B.: *J. Electroanal. Chem.* 123, 105-119 (1981).

24. Heiger D.: *High Performance Capillary Electrophoresis*. Hewlett-Packard, Avondale 1993.
25. Knob R.: *Polypyrrole coated capillaries for capillary electrophoresis*. Diploma thesis, Palacký University, Olomouc 2010.
26. Salem L., Chapuisat X., Segal G., Hiberty P. C., Minot C., Leforrestier C., Sautet P.: *J. Am. Chem. Soc.* *109*, 2887-2894 (1987).
27. Riekkola M. L., Jonsson J. A., Smith R. M.: *Pure Appl. Chem.* *76*, 443-451 (2004).
28. Scriba G. K. E., Altria K.: *LC-GC Europe* *22*, 420-430 (2009).
29. Desiderio C., Fanali S.: *J. Chromatogr.* *716*, 183-196 (1995).
30. Tanaka Y., Terabe S.: *Chromatographia* *44*, 119-128 (1997).
31. Chankvetadze B., Endresz G., Blaschke G.: *Electrophoresis* *15*, 804-807 (1994).
32. Chankvetadze B., Schulte G., Blaschke G.: *J. Chromatogr.* *732*, 183-187 (1996).
33. Werner A., Nassauer T., Kiechle P., Erni F.: *J. Chromatogr.* *666*, 375-379 (1994).
34. Chankvetadze B., Schulte G., Blaschke G.: *J. Pharm. Biomed. Anal.* *15*, 1577-1584 (1997).
35. Schmitt T., Engelhardt H.: *J. High Resolut. Chromatogr.* *16*, 525-529 (1993).
36. Mazzeo J. R., Grover E. R., Swartz M. E., Petersen J. S.: *J. Chromatogr.* *680*, 125-135 (1994).
37. Berthod A., Liu Y., Bagwill C., Armstrong D. W.: *J. Chromatogr.* *731*, 123-137 (1996).
38. Armstrong D. W., Zhou Y.: *J. Liq. Chromatogr.* *17*, 1695-1707 (1994).
39. Desiderio C., Fanali S.: *J. Chromatogr.* *807*, 37-56 (1998).
40. Armstrong D. W., Rundlett K. L., Reid G.: *Anal. Chem.* *66*, 1690-1695 (1994).
41. Ward T. L., Dann C., Blaylock A.: *J. Chromatogr.* *715*, 337-344 (1995).
42. Armstrong D. W., Nair U. B.: *Electrophoresis* *18*, 2331-2342 (1997).
43. Armstrong D. W., Rundlett K. L., Chen J.-R.: *Chirality* *6*, 496-509 (1994).
44. Rundlett K. L., Gasper M. P., Zhou E. Y., Armstrong D. W.: *Chirality* *8*, 88-107 (1996).
45. Armstrong D. W., Gasper M. P., Rundlett K. L.: *J. Chromatogr.* *689*, 285-304 (1995).
46. Armstrong D. W., Rundlett K. L.: *J. Liq. Chromatogr.* *18*, 3659-3674 (1995).
47. Rundlett K. L., Armstrong D. W.: *Anal. Chem.* *34*, 2088-2095 (1995).
48. Lurie I. S., Klein R. F. X., Cason T. A. D., LeBelie M. J., Brenneisen R., Weinberger R. E.: *Anal. Chem.* *66*, 4019-4026 (1994).

49. Gasper M. P., Berthod A., Nair U. B., Armstrong D. W.: *Anal. Chem.* *68*, 2051-2514 (1996).
50. Kuhn R.: *Electrophoresis* *20*, 2605-2613 (1999).
51. Kuhn R., Hoffstetter-Kuhn S.: *Chromatographia* *34*, 505-512 (1992).
52. Kuhn R., Stoeklin F., Erni F.: *Chromatographia* *33*, 32-36 (1992).
53. Szejtli J., *Chem. Rev.* *98*, 1743-1753 (1998).
54. Bender H.: *Carbohydrates Res.* *65*, 85-89 (1978).
55. Li S., Purdy W. C.: *Chem. Rev.* *92*, 1457-1470 (1992).
56. Thompson D. O.: *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.* *14*, 101-104 (1997).
57. Hedges R. A.: *Chem. Rev.* *98*, 2035-2044 (1998).
58. Szejtli J.: *Cyclodextrin Technology*. Kluwer Academic Publishers, Boston 1988.
59. Cigic I. K., Guček M., Zupančič-Kralj L., Pihlar B.: *J. Sep. Sci.* *26*, 1253-1258 (2003).
60. Sepaniak M. J., Cole R. O., Clark B. K.: *J. Liq. Chromatogr.* *15*, 1023-1040 (1992).
61. Nardi A., Ossicini L., Fanali S.: *Chirality* *4*, 56-61 (1992).
62. Francotte E., Cherkaoui S., Faupel M.: *Chirality* *5*, 516-526 (1993).
63. Heuermann M., Blaschke G.: *J. Chromatogr.* *648*, 267-274 (1993).
64. Gareil P., Gramond J. P., Guyon F.: *J. Chromatogr.* *615*, 317-325 (1993).
65. Guttman A., Paulus A., Cohen A. S., Grinberg N., Karger B. L.: *J. Chromatogr.* *448*, 41-53 (1988).
66. Bechet I., Paques P., Fillet M., Hubert P., Crommen J.: *Electrophoresis* *15*, 808-817 (1994).
67. Wren S. A. C., Rowe R. C.: *J. Chromatogr.* *609*, 363-367 (1992).
68. Rawjee Y. Y., Staerk D. U., Vigh G.: *J. Chromatogr.* *635*, 291-306 (1993).
69. Penn S. G., Goodall D. M., Loran J.: *J. Chromatogr.* *636*, 149-152 (1993).
70. Chankvetadze B., Endresz G., Blaschke G.: *J. Chromatogr.* *704*, 234-238 (1995).
71. García-Ruiz C., Crego A. L., Marina M. L.: *Electrophoresis* *24*, 2657-2664 (2003).
72. Juvancz Z., Markides K. E., Jicsinszky L.: *J. Microcol. Sep.* *11*, 716-722 (1999).
73. Izumoto S-I., Nishi H.: *Bunseki Kagaku* *47*, 739-746 (1998).
74. Juvancz Z., Jicsinszky L., Markides K. E.: *J. Microcol. Sep.* *9*, 581-589 (1997).
75. Yanes E. G., Gratz S. R., Sutton R. M. C., Stalcup A. M.: *J Anal. Chem.* *369*, 412-417 (2001).
76. Juvancz Z., Markides K. E., Jicsinszky L., Iványi R.: *J. Microcol. Sep.* *13*, 62-68 (2001).

77. Desiderio C., Rudaz S., Raggi M. A., Fanali S.: *Electrophoresis* 20, 3432-3438 (1999).
78. Lurie I. S.: *J. Chromatogr.* 792, 297-307 (1997).
79. Rudaz S., Stella C., Balant-Gorgia A. E., Fanali S., Veuthey J-L.: *J. Pharm. Biomed. Anal.* 23, 107-115 (2000).
80. Chapple C. R., Yamanishi T., Chess-Williams R.: *Urology* 60, 82-89 (2002).
81. Moffat A. C., Widdap M. D. (Eds.): *Clarke's Analysis of Drugs and Poisons in Pharmaceuticals, Body Fluids and Postmortem material*, Vol. 2. Pharmaceutical Press, London 2004.
82. Palmer L.: *J. Pharm. Biomed. Anal.* 16, 155-165 (1997).
83. Andersson S.: *Drug Metab. Dispos.* 26, 528-535 (1998).
84. Swart R., Koivisto P., Markides K. E.: *J. Chromatogr.* 828, 209-218 (1998).
85. Huang Z., Du J-Q., Cai W.: *Chin. J. Pharm. Anal.* 21, 351-354 (2001).
86. Xia Z. L., Chen Z. Y., Yao T. W.: *Pharmazie* 62, 170-173 (2007).
87. Ramstad T.: *J. Chromatogr* 1127, 286-294 (2006).
88. Kumar Y. R., Ramulu G., Vevakanand V. V., Vaidyanathan G., Srinivas K., Kumar M. K., Mukkanti K., Reddy M. S., Venkatraman S., Suryanarayana M. V.: *J. Pharm. Biomed. Anal.* 35, 1279-1285 (2004).
89. Maier V., Horáková J., Petr J., Tesařová E., Coufal P., Ševčík J.: *J. Pharm. Biomed. Anal.* 39, 691-696 (2005).

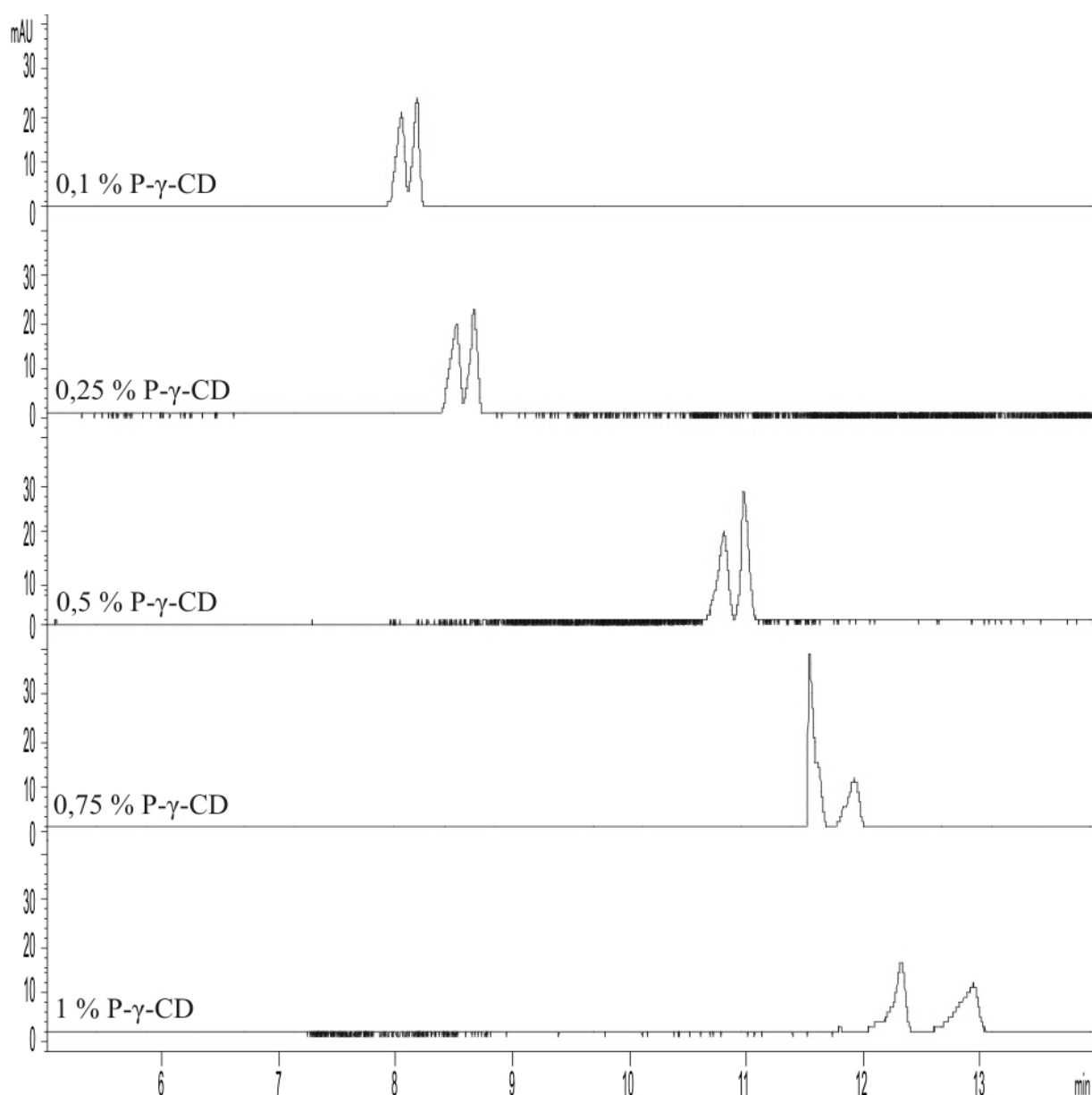
7 Seznam použitých zkratek a symbolů

α -CD	α -cyklodextrin
β -CD	β -cyklodextrin
γ -CD	γ -cyklodextrin
δ -CD	δ -cyklodextrin
18C6H4	18-crown-6-tetrakarboxylová kyselina
BGE	pracovní elektrolyt
CD	cyklodextrin
CE	kapilární elektroforéza
CEC	kapilární elektrochromatografie
CGE	kapilární gelová elektroforéza
CIEF	kapilární izoelektrická fokusace
CITP	kapilární izotachoforéza
CMC	kritická micelární koncentrace
CNS	centrální nervová soustava
CS	chirální selektor
CZE	kapilární zónová elektroforéza
DAD	detektor diodového pole
ECC	elektrokinetická kapilární chromatografie
EOF	elektroosmotický tok
ESI	ionizace elektrosprejem
FLEC	9-fluorenylethyl chloroformiát
GC	plynová chromatografie
GIT	gastrointestinální trakt
GITC	1-fluoro-2,4-dinitrofenyl-5-L-alaninamid
HPLC	vysokuúčinná kapalinová chromatografie
HP- β -CD	hydroxypropyl β -cyklodextrin
IUPAC	mezinárodní unie pro čistou a užitou chemii
LC	kapalinová chromatografie
LOD	limit detekce

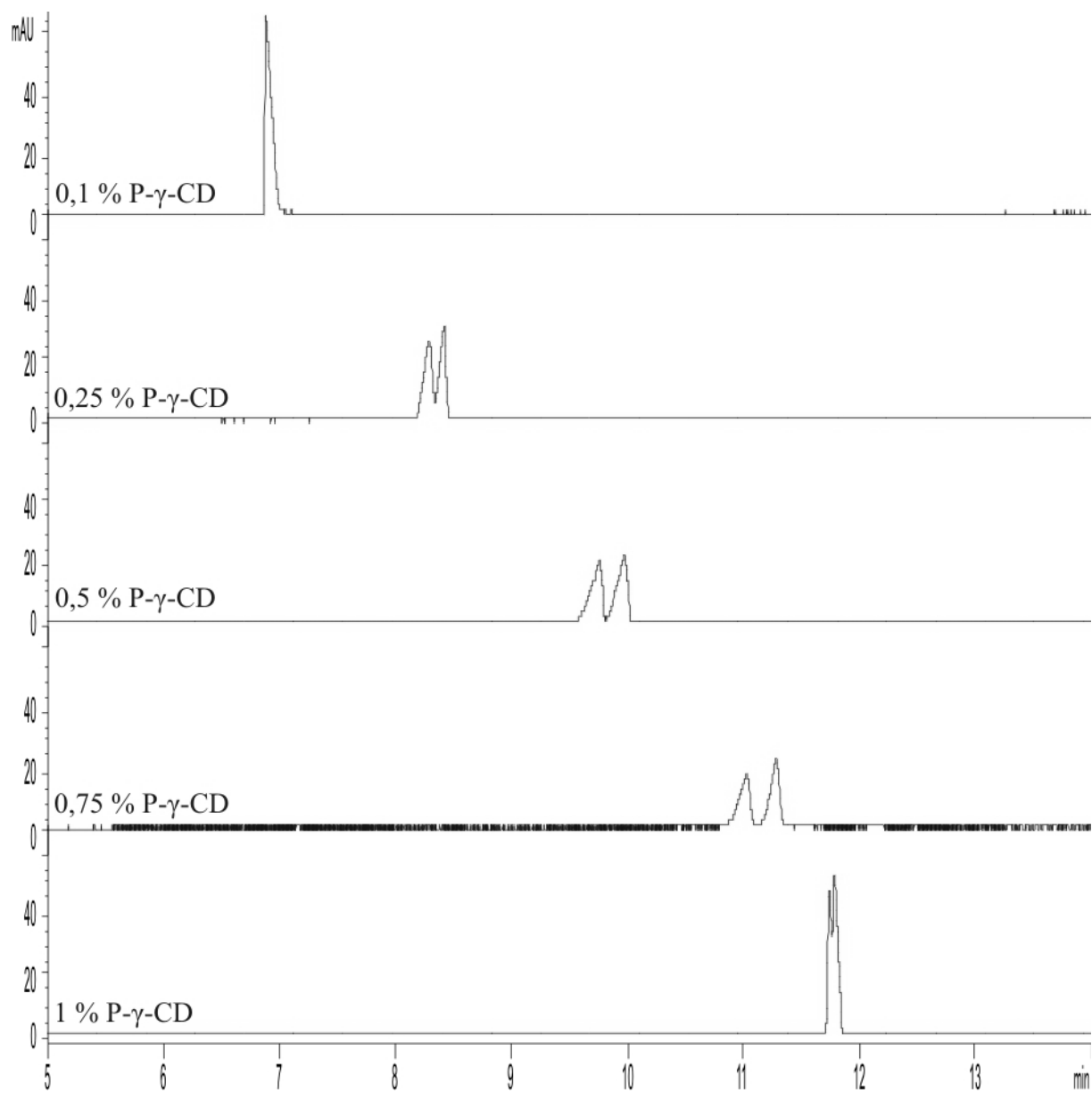
LOQ	limit stanovitelnosti
MEEKC	mikroemulzní elektrokinetická chromatografie
MEKC	micelární elektrokinetická chromatografie
MS	hmotnostní spektrometrie
P- γ -CD	fosfatovaný γ -CD
SDS	dodecylsírán sodný
TLC	tenkovrstevná kapalinová chromatografie
TRIS	tris(hydroxymethyl)aminomethan

8 Přílohy

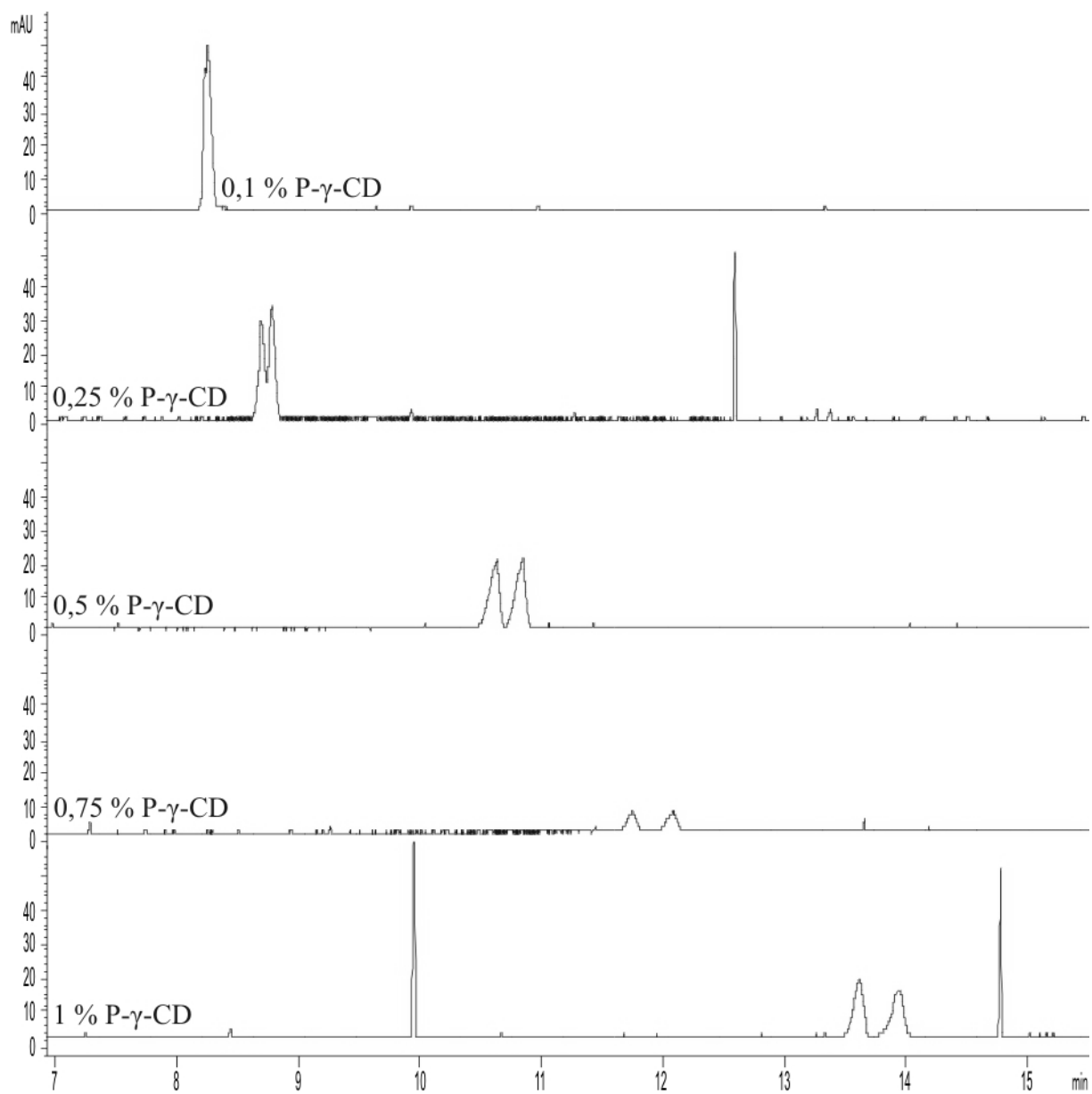
8.1 Elektroferogramy chirální separace *R,S*-methoxytolterodinu v elektrolytu fosfátu sodného



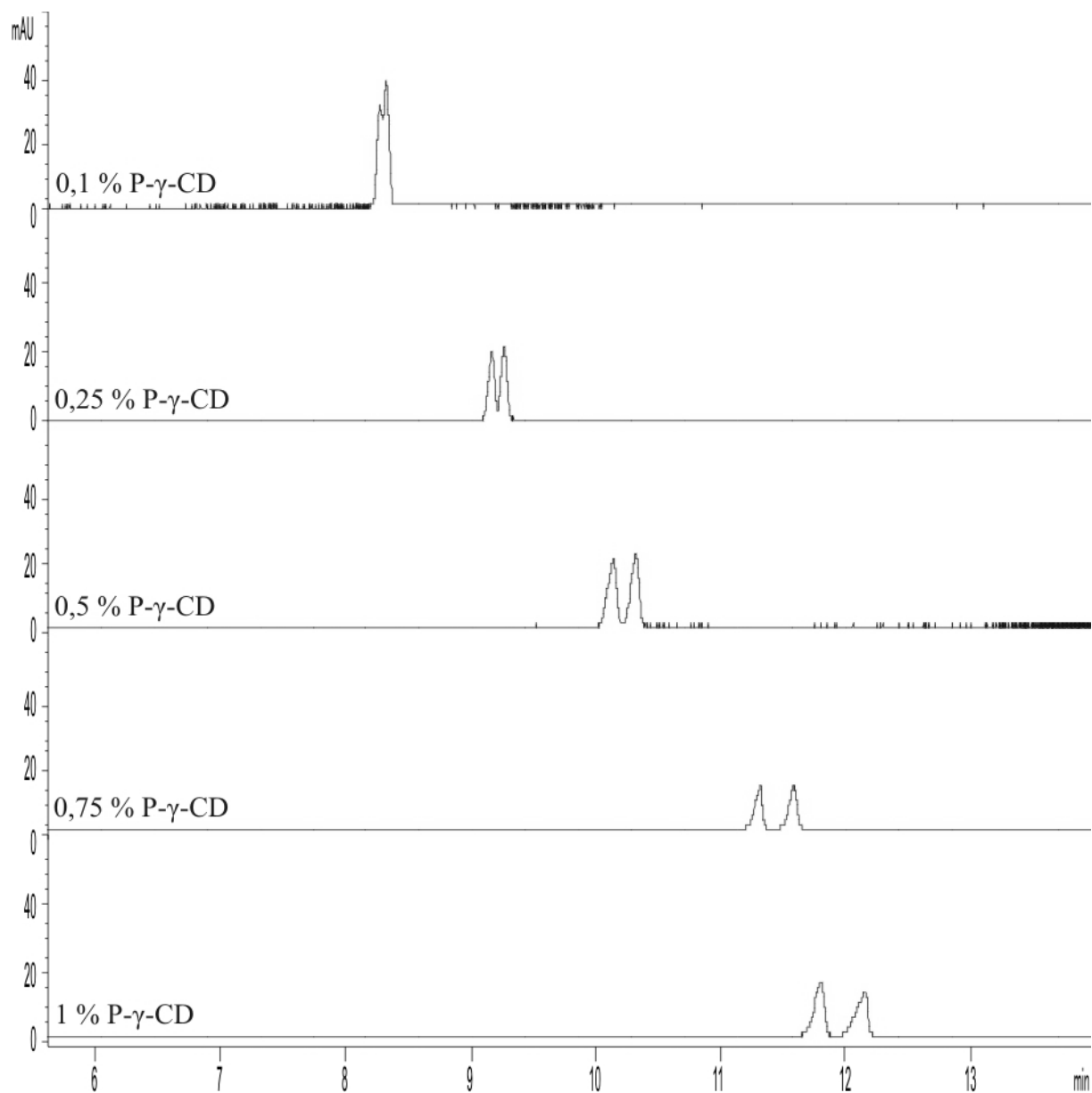
Obrázek 40a: Elektroferogramy separace *R,S*-methoxytolterodinu ve 25 mM fosfátu sodném o pH 2 a koncentracích 0,1-1 % P- γ -CD



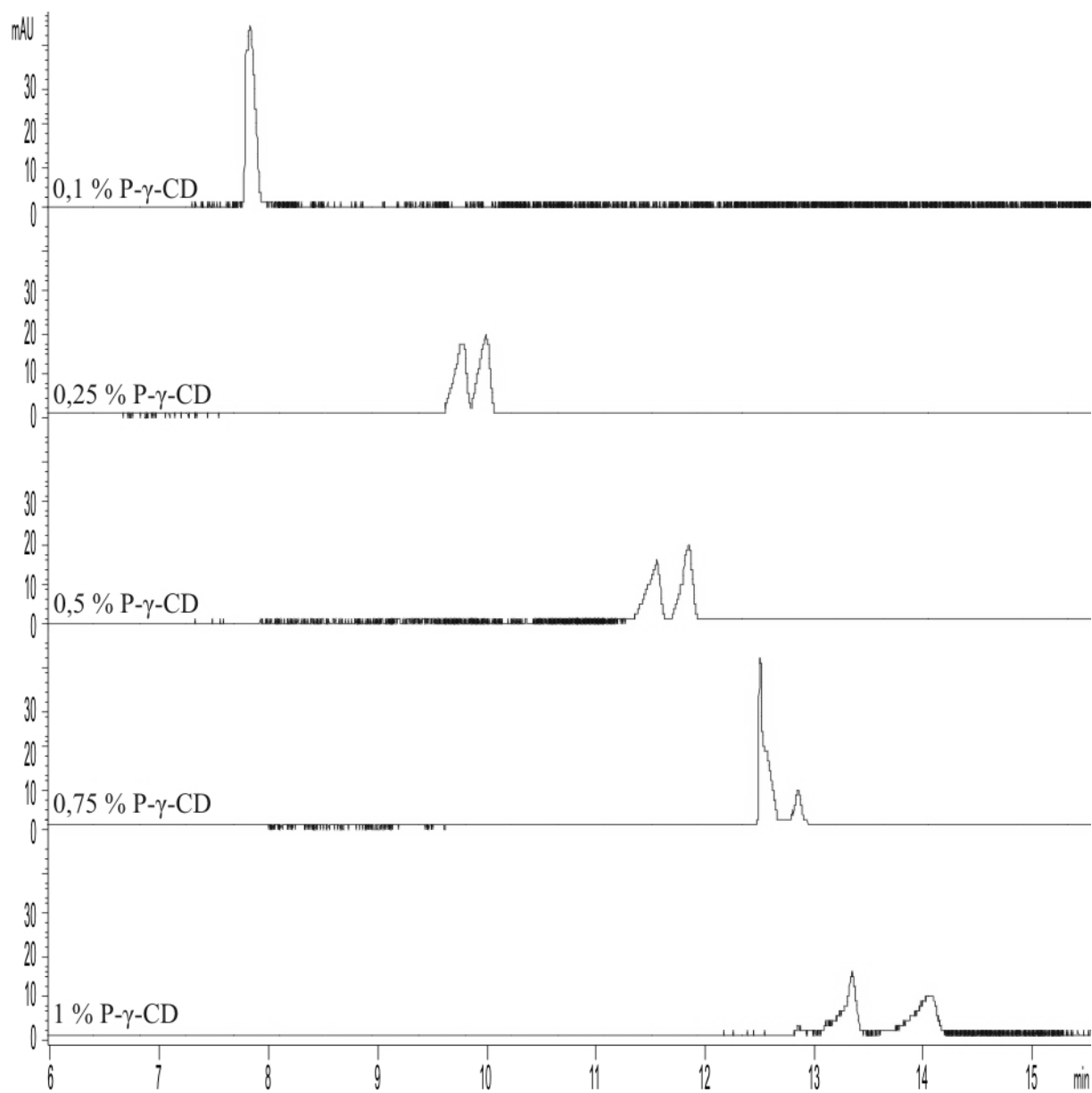
Obrázek 40b: Elektroferogramy separace *R,S*-methoxytolterodinu v 50 mM fosfátu sodném o pH 2 a koncentracích 0,1-1 % P- γ -CD



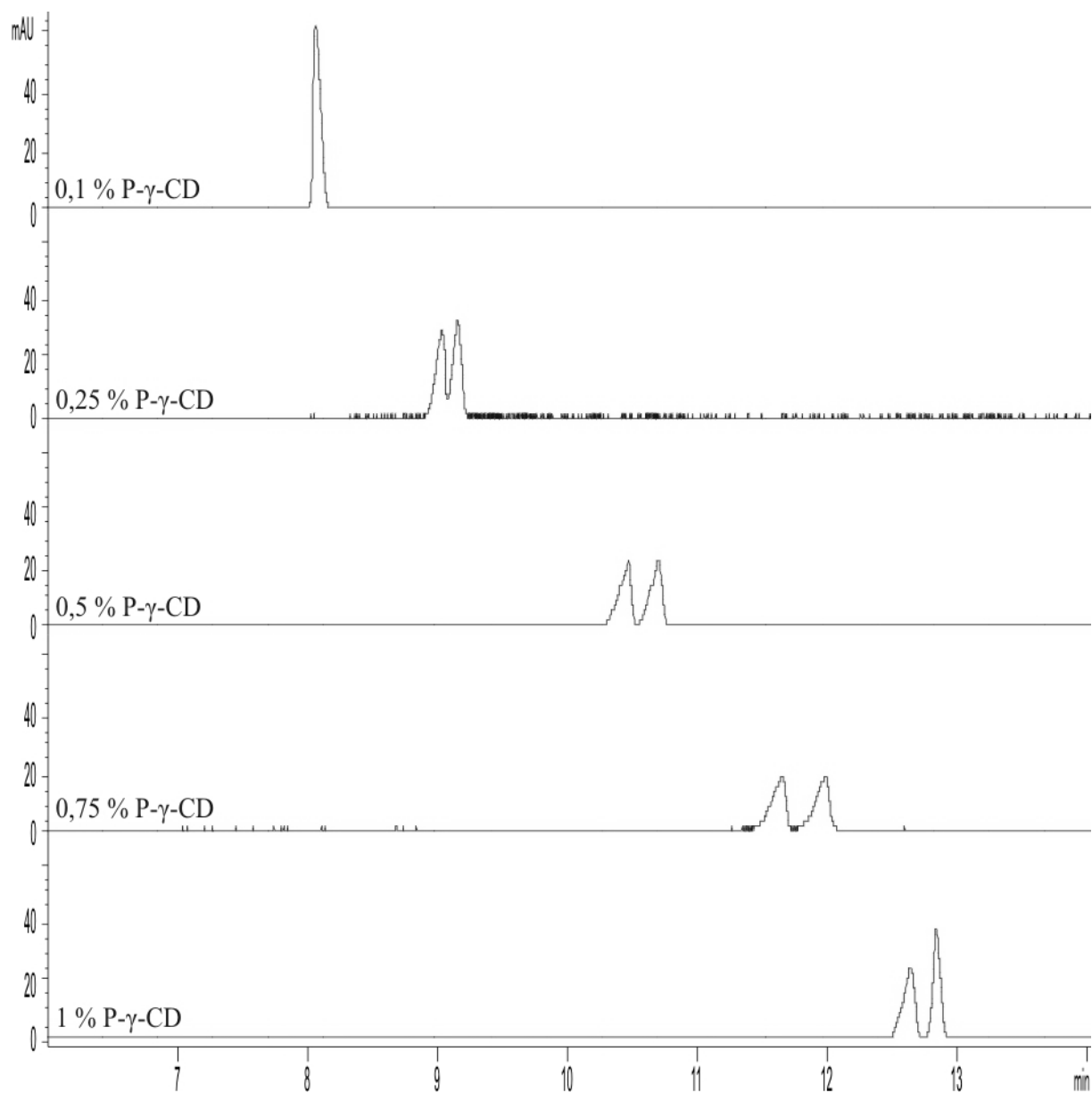
Obrázek 40c: Elektroferogramy separace *R,S*-methoxytolterodinu v 75 mM fosfátu sodném o pH 2 a koncentracích 0,1-1 % P- γ -CD



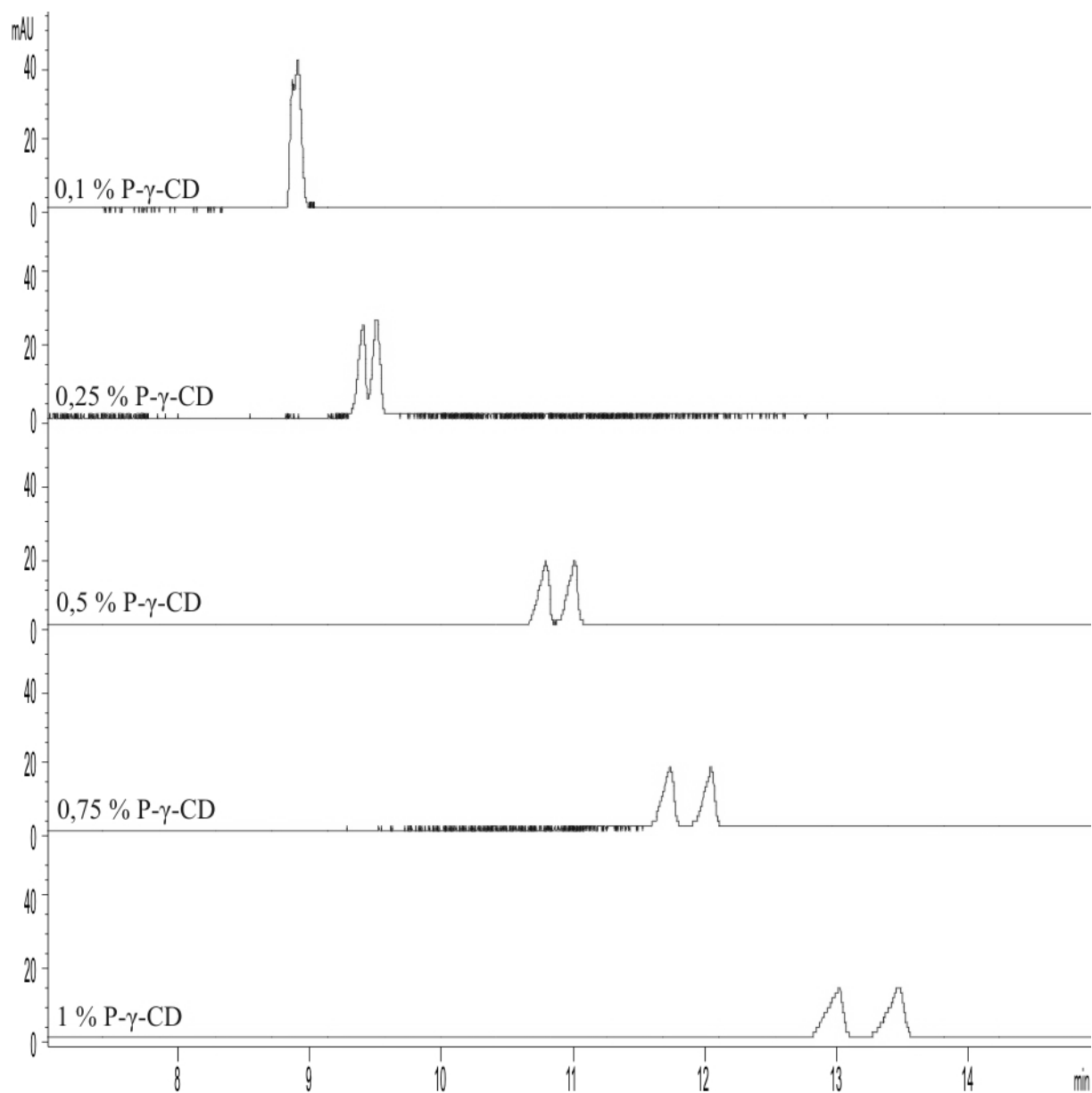
Obrázek 40d: Elektroferogramy separace *R,S*-methoxytolterodinu v 100 mM fosfátu sodném o pH 2 a koncentracích 0,1-1 % P- γ -CD



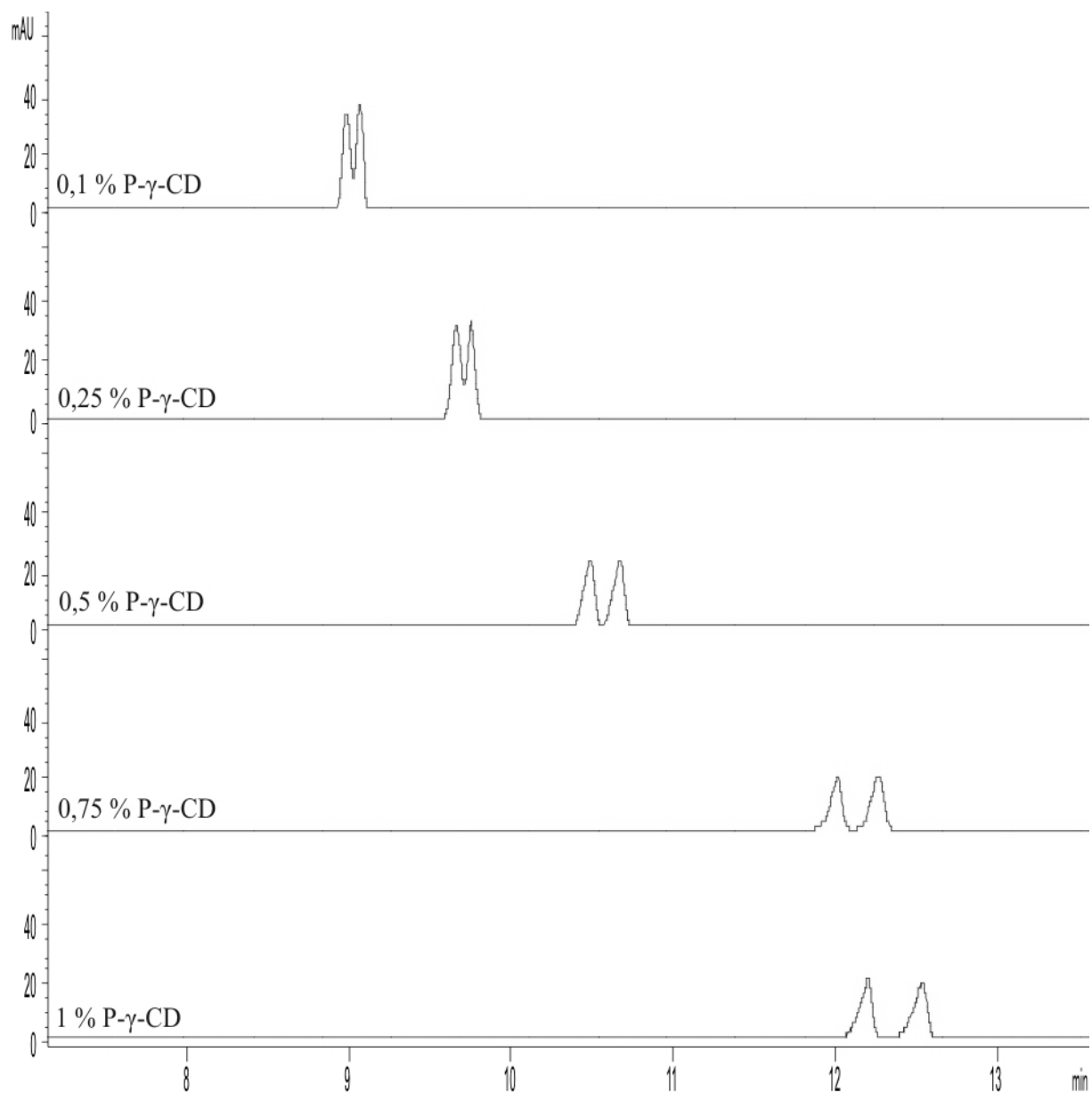
Obrázek 41a: Elektroferogramy separace *R,S*-methoxytolterodinu ve 25 mM fosfátu sodném o pH 2,5 a koncentracích 0,1-1 % P- γ -CD



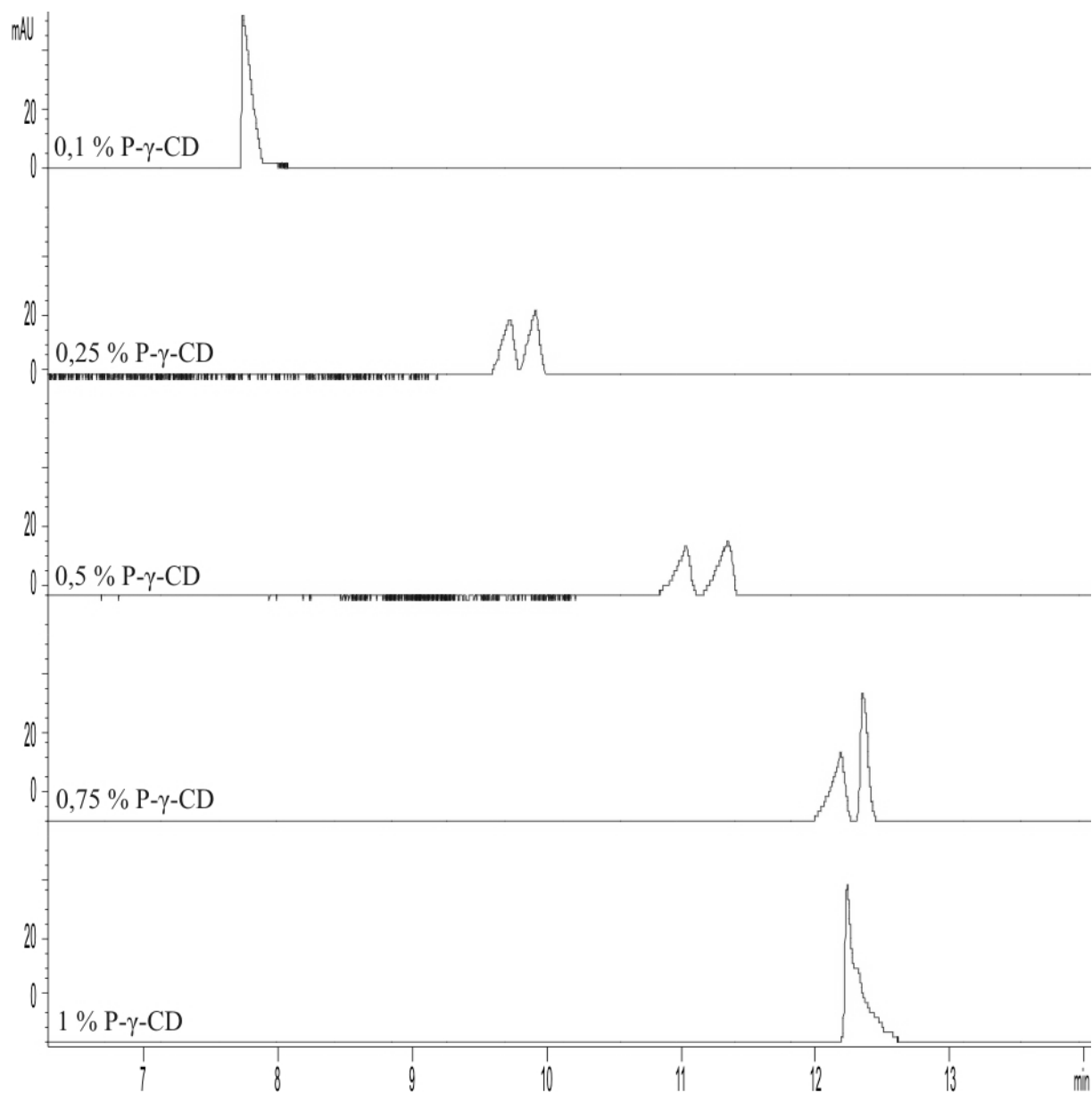
Obrázek 41b: Elektroferogramy separace *R,S*-methoxytolterodinu v 50 mM fosfátu sodném o pH 2,5 a koncentracích 0,1-1 % P- γ -CD



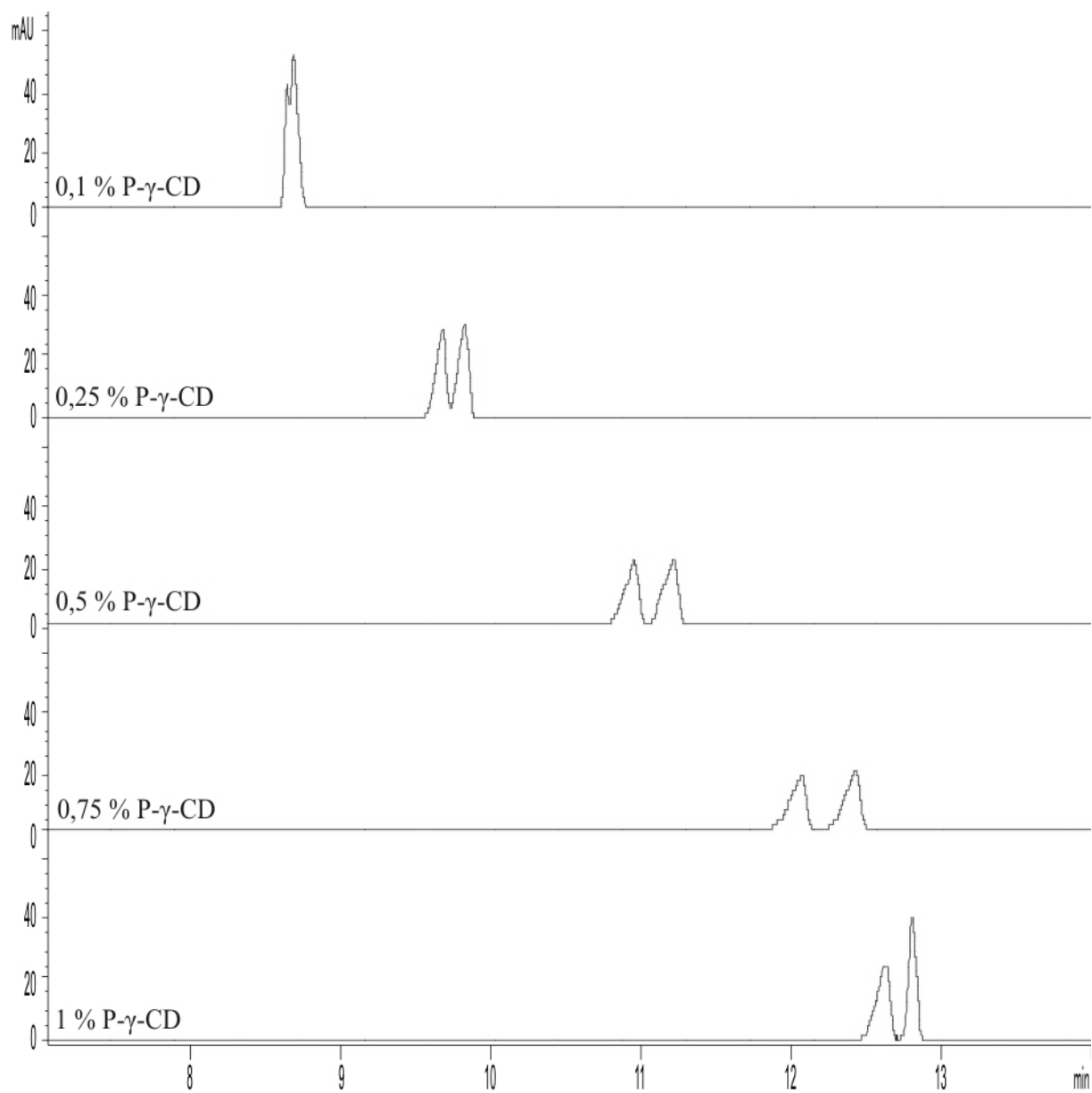
Obrázek 41c: Elektroferogramy separace *R,S*-methoxytolterodinu v 75 mM fosfátu sodném o pH 2,5 a koncentracích 0,1-1 % P- γ -CD



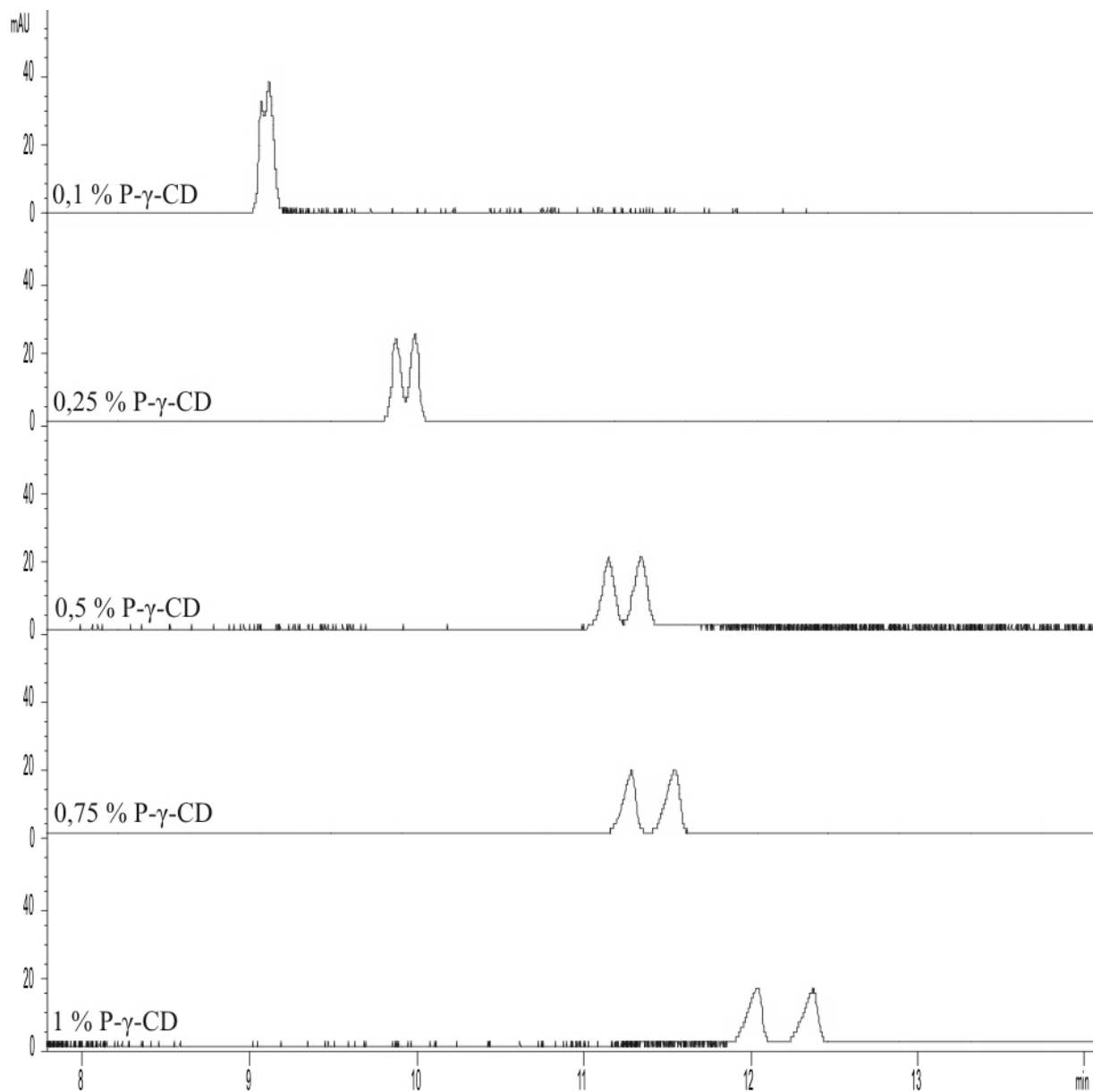
Obrázek 41d: Elektroferogramy separace *R,S*-methoxytolterodinu v 100 mM fosfátu sodném o pH 2,5 a koncentracích 0,1-1 % P- γ -CD



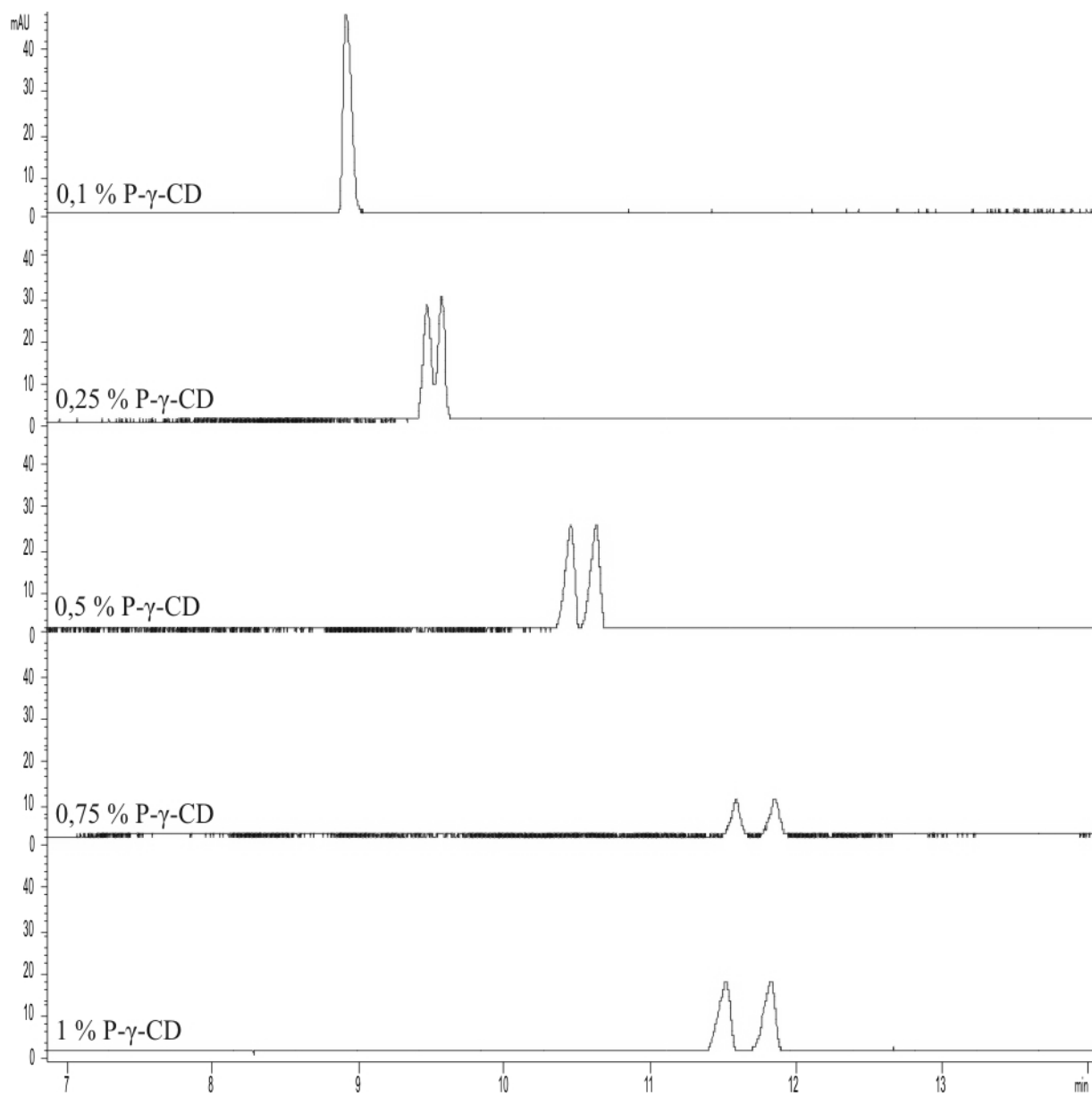
Obrázek 42a: Elektroferogramy separace *R,S*-methoxytolterodinu ve 25 mM fosfátu sodném o pH 3 a koncentracích 0,1-1 % P- γ -CD



Obrázek 42b: Elektroferogramy separace *R,S*-methoxytolterodinu v 50 mM fosfátu sodném o pH 3 a koncentracích 0,1-1 % P- γ -CD

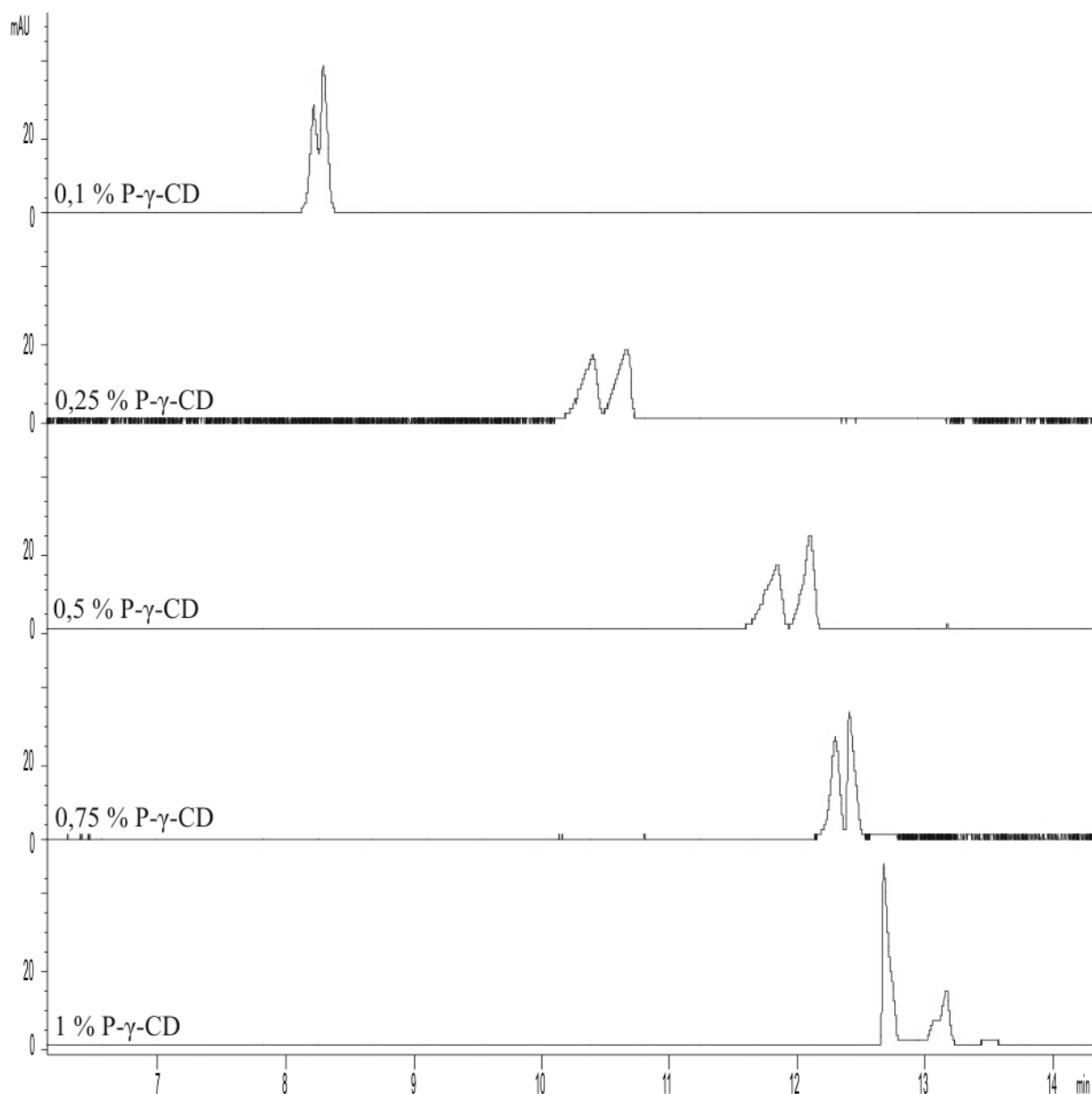


Obrázek 42c: Elektroferogramy separace *R,S*-methoxytolterodinu v 75 mM fosfátu sodném o pH 3 a koncentracích 0,1-1 % P- γ -CD

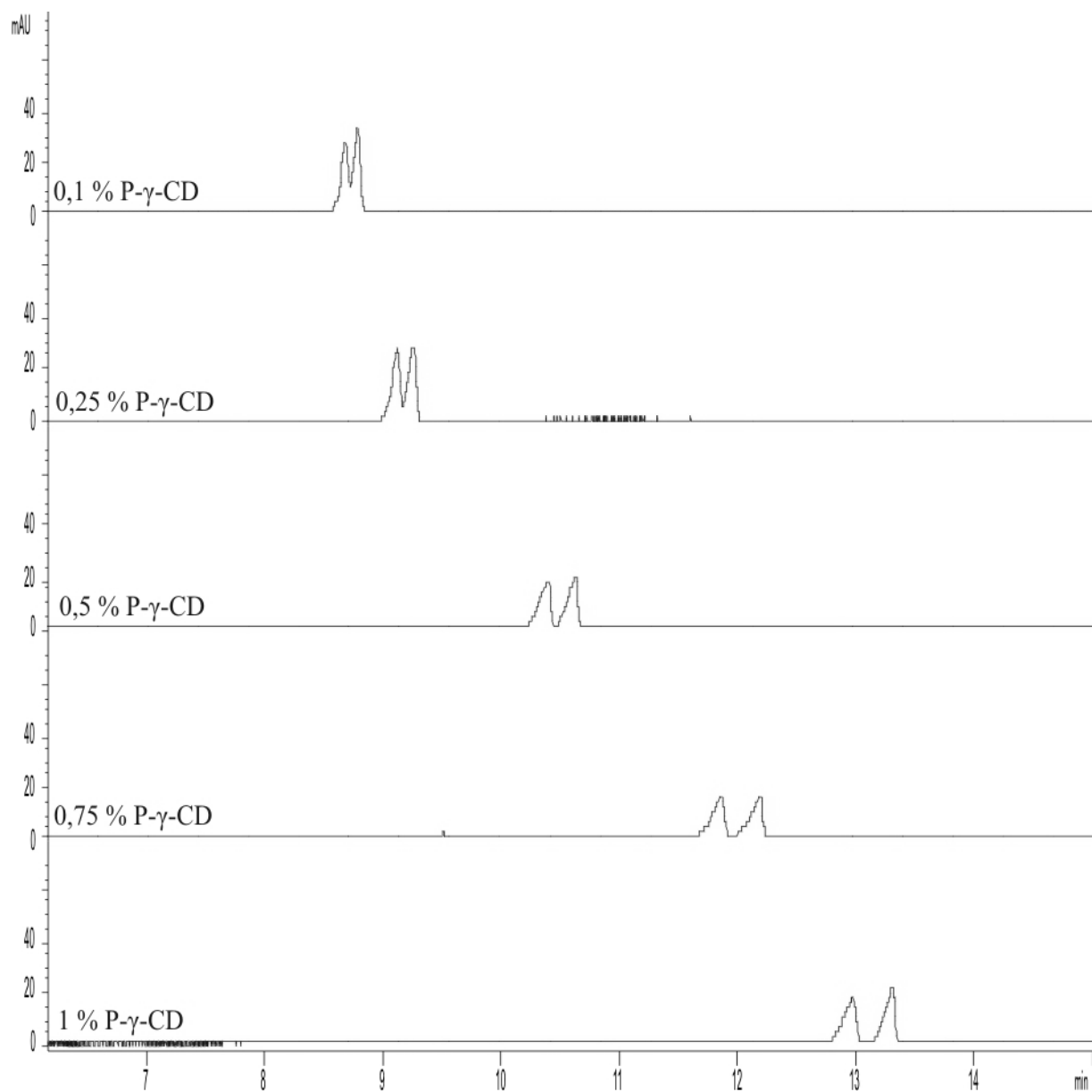


Obrázek 42d: Elektroferogramy separace *R,S*-methoxytolterodinu v 100 mM fosfátu sodném o pH 3 a koncentracích 0,1-1 % P- γ -CD

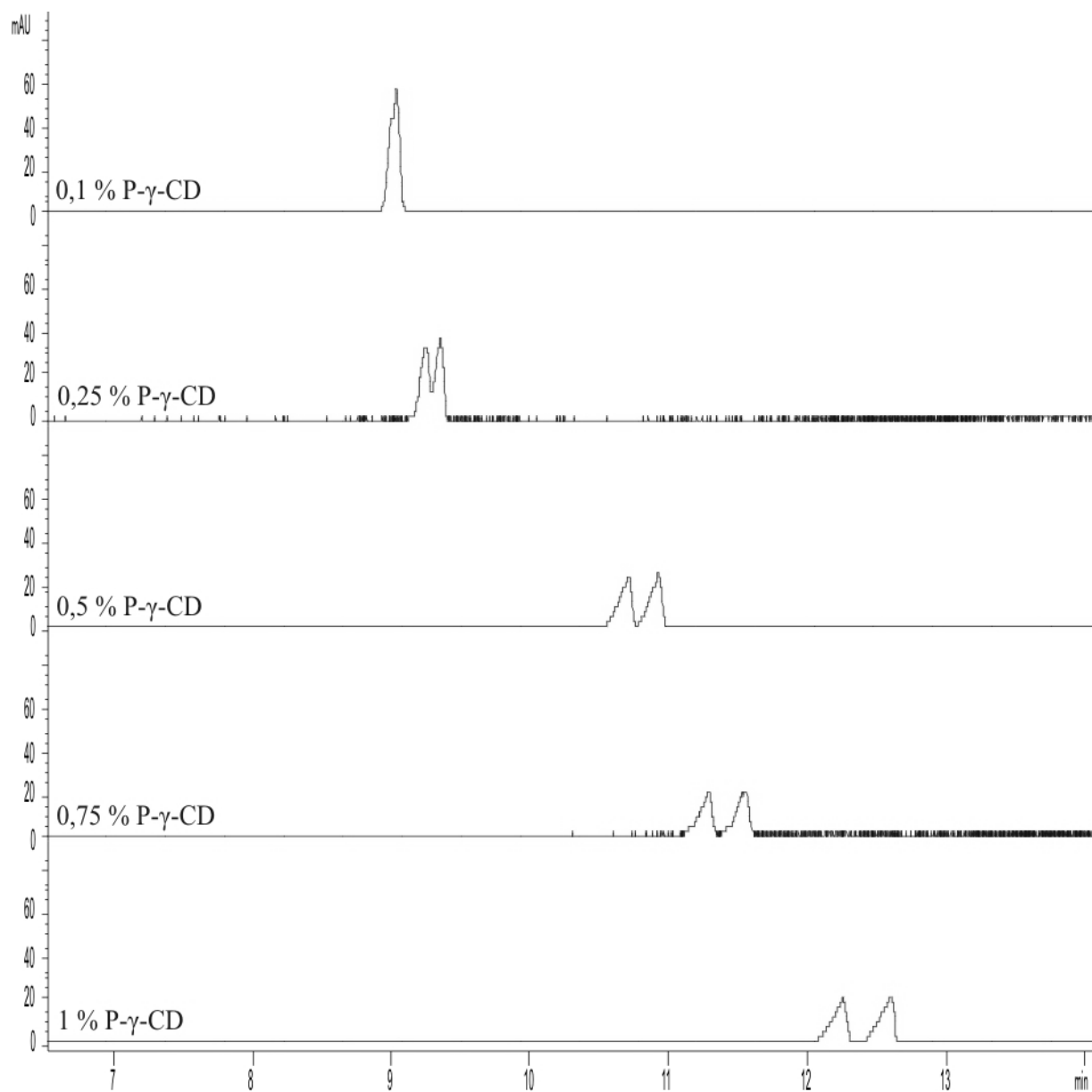
8.2 Elektroferogramy chirální separace *R,S*-methoxytolterodinu v elektrolytu fosfátu tris



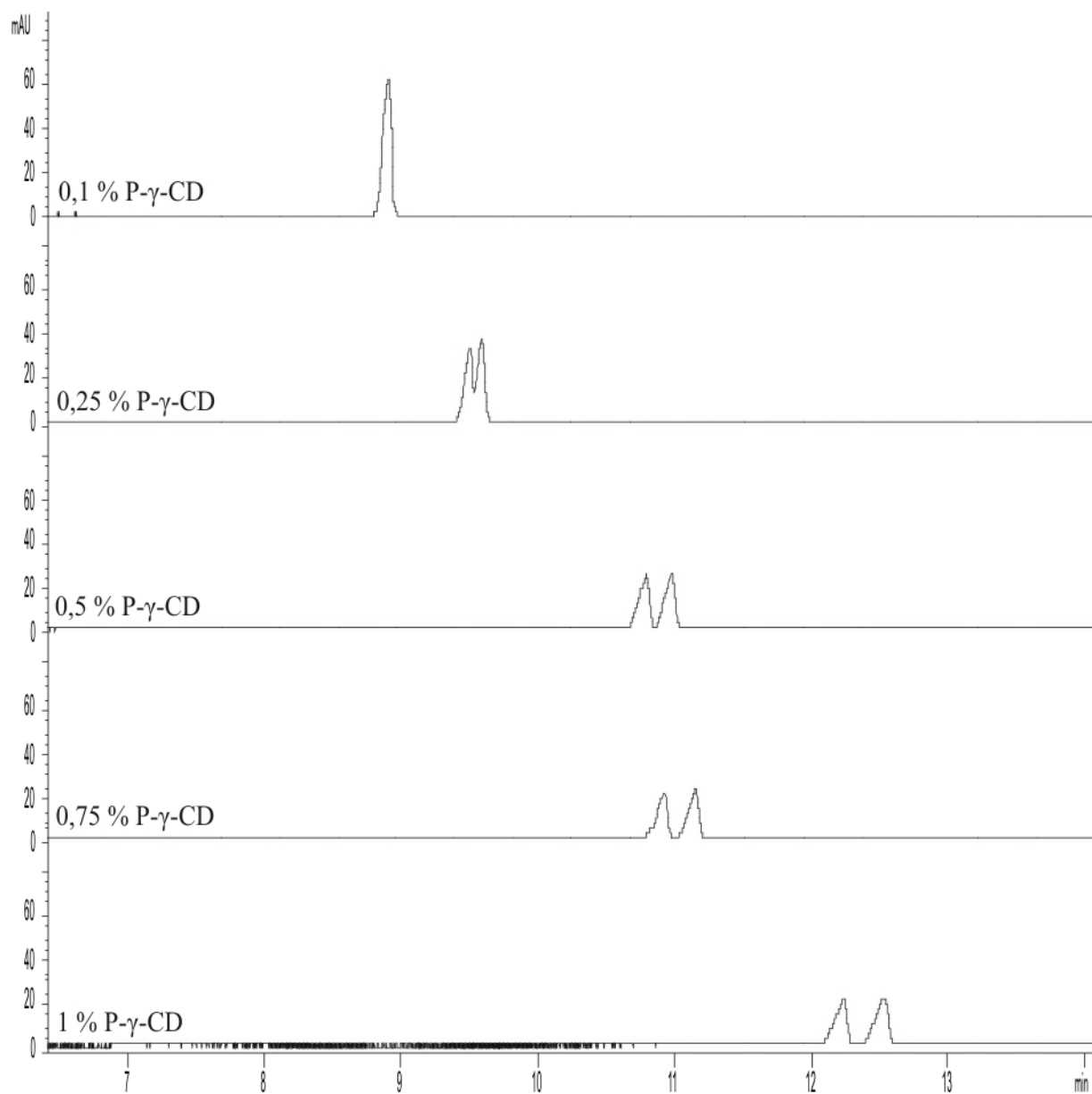
Obrázek 43a: Elektroferogramy separace *R,S*-methoxytolterodinu ve 25 mM fosfátu tris o pH 2 a koncentracích 0,1-1 % P- γ -CD



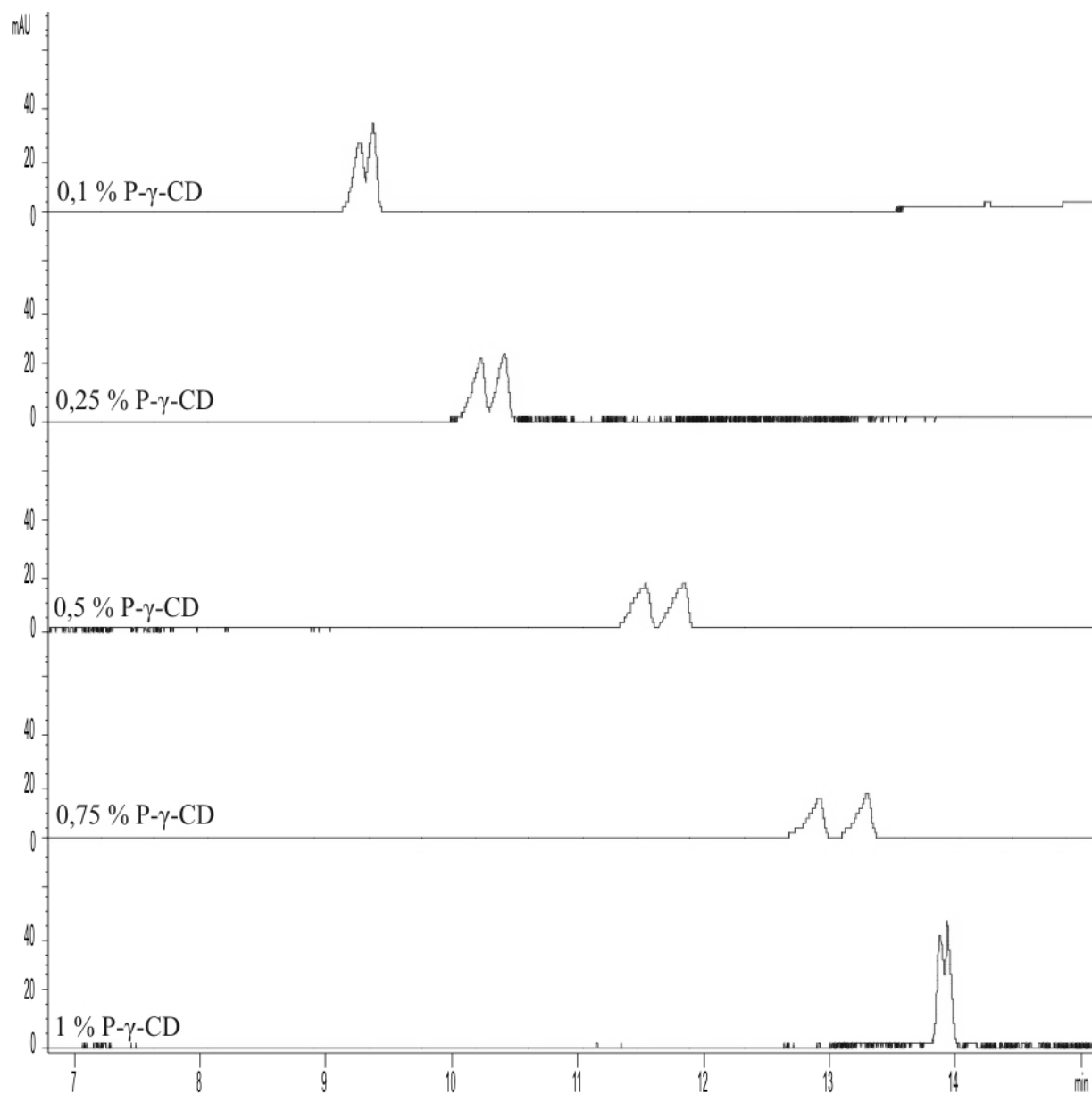
Obrázek 43b: Elektroferogramy separace *R,S*-methoxytolterodinu v 50 mM fosfátu tris o pH 2 a koncentracích 0,1-1 % P- γ -CD



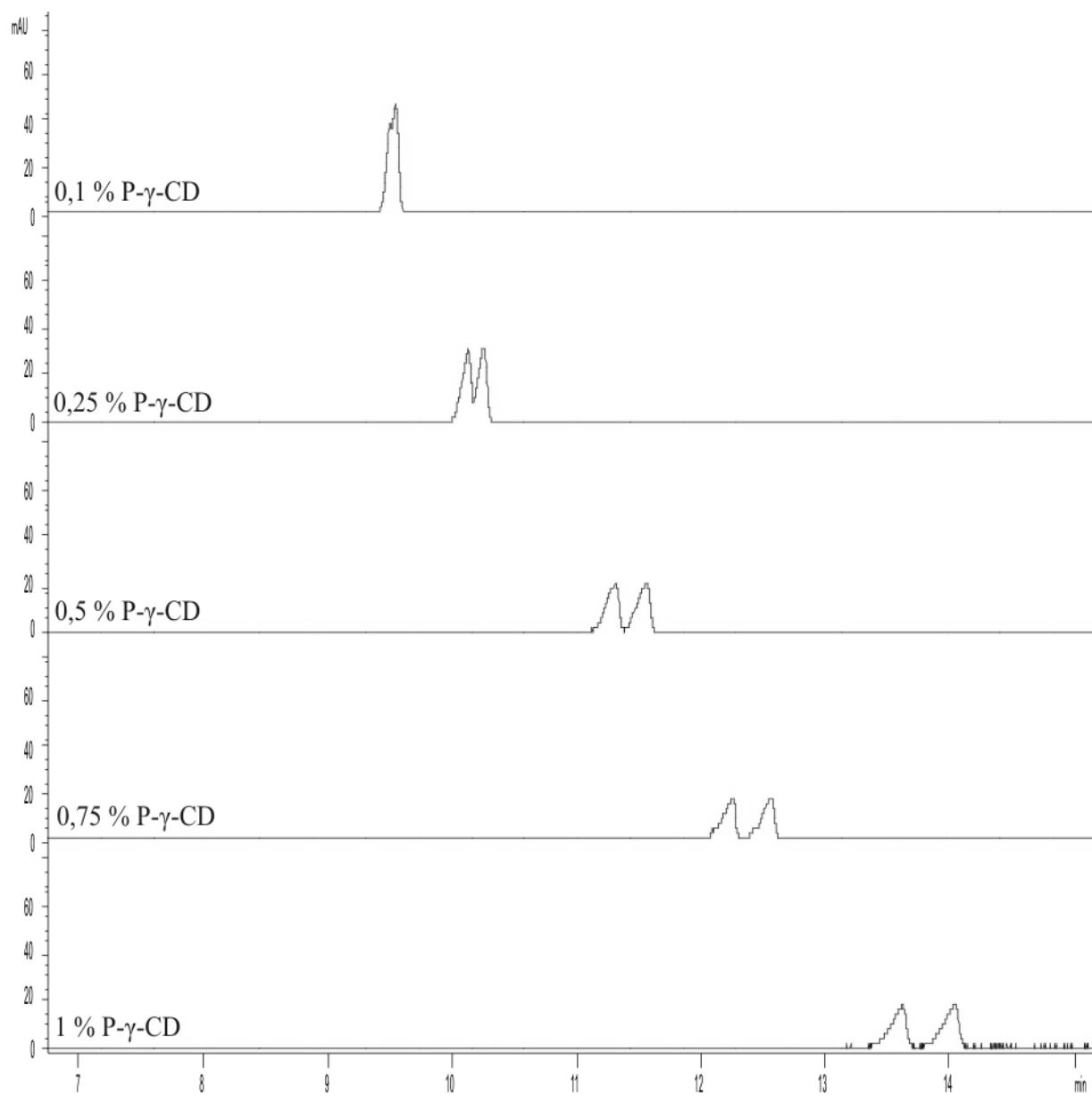
Obrázek 43c: Elektroferogramy separace *R,S*-methoxytolterodinu v 75 mM fosfátu tris o pH 2 a koncentracích 0,1-1 % P- γ -CD



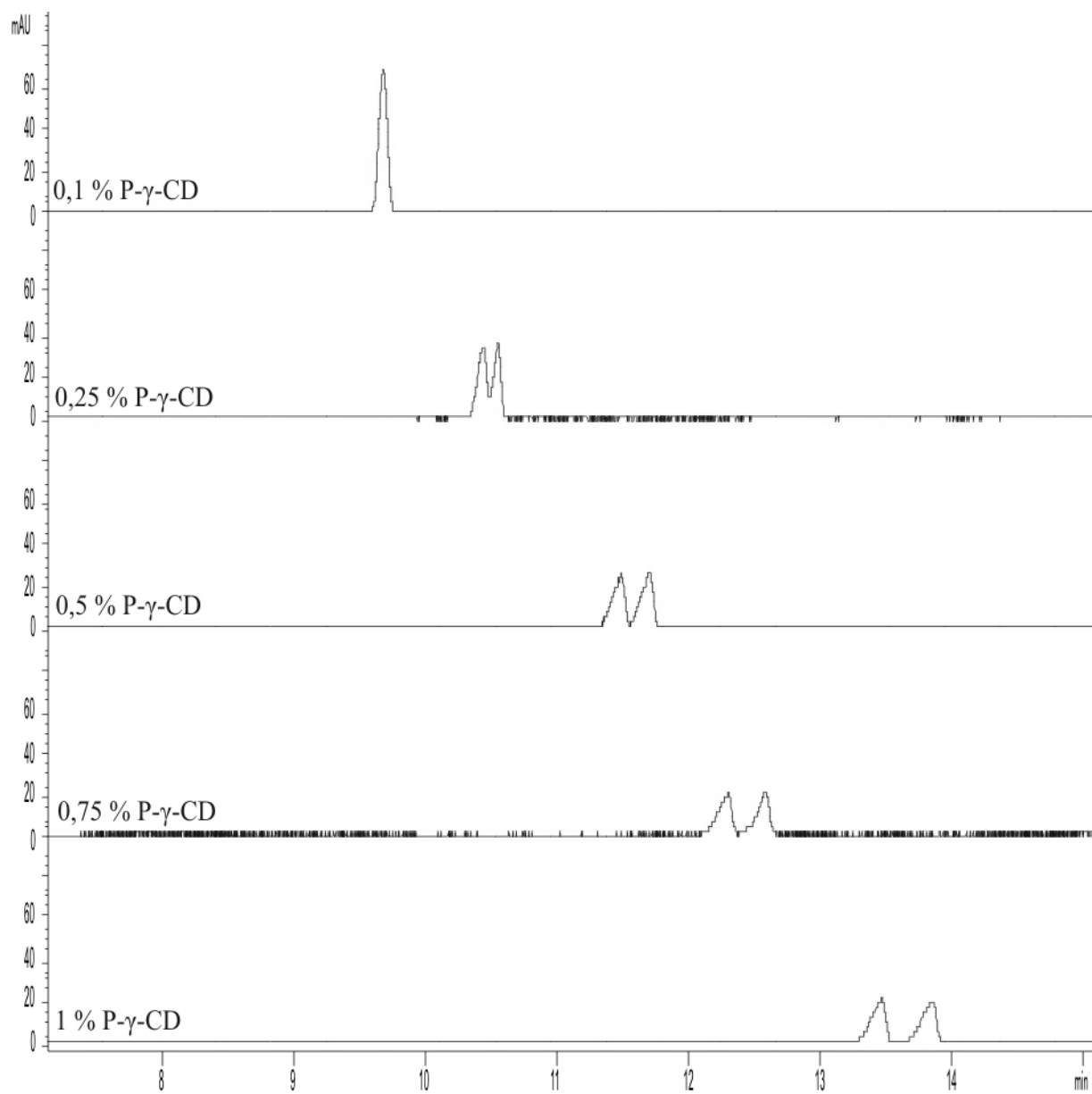
Obrázek 43d: Elektroferogramy separace *R,S*-methoxytolterodinu v 100 mM fosfátu tris o pH 2 a koncentracích 0,1-1 % P- γ -CD



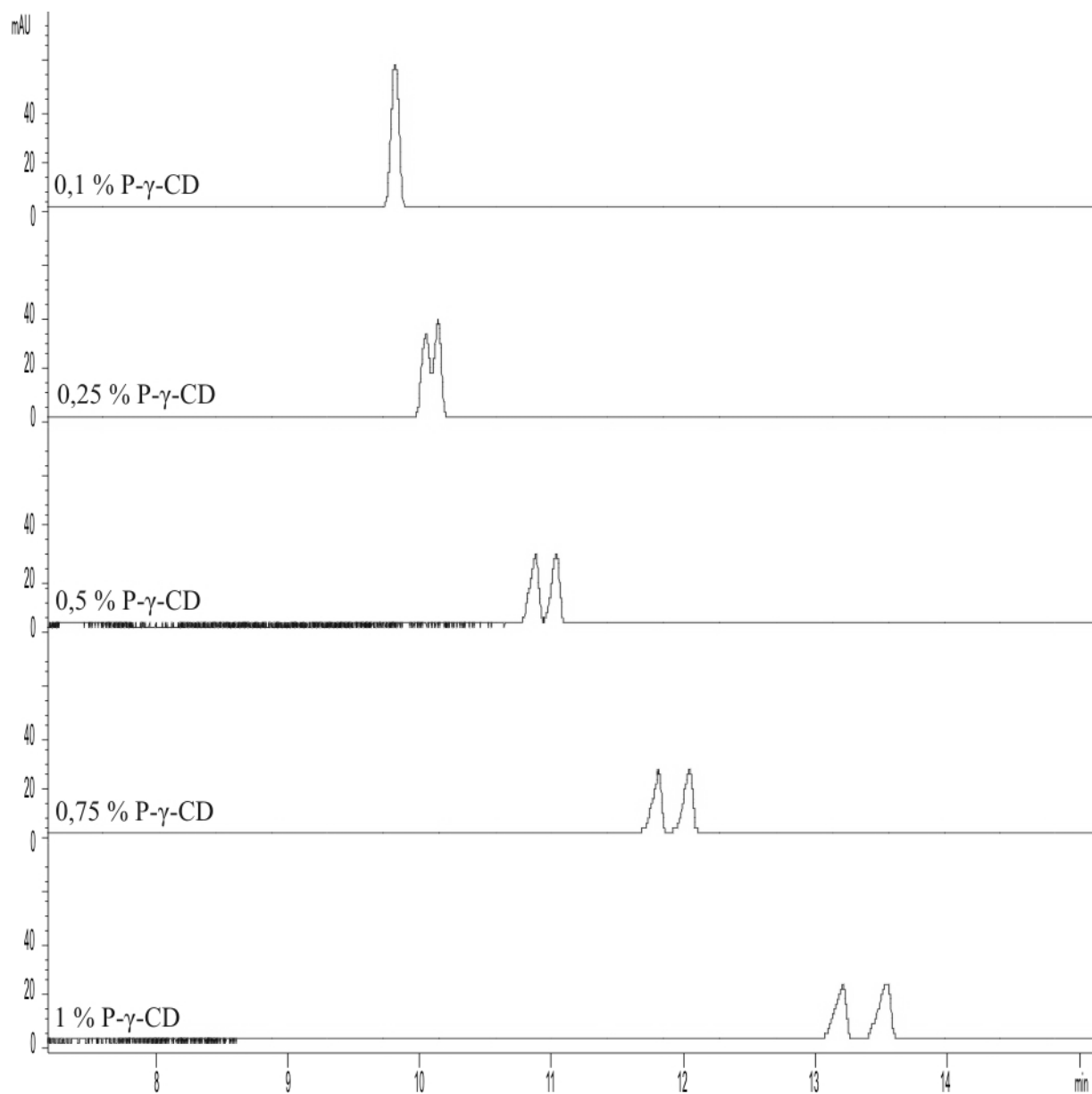
Obrázek 44a: Elektroferogramy separace *R,S*-methoxytolterodinu ve 25 mM fosfátu tris o pH 2,5 a koncentracích 0,1-1 % P- γ -CD



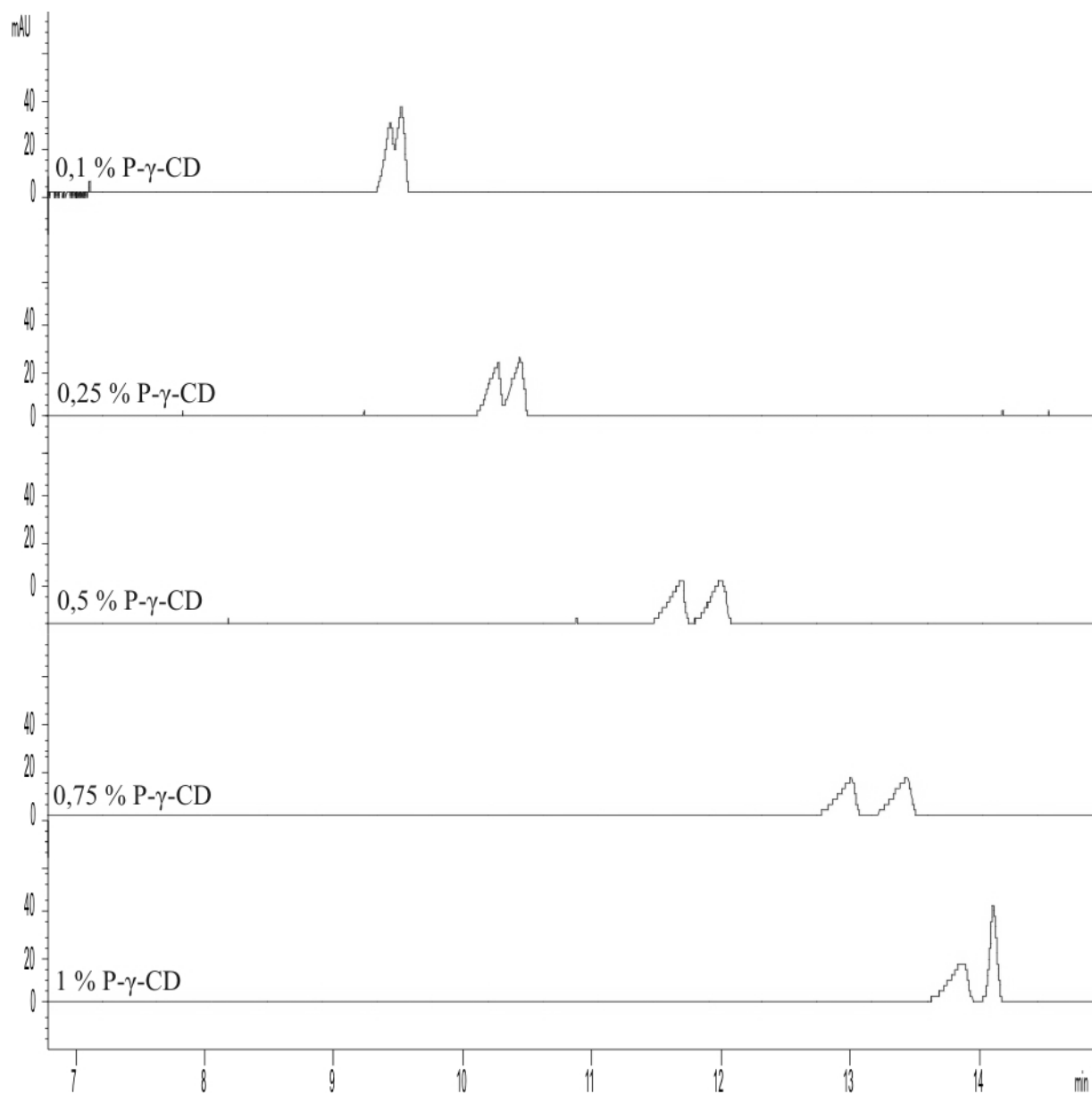
Obrázek 44b: Elektroferogramy separace *R,S*-methoxytolterodinu v 50 mM fosfátu tris o pH 2,5 a koncentracích 0,1-1 % P- γ -CD



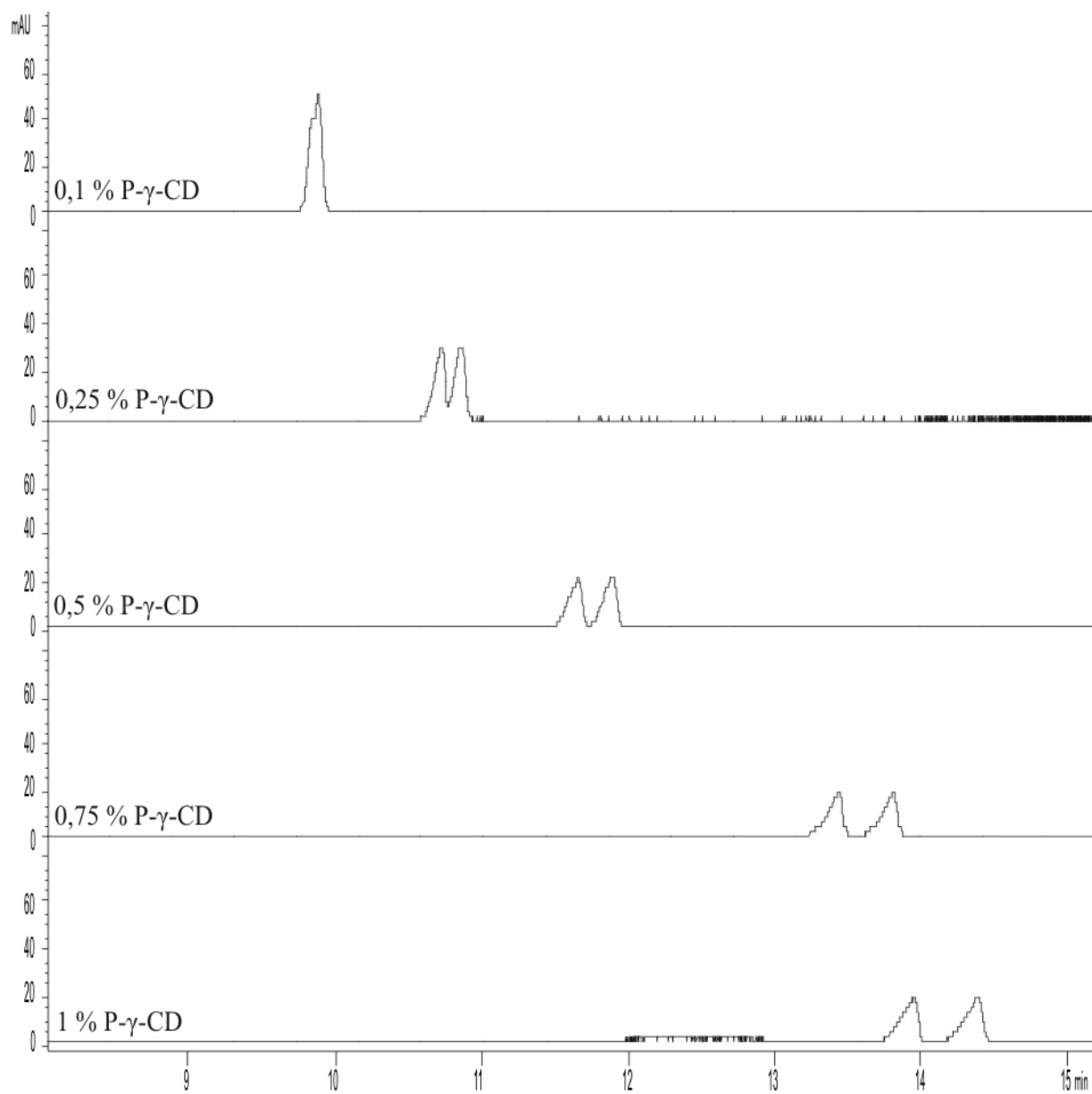
Obrázek 44c: Elektroferogramy separace *R,S*-methoxytolterodinu v 75 mM fosfátu tris o pH 2,5 a koncentracích 0,1-1 % P- γ -CD



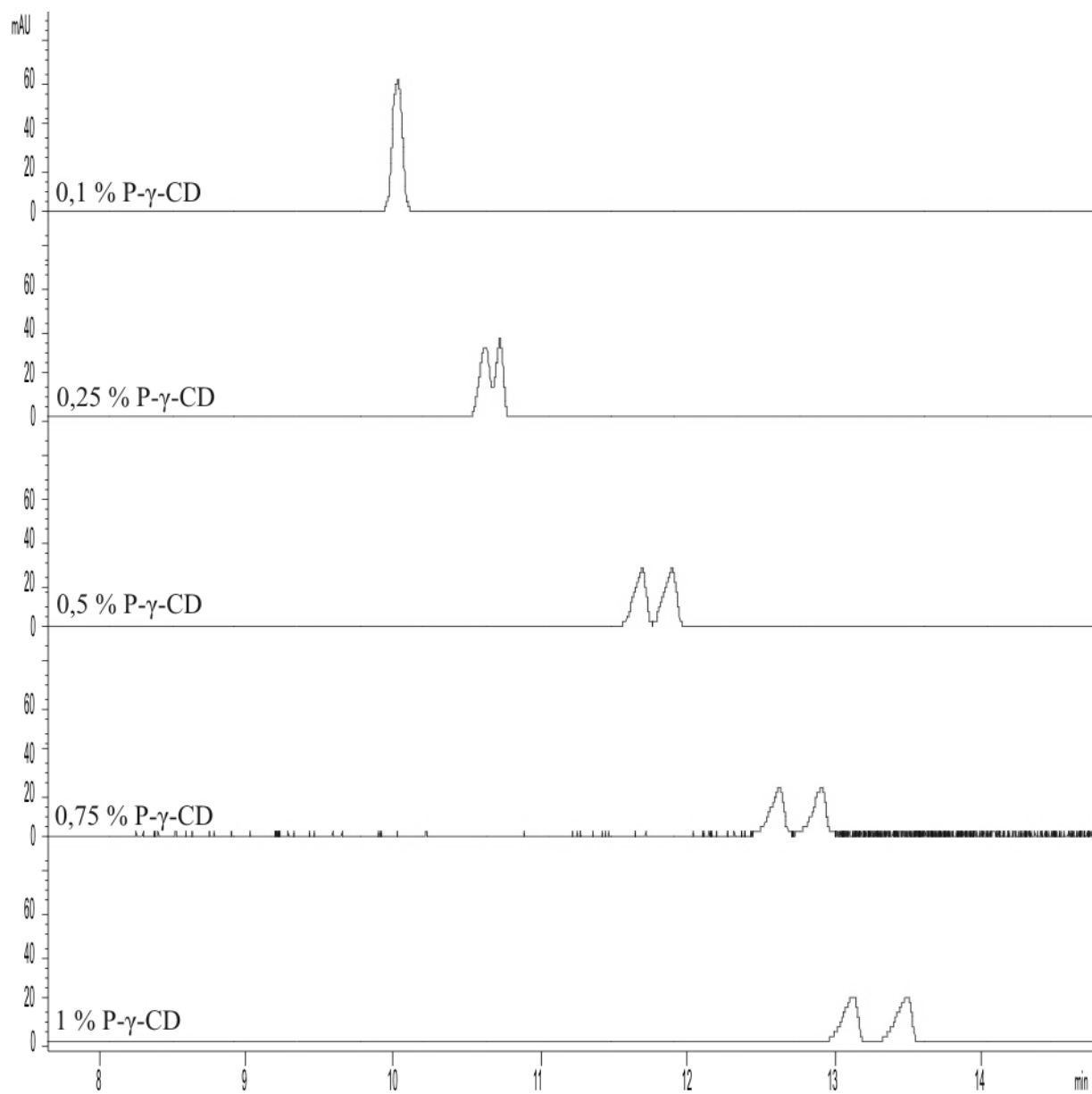
Obrázek 44d: Elektroferogramy separace *R,S*-methoxytolterodinu v 100 mM fosfátu tris o pH 2,5 a koncentracích 0,1-1 % P- γ -CD



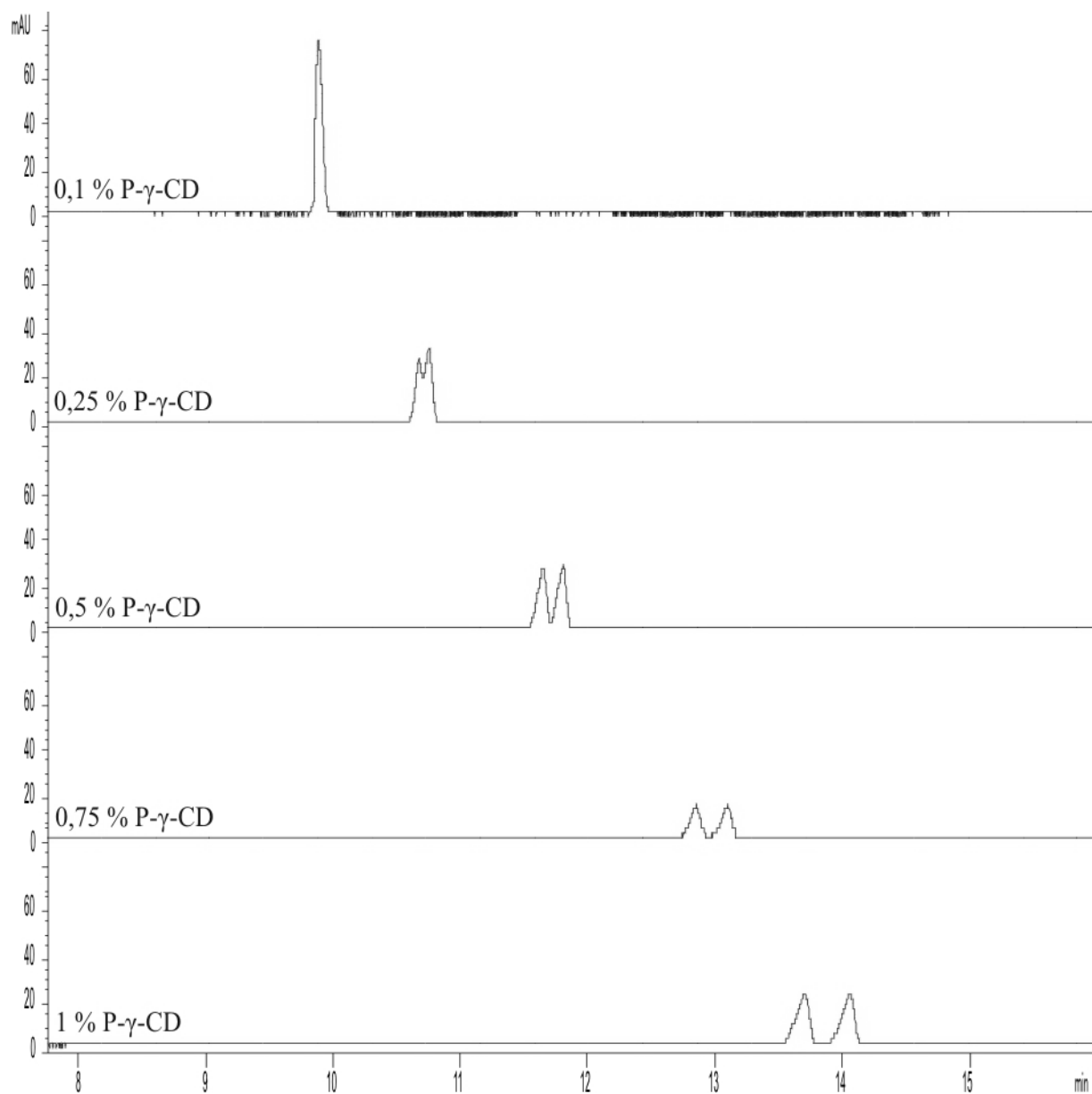
Obrázek 45a: Elektroferogramy separace *R,S*-methoxytolterodinu ve 25 mM fosfátu tris o pH 3 a koncentracích 0,1-1 % P- γ -CD



Obrázek 45b: Elektroferogramy separace *R,S*-methoxytolterodinu v 50 mM fosfátu tris o pH 3 a koncentracích 0,1-1 % P- γ -CD



Obrázek 45c: Elektroferogramy separace *R,S*-methoxytolterodinu v 75 mM fosfátu tris o pH 3 a koncentracích 0,1-1 % P- γ -CD



Obrázek 45d: Elektroferogramy separace *R,S*-methoxytolterodinu v 100 mM fosfátu tris o pH 3 a koncentracích 0,1-1 % P- γ -CD