

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Fakulta přírodovědecká

Katedra analytické chemie

SEPARACE OPTICKÝCH ISOMERŮ KAPILÁRNÍ ELEKTROFORÉZOU
CHIRÁLNÍ SEPARACE AMBRISANTANU

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Autor práce:
Studijní obor:

Petra Švecová
Chemie

Vedoucí diplomové práce:
Konzultant:

Mgr. Joanna Znaleziona, Ph.D.
Doc. RNDr. Jan Petr, Ph.D.

Olomouc 2014

Souhrn

Tato bakalářská práce se věnuje chirální separaci *R,S*-enantiomerů léčiva ambrisentanu pomocí kapilární elektroforézy ve spojení s UV detekcí.

V teoretické části jsou popsány základy kapilární elektroforézy a chiralitý látek. Dále je zde popsána chirální separace v kapilární elektroforéze, typy chirálních selektorů a z nich nejpoužívanější chirální selektory cyklodextriny.

Praktická část se věnuje optimalizaci metody, která spočívala především ve volbě vhodného chirálního selektoru a jeho koncentrace, typu a koncentraci pufru, teploty a separačního napětí. V poslední kapitole jsou popsány analytické parametry stanovení ambrisentanu a prezentována získaná chirální separace *R,S*-ambrisentanu.

Summary

The presented bachelor thesis deals with the chiral separation of *R,S*-enantiomers of drug ambrisentan by capillary electrophoresis in combination with UV detection.

The theoretical part cover basics of capillary electrophoresis and chirality of compounds. It also describes the chiral separation by capillary electrophoresis, types of chiral selectors with the among of frequently used cyclodextrins.

The practical part deals with the method optimization, which is mainly focused on the selection of a suitable chiral selector, its concentration and type, as well as concentration of buffer, temperature and separation voltage. The last chapter describes the analytical parameters of determination method of ambrisentan and presentes the resulting chiral separation of *R,S*-ambrisentan.

Prohlašuji, že jsem tuto práci vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, 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.....

.....
Vlastnoruční podpis

Chtěla bych poděkovat své vedoucí práce Mgr. Joanně Znalezioně, Ph.D., za její odborné vedení, ochotu a pomoc při zpracování bakalářské práce.

Dále bych chtěla poděkovat celé katedře analytické chemie za poskytnutí materiálního zázemí potřebného k realizaci praktické části mé bakalářské práce.

OBSAH

| | Strana |
|----------|---|
| 1 | ÚVOD.....8 |
| 2 | TEORETICKÁ ČÁST.....9 |
| 2.1 | Kapilární elektroforéza 9 |
| 2.2 | Důležité pojmy v kapilární elektroforéze 9 |
| 2.2.1 | Základy instrumentace a pracovní podmínky 13 |
| 2.2.2 | Separční principy 14 |
| 2.2.3 | Vyhodnocování dat kapilární elektroforézy 15 |
| 2.3 | Chiralita látek 16 |
| 2.4 | Chirální separace v kapilární elektroforéze 18 |
| 2.5 | Chirální selektory 21 |
| 2.5.1 | Klasifikace chirálních selektorů 21 |
| 2.5.2 | Přehled jednotlivých chirálních selektorů 21 |
| 2.6 | Cyklodextriny 22 |
| 2.6.1 | Derivatizované cyklodextriny 24 |
| 2.6.1.1 | Sodná sůl sulfobutylovaného β -cyklodextrinu 24 |
| 2.7 | Ambrisentan 25 |
| 2.7.1 | Separace ambrisentanu 26 |
| 3 | EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....27 |
| 3.1 | Přístrojové vybavení 27 |
| 3.2 | Chemikálie 27 |
| 3.3 | Experimentální podmínky 27 |
| 3.4 | Příprava vzorku ambrisentanu 28 |
| 3.5 | Příprava roztoků pufrů 28 |
| 4 | VÝSLEDKY A DISKUZE.....29 |
| 4.1 | Chirální separace <i>R,S</i> -ambrisentanu 29 |
| 4.1.1 | Volba cyklodextrinu 29 |
| 4.1.2 | Složení pufru 30 |
| 4.1.2.1 | Vliv koncentrace SB- β -CD 30 |
| 4.1.2.2 | Vliv pH pufru 32 |
| 4.1.2.3 | Vliv koncentrace pufru 34 |
| 4.1.3 | Podmínky měření 35 |
| 4.1.3.1 | Vliv napětí na separaci 35 |
| 4.1.3.2 | Vliv teploty na separaci 37 |

| | | |
|----------|--|-----------|
| 4.1.3.3 | Vliv doby dávkování vzorku | 38 |
| 4.1.4 | Analytické parametry stanovení <i>R,S</i> -ambrisentanu..... | 39 |
| 5 | ZÁVĚR..... | 42 |
| 6 | LITERATURA..... | 43 |
| 7 | SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ...^o | 45 |

1 ÚVOD

Kapilární elektroforéza (CE) je moderní analytická technika, která poskytuje rychlou a účinnou separaci látek. Mezi výhody CE patří možnost analyzovat malé objemy vzorků látek a jednoduchá instrumentace¹.

CE má také vysoké aplikační možnosti. Používá se pro separaci široké škály rozpustných ionogenních nízkomolekulárních i vysokomolekulárních látek (kyselin, bází, sacharidů, aminokyselin, nukleových kyselin...). Může také separovat i látky neionogenní povahy (alkoholy, ketony...)². Díky své jednoduchosti a variabilitě dosahuje výrazných úspěchů i v separaci chirálních látek³.

Separace chirálních látek má v současné době velký význam, protože zhruba 75 % léčiv je chirálních, takže mohou existovat ve formě jak *R*-, tak *S*-isomeru. Jenom jeden z isomerů je však farmaceuticky aktivní. Druhý isomer je farmaceuticky neaktivní a v některých případech může být dokonce toxický. Proto se vyrobená léčiva musí testovat na přítomnost neaktivního isomeru².

Příkladem chirálního léčiva, u kterého se objevuje toxicita druhého isomeru, je thalidomid. Jeho *R*-isomer má sedativní účinky, zatímco *S*-isomer je silně teratogenní. V historii tento poznatek nebyl známý, a proto se ženám užívající tento lék na ranní nevolnosti často rodily postižené děti. U těchto dětí se objevovaly různé deformace končetin, očí, srdce a trávicí soustavy⁴.

Pro separaci enantiomerů chirálních látek se používá řada separačních technik, mezi něž patří vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC), plynová chromatografie (GC), superkritická fluidní chromatografie (SFC), tenkovrstvá chromatografie (TLC), kapilární elektrochromatografie (CEC) a kapilární elektroforéza (CE)⁵, která má řadu výhod. Mezi tyto výhody patří velká separační účinnost, malá spotřeba vzorku a vodných roztoků pufrů, časová nenáročnost a široká variabilita použití⁶.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Kapilární elektroforéza

Kapilární elektroforéza (CE) se řadí mezi elektromigrační separační metody. CE probíhá v tenké kapiláře naplněné puftrem, který vede el. proud. Kapilára, používaná pro CE, je obvykle z taveného křemene o vnitřním průměru nejčastěji 25, 50 a 75 μm a délce 25-75 cm podle typu přístroje. Díky relativně velkému povrchu kapiláry vůči objemu vykazuje CE dobrý odvod Jouleova tepla oproti elektroforéze v plošném uspořádání. Jednou z výhod CE je možnost separovat a analyzovat širokou škálu rozpustných ionogenních nízkomolekulárních a vysokomolekulárních látek. Mezi další výhody patří jednoduchost instrumentace, malá spotřeba vzorku a účinnost separace dosahující stovek tisíc až milionů teoretických pater. Mezi nevýhody CE patří horší reprodukovatelnost a koncentrační citlivost^{2, 7-10}.

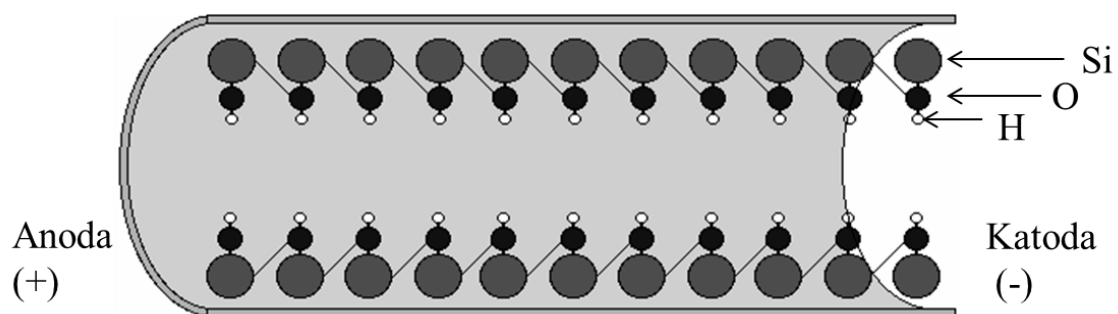
Princip CE spočívá v migraci elektricky nabitých částic ve stejnosměrném elektrickém poli. Toto elektrické pole je vytvářeno vkládáním konstantního stejnosměrného napětí mezi elektrody⁸.

2.2 Důležité pojmy v kapilární elektroforéze

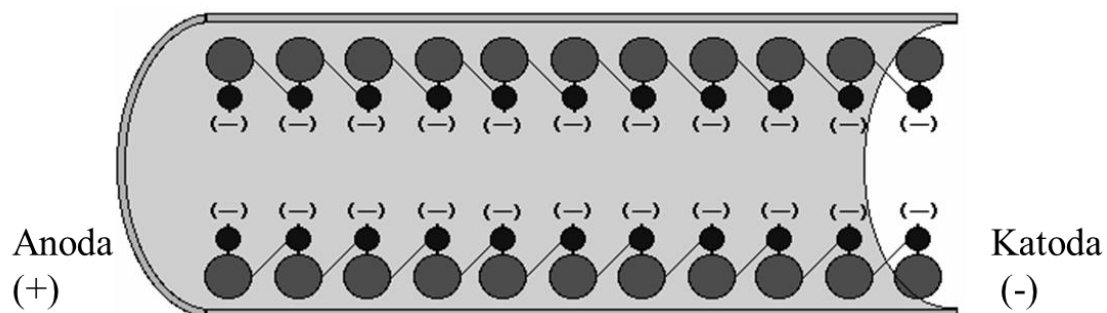
Elektroosmotický tok

Elektroosmotický tok (EOF) patří mezi jeden z transportních jevů v kapiláře. Vzniká působením stejnosměrného elektrického pole na difúzní část elektrické dvojvrstvy na rozhraní pevné a kapalné fáze u vnitřní stěny kapiláry⁷. Elektrická dvojvrstva vzniká v důsledku selektivní adsorpce jednoho druhu iontů na stěnu kapiláry a/nebo disociace ionogenních skupin (silanolových skupin) na vnitřním povrchu křemenné kapiláry. Adsorbované nebo disociací vzniklé ionty vytvářejí na stěně kapiláry imobilizovanou část elektrické dvojvrstvy, zatímco v její difúzní části směrem do roztoku zůstává přebytek volného náboje. Tím se v blízkosti stěny kapiláry vytváří potenciálový rozdíl, jehož část vyskytující se v difúzní oblasti elektrické dvojvrstvy se nazývá elektrokinetický potenciál. Působením stejnosměrného elektrického pole se uvádí do pohybu nejen difúzní část elektrické dvojvrstvy, ale prostřednictvím vnitřního tření v kapalině i veškerý roztok. Průběh vzniku EOF je i názorně zobrazen na (Obr. 1)⁷.

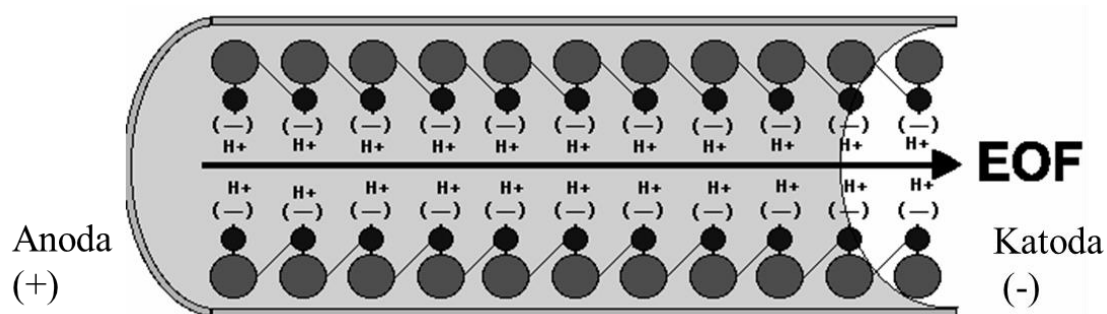
1) Kapilára z taveného křemene.



2) Disociace hydroxylových skupin zanechá na vnitřním povrchu negativní náboj.



3) Po vložení napětí se začne kapalina pohybovat ke katodě.



Obr. 1 Průběh vzniku EOF²

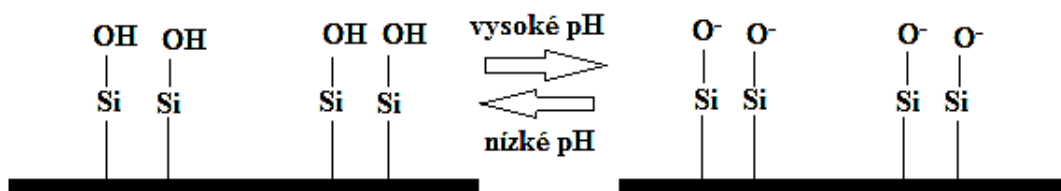
Po teoretickém a názorném objasnění vzniku EOF je dále uveden vztah pro výpočet EOF rychlosti a mobility.

$$v_{\text{eof}} = \mu_{\text{eof}} \cdot E \quad (1) \quad [\text{m} \cdot \text{s}^{-1}]$$

$$\mu_{\text{eof}} = \frac{\varepsilon \cdot \zeta}{\eta} \quad (2) \quad [\text{m}^2 \text{V}^{-1} \text{s}^{-1}]$$

v_{eof}rychlost EOF
 Eintenzita el. pole
 εdielektrická konstanta
 ζzeta potenciál
 μ_{eof}EOF mobilita
 ηviskozita prostředí⁷

Elektrokinetický potenciál je určen povrchovou hustotou náboje na vnitřní stěně kapiláry, a jelikož je disociace silanolových skupin závislá na pH roztoku, je EOF tok silně závislý na pH pufru. Lze tudíž měnit EOF tok změnou složení pufru (pH, iontová síla)⁷. Při nízkém pH jsou totiž silanolové skupiny nedisociované a EOF je proto mnohem slabší a při velmi nízkém pH až skoro nulový, jak je názorně ukázáno na (Obr. 2)².



Obr. 2 Disociace silanolových skupin²

Elektroforetická mobilita

Elektroforetická mobilita (pohyblivost) (μ_e) je definovaná jako rychlost (v) pohybu nabitých částic v kapalném prostředí ve stejnosměrném elektrickém poli o jednotkové intenzitě (E)⁷.

Vztah pro výpočet elektroforetické mobility:

$$\mu_e = \frac{v}{E} = \frac{v \cdot L}{U} \quad (3) \quad [\text{m}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}]$$

L.....délka kapiláry
U.....vložené napětí
v.....rychlost pohybu částic v el. poli
E.....intenzita el. pole⁷

Na nabitou částici o náboji (q) působí v elektrickém poli o intenzitě (E) dvě síly⁸. Síla elektrického pole (F_e), která uvádí částici s nábojem (q) v elektrickém poli o intenzitě (E) do pohybu a frikční síla prostředí (F_f), která působí proti tomuto pohybu částice. Frikční síla je dána Stokesovým zákonem⁷.

Vztahy pro výpočet sil působících na částici:

$$F_e = q \cdot E \quad (4)$$

$$F_f = -6\pi\eta r v \quad (5)$$

q.....náboj iontu
E.....intenzita el. pole
 ηviskozita roztoku
r.....poloměr iontu
v.....rychlost pohybu iontu⁷

Z rovnosti těchto opačně orientovaných sil v ustáleném stavu lze odvodit vztah pro elektroforetickou mobilitu⁷.

Vztah pro výpočet elektroforetické mobility:

$$\mu_e = \frac{q}{6r\pi\eta} \quad (6) \quad [\text{m}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}]$$

Z tohoto vztahu vyplývá, že pohyblivost iontu je přímo úměrná náboji (q) a nepřímo úměrná jeho poloměru (r) a viskozitě roztoku (η)⁷.

Zdánlivá mobilita

Zdánlivá mobilita iontu (μ_a) je definována jako součet elektroforetické mobility iontu (μ_e) a elektroosmotické mobility (μ_{eof})¹¹.

Vztah pro výpočet zdánlivé mobility:

$$\mu_a = \mu_e + \mu_{eof} \quad (7) \quad [\text{m}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}]$$

Zdánlivou mobilitu iontu můžeme také vypočítat z experimentálně změřeného migračního času (t_m) tohoto iontu¹¹.

Vztah pro výpočet zdánlivé mobility:

$$\mu_a = \frac{L \cdot l}{U \cdot t_m} \quad (8) \quad [\text{m}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}]$$

L.....celková délka kapiláry

l.....efektivní délka kapiláry

U.....vkládané napětí

t_mmigrační čas iontu¹¹

Limitní (iontová) mobilita

Limitní mobilita (μ_{lim}) je mobilita iontů při nekonečném zředění. Limitní mobility jsou při teplotě 25 °C tabelovány jako fyzikálně chemické konstanty iontů⁷.

Efektivní mobilita

Efektivní mobilita (μ_{ef}) je definována pro roztoky slabých elektrolytů. V roztocích slabých elektrolytů jsou vedle sebe disociované (nabitě) a nedisociované (nenabitě) molekuly. Podíl nabitých částic v roztoku je určen stupněm disociace (α) a efektivní mobilita je na tomto stupni disociace závislá⁸.

Vztah pro výpočet efektivní mobility:

$$\mu_{ef} = \mu_e \cdot \alpha \quad (9) \quad [\text{m}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}]$$

αstupeň disociace

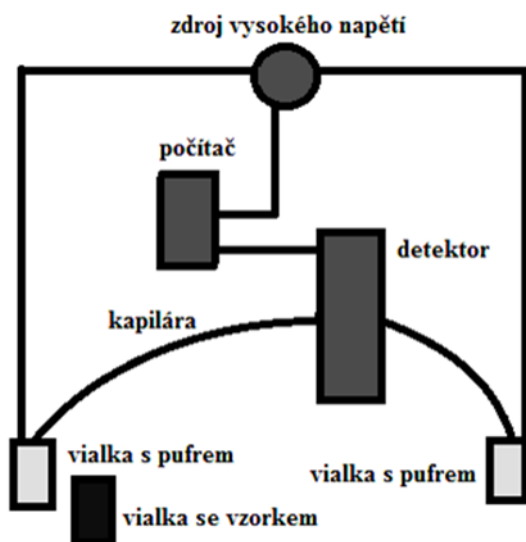
μ_eelektroforetická mobilita⁸

2.2.1 Základy instrumentace a pracovní podmínky

Při kapilární elektroforéze musí být dodrženy určité pracovní podmínky, jako např. vkládané vysoké napětí, proud a rozměry kapiláry, jež jsou uvedeny níže. Používají se také

různé způsoby dávkování vzorku. Většinou se však používá aplikace přetlaku na nádobku u injekčního konce kapiláry nebo podtlaku na nádobku u detektorového konce kapiláry. Dále se používají různé detektory. Mezi nejčastěji používané detektory se řadí UV detektor². Instrumentace a základní uspořádání přístroje je zobrazeno na (Obr. 3)².

| <i>Pracovní podmínky</i> | <i>Dávkování vzorku</i> | <i>Detektory</i> |
|---|-----------------------------------|------------------------------------|
| Křemenná kapilára (I.D. 10-100 μm) | Elektrokinetické Hydrostatické | UV/VIS detektor Elektrochemický |
| Elektrolyty s tlumícími schopnostmi | Hydrodynamické | Fluorescenční Vodivostní |
| Vysoké napětí (5-30 kV) | | Hmotnostní ² |



Obr. 3 Instrumentace CE

2.2.2 Separační principy

Univerzálnost CE je částečně odvozena z velkého počtu módů (principů separace). Separační mechanismy jednotlivých módů se liší, přičemž většinou ke změně módu stačí

změna složení pufru. Mezi základní módy CE patří kapilární zónová elektroforéza (CZE), micelární elektrokinetická chromatografie (MEKC), kapilární gelová elektroforéza (CGE), kapilární izoelektrická fokusace (CIEF) a kapilární izotachoforéza (CITP)¹².

Nejjednodušší mód kapilární elektroforézy je CZE. U CZE probíhá transport analyzovaných iontů a jejich separace v kapiláře, která propojuje dvě nádoby. Do roztoku pufru jsou ponořeny elektrody, jimiž se přivádí elektrické napětí obstarávající pohyb iontů. Pufrr je také v kapiláře, do níž je dávkován přetlakem nad hladinou kapaliny v jedné nádobce. Potom se jeden konec kapiláry ponoří do nádoby s analyzovaným vzorkem a malý sloupeček vzorku vnikne na začátek kapiláry. Kapilára se poté vrátí zpět do nádoby s pufrem a zapne se hnací napětí. Na druhém konci kapiláry je detektor, který zaznamenává průchod jednotlivých látek. V jedné analýze můžeme separovat jak kationty, tak anionty^{10,13}.

Jak je uvedeno výše, průchod jednotlivých látek kapilárou zaznamenává detektor. Detektory v CE musí být dostatečně citlivé kvůli malému vnitřnímu průměru kapiláry. Mezi nejčastěji používané detektory v CE patří UV/VIS detektor opatřený diodovým polem, který má však malou citlivost. Naopak velmi citlivý je detektor s laserem indukovanou fluorescencí, jehož pořizovací cena je však vyšší. Mezi další detektory používané v CE řadíme amperometrické, potenciometrické a vodivostní detektory. V poslední době se k detekci látek využívá i spojení CE s hmotnostní spektrometrií (MS)^{1,8}.

2.2.3 Vyhodnocování dat kapilární elektroforézy

Projevem jednotlivých zón putujících kapilárou je odezva detektoru před koncem kapiláry, která má charakter píku. Kvalitativní charakteristikou je migrační čas látky a kvantitativní charakteristikou je plocha píku².

Počet teoretických pater

Počet teoretických pater (N) je mírou účinnosti separace². Vypočítá se ze vztahu.

$$N = 16 \cdot \frac{t_m^2}{w^2} \quad (10)$$

t_mmigrační čas látky
 wšířka píku látky při základně²

Rozlišení

Rozlišení (R_s) popisuje míru separace dvou látek. Při $R_s = 1,50$ považujeme píky látek za kvantitativně rozdělené². Vypočítá se ze vztahu.

$$R_s = \frac{t_{m2} - t_{m1}}{(w_2 + w_1)/2} \quad (11)$$

t_{m2}, t_{m1}migrační časy látek 1 a 2

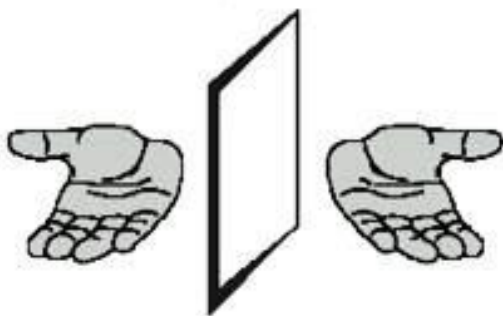
w_2, w_1šířky píků látek 1 a 2 při základně²

Limit detekce, limit kvantifikace

Jednou z důležitých charakteristik jakékoli metody stanovení je určení limitu detekce (LOD), resp. limitu kvantifikace (LOQ). Existuje několik možností, jak určit LOD. Jednou z metod je metoda postupného zředování, kdy dávkovaný analyt postupně ředíme až do chvíle, kdy poskytnutý signál má ještě výšku 3x větší než průměrný šum. Tento stav definuje nejmenší spolehlivě detekovatelnou koncentraci = dolní limit detekce. Další, experimentálně méně pracnou možností, je vypočítat statistický průměrný šum základní linie a odečíst z kalibrační křivky odpovídající koncentraci. LOQ odpovídá množství, které jsme schopni spolehlivě nejen detekovat, ale i stanovovat a je nejčastěji 3,3 násobkem limitu detekce².

2.3 Chiralita látek

Podíváme-li se na svou tvář v zrcadle, uvidíme někoho, kdo je nám sice velmi podobný, ale jen podobný. Kdyby náš obraz vyšel ze světa za zrcadlem a postavil se vedle nás, zjistili bychom řadu nesrovnalostí. Lidské tělo totiž není symetrické a každá asymetrie například v obličeji by u našeho obrazu byla opačná. Ve skutečnosti nepotkáme nikoho, kdo by byl naším zrcadlovým obrazem. Naproti tomu ve světě molekul je to celkem běžný jev. Organické molekuly mohou existovat v symetrických formách (enantiomerech), které jsou téměř identické, jedna forma je zrcadlovým obrazem druhé. Říkáme tomu pak, že molekuly jsou chirální. Název chirální pochází z řeckého slova „chiros“ ruka. A skutečně, pravá a levá dlaň jsou zrcadlově symetrické, stejně jako chirální molekuly, což je ukázáno na (Obr. 4)¹⁴.



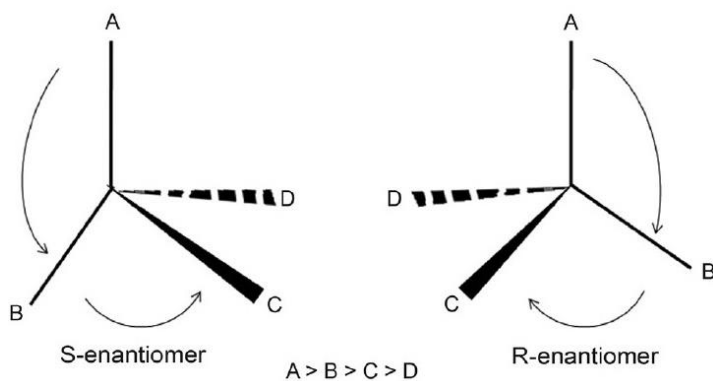
Obr. 4 Zrcadlové obrazy¹⁵

Zajímavé je, jak často bývá takový poměrně malý rozdíl mezi molekulami podstatný. Např. jeden enantiomer může být léčivo a naopak druhý enantiomer může být neúčinný nebo dokonce toxický¹⁴.

Zhruba 75 % všech nově vyvíjených léčiv je chirálních. Většina těchto léků byla původně vyráběna jako směs isomerů, ale nyní se vyrábějí jako čisté isomery, což způsobuje značné výrobní a kontrolní problémy. Musí se totiž ověřovat, zda je lék tvořen jen farmaceuticky potřebným enantiomerem².

Chiralita se obecně projevuje existencí dvou konstitučně identických molekul (enantiomerů), lišící se pouze ve vzájemném uspořádání atomů a vazeb v prostoru. Enantiomery mají v achirálním prostředí stejné fyzikálně-chemické vlastnosti, ale vykazují odlišné biologické, toxikologické a farmakologické vlastnosti¹⁶.

V roce 1951 se poprvé podařilo určit skutečné prostorové uspořádání atomů v chirální molekule (absolutní konfiguraci). Při určování absolutní konfigurace nejdříve identifikujeme střed chiralit. Dále určíme prioritu čtyř substituentů, které vycházejí z tohoto středu, podle Cahnových-Ingoldových-Prelogových pravidel. Nakonec určíme konfiguraci enantiomeru podle směru, ve kterém jsou řazeny substituenty podle priority. Je-li tento směr ve směru hodinových ručiček, tak se jedná o *R*-konfiguraci. Je-li tento směr proti směru hodinových ručiček, jedná se o *S*-konfiguraci¹⁷. Názorná ukázka určení *R*- a *S*-konfigurace je na (Obr. 5).



Obr. 5 Konfigurace enantiomerů¹⁸

2.4 Chirální separace v kapilární elektroforéze

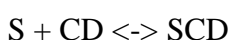
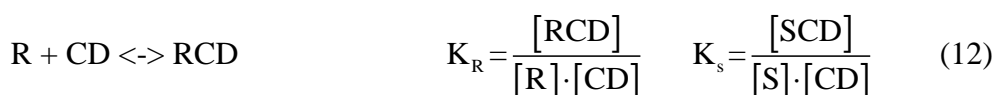
Jednou z aplikací CE je separace chirálních látek. Pro rozlišení enantiomerů chirálních látek se používají metody přímé nebo nepřímé. Nepřímé metody se vyznačují tvorbou diastereoisomerních komplexů derivatizací enantiomerů před vlastní separací v achirálním prostředí. Více využívány jsou však metody přímé, při nichž dochází k dynamické tvorbě přechodných komplexů v průběhu vlastního separačního procesu. K tvorbě diastereoisomerních komplexů přispívají intermolekulární interakce chirálního selektoru a analytu. Mezi tyto interakce patří coulombické repulze a atrakce, tvorba vodíkových vazeb, hydrofobní interakce, interakce π - π a interakce dipól-dipól³.

Vlastní rozlišení enantiomerů je pak založeno na představě „tříbodové“ interakce analytu a chirálního selektoru. Alespoň jedna interakce analytu s chirálním selektorem musí být stereoselektivní^{3,16}. Interakce mezi analytem a chirálním selektorem buď zvýší anebo sníží pohyblivost enantiomerů. Když je interakce jednoho ze dvou enantiomerů se selektorem silnější, dojde k separaci¹⁹.

Nejčastěji se pro chirální separace používají jako chirální selektory cyklodextriny (CD). Primárně CD formují komplexy s molekulami analytu tím, že je zahrnují do své hydrofobní dutiny. Jako sekundární procesy jsou označovány vodíkové interakce nebo dipól-dipól interakce analytu s -OH skupinami nebo dalšími polárními substituenty na CD. V případě nabitého cyklodextrinu hrají značnou roli i iontové interakce^{3,19}. Vlastní rozlišení je pak založeno na „tříbodové“ interakci analytu s CD³.

Vznik diastereoisomerních komplexů

Navázání hostujících enantiomerických molekul na CD vede ke vzniku diastereoisomerních komplexů. Tyto komplexy se liší ve vlastnostech, jako jsou např. náboj, velikost komplexu a konstanta komplexace. Tyto rozdíly vedou k separaci. Konstanta komplexace jednotlivých enantiomerů s CD vyjadřuje termodynamickou rovnováhu tvorby těchto komplexů za předpokladu, že jsou CD a enantimery v poměru 1:1. (cit.¹⁹)



Efektivní mobilita enantiomerů

Efektivní mobilita enantiomeru (μ_{eff}) je složena z mobility volného enantiomeru, který není navázaný na CD a z mobility komplexu daného enantiomeru s CD. Rozdíl mezi efektivními mobilitami enantiomerů vyvolá separaci a můžeme ho vypočítat z rovnice podle Wrena a Rowa¹⁹.

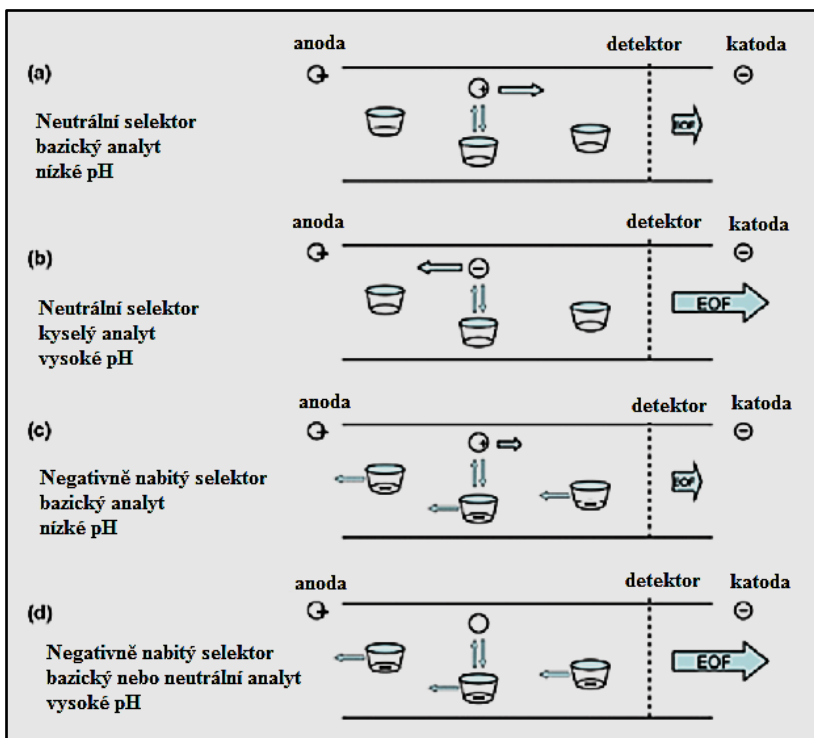
$$\Delta\mu = \mu_{eff}^R + \mu_{eff}^S = \frac{\mu_f + \mu_{cplx}^R \cdot K_R \cdot [C]}{1 + K_R \cdot [C]} - \frac{\mu_f + \mu_{cplx}^S \cdot K_S \cdot [C]}{1 + K_S \cdot [C]} \quad (13)$$

μ_{eff}^R a μ_{eff}^S efektivní mobility enantiomerů

μ_{cplx}^R a μ_{cplx}^S mobility komplexů

[C].....koncentrace cyklodextrinu¹⁹

S ohledem na náboj analytů a CD můžeme v CE aplikovat různé separační módy. Jednotlivé případy jsou znázorněny na (Obr. 6)¹⁹.



Obr. 6 Různé separační mechanismy v CE¹⁹

Při separaci zásaditých sloučenin v pufru o nízkém pH dochází k protonizaci analytu, který migruje k detektoru na katodickém konci kapiláry. Při použití nenabitých selektorů nemá selektor vlastní mobilitu a je transportován k detektoru EOF, který je však při nízkém pH zanedbatelný. Proto enantiomer, který je silněji vázán k selektoru, migruje jako druhý. Při separaci kyselých sloučenin můžeme použít pufr o vysokém pH, při němž získá analyt záporný náboj a migruje směrem k anodickému konci kapiláry. Naproti tomu nenabitý selektor je unášen silným EOF ke katodě. Proto enantiomer, který je silněji vázán k selektoru, migruje jako první¹⁹.

Nabité selektory jsou více univerzální, protože mají vlastní mobilitu a umožňují dobře separovat neutrální molekuly. V podmínkách kyselého pH negativně nabitě selektory migrují k anodě, zatímco pozitivně nabitě zásadité molekuly migrují směrem ke katodě. V případě silnější vazby mezi enantiomerem a selektorem migruje analyt jako druhý. V podmínkách zásaditého pH migrují záporně nabitě selektory k anodě, zatímco zásadité nebo neutrální molekuly jsou nenabité a migrují ke katodě. Proto enantiomery se slabší vazbou k selektoru migrují jako první¹⁹.

2.5 Chirální selektory

2.5.1 Klasifikace chirálních selektorů

Chirální selektory (CS) rozdělujeme podle jednotlivých kritérií do skupin.

Podle původu: Přírodní selektory, mezi něž řadíme cyklodextriny, makrocyklická antibiotika a proteiny. Semisyntetické, které zahrnují derivatizované cyklodextriny, deriváty polysacharidů a modifikovaná makrocyklická antibiotika a syntetické, kam patří chirální polyethery a methakrylátové polymery²⁰.

Podle velikosti selektoru: Makrocykly, polymery a malé molekuly²⁰.

Podle typu převládající interakce mezi selektorem a analytem: Hydrofobní nebo polární interakce, π - π interakce (doprovázené vodíkovou vazbou a stericou repulzí), inkluze²⁰.

2.5.2 Přehled jednotlivých chirálních selektorů

Cyklodextriny: Jsou to produkty enzymatické degradace škrobu glukosyltransferázami bakterií *Bacillus macerans*. Jsou to cyklické oligosacharidy složené z 6 a více D-glukopyranosových jednotek spojených alfa-1,4 vazbami. (Např. β -cyklodextrin, γ -cyklodextrin, α -cyklodextrin a jejich deriváty)¹⁶.

Antibiotika: Jsou to makrocyklické sloučeniny mající několik stereoselektivních center. (Např. Vankomycin (separace karboxylových kyselin), Teikoplanin, Ristocein, Rifamycin, Boromycin...)¹⁶.

Crown ethery: Mechanismus separace spočívá v interakci vodíků primární aminoskupiny s kyslíky polyetherového kruhu pomocí vodíkových vazeb. (Např. Crownethertetrakarboxylová kyselina – CETK (separace chirálních primárních aminů))¹⁶.

Komplexy přechodných kovů s chirálními ligandy: Využívají pro separaci tvorbu ternárních diastereoismerních komplexů¹⁶.

Žlučové kyseliny: Chovají se jako tenzidy a mají schopnost tvořit micely. Jsou vhodné k separaci pouze omezeného počtu látek s planární strukturou. (Např. kyselina cholová)¹⁶.

Proteiny: Obsahují velké množství stereoselektivních center. (Např. Hovězí sérový Albumin)¹⁶.

2.6 Cyklodextriny

První zmínka o CD byla publikována v roce 1891, kdy Villiers popsal izolaci krystalické látky ze škrobu natráveného bakteriemi *Bacillus amylobacter*. Následně Schardinger dokázal, že použitím teplotně odolných bakterií *Bacillus macerans* lze získat dvě složky, lišící se výslednou barvou jodového testu. Cyklická molekulární struktura CD a jejich molekulové hmotnosti byly prokázány a stanoveny koncem třicátých let dvacátého století²¹.

CD jsou cyklické oligosacharidy složené z 6, 7 a 8 glukopyranosových jednotek spojených α -1,4-glykosidickou vazbou. Nejvíce zastoupeným CD je α -CD, barví se jodem do modra resp. zelena a složený z 6 glukosových kruhů. Dalším zástupcem je β -CD, poskytující s jodem nahnědlý produkt a složený ze 7 glukosových kruhů. O něco později objevený γ -CD obsahuje 8 glukosových kruhů. CD s menším počtem kruhů než 6 enzymaticky nevznikají kvůli velkému pnutí. Nicméně byl synteticky připraven „pre- α -cyklodextrin“ s 5 glukosovými jednotkami. Rovněž existují i CD s větším počtem glukosových jednotek než 8, ale jejich příprava je obtížná. Proto se nejčastěji používají CD s 6, 7 a 8 glukopyranosovými jednotkami²¹.

Molekuly běžných CD mají tvar komolého kuželu s hydrofilním vnějškem, přičemž na užším okraji jsou primární hydroxylové skupiny (na uhlících 6) a na širším okraji jsou sekundární hydroxylové skupiny (na uhlících 2 a 3). Naopak vnitřní stěna CD je tvořena hydrofobní uhlíkovou páteří z glukopyranosových monomerů, která dává vnitřku CD hydrofobní charakter, a díky tomu jsou CD schopné do této hydrofobní dutiny zachytávat molekuly^{21,22}. Tvar CD i s vyobrazenými hydroxylovými skupinami je na (Obr. 7).

Struktura CD byla studována jak v roztoku, tak v pevné fázi. Glukosové jednotky mají v nativních CD 4C_1 židličkovou konformaci. Pouze v několika případech modifikovaných derivátů CD byla v krystalu zjištěna 1C_4 inverzní konformace²³.

Neutronovou difrakcí bylo zjištěno, že makrocyclus α , β , γ -CD je stabilizován pásem vodíkových vazeb mezi $O2_{(n)}$ kyslíky a $O3_{(n-1)}$ kyslíky hydroxylových skupin sousedních glukosových jednotek. Se vzrůstajícím počtem jednotek se vzdálenost hydroxylových skupin zkracuje a tím roste pevnost vodíkových vazeb²³.

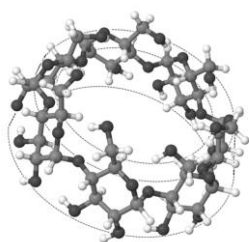
CD jsou látky málo toxické a jsou biologicky degradabilní²³.

Rozměry molekul běžných CD spolu s jejich některými molekulárními a látkovými parametry jsou uvedeny v (Tab. I)²¹.

Přírodní CD a jejich deriváty si můžeme zakoupit u dodavatelů organických chemikálií jako je Sigma Aldrich nebo Fluka. Další dodavatelé jsou CTD Inc. a Cyclolab, který poskytuje rozsáhlou škálu CD a jejich derivátů. Dále můžeme získat CD od firem, které se specializují právě na jeden typ CD. Mezi tyto firmy patří PAC L. P. a CyDex Inc¹⁹.

Tab. I Vybrané vlastnosti běžných cyklodextrinů²¹

| Vlastnosti | Cyklodextrin | | |
|--|--------------|---------|----------|
| | α | β | γ |
| Počet glukosových jednotek | 6 | 7 | 8 |
| Molekulová hmotnost | 973 | 1135 | 1297 |
| Výška molekuly, nm | 0,78 | 0,78 | 0,78 |
| Vnější průměr, strana sekundárních hydroxylů, nm | 1,37 | 1,53 | 1,69 |
| Vnitřní průměr, strana sekundárních hydroxylů, nm | 0,57 | 0,68 | 0,95 |
| Vnější průměr, strana primárních hydroxylů, nm | 1,32 | 1,49 | 1,61 |
| Vnitřní průměr, strana primárních hydroxylů, nm | 0,45 | 0,61 | 0,77 |
| Objem kavity, nm ³ | 0,174 | 0,262 | 0,427 |
| Specifický objem kavit, ml g ⁻¹ | 0,10 | 0,14 | 0,20 |
| Rozpustnost ve vodě 25 °C, g (100 ml ⁻¹) | 14,5 | 1,85 | 8,19 |



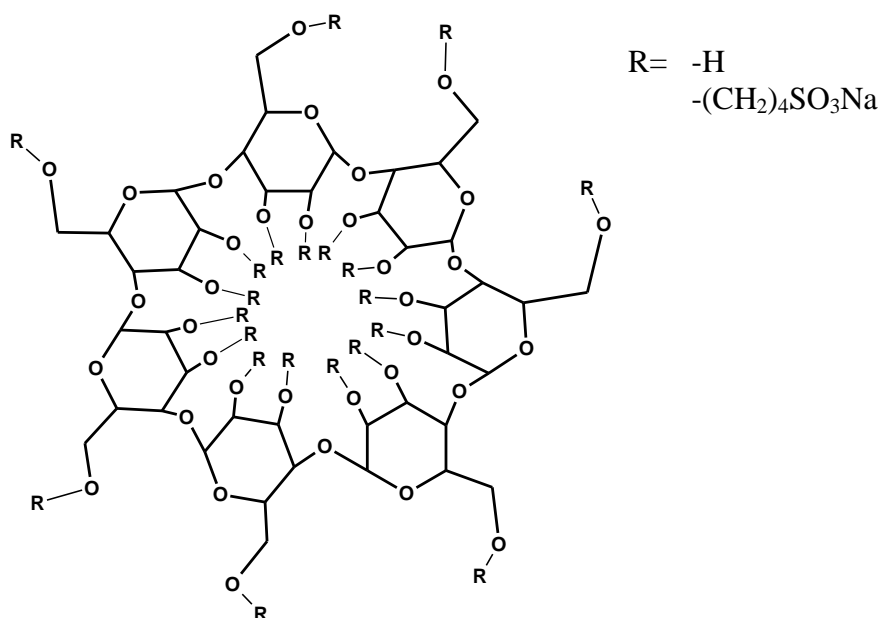
Obr. 7 Struktura β -CD s naznačenou aproximací dutým komolým kuželem²¹

CD se dostává značného využití v oblasti farmacie, potravinářství a kosmetiky. Možné je také jejich prozatím hypotetické využití v oblasti supramolekulární chemie a nanotechnologií²¹.

2.6.1 Derivatizované cyklodextriny

Chemickou derivatizací (modifikací) CD můžeme měnit jejich fyzikálně-chemické vlastnosti a zvyšovat jejich rozpustnost ve vodě a v organických rozpouštědlech, což je pro analytika výhodné. Při syntéze modifikovaných CD se téměř vždy vychází z nativního CD, který podléhá elektrofilním substitučním reakcím na kyslíku hydroxylové skupiny s řadou alkylačních a acylačních činidel za vzniku etherů, resp. esterů²³. Chemické reakce na CD makrocyklu mohou být klasifikovány z hlediska reaktivního místa na glukosové jednotce (např. substituce hydroxylové skupiny v poloze C6) nebo vzhledem k počtu modifikovaných jednotek (substituce provedená na jedné nebo více glukosových jednotkách)²³. Derivatizované CD mohou být nenabitě (např. hydroxypropyl- α -CD), negativně nabitě (např. karboxymethyl- β -CD) nebo pozitivně nabitě (např. 6-amino- β -CD)²⁴.

2.6.1.1 Sodná sůl sulfobutylovaného β -cyklodextrinu



Obr. 8 Struktura SB- β -CD

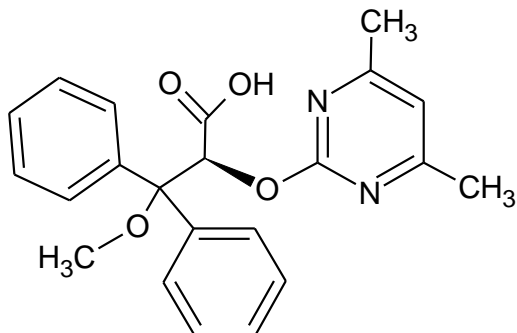
Sodná sůl sulfobutylovaného β -cyklodextrinu (SB- β -CD) patří do skupiny aniontových derivatizovaných CD. Molekulový vzorec této látky je $C_{42}H_{70-n}O_{35} \cdot (C_4H_8O_3SNa)_n$

a molekulární hmotnost tohoto CD činí $1135,0 + n \cdot (158,2)$. Index n odpovídá počtu substituovaných jednotek. V CD nemusí být substituované všechny OH skupiny, počet substituovaných jednotek je variabilní, a proto se uvádí průměrná hodnota molekulární hmotnosti²⁴.

SB- β -CD je bílý prášek, jehož rozpustnost ve vodě je větší než $50\text{g} \cdot 100\text{cm}^{-3}$ rozpouštědla. Je též rozpustný jak v methanolu, tak v acetonu a rozpustnost v těchto rozpouštědlech je menší než $5\text{g} \cdot 100\text{cm}^{-3}$ rozpouštědla. Tyto rozpustnosti byly stanoveny při teplotě $25\text{ }^\circ\text{C}$. Vzorek CD může obsahovat i nečistoty např. reziduální β -CD nebo sodnou sůl 4-hydroxybutan-1-sulfonové kyseliny. Jeden z dodavatelů této chemikálie je firma Cyclolab²⁴.

2.7 Ambrisentan

Systematický název ambrisentanu je (2S)-2-[(4,6-Dimethyl-2-pyrimidinyl)oxy]-3-methoxy-3,3-diphenylpropanová kyselina. Jeho sumární vzorec je $\text{C}_{22}\text{H}_{22}\text{N}_2\text{O}_4$. Aktivní forma ambrisentanu je S a jeho relativní molekulová hmotnost činí $378,2\text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$. Chemická struktura této látky je zobrazena na (Obr. 9)^{25, 26}.



Obr. 9 Chemická struktura S-ambrisentanu

Ambrisentan je chirální léčivo používané k léčbě pulmonální arteriální hypertenze (PAH). PAH je progresivně oslabující onemocnění, při němž dochází ke zvyšování pulmonálního arteriálního tlaku. Sekundárně dochází k vazokonstrikci (zúžení cév), hypertrofii (zbytnění) a přestavbě cévního systému plic. PAH způsobuje závažné poškození funkce plic se špatnou prognózou a s průměrnou délkou života 2,8 let u neléčených pacientů. Úmrtí je u pacientů trpících touto chorobou způsobeno ze 47 % pravostranným srdečním

selháním a z 26 % náhlou srdeční smrtí. Mezi symptomy PAH patří dušnost při námaze, která se postupně objevuje i v klidu. Další příznaky jsou vyčerpanost, slabost, synkopa (krátkodobá ztráta vědomí) a anginózní bolest na hrudi²⁷.

Jaká vlastnost dává ambrisentanu jeho léčivé účinky při terapii PAH? Ambrisentan je antagonist endoteliálního receptoru typu A (ET_A). V lidském organismu jsou tři typy endotelinů, endotelin 1, 2, 3 a každý z nich se skládá z 21 aminokyselin. Převažující formou v lidském organismu je endotelin 1. Endotelin 1 se vyznačuje vasokonstrikčním, proliferačním a hypertrofickým účinkem. U pacientů s PAH byla objevena vyšší hladina právě tohoto typu endotelinu. Endotelin se může vázat na dva různé receptory na ET_A nebo ET_B , které mají rozdílnou funkci. V plicích převažuje ET_A receptor, který zprostředkovává vasokonstrikční, proliferační a hypertrofické účinky endotelinu 1. Terapie je proto zaměřena na blokování receptoru ET_A pro endotelin 1 ambrisentanem²⁷.

2.7.1 Separace ambrisentanu

Zatím bylo léčivo ambrisentan separováno jen metodou vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC). Při metodě HPLC bylo použito šest kolon s obrácenými fázemi systému. Nejlepšího výsledku s rozlišením více než 2,5 bylo dosaženo při použití kolony Chiralcel OZ-3R (celulóza 3-chlor-4-methylphenylcarbamate). Jako mobilní fáze byla použita směs $20 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ formiátu sodného (pH 3,0) s acetonitrilem (55:45, v/v). Výhodou této metody je velmi rychlá separace (méně než 6 min). Proto se tato metoda používá pro rutinní stanovení *R*-ambrisentanu ve farmaceuticky aktivním *S*-ambrisentanu²⁸.

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Přístrojové vybavení

Kapilární elektroforéza HP 3D Agilent vybavená UV-Vis detektorem diodového pole (*Agilent Technologies*), pH metr (*inoLab*), magnetická míchačka (*Thermo electron corporation*), značkovač (*MicroSolv*), ultrazvuk (*Bandelin Sonorec digitec*), minitřepačka (*Merci*), analytické váhy (*Mettler toledo*).

3.2 Chemikálie

R,S-ambrisentan od firmy *Zentiva*, Cyklodextriny: sulfatovaný- γ -CD (*S- γ -CD*), sulfobutylovaný- β -CD (*SB- β -CD*), fosfatovaný- γ -CD (*P- γ -CD*), γ -CD, heptakis (6-Amino-6-Deoxy)- β -CD heptachlorid (heptakis (6-A-6-D)- β -CD) dodané firmou *Cyclolab*, sulfatovaný- β -CD (*S- β -CD*), sulfatovaný- α -CD (*S- α -CD*), karboxymetylovaný- β -CD (*CM- β -CD*), 2-hydroxypropylovaný- γ -CD (*HP- γ -CD*), 2-hydroxypropylovaný- β -CD (*HP- β -CD*), 6-O- α -Maltosyl- β -CD dodané firmou *Sigma-Aldrich*. Kyselina octová, kyselina fosforečná, hydroxid sodný, kyselina boritá dodané firmou *Sigma Aldrich*. Kyselina mravenčí od firmy *Fluka*, methanol od firmy *Penta*. Deionizovaná voda byla získána pomocí systému na úpravu vody *Simplicity (Millipore)*. Všechny látky jsou čistoty p. a.

3.3 Experimentální podmínky

Všechna měření byla prováděna na kapilární elektroforéze HP 3D Agilent v nepokryté křemenné kapiláře (vnitřní průměr 50 μ m) o celkové délce 48,5 cm s efektivní délkou 40 cm (*MicroSolv Technology Eaton town, NJ, USA*). Kapilára byla vždy termostatována na teplotu 20 °C. Výjimkou byla optimalizace teploty, kdy byla kapilára postupně termostatována na teploty v rozmezí od 10 do 50 °C. Dále bylo na kapiláru vkládáno napětí ± 20 kV, podle požadavku analýzy. Výjimkou byla optimalizace napětí, kdy bylo na kapiláru postupně vkládáno napětí od -15 do -30 kV. Vzorek byl dávkován do kapiláry tlakem 50 mbar po dobu

10 sekund. Výjimkou byla optimalizace doby dávkování, kdy byl vzorek dávkován do kapiláry různou dobu od 5 do 60 sekund.

Na začátku každého pracovního dne byla kapilára promývána 15 minut $0,1 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ NaOH a 10 minut deionizovanou H_2O . Před každým měřením byla kapilára promývána 2 minuty $0,1 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ NaOH, 2 minuty deionizovanou H_2O a 3 minuty pufrům.

Jako detektor byl používán UV-Vis detektor s diodovým polem a detekční vlnové délky byly nastaveny na 200 a 260 nm.

3.4 Příprava vzorku ambrisentanu

Na analytických vahách byl navážen 1 mg *R*-isomeru a 1 mg *S*-isomeru do 1,5 ml ependorfeček. Dále byl do každé ependorfečky odpipetován 1 ml methanolu. Aby se látky v methanolu dobře rozpustily, byly ependorfečky promíchány na minitřepačce a dané na 5 minut do ultrazvuku. Poté bylo odpipetováno 100 μl *R*- a 100 μl *S*- do 1,5 ml ependorfečky a k nim bylo přidáno 800 μl deionizované vody. Tím byl připraven zásobní roztok o koncentraci $0,1 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ *R,S*-ambrisentanu, který byl následně uchován při teplotě $-20 \text{ }^\circ\text{C}$. Dále byly roztoky o koncentracích různých od $0,1 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ připraveny postupným ředěním deionizovanou vodou.

3.5 Příprava roztoků pufrů

Pro přípravu $50 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ fosfátu sodného pH 2,5 bylo odměřeno vypočtené množství kyseliny fosforečné do 100 ml odměrné baňky a doplněno deionizovanou vodou po rysku. Dále byl získán pufr potřebného pH titrací nasyceným roztokem NaOH. Pro přípravu $50 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ borátu sodného pH 9,0 bylo naváženo vypočtené množství kyseliny borité a rozpuštěno v deionizované vodě. Roztok byl kvantitativně převeden do 100 ml odměrné baňky a doplněn deionizovanou vodou po rysku. Dále bylo získáno potřebné pH pufru titrací nasyceným roztokem NaOH. Stejný postup byl aplikován i pro přípravu octanového a formiátového pufru příslušného pH. Ve výše připravených pufrách bylo vždy rozpuštěno vypočtené množství cyklodextrinu podle jeho požadované koncentrace.

4 VÝSLEDKY A DISKUZE

4.1 Chirální separace *R,S*-ambrisentanu

Nejprve byly provedeny separace enantiomerů ambrisentanu pomocí jednotlivých cyklodextrinů ve fosfátu sodném o pH 2,5 a v borátu sodném o pH 9,0. Koncentrace CD v pufru byla 2,0 % a standardní roztok ambrisentanu měl koncentraci 0,01 mg·ml⁻¹. Nejlepší výsledky byly získány při použití SB-β-CD, pro něž se dále studoval vliv koncentrace CD, složení pufru, teploty, napětí a doby dávkování vzorku na chirální separaci.

4.1.1 Volba cyklodextrinu

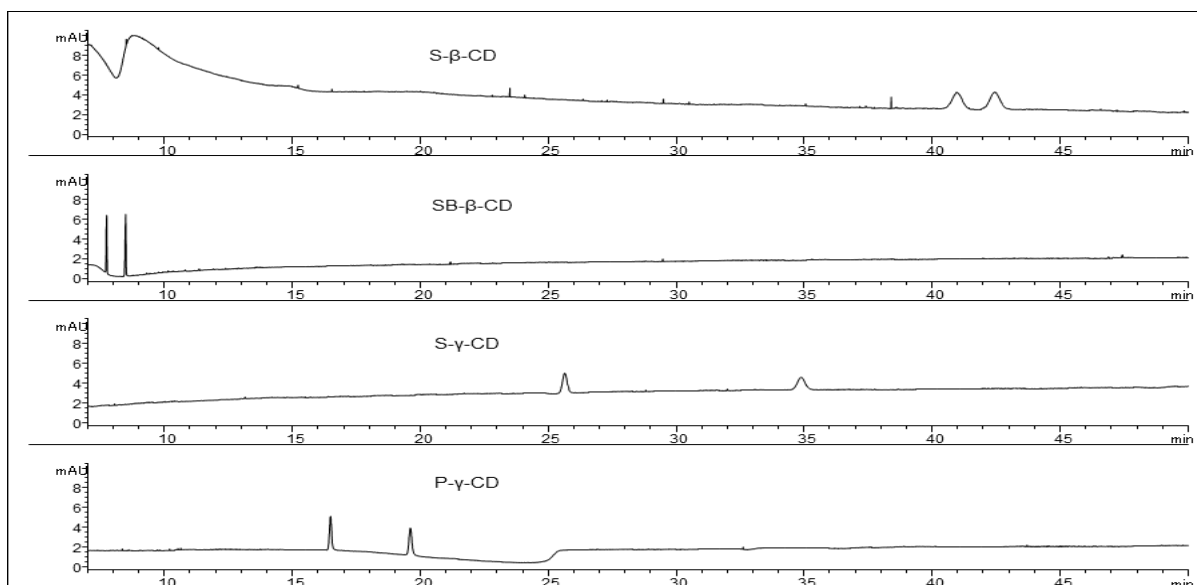
Tab. II Separace ambrisentanu v 50 mmol·l⁻¹ fosfátu sodném pH 2,5

| cyklodextrin | rozlišení | počet teoretických pater | migrační čas [min] |
|--------------|-----------|--------------------------|--------------------|
| S-γ-CD | 22,1 | 89803 | 25,0 |
| | | 62548 | 36,9 |
| SB-β-CD | 12,6 | 325524 | 7,8 |
| | | 305471 | 8,6 |
| S-β-CD | 2,3 | 48203 | 41,6 |
| | | 59197 | 43,4 |
| P-γ-CD | 15,1 | 177123 | 16,5 |
| | | 148760 | 19,5 |

Studovanými pufrů při volbě vhodného CD byly 50 mmol·l⁻¹ fosfát sodný (pH 2,5) a 50 mmol·l⁻¹ borát sodný (pH 9,0). Výsledky získané při použití fosfátu sodného jsou prezentovány v (Tab. II), všechny z uvedených selektorů jsou záporně nabitě. Ostatní studované CD, pro něž byla testována jejich schopnost chirální separace v tomto pufru, neposkytovaly za použitých experimentálních podmínek chirální separaci ambrisentanu. Mezi tyto CD patří Maltosyl-β-CD, γ-CD, S-α-CD, CM-β-CD, HP-γ-CD, HP-β-CD, Heptakis (6-A-6-D)-β-CD. Dále pro chirální separaci v borátu sodném byly použity stejné CD, jako při chirální separaci ve fosfátu sodném. Při tomto pH však nebyla žádná chirální separace úspěšná.

Z (Obr. 10) je patrné, že nejlepší tvar, výška píků a nejkratší dobu analýzy má SB-β-CD. Z (Tab. II) je také patrné, že píky získané při separaci využívající SB-β-CD

mají největší počet teoretických pater a rozlišení 12,6, které je v porovnání s hodnotou 1,5, která postačuje pro úspěšnou chirální separaci, vynikající. Proto byl vybrán SB- β -CD pro další optimalizaci.



Obr. 10 Elektroferogramy chirální separace ambrisentanu v $50 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ fosfátu sodném pH 2,5

4.1.2 Složení pufru

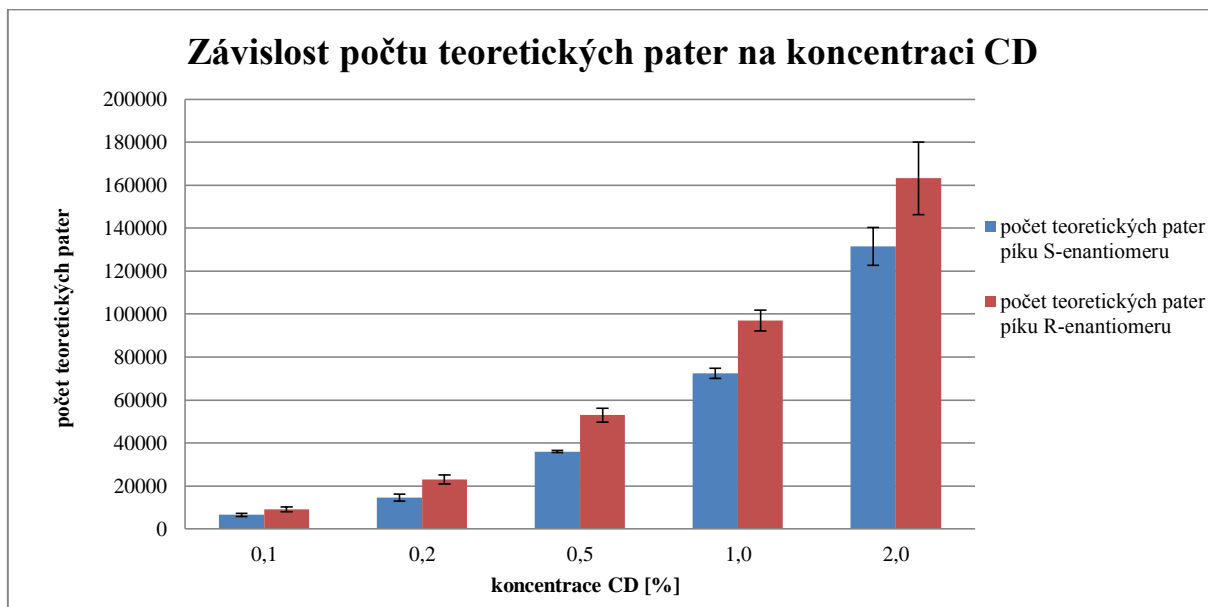
4.1.2.1 Vliv koncentrace SB- β -CD

Jako další krok po volbě vhodného CD následovala volba koncentrace CD. Byly testovány koncentrace od 0,1 do 2,0 % CD v $50 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ fosfátu sodném pH 2,5.

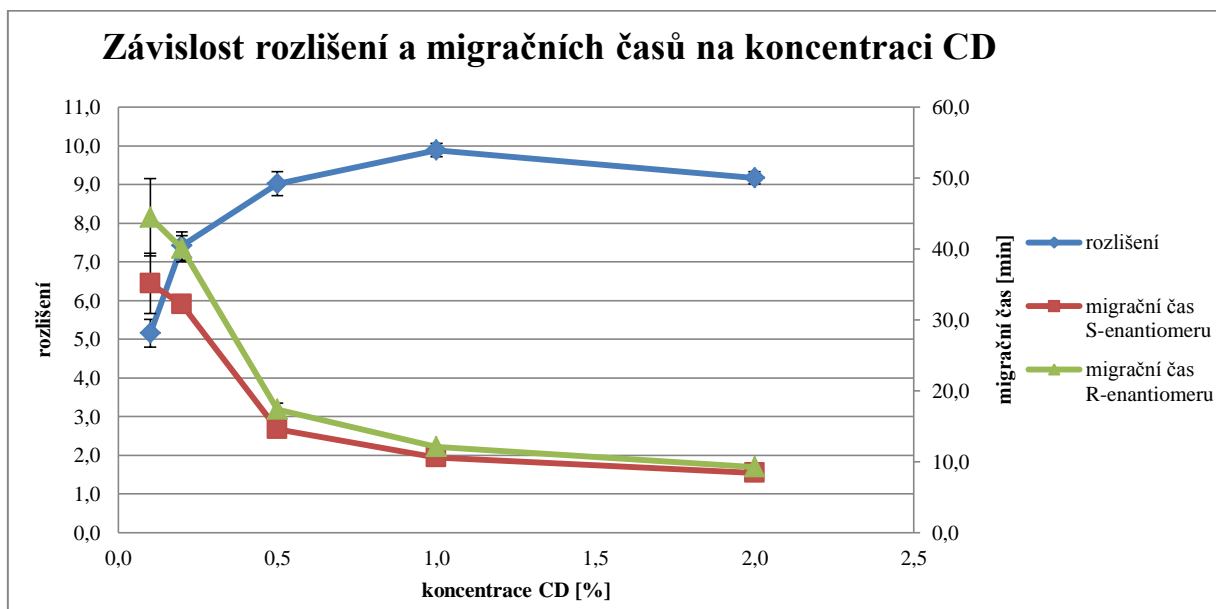
Při všech měřeních bylo aplikováno napětí -20 kV, protože CD při pH 2,5 díky malému EOF vede analyt opačným směrem než je normální polarita. Při napětí 20 kV nebyl u nízkých koncentrací pozorován žádný pík, a tím bylo potvrzeno, že už koncentrace 0,1 % je dostačující k tomu, aby převažoval pohyb analytu ve směru od katody k anodě.

Z (Obr. 11 a 12) je patrné, že nejlepší rozlišení a největší počet teoretických pater píků separované látky poskytují koncentrace 1,0 a 2,0 %. Při analýzách však musíme brát ohled i na ekonomickou stránku a pro tyto dvě koncentrace by bylo zbytečně spotřebováno velké

množství CD. Proto nám stačí koncentrace 0,5 %, která má také dobré rozlišení a poměrně krátkou dobu analýzy do 15 minut oproti nižším koncentracím.

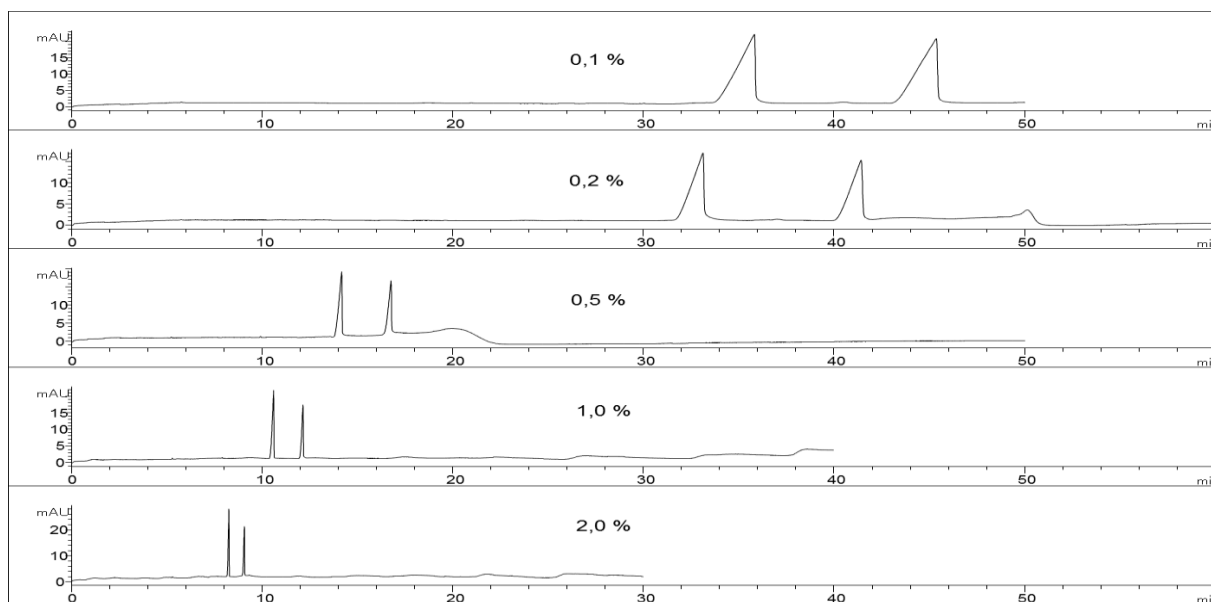


Obr. 11 Závislost počtu teoretických pater píků chirální separace ambrisentanu na koncentraci SB- β -CD



Obr. 12 Závislost rozlišení a migračních časů chirální separace ambrisentanu na koncentraci SB- β -CD

Na (Obr. 13) je vidět, že s rostoucí koncentrací CD se zlepšují tvary píků, nedochází totiž k tak velkému rozmývání zóny vzorku. Také s rostoucí koncentrací CD klesá doba analýzy. Je to z toho důvodu, že při nízké koncentraci CD, který má (-) náboj a jde v opačném směru než samotný (+) nabitý analyt, je při nízké koncentraci CD analyt schopen více odolávat pohybu ve směru od katody k anodě. Pro další měření byla zvolena koncentrace CD 0,5%.

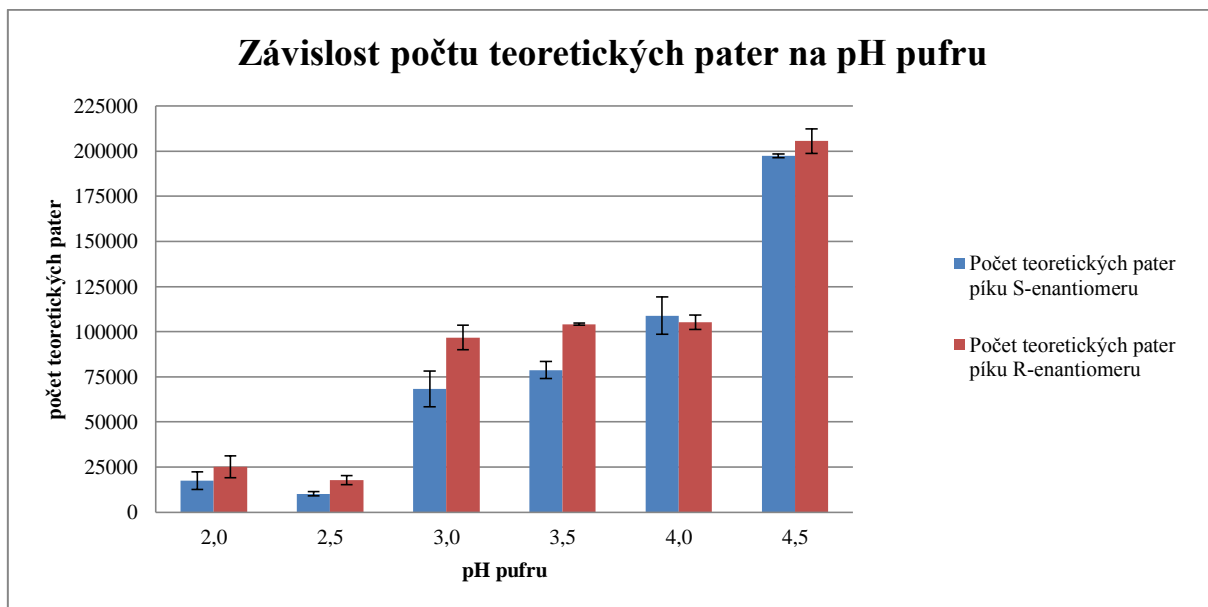


Obr. 13 Elektroferogramy chirální separace ambrisentanu pro různé koncentrace SB-β-CD

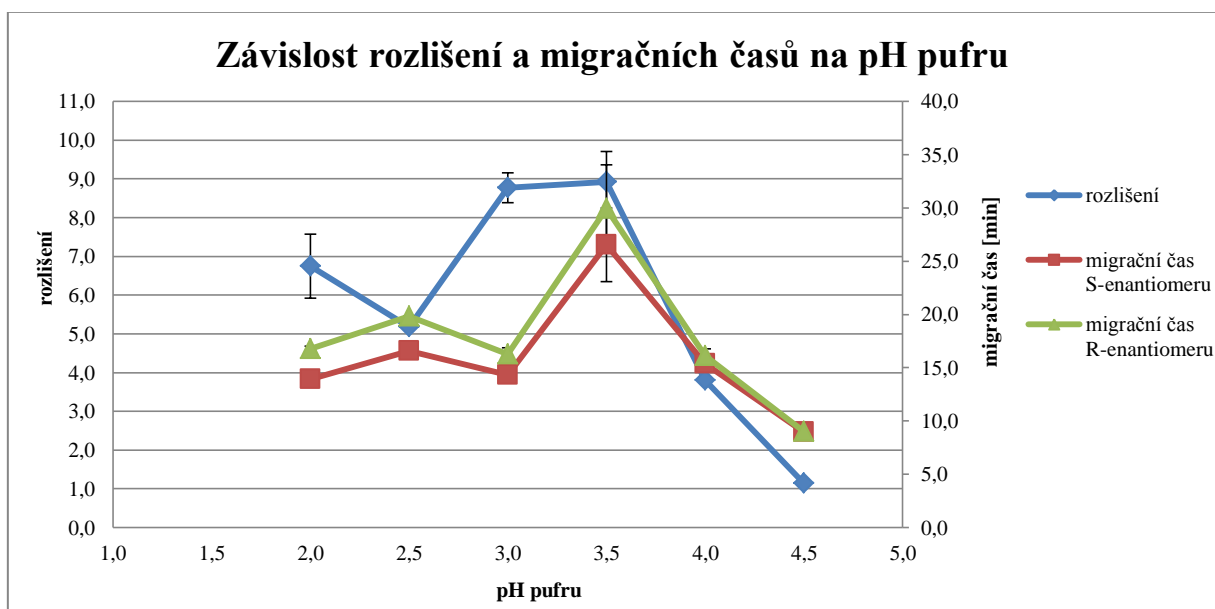
4.1.2.2 Vliv pH pufru

Při optimalizaci pH pufru se postupně měnilo pH v rozmezí od 2,0 do 4,5. Vyšší pH pufru nebylo analyzováno, protože už při pH 4,5 došlo ke snížení rozlišení píků.

Při optimalizaci pH byly analýzy prováděny za napětí -20 kV pro pH 2,0-3,5 a 20 kV pro pH 4,0 a 4,5. Tyto rozdílné polarilty se volily z toho důvodu, že od pH 4,0 je už EOF dostačující k tomu, aby převážil pohyb analytu od anody ke katodě, a proto se může volit normální polarita.



Obr. 14 Závislost počtu teoretických pater píků chirální separace ambrisentanu na pH pufru



Obr. 15 Závislost migračních časů a rozlišení chirální separace ambrisentanu na pH pufru

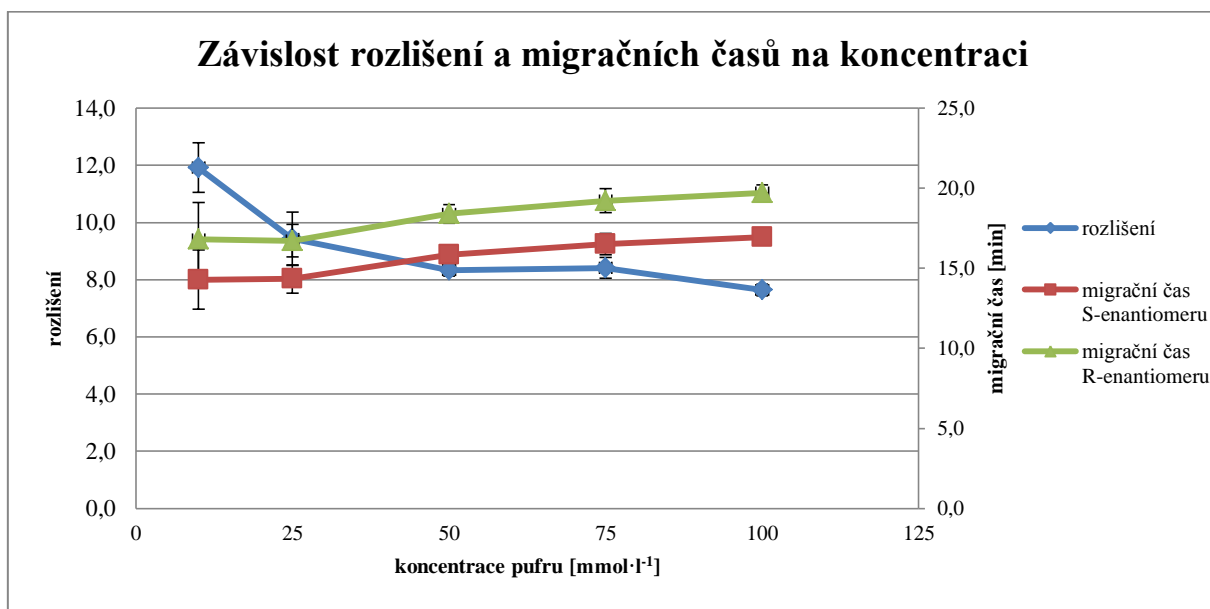
Z (Obr. 14) a (Obr. 15) je patrné, že změna počtu teoretických pater, migračních časů a rozlišení píků chirální separace ambrisentanu nemá žádnou pravidelnou závislost (žádný parametr se nemění pravidelně se zvyšujícím se pH). Největšího rozlišení píků je dosaženo při pH 3,5. Zároveň je však při tomto pH nejdelší doba analýzy. Druhého největšího rozlišení je

dosazeno při pH 3,0. Při tomto pH je i poměrně krátká doba analýzy kolem 15 minut a proto byl pro další měření vybrán pufr o pH 3,0.

4.1.2.3 Vliv koncentrace pufru

Poté, co byl vybrán pufr o pH 3,0, bylo vyzkoušeno, jak se budou měnit parametry jako je rozlišení, počet teoretických pater a migrační časy pro různé typy pufrů. Byly připraveny octanový, formiátový a fosfátový pufr o daném pH a s ohledem na požadované parametry byl vybrán fosfátový pufr, který měl nejnižší migrační časy a nejlepší tvary píků.

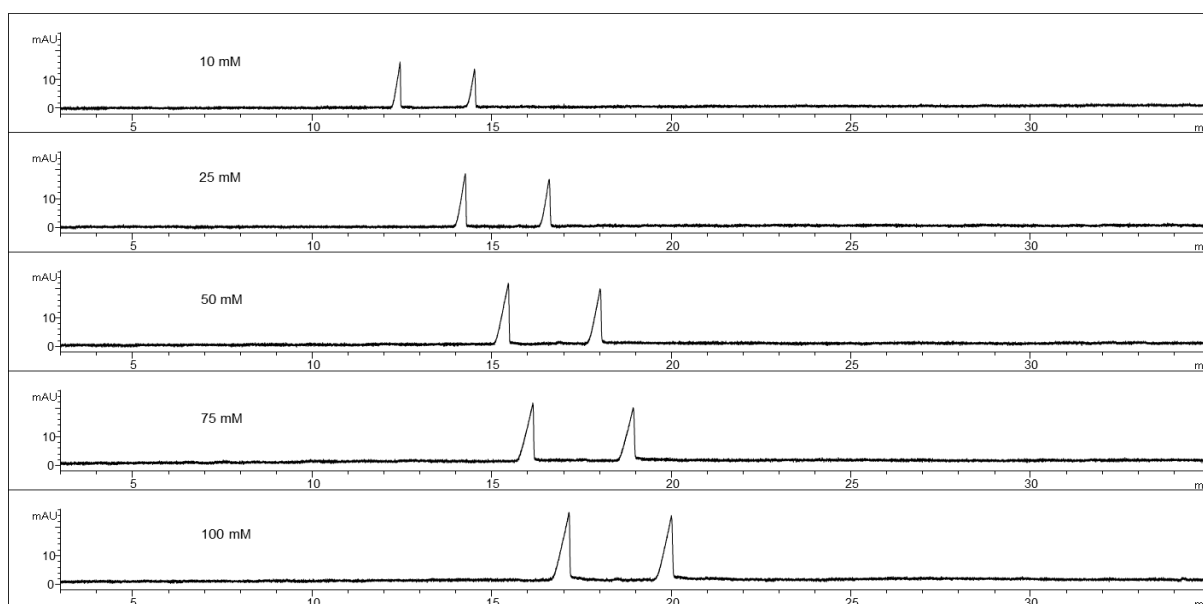
Poté, co byl zvolený jako vhodný pufr fosfát sodný o pH 3,0, byla provedena volba jeho koncentrace. Byly připraveny pufrы v rozmezí koncentrací od 10 do 100 mmol·l⁻¹ postupným ředěním, které byly následně analyzovány.



Obr. 16 Závislost migračních časů a rozlišení chirální separace ambrisentanu na koncentraci pufru

Z (Obr. 16) je patrné, že doba analýzy se při zvyšující koncentraci prodlužuje, což je patrné i z (Obr. 17). Rostoucí dobu analýzy může způsobovat fakt, že se zvyšující se koncentrací pufru získává analyt větší kladný náboj a více se brání putování ve směru

od – k + po navázání na záporně nabitý cyklodextrin. Z (Obr. 16) je také patrné, že rozlišení píků se s rostoucí koncentrací pufru snižuje. Výjimkou v této klesající závislosti je koncentrace $75 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$, při níž je rozlišení píků nepatrně vyšší než při koncentraci $50 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$. Pro další měření se jevil jako vhodný pufr o koncentraci $50 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$, který sice nemá nejlepší rozlišení ani migrační časy, ale má malé odchylky od středních hodnot pro tyto parametry. Pufry o koncentraci 10 a $25 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ mají sice hodnoty migračních časů a rozlišení lepší, ale naopak mají pro tyto parametry velké odchylky. Navíc má pufr o koncentraci $50 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ lepší výšku a tvar píků než nižší koncentrace.



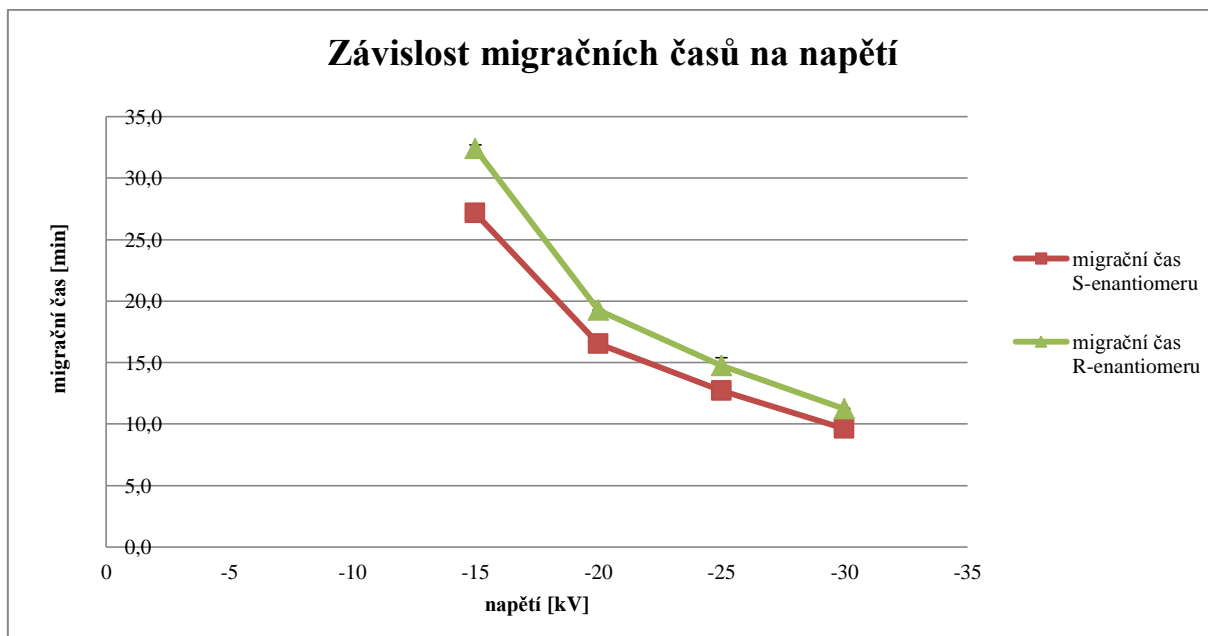
Obr. 17 Elektroferogramy chirální separace ambrisentanu pro různé koncentrace pufru

Pufr pro separaci ambrisentanu byl zvolený $50 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ fosfát sodný pH 3,0.

4.1.3 Podmínky měření

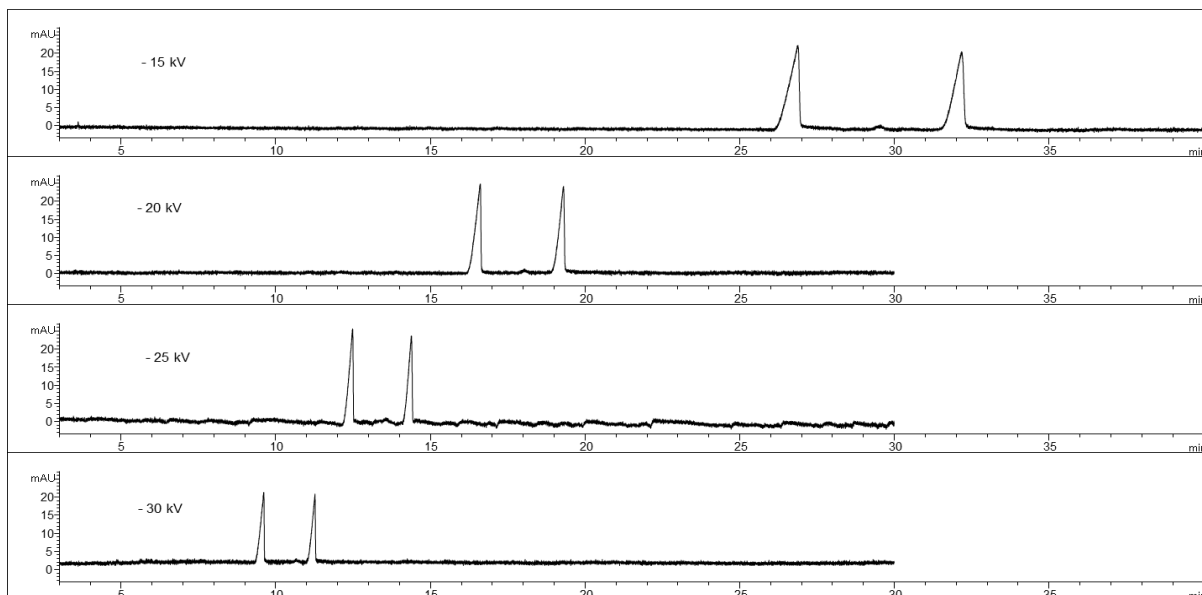
4.1.3.1 Vliv napětí na separaci

Po volbě složení pufru, byla dalším krokem volba velikosti vkládaného napětí. Napětí bylo vkládáno v rozmezí od -15 kV do -30 kV.



Obr. 18 Závislost migračních časů chirální separace ambrisentanu na vkládaném napětí

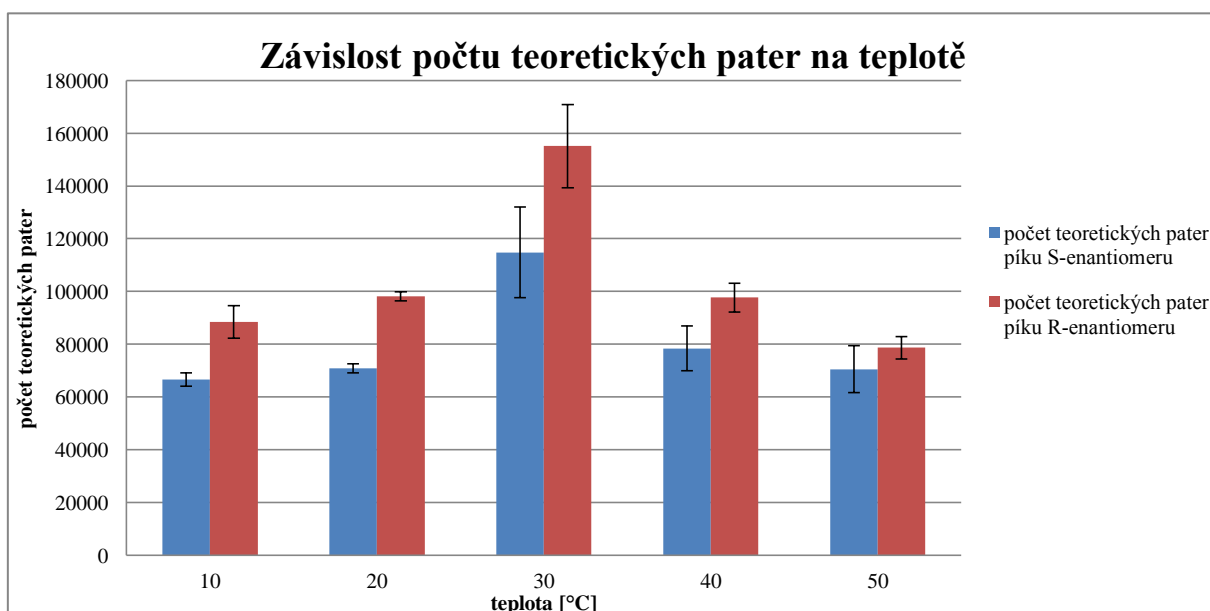
Z (Obr. 18 a 19) je patrné, že se zvyšujícím se napětím klesá doba analýzy. Z (Obr. 19) je také patrné, že se zvyšujícím se vkládaným napětím se zmenšuje rozlišení píků. Protože je obecně požadován co nejnižší čas analýzy, přicházejí v úvahu hodnoty napětí -30 a -25 kV. Dále byla posuzována vhodnost obou napětí podle procházejícího proudu, který pro -25 kV činil $-48 \mu\text{A}$ a pro -30 kV $-61 \mu\text{A}$, z tohoto hlediska bylo nakonec vybráno jako vhodnější napětí -25 kV, protože vyšší proud pro -30 kV by pro další optimalizovaný parametr (teplotu), mohl způsobovat problémy ve formě většího Jouleova tepla a většího rozmývání zóny vzorku.



Obr. 19 Elektroferogramy chirální separace ambrisentanu pro různá napětí

4.1.3.2 Vliv teploty na separaci

Jako další parametr byla optimalizovaná teplota. Kapilára byla postupně termostatována v rozmezí teplot od 10 do 50 °C.

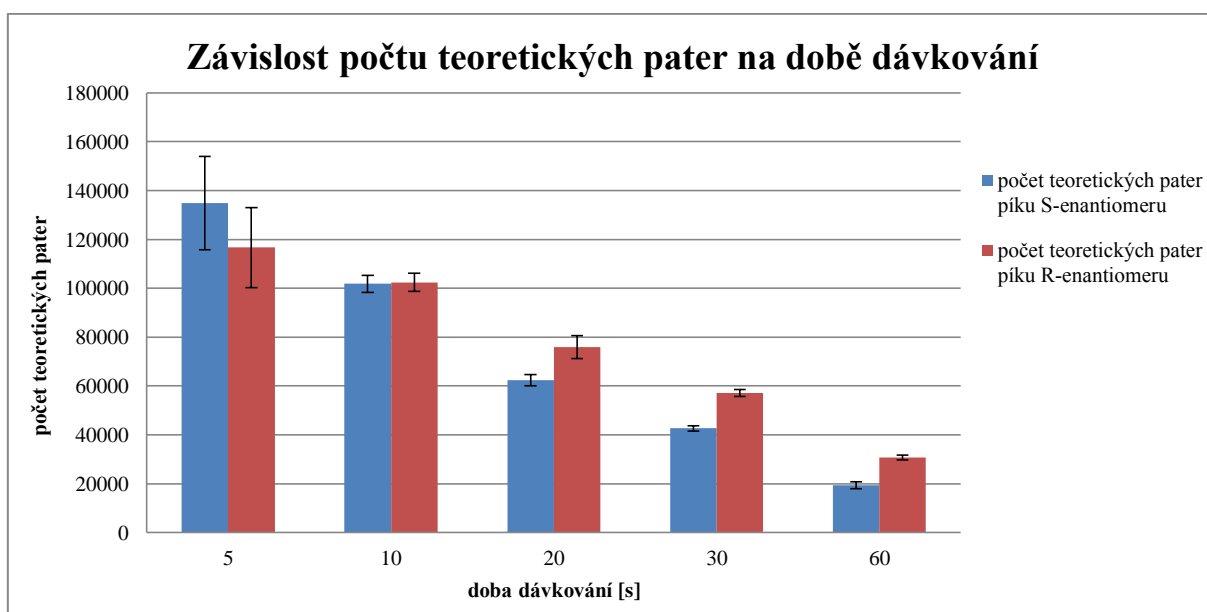


Obr. 20 Závislost počtu teoretických pater píků chirální separace ambrisentanu na teplotě

Z (Obr. 20) je patrné, že největší počet teoretických pater píků separované látky je při teplotě 30 °C, ale zároveň se zde vyskytují i největší odchylky od středních hodnot, zatímco teplota 20 °C má tyto odchylky nejmenší a píky mají také poměrně velký počet teoretických pater. Proto se tato teplota jevila jako nejvhodnější. Výběr této teploty podporovalo také vysoké rozlišení 11,2 a poměrně krátké migrační časy 13,4 pro *S*-isomer a 15,6 minut pro *R*-isomer.

4.1.3.3 Vliv doby dávkování vzorku

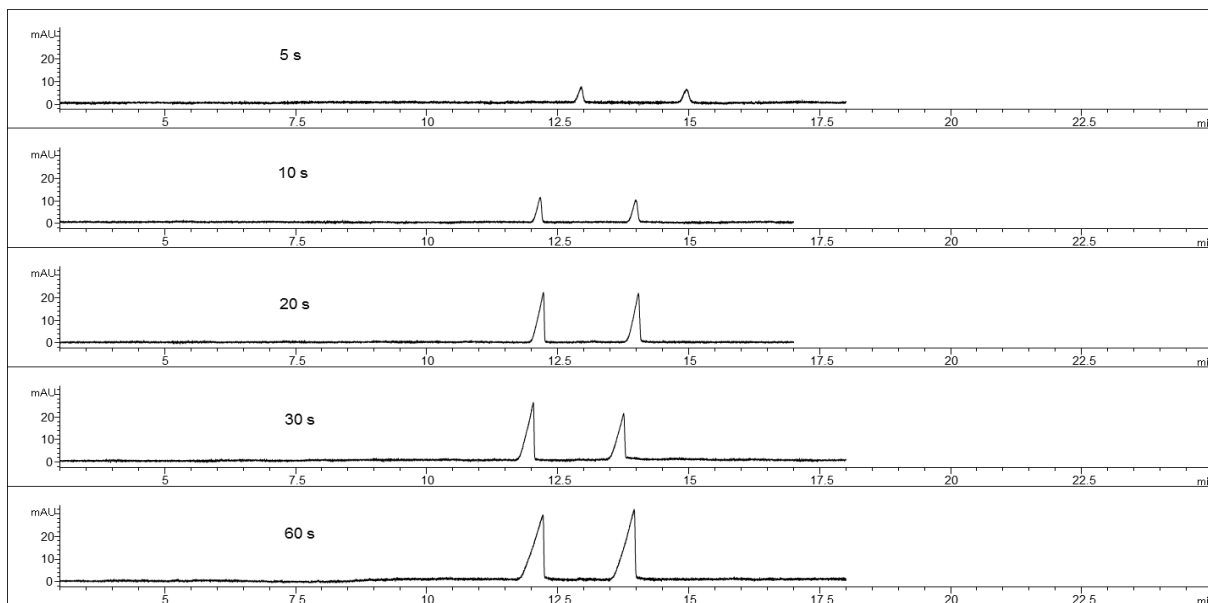
Jako další parametr byla optimalizovaná doba dávkování vzorku. Vzorek byl postupně dávkován po dobu 5, 10, 20, 30 a 60 s při tlaku 50 mbar.



Obr. 21 Závislost počtu teoretických pater píků chirální separace ambrisentanu na době dávkování

Z (Obr. 21) je patrné, že s rostoucí dobou dávkování klesá počet teoretických pater píků separované látky. Dále je z (Obr. 22) patrná změna výšky a tvaru píku s rostoucí dobou dávkování. S rostoucí dobou dávkování roste výška píku. Dochází však i k většímu rozmývání zóny vzorku, což je nežádoucí, protože rozmývání vede k většímu odchýlení tvaru píku od ideálního tvaru. V našem případě dochází postupně k čím dál většímu zhoršení tvaru píku. Z obrázku je také patrné, že doba dávkování vzorku neovlivňuje migrační čas analytu.

Proto byla vybrána jako vhodná doba dávkování 10 sekund, u níž není přítomné tak velké rozmývání zóny vzorku a píky mají dostačující výšku.



Obr. 22 Elektroferogramy chirální separace ambrisentanu s měnící se dobou dávkování vzorku

4.1.4 Analytické parametry stanovení *R,S*-ambrisentanu

Linearita metody byla studována v rozmezí koncentrací 0,0005-0,075 mg·ml⁻¹, každá koncentrace byla proměřena 5x. Pro kalibrační závislost se může používat buď závislost plochy anebo korigované plochy na koncentraci. Korigovaná plocha je plocha dělená migračním časem. Mezi důležité parametry stanovení *R,S*-ambrisentanu řadíme LOD a LOQ. LOD byl vypočítán z šumu a LOQ je 3,3 násobkem LOD.

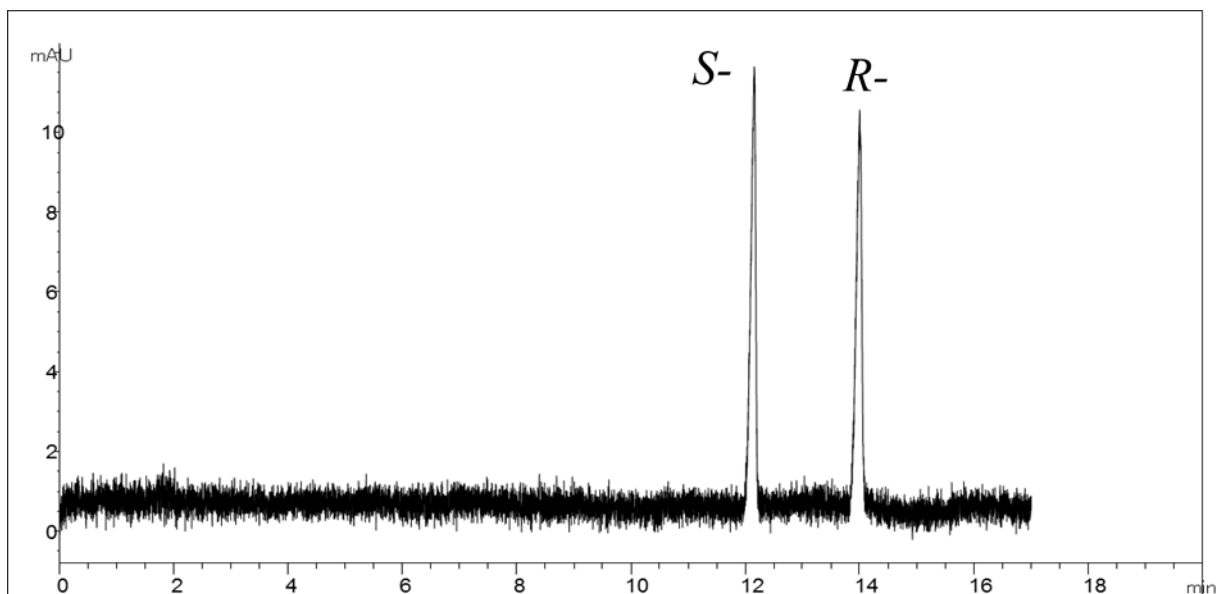
Limit detekce: 0,0005 mg·ml⁻¹

Limit kvantifikace: 0,0165 mg·ml⁻¹

Tab. III Parametry *R,S*-ambrisentanu

| Enantiomer | Opakovatelnost ploch píků [%] | Opakovatelnost migračních časů [%] | Rovnice regrese | R ² |
|-----------------------|-------------------------------|------------------------------------|------------------------|----------------|
| <i>S</i> -ambrisentan | 3,3 | 2,7 | $y = 726,32x - 8,2611$ | 0,9984 |
| <i>R</i> -ambrisentan | 4,0 | 2,9 | $y = 1074x - 8,5067$ | 0,9922 |

Na (Obr. 23) je znázorněna chirální separace ambrisentanu pomocí vyvinuté metody. Finální parametry metody jsou shrnuty v tabulce (Tab. IV).



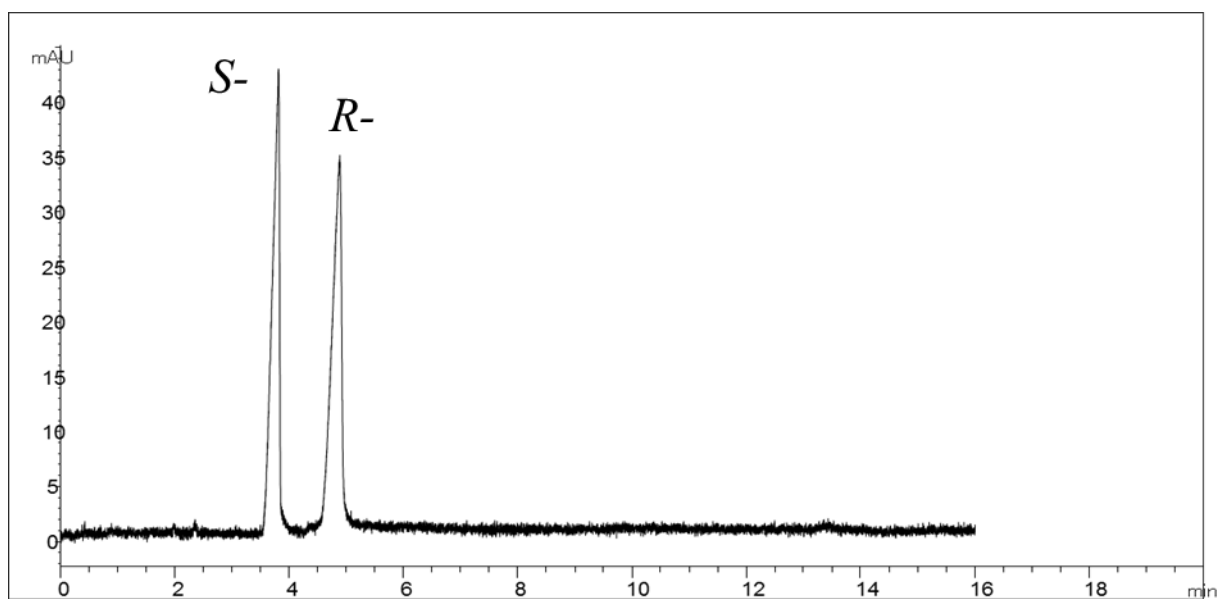
Obr. 23 Elektroferogram chirální separace ambrisentanu

Tab. IV Parametry vyvinuté metody

| PARAMETR | HODNOTA |
|-----------------------------------|--|
| Délka kapiláry/efektivní délka | 48,5 cm/40,0 cm |
| I. D. kapiláry | 50 μm |
| Dávkování vzorku | 50 mbar x 10s |
| Napětí | -25 kV |
| Teplota | 20 $^{\circ}\text{C}$ |
| Promývání kapiláry mezi analýzami | 2 min 0,1 mol \cdot l $^{-1}$ NaOH 2 min H $_2$ O 3 min pufrem |
| Složení pufru | 50 mmol \cdot l $^{-1}$ fosfát sodná pH 3,0 |

Poslední etapou experimentální části bylo vyzkoušení, zda-li můžeme provést chirální separaci zkoumané látky z „krátkého konce“ kapiláry, kdy efektivní délka kapiláry k detektoru je 8,5 cm. Jak je patrné z (Obr. 24), analýza byla úspěšná. Využití kratší délky

kapiláry vedlo k zrychlení separace pod 6 minut, ačkoliv bylo dosaženo menšího rozlišení píků kolem 4,2.



Obr. 24 Elektroferogram chirální separace ambrisentanu z krátkého konce kapiláry

5 ZÁVĚR

Bakalářská práce se prvotně zabývá výběrem vhodného cyklodextrinu pro chirální separaci ambrisentanu. Po volbě SB- β -CD jako selektoru, byl dále zkoumán vliv různého složení pufru, různé koncentrace CD a vliv parametrů jako je teplota, napětí a doba dávkování na chirální separaci. V 50 mmol·l⁻¹ fosfátu sodném o pH 3,0 s koncentrací SB- β -CD 0,5 % se podařilo dosáhnout doby analýzy pod 19 minut a rozlišení kolem 8,5. Změnou vkládaného napětí z -20 kV na -25 kV se podařilo zkrátit dobu analýzy pod 15 minut. Bylo také vyzkoušeno, jak se změní chirální separace ambrisentanu, když je vzorek dávkován z krátkého konce kapiláry. Při tomto uspořádání došlo ke zkrácení doby analýzy pod 6 minut a ke snížení rozlišení píků na 4,2. V porovnání s metodou HPLC bylo dosaženo lepšího rozlišení píků *R*- a *S*-enantiomerů ambrisentanu, které při HPLC bylo kolem 2,5 a při CE kolem 8,5. Při použití dávkování vzorku z „krátkého konce“ kapiláry bylo také dosaženo srovnatelné doby analýzy kolem 6 minut. Nebylo však dosaženo srovnatelného limitu detekce, který byl pro HPLC 0,06 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ a pro CE byl 0,5 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. Pro dosažení lepšího limitu detekce můžeme použít řadu prekoncentračních technik, které vedou k zakoncentrování vzorku v kapiláře. Nakonec je důležité zmínit, že v CE migroval jako první *S*-enantiomer a druhý *R*-enantiomer a u HPLC tomu bylo naopak.

6 LITERATURA

1. Li S. F. Y.: *Capillary Electrophoresis: Principles, Practise and Applications*, Elsevier, Amsterdam 1993.
2. Pazourek J.: *Modernírní elektroforetické analytické metody*, <http://faf.vfu.cz/pub-files/ustavy/ustav-chemicky-leciv/vyuka-predmetu/analyticka-chemie-i-ii/separacni-metody---elektroforeza.pdf>, staženo 15. listopadu 2013.
3. Petr J., Maier V., Horáková J., Tesařová E., Ševčík J.: *Chem. Listy* 99, 190 (2005).
4. Bureš J.: *Folia gastroenterol. hepatol.* 5, 33 (2007).
5. Gűbitz G., Schmid M. G.: *Biopharm. Drug Dispos.* 22, 291 (2001).
6. Plaček L.: *CHEMagazin* 2, 11 (2011).
7. Kašička V.: *Chem. Listy* 91, 320 (1997).
8. Klouda P.: *Moderní analytické metody*, Pavko, Ostrava 2003.
9. Glatz Z.: *Kapilární elektromigrační metody*, <http://orion.sci.muni.cz/virtuallab/dokumenty/pdf/CZE.pdf>, staženo 21. dubna 2014.
10. Lauer H. H., Rozing G. P.: *High Performance Capillary Electrophoresis*, Agilent Technologies, Germany 2009/2010.
11. Chankvetadze B.: *Capillary Electrophoresis in Chiral Analysis*, John Wiley and Sons, New York 1997.
12. Jállová V.: *Diplomová práce*. Masarykova Univerzita, Brno 2006.
13. Gaš B.: *Vesmir* 80, 370 (2001).
14. Polčík M.: *Vesmir* 83, 703 (2004).

15. Hovorková I.: *Chirální látky v prostředí - dvě tváře téže látky*,
<http://www.chempoint.cz/chiralni-latky-v-prostredi>, staženo 15. prosince 2013.
16. *Chirální separace v CE*, <http://ach.upol.cz/user-files/intranet/aet2-1268581674.pdf>,
staženo 1. března 2014.
17. Literák J.: *Prostorové uspořádání molekul organických sloučenin*,
<http://vibuch.math.muni.cz/upload/zadani/2010/1-3-A2.pdf>, staženo 19. března 2014.
18. Mitra S., Chopra P.: *Indian J. Anaesth.* 55, 556 (2011).
19. Scriba G. K. E., Altria K.: *LC·GC Eur.* 22, 420+ (2009).
20. Bosáková Z.: *Chirální separace v kapalinové chromatografii*,
<http://www.vscht.cz/anl/paci/PAC/prezentace/Bosakova.pdf>, staženo 1. března 2014.
21. Horský J., Jindřich J.: *Chem. Listy* 107, 769 (2013).
22. Kurkov S. V., Loftsson T.: *Int. J. Pharm.* 453, 167 (2013).
23. Kraus T.: *Cyklodextriny*, http://www.uochb.cas.cz/Zpravy/PostGrad2004/8_Kraus.pdf,
staženo 3. března 2014.
24. Specifikace produktu: sulfobutylovaný- β -CD,
<http://www.cyclolab.hu/products/cy20412/tis.pdf>, staženo 1. března 2014.
25. CSID: 5293690, <http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.5293690.html>, staženo
21. listopadu 2013.
26. Struktura ambrisentanu, chemicalize.org a ChemAxon, <http://www.chemaxon.com>,
staženo 21. listopadu 2013.
27. Elshaboury S. M., Anderson J. R.: *Patient Prefer. Adher.* 7, 401 (2013).
28. Dousa M., Gibala P.: *J. Sep. Sci.* 35, 798 (2012).

7 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ

| | |
|---------------------------------|--|
| CD | cyklodextrin |
| CE | kapilární elektroforéza |
| CEC | kapilární elektrochromatografie |
| CETK | crownehtertetrakarboxylová kyselina |
| CGE | kapilární gelová elektroforéza |
| CIEF | kapilární izoelektrická fokusace |
| CITP | kapilární izotachoforéza |
| CM- β -CD | karboxymetylovaný- β -CD |
| CS | chirální selektory |
| CZE | kapilární zónové elektroforéza |
| el. | elektrický |
| EOF | elektroosmotický tok |
| ET _A | endoteliální receptor typu A |
| GC | plynová chromatografie |
| Heptakis (6-A-6-D)- β -CD | heptakis (6-Amino-6-Deoxy)- β -CD heptachlorid |
| HPLC | vysokoúčinná kapalinová chromatografie |
| HP- β -CD | 2-hydroxypropylovaný- γ -CD |
| HP- γ -CD | 2-hydroxypropylovaný- γ -CD |
| I. D. | vnitřní průměr |
| LOD | limit detekce |
| LOQ | limit kvantifikace |
| MEKC | micelární elektrokinetická chromatografie |
| MS | hmotnostní spektrometrie |
| N | počet teoretických pater |
| např. | například |
| PAH | pulmonální arteriální hypertenze |
| P- γ -CD | fosfátovaný- γ -CD |
| resp. | respektive |
| R _s | rozlišení |

| | |
|-------------------------|---------------------------------------|
| SB- β -CD | sulfobutylovaný- β -CD |
| SFC | superkritická fluidní chromatografie |
| S- α -CD | sulfatovaný- γ -CD |
| S- β -CD | sulfatovaný- β -CD |
| S- γ -CD | sulfatovaný- γ - CD |
| TLC | tenkovrstvá chromatografie |
| UV, Vis | ultrafialové (ultraviolet), viditelné |
| α, β, γ | alfa, beta, gama |