

Analýza optické čistoty vybraných léčiv pomocí HPLC
– inovace úloh praktických cvičení z předmětů:
organická chemie, farmaceutická chemie, analytická
chemie nebo analýza léčiv

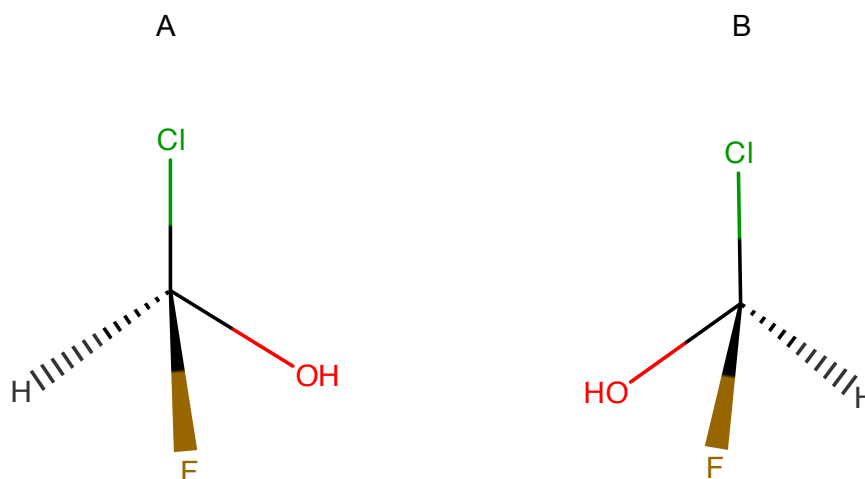
Lucie Brunclíková
Ing. Pavel Bobál, CSc.

BRNO 2015

Teoretická část

1. Úvod do studia stereochemie

Při studiu chemických látek narážíme na problematiku izomerie, tedy na situaci, kdy sumární vzorec dvou a více molekul je stejný, ale jejich uspořádání se liší. Zvláštním příkladem izomerie je stereoizomerie, kdy se molekuly od sebe navzájem liší svým uspořádáním v trojrozměrném prostoru. Uvedme si jednoduchý příklad. Na obrázku 1 vidíme molekulu se čtyřmi různými funkčními skupinami. Mohlo by se zdát, že jde o totožné molekuly. Chlór s hydroxylovou skupinou jsou v rovině, fluor je před rovinou a vodík je za rovinou. Budeme-li však otáčet s molekulou B, nikdy nedostaneme obraz molekuly A a obráceně.

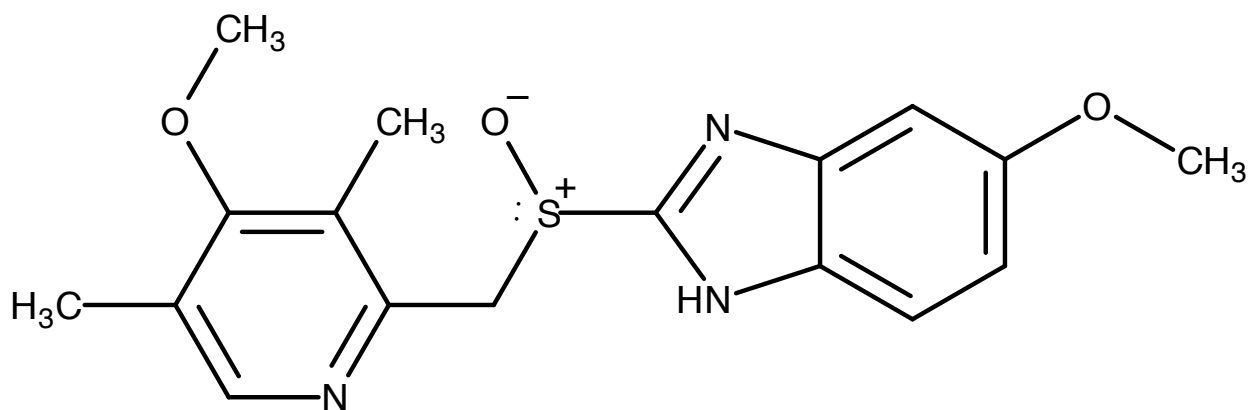


Obr. 1: Zrcadlové obrazy sloučeniny

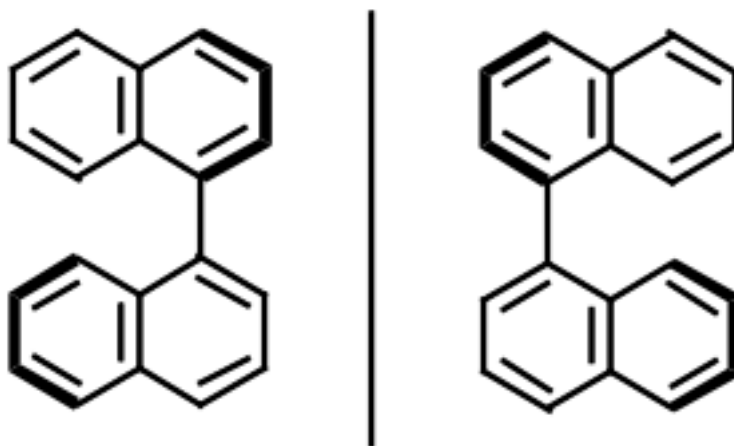
Molekuly, jež jsou svými zrcadlovými obrazy, se nazývají **chirální**. Tyto izomery můžeme specifikovat jako **enantiomery**. Jedná se obvykle o sloučeniny s centrem chiraloty. Ty jsou nejčastěji tvořené asymetrickým tetraedrickým uhlíkovým atomem. Aby byla zachována podmínka chiraloty, musí atom uhlíku obsahovat čtyři různé funkční skupiny. Chirální však nemusí být pouze atom uhlíku. Asi nejnámějším příkladem neuhlíkových enantiomerů mezi léčivy jsou prazoly (omeprazol, pantoprazol, lansoprazol a další), skupina inhibitorů protonové pumpy. Chirální centrum prazolů tvoří atom síry. Na první pohled se omeprazol nejeví jako chirální vzhledem k přítomnosti dvojně vazby síra - kyslík. Je třeba si však uvědomit, že k atomu síry náleží ještě volný elektronový pár, který dává síře tetraedrický tvar (sp^3 - hybridizace). Chirální může být i fosfor nebo dusík.

Chirální nemusí být pouze molekuly, na kterých se vyskytuje chirální atom, ale i molekuly s osou symetrie. Například 2,2'-substituované bifenoly nebo binaftyly (Obr. 3).

Enantiomery mají stejné chemické a fyzikální vlastnosti kromě schopnosti stáčet rovinu polarizovaného světla vpravo (+) nebo vlevo (-). Jejich biologické vlastnosti jsou však odlišné. Tomuto tématu se budeme věnovat dále.



Obr. 2: Struktura omeprazolu s vyznačeným volným elektronovým párem

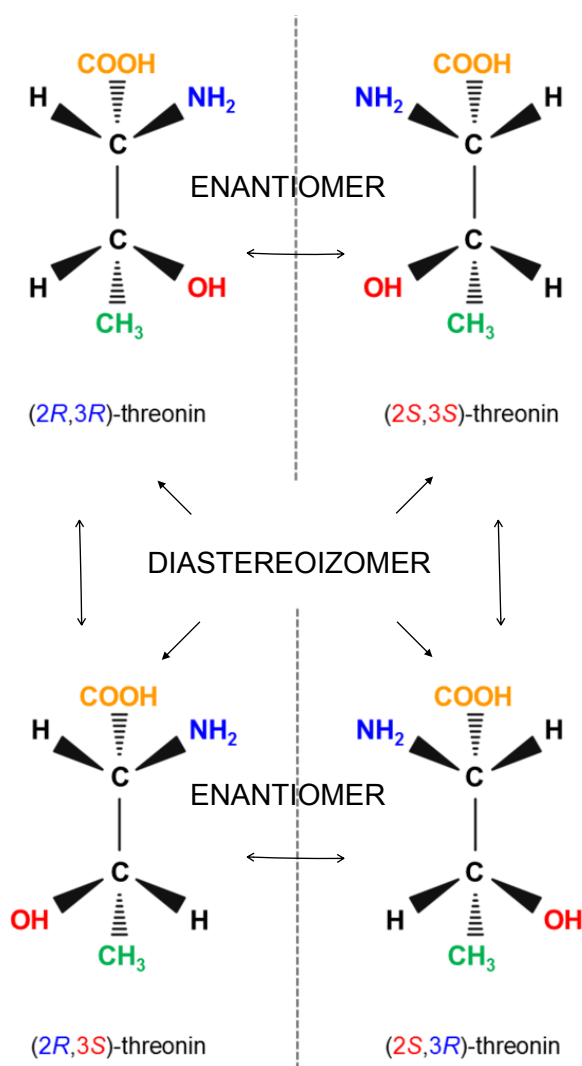


Obr. 3: Chirální binaftyly (vazba mezi naftaleny je stéricky bráněna a není schopna rotace)

K označení uspořádání atomů chirálního centra (konfigurace) nám slouží písmena *R* (z lat. rectus) a *S* (z lat. sinister). Určení konfigurace se řídí Cahlovým-Ingoldovým-Prelogovým pravidlem posloupnosti.

Zatím jsme se zabývali pouze případem, kdy se na molekule vyskytuje pouze jedno stereogenní centrum, a tedy existuje pouze *R* a *S* enantiomer. Představme si však molekuly, kde se vyskytují dva nebo více chirálních atomů. Má-li molekula dvě stereogenní centra, existují pak čtyři stereoizomery (platí: 2^n kde n je počet stereogenních center). Tak je tomu například u threoninu (viz. Obr. 4).

Izomery 2*R*, 3*R*, a 2*S*, 3*S* jsou zrcadlovými obrazy, enantiomery. Stejně je tomu u izomerů 2*R*, 3*S* a 2*S*, 3*R*. Avšak vztah například mezi izomerem 2*S*, 3*S* a 2*S*, 3*R* není enantiomerní. Jejich konfigurace je na jednom centru opačná a na druhém totožná. Jedná se tedy o **diastereoizomery**. Diastereoizomery nebo také diastereoмеры mají oproti enantiomerům rozdílné fyzikální a chemické vlastnosti. Toho se využívá při dělení enantiomerů. Ekvimolární směs enantiomerů se nazývá racemát (racemická směs). Racemát nestáčí rovinu polarizovaného světla, jelikož jsou v něm obě formy, jak pravotočivá, tak levotočivá, zastoupeny stejnou měrou. Racemáty se chovají jako chemicky čisté látky a běžnými laboratorními metodami nelze jednotlivé enantiomery oddělit.



Obr. 4: Vzájemný vztah izomerů threoninu

2. Chiralita a léčiva

Důvod velkého zájmu o chiralitu chemických látek tkví v tom, že mnohá léčiva jsou efektivnější, pokud léčivou látkou není racemická směs, ale jen jeden z enantiomerů. Prostředí, ve kterém žijeme, které nás zformovalo, je plné chirálních látek. Je tedy pochopitelné, že i živé organismy vykazují jistou selektivitu k chirálním látkám. Skvělým příkladem je rozdílná vůně levotočivé a pravotočivé formy karvonu (chirálního monoterpenu). Levotočivá forma je sekundárním metabolitem *Mentha piperita*, zatímco pravotočivá forma je demonstrována rostlinou *Carum carvi*. Lidské receptory dokáží přesně odlišit rozdílnou prostorovou orientaci molekuly karvonu a mozek tento rozdíl vyhodnotí jako jinou vůni. Jako farmaceuti se také zabýváme interakcí látek (léčiv) s receptory. Receptor je trojrozměrná struktura a účinek léčiva je tedy závislý na jeho prostorové orientaci. Pokud je jeden z enantiomerů biologicky účinnější než ten druhý, nazývá se **eutomer**. Méně účinný enantiomer pak označujeme jako **distomer**. Musíme si uvědomit, že stereoizomery se nemusí lišit jen tím, že na receptoru vyvolají stejný efekt různé síly. Jeden z enantiomerů nemusí být aktivní vůbec, ba dokonce může působit odlišně nebo na úplně jiném receptoru. Na stereoizomery je třeba nahlížet i z hlediska farmakokinetického jako na látky, které mohou mít různou afinitu k plasmatickým bílkovinám nebo jaterním enzymům. Chiralita léčiva hraje roli ve všech fázích průchodu léčiva organismem (absorpce, distribuce, metabolismus, eliminace) Jeden z enantiomerů může mít žádoucí terapeutický efekt a ten druhý může být toxický. Tabulka níže nabízí stručný přehled účinků enantiomerů známých léčiv. Selektivní podání jednoho z enantiomerů s sebou nese odstranění nežádoucích účinků spjatých s druhým enantiomerem nebo snížení dávky díky vyššímu účinku čistého enantiomeru.

	<i>R</i> - enantiomer	<i>S</i> - enantiomer
ketoprofen		vyšší aktivita
ibuprofen		vyšší aktivita
omeprazol		vyšší aktivita
mianserin	agranulocytóza, hepatotoxicita	netoxický
zopiclon		vyšší aktivita
atenolol		vyšší aktivita
metoprolol		vyšší aktivita
thalidomid	netoxický, ale podléhá inverzi na <i>S</i>	teratogen
naproxen		vyšší aktivita
cetirizin		vyšší aktivita

Tab. 1: Porovnání aktivity enantiomerů léčiv

3. Separace chirálních látek

Z předchozího pojednání o významných rozdílech aktivity enantiomerů léčiv je pochopitelné, že je zájem o jejich analýzu a především o efektivní separaci. Jak již bylo řečeno v úvodu, enantiomery se z fyzikálně-chemického hlediska chovají jako dvě identické látky. K jejich identifikaci nebo případné separaci je potřeba specifických technik. Jednou z těchto technik je i vysokoúčinná kapalinová chromatografie - HPLC. Dělení enantiomerů na HPLC však neprobíhá na standardních kolonách (C18, silikagel), na které jsme zvyklí, a je třeba úprav mobilní nebo stacionární fáze, které vedou k požadovanému výsledku.

Principem separace enantiomerů je tvorba diastereomerů, které, jak již víme, mají odlišné fyzikálně-chemické vlastnosti.

Nepřímé dělení

Podstatou nepřímého dělení enantiomerů nebo-li chirální derivatizace je chemická reakce (tvorba kovalentní nebo iontové vazby) mezi racemickou směsí a opticky čistým enantiomerem - chirálním selektorem. S výhodou se využívá funkčních skupin -OH, -SH, -COOH, -CO-, -NH₂, -NRH. Následně pak vzniknou dva diastereomery, které je možné rozdělit konvenčními separačními metodami na základě jejich rozdílných fyzikálně-chemických vlastností. V případě kapalinové chromatografie lze použít achirální kolonu (silikagel, C18). U této metody je však nutné zohlednit řadu požadavků. K nejdůležitějším patří vysoká enantiomerní čistota derivatizačního činidla. Dále musí reakce proběhnout kvantitativně a nesmí docházet k racemizaci výsledného produktu.

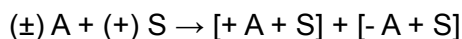


Schéma 1: Vznik diastereomerních produktů reakcí racemátu ($\pm A$) a selektoru ($+ S$)

Přímé dělení

Zatímco při nepřímém dělení lze využít i jiných metody než jen chromatografii (krystalizace), u přímého dělení je třeba pracovat s kapalinovou chromatografií, konkrétně s HPLC. Existují dvě metody přímého dělení. Obě jsou založeny na přítomnosti chirálního selektoru - látky, která krátkodobě interaguje s chirálním analytem. V jednom případě je však chirální selektor přítomen v mobilní fázi a ve druhém případě je přímo navázán na stacionární fázi kapalinové chromatografie. Interakcí chirálního selektoru s enantiomerem vznikají transitní diastereomery.

Chirální aditiva v mobilní fázi

Interakcí chirálního aditiva (selektoru), přítomného v mobilní fázi, s enantiomerem (analytem) vznikají nestabilní diastereomerní komplexy. V systému, kde je přítomen analyt, aditivum, mobilní a stacionární fáze dochází k několika jevům. Za prvé je analyt (racemát) v rovnovážném stavu vůči mobilní a stacionární fázi. Dále dochází ke tvorbě již zmiňovaných komplexů, a to jak s analytem, přítomným v mobilní fázi, tak s analytem, který je zadržován na stacionární fázi. Komplexy enantiomeru A mají jinou retenci než komplexy enantiomeru B a tím dochází k jejich rozdělení v čase. Jako každá metoda, i tato má svoje výhody a nevýhody. Výhodou je dostupnost široké skupiny chirálních selektorů a možnost jejich rychlého střídání. Další výhodou je použití finančně dostupnějších achirálních kolon. Nevýhodami chirálních aditiv může být rozdílná rozpustnost nebo vyšší absorbance mobilní fáze v jejich přítomnosti. Zároveň je třeba zohlednit, že chirální aditivum je vymýváno spolu s mobilní fází a již je nelze znovu použít.

Chirální stacionární fáze

V předchozím případě byl chirální selektor volně rozpuštěn v mobilní fázi a interagoval s celým systémem. V tomto případě je chirální selektor pevně vázán na nosič a tvoří tak chirální stacionární fázi (CSP). Při tvorbě diastereomerních komplexů se uplatňují různé interakce (π - π interakce, vodíkové vazby, interakce polární, dipólové, elektrostatické, komplexace a sterické efekty). Enantiomery jsou podle síly interakce na koloně pozdrženy různou dobu a dochází k jejich separaci.

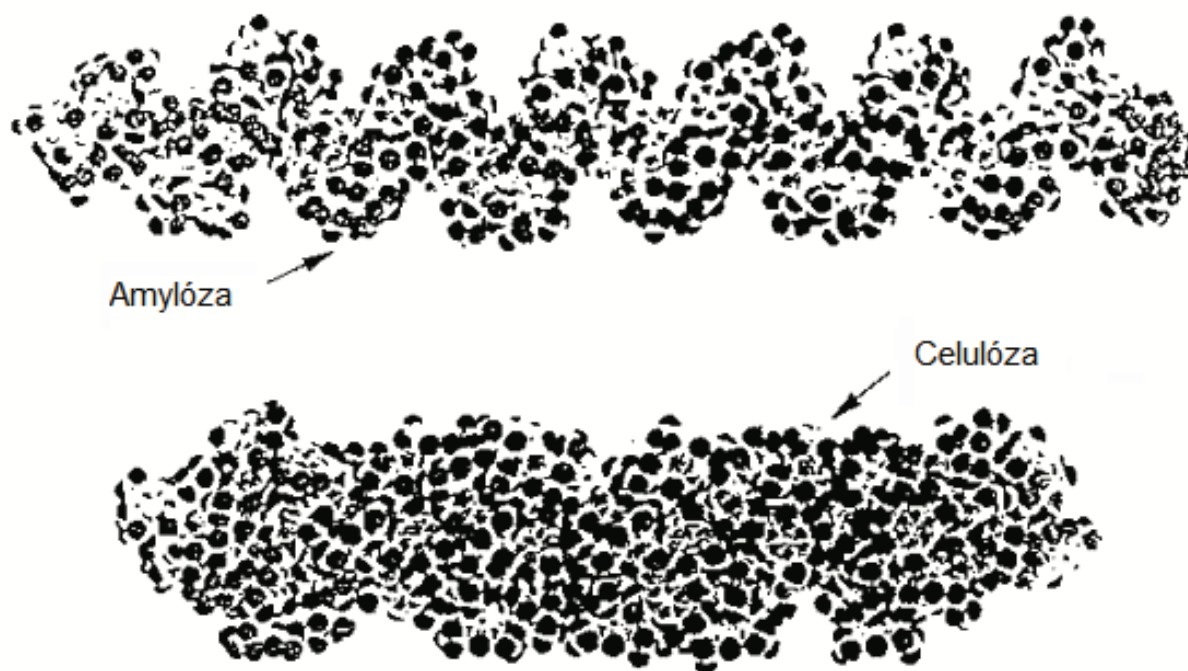
Podle interakcí klasifikujeme několik typů chirálních stacionárních fází. Jelikož však na jedné chirální stacionární fázi dochází k více interakcím, je přehlednější dělení dle původu stacionární fáze (viz. tabulka níže).

Typ fáze/ název fáze	Typ interakce
Polysacharidy	vodíkové vazby, π - π interakce
Antibiotika	vodíkové vazby, π - π interakce, hydrofobní inkluze
Proteiny	vodíkové vazby, π - π interakce, hydrofobní inkluze
Crown - ethery	inkluzní komplexace
Cyklodextriny	inkluzní komplexace
Pirklovy fáze	π - π interakce a další

Tab. 2: Typy chirálních stacionárních fází a jejich hlavní interakce s analytem

Polysacharidové chirální stacionární fáze

Prvními polysacharidovými CSP byly celulóza a amyulóza. Celulóza je polysacharid tvořený molekulami D-glukózy, které jsou spojeny β (1 \rightarrow 4) glykosidickou vazbou, zatímco amyulóza je tvořena jednotkami D-glukózy, které jsou spojeny α (1 \rightarrow 4) glykosidicky. Řetězce celulózy se spolu spojují vodíkovými můstky a dochází tak k tvorbě páskovité konformace, zatímco u amyulózy dochází ke svinutí řetězce a k tvorbě helikálního uspořádání. Tyto sekundární struktury jsou podmíněny uspořádáním β (1 \rightarrow 4) a α (1 \rightarrow 4) vazby.

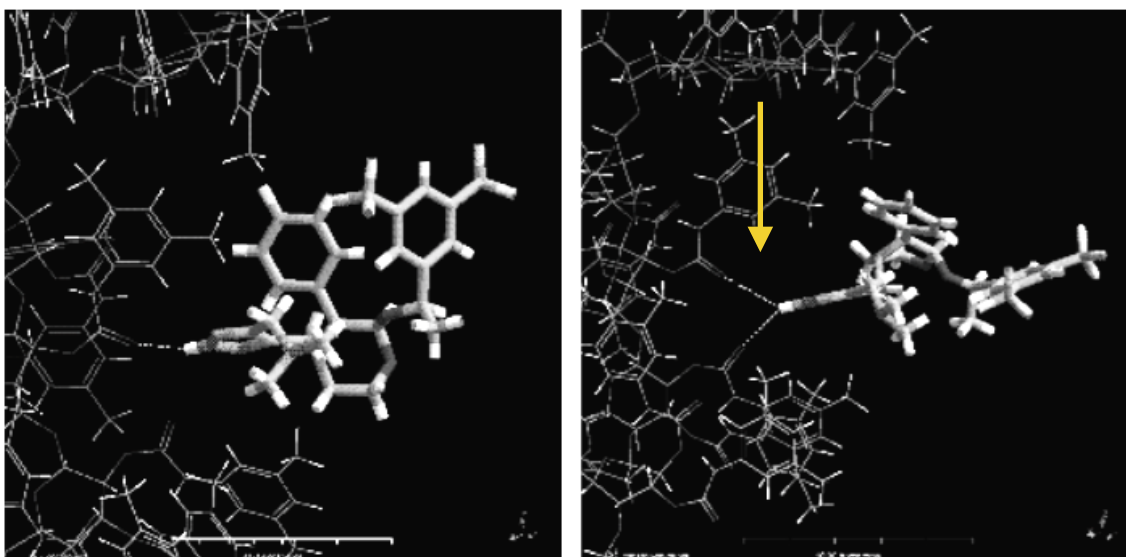


Obr. 5: Prostorové uspořádání amyulózy a celulózy

Čistá celulóza a amyulóza se ukázaly jako nepříliš vhodné. Lze na nich dělit jen omezené spektrum látek. Dnes se využívají modifikované typy těchto dvou polysacharidů, které zajišťují vyšší enantioselektivitu. Modifikace spočívá v derivatizaci hydroxylových skupin glukózových jednotek organickými estery, karbamáty, nitráty a ethery. Z příkladů je nutno uvést především triacetát celulózy, který je vhodný pro dělení nepolárních látek.

Tris(3,5-dimethylfenylkarbamát) celulózy a tris(3,5-dimethylfenylkarbamát) amyulózy jsou dva zdánlivě podobné typy modifikovaných CSP, avšak v důsledku různé konformace polysacharidu nelze dosáhnout stejné enantioselektivity.

Separace enantiomerů na chirálních kolonách tohoto typu je založena na vzniku různě stabilních vodíkových vazeb a π - π interakcí. Na obrázku níže je znázorněna tvorba vodíkového můstku enantiomeru s amyulózo-karbamátovou fází. Komplex tvořený levotočivým enantiomerem je stabilnější než komplex pravotočivého enantiomeru, který vytváří labilnější rozdvojený (bifurkace) vodíkový můstek.

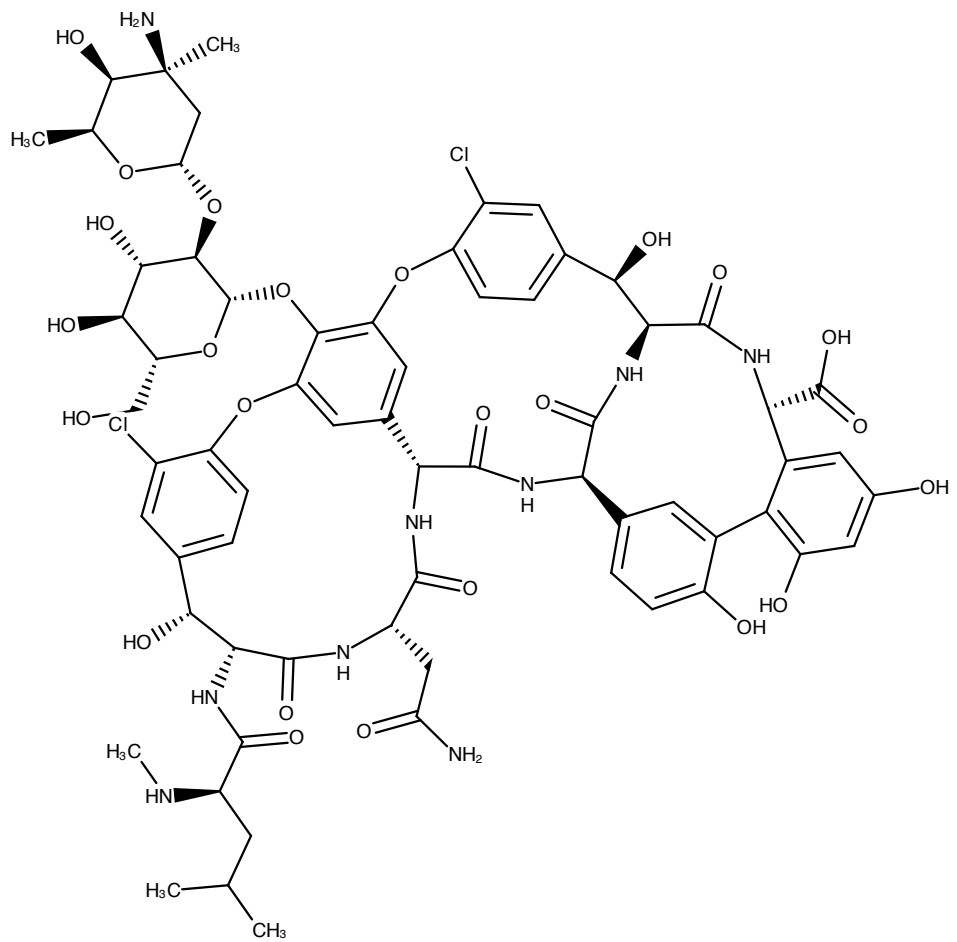


Obr. 6: Vznik labilního rozdvojeného vodíkového můstku

Na efektivitě chirální separace se kromě interakcí CSP s analytem podílí také vlastnosti mobilní fáze a teplota.

Chirální stacionární fáze na bázi antibiotik

Antibiotika používaná jako chirální selektory patří do skupiny makrocyclických glykoproteinů. Vankomycin (syntetizován bakterií *Streptomyces orientalis*), teikoplanin (*Actinoplanes teichomyceticus*) a ristocetin A (*Nocardia lurida*) patří mezi nejčastěji využívané CSP na bázi antibiotik s širokými aplikačními možnostmi. Tyto CSP dovolují pracovat jak v normálním, polárním (bezvodém), tak v reverzním (vodném) módu. Dělení enantiomerů je možné především díky tvorbě vodíkových vazeb, π - π interakcím a inkluzím do hydrofobních kapes. V reverzním módu jsou preferovány π - π interakce a inkluze analytu do strukturních kapes stacionární fáze. V přítomnosti organického modifikátoru (methanol, acetonitril, tetrahydrofuran, dioxan, ethanol, propanol) se uplatňují elektrostatické interakce a tvorba vodíkových vazeb. V normálním módu dochází při separaci k π - π hydrofobním a dipólovým interakcím. Selektivita chirální fáze k analytu je dána pH prostředí. To je možné upravit přidáním organických kyselin (octová, trifluoroctová, mravenčí), bazí (triethylamin, diethylamin, ethylendiamin) nebo pufru (octan nebo mravenčan amonný). Existují i derivatizované typy antibiotických CSP například vankomycin s 3,5-dimethylfenylisokyanatanem nebo teikoplanin a vankomycin bez cukerných složek (aglykony).



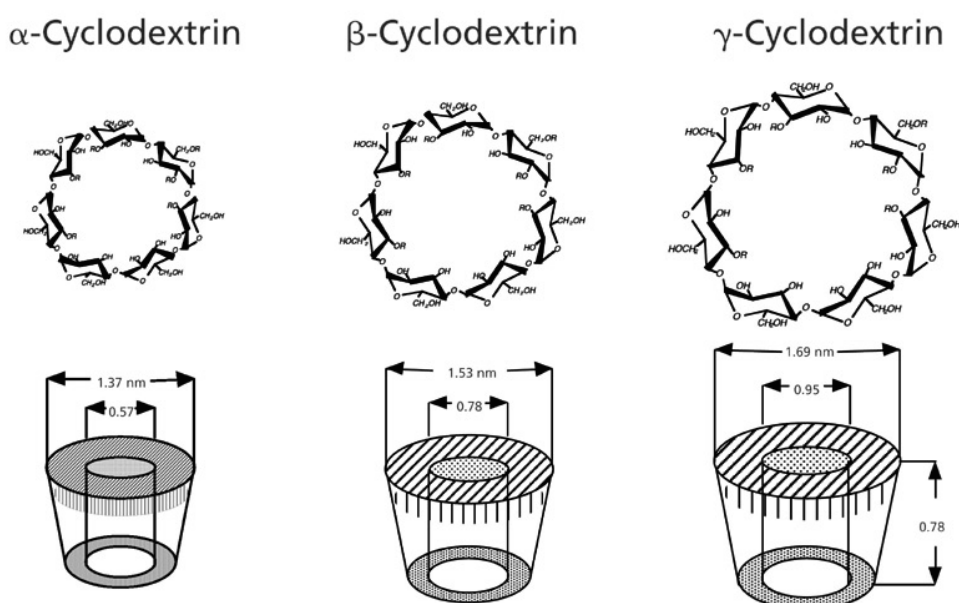
Obr. 7: Struktura vankomycinu

Proteinové chirální stacionární fáze

Na proteinech se díky jejich složité struktuře nachází mnoho vazebných míst. V živých organismech figurují proteiny jako receptory, které, jak již víme, mohou být enantioselektivní. Proto se proteiny uplatňují jako CSP. K příkladům patří proteinové CSP na bázi albuminu (lidský nebo hovězí sérový albumin), na bázi glykoproteinů (ovomukoid, avidin, kyselý α_1 - glykoprotein) nebo na bázi enzymů (trypsin, chymotrypsin, lysosomy, pepsin). CSP na bázi proteinů patří, vedle polysacharidových a antibiotických, k fázím, kde se uplatňuje více typů interakcí (hydrofobní, elektrostatické, vodíkové). K nevýhodám proteinových CSP patří malá kapacita (nelze nastříknout vzorek o koncentraci vyšší než 0,1 mg/ml), tlakový limit, ale především malá stabilita při vyšších teplotách, nevhodných hodnotách pH nebo po přidavku organického rozpouštědla.

Cyklodextrinové chirální stacionární fáze

Cyklodextriny představují produkt degradace amylyzy glukosyltransferázami. Jedná se o cyklické oligosacharidy s různým počtem cukerných jednotek, a tedy s různým průměrem vnitřní dutiny (cyklodextriny α , β , γ). Hlavním mechanismem chirálního dělení na cyklodextrinových CSP je inkluzní komplexace. Ta je možná díky jedinečnému uspořádání cyklodextrinové kavity. Povrch kavity je díky hydroxylovým skupinám hydrofilní (interaguje s hydrofilní částí molekuly analytu), zatímco uvnitř je prostředí hydrofobní (interaguje s hydrofobní částí - aromatický kruh). Díky tomu, že jsou enantiomery různě geometricky uspořádány, preferují různé polohy při interakci s cyklodextriny. Tato uspořádání mohou být různě stabilní a analyt setrvá na povrchu cyklodextrinu různě dlouhou dobu. To vede k rozdělení enantiomerních analytů.

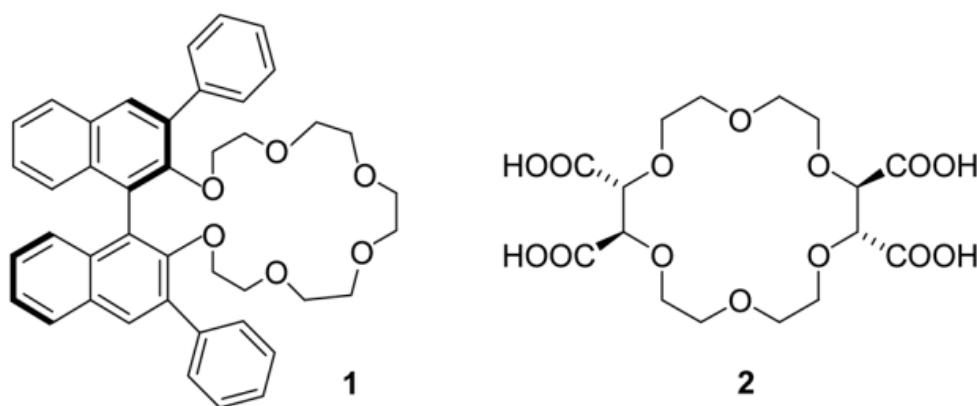


Obr. 8: Struktura cyklodextrinů a parametry jejich kavít

Cyklodextrinové CSP je možné použít pro reverzní, normální i pro polárně - organický mód (acetonitril, methanol). O výběru mobilní fáze rozhodují vlastnosti analytu (rozpustnost, pKa). Reverzní mód je však separačně neúčinnější. Stabilitu inkluzních komplexů významně ovlivňuje pH mobilní fáze. To však nesmí být nižší než 3, jinak dojde k rozkladu stacionární fáze. Podobně jako u předchozích CSP, existuje i celá řada derivatizovaných cyklodextrinových fází, které jsou chirálně specifitější.

Crown - etherové chirální stacionární fáze

Crown - ethery jsou makrocycly tvořené ethylenovými můstky, mezi které je zabudován heteroatom. Tím je obvykle kyslík, ale může jím být i síra nebo dusík. Crown - etherové uspořádání vytváří kavitu, podobně jako je tomu u cyklodextrinů. Nitro kavity však není hydrofobní, ale hydrofilní a vytváří přednostně komplexy s amoniovým iontem. V praxi se využívají crown - ethery derivatizované. Jsou vhodné především k dělení sloučenin s amino skupinou hned vedle chirálního centra (např. aminokyseliny).



Obr. 9: Struktura crown - etherů

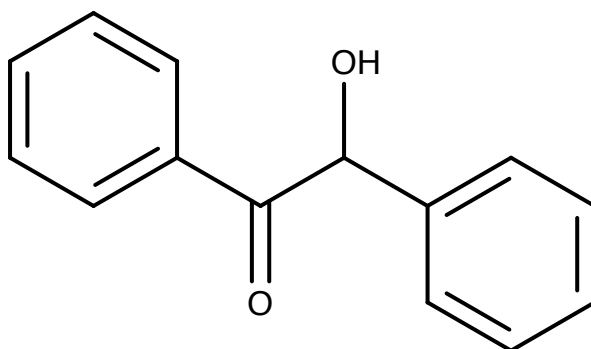
Pirklovy chirální stacionární fáze

Pirklovy fáze patří mezi nejstarší používané CSP. Můžete se s nimi setkat například pod značkou Chirex od firmy Phenomenex. Při dělení se uplatňuje více interakcí (π - π , vodíkové, van der Waalovy, dipólové, stérické). Představitelem π - π interakce je tendence π -akceptorové skupiny přijímat elektron od π -donorní skupiny a tvořit tak π - donor/ akceptorový komplex. Chirální selektor může obsahovat buď jednu z těchto skupin, anebo obě z nich, čímž se zvyšuje univerzálnost fáze. Pirklovy CSP jsou vhodné pro dělení v normálním módu pro široké spektrum látek.

Praktická část

Následují praktické úlohy zaměřené na chirální separaci léčiv a jejich prekurzorů pomocí HPLC s chirální stacionární fází.

Benzoin



Název:

(2*RS*)-2-hydroxy-1,2-difenyl-ethanon

Charakteristika látky:

Bílá až žlutobílá krystalická látka. Teplota tání: 137° C

Použití:

Prekurzor při přípravě fenytoinu.

Potenciální cytostatická aktivita derivátů benzoinu.

Příprava na analýzu:

Navažte 1 mg benzoinu do Eppendorfky a rozpustte ve 100 μ l propan-2-olu, poté přidejte 900 μ l heptanu. Obsah nasajte do stříkačky a zfiltrujte přes stříkačkový filtr do vialky.

Parametry analýzy:

Kolona: Phenomenex Lux 5 μ m - Amylose - 1, 250 x 4,6 mm

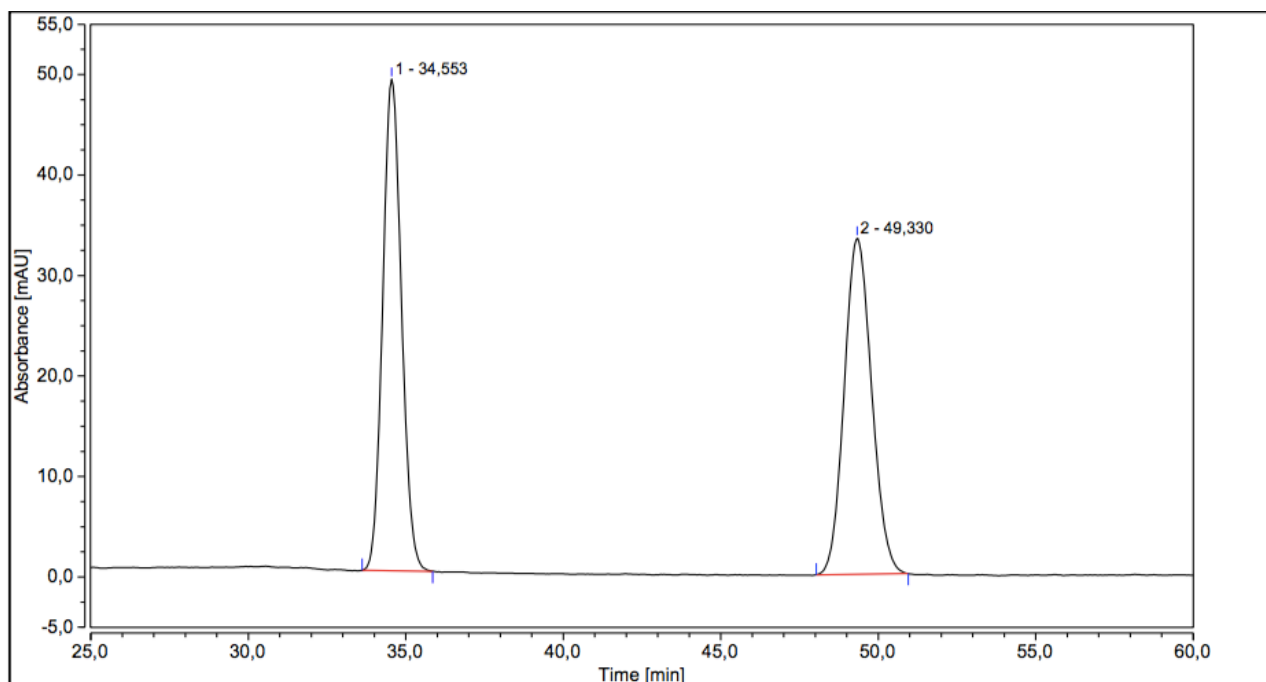
Mobilní fáze: Propan-2-ol : heptan (20 : 80), isokratická eluce

Průtok: 0,5 ml/min

Teplota: 5° C

Detekce: UV - VIS - Vlnová délka: 230 nm

Chromatogram:



Integration Results							
No.	Peak Name	Retention Time min	Area mAU*min	Height mAU	Relative Area %	Relative Height %	Amount n.a.
1		34,553	33,761	48,920	50,03	59,39	n.a.
2		49,330	33,715	33,453	49,97	40,61	n.a.
Total:			67,476	82,372	100,00	100,00	

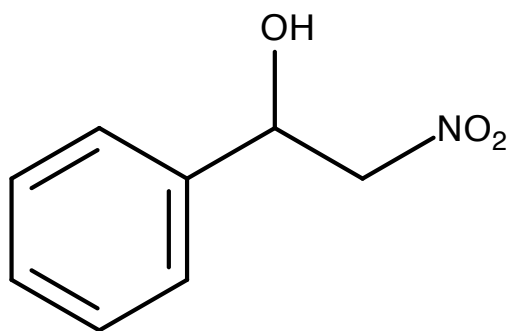
Poznámka:

Jako CSP byla použita Phenomenex Lux Amylose - 1. Jedná se o polysacharidovou fázi derivatizovanou 3,5-dimethylfenylkarbamátem. Analyt interaguje se selektorem za vzniku vodíkových můstků, dipólových interakcí a π - π interakcí. Helikální struktura amylozy zajišťuje stérické prostředí a vyšší enantioselektivitu.

Úkol:

1. Změřte teplotu tání benzoinu.
2. Jaký bude rozdíl ve výsledku z TLC a HPLC?

(1*RS*)-2-nitro-1-fenylethan-1-ol



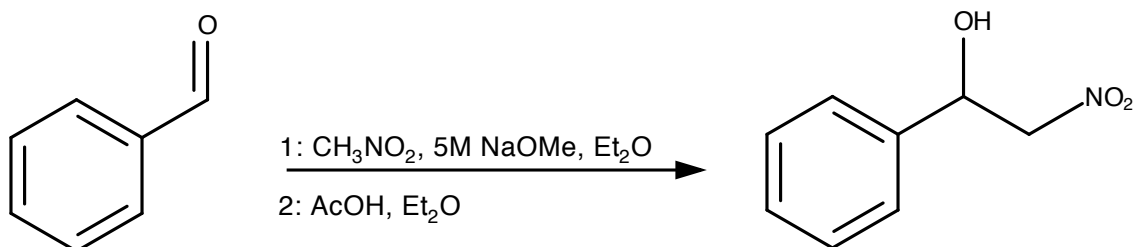
Charakteristika látky:

Žlutá olejovitá kapalina.

Použití:

Prekurzor při přípravě léčiv (chloramfenikol, inhibitory β -sekretáz)

Příprava (1*RS*)-2-nitro-1-fenylethan-1-olu Henryho reakcí:



Připravte si 25ml baňku s magnetickým míchadlem a septem. Pod argonem rozpusťte 10 mmol benzaldehydu v 10 mmol nitromethanu v 7,5 ml suchého diethyletheru.

V jiné baňce si pod argonem připravte 5M roztok methoxidu sodného v suchém methanolu. Po homogenizaci přidejte 2,5 ml suchého diethyletheru a tuto směs po kapkách přidávejte k roztoku benzaldehydu a nitromethanu za intenzivního míchání při teplotě 0 - 5° C. Nechte míchat hodinu při této teplotě.

Hotovou směs zpracujte přidávkem 0,55 ml ledové kyseliny octové rozpuštěné v 2,5 ml diethyletheru a nechte míchat ještě 30 min při teplotě 5 - 10° C. Poté převedte směs do děličky, přidejte 30 ml vody a extrahujte 3 x 25 ml diethyletheru. Spojené organické fáze promyjte 20 ml 5% roztoku Na₂CO₃, 10 x 20 ml 20% roztoku NaHSO₃, 20 ml vody a 20 ml solanky. Organickou fází vysušte bezvodým Na₂SO₄, zfiltrujte do předem zvážené baňky a odpaňte na vakuové odparce.

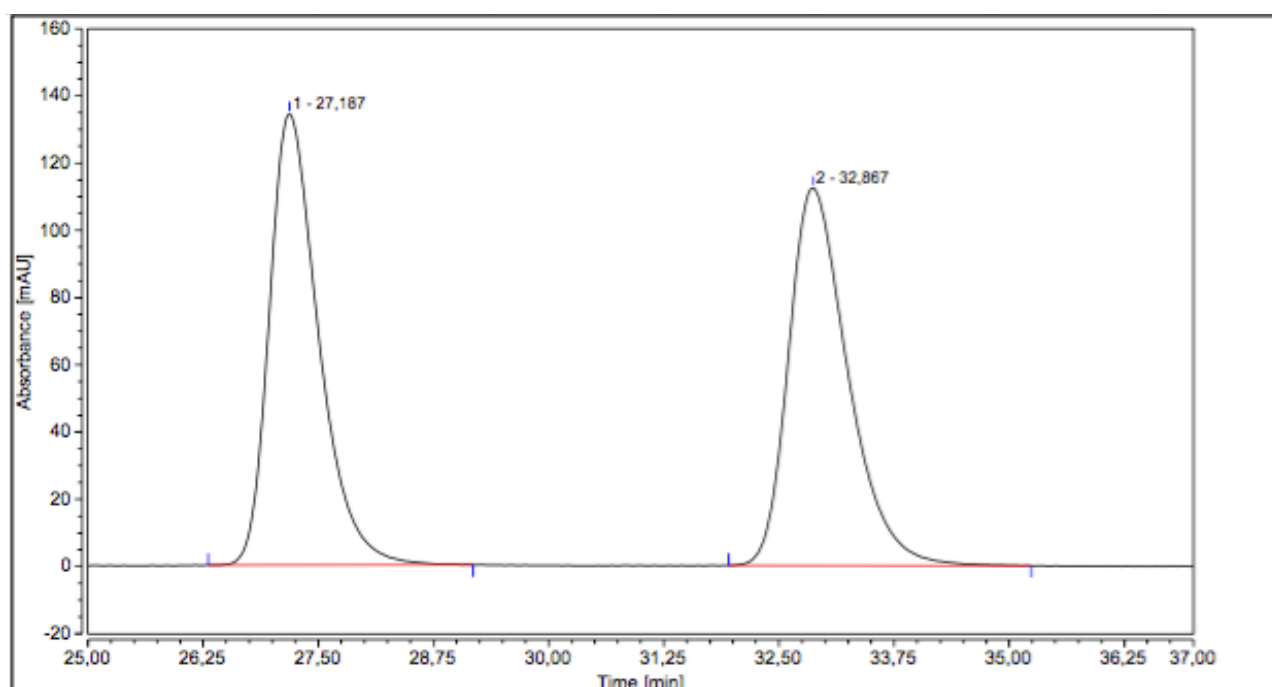
Příprava na analýzu:

Obsah baňky rozpustíte v propan-2-olu. Přidejte tolik propan-2-olu, abyste dosáhli koncentrace 10 mg/ml. Odeberte pipetou 100 μ l a přidejte 900 μ l heptanu. Obsah nasajte do stříkačky a zfiltrujte přes stříkačkový filtr do vialky.

Parametry analýzy:

Kolona: Phenomenex Lux 3 μ m - Cellulose - 1, 250 x 4,6 mm
Mobilní fáze: Propan-2-ol : heptan (20 : 80), isokratická eluce
Průtok: 0,5 ml/min
Teplota: 5° C
Detekce: UV - VIS - Vlnová délka: 230 nm

Chromatogram:



Integration Results							
No.	Peak Name	Retention Time min	Area mAU*min	Height mAU	Relative Area %	Relative Height %	Amount
1		27,187	83,393	134,222	49,93	54,45	n.a.
2		32,867	83,619	112,300	50,07	45,55	n.a.
Total:			167,013	246,522	100,00	100,00	

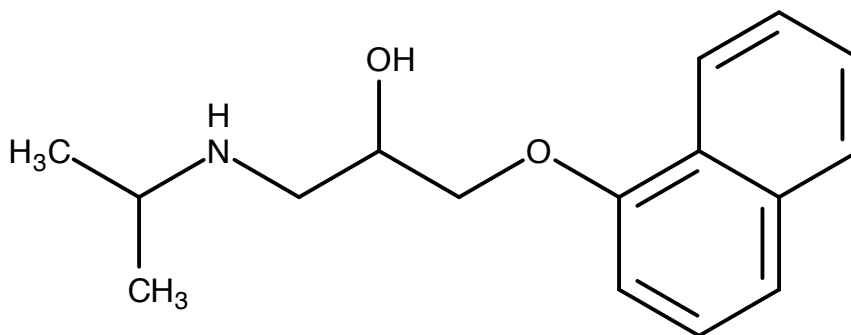
Poznámka:

Jako CSP byla použita Lux Cellulose - 1. Jedná se o fázi na bázi celulózy, která je derivatizovaná 3,5-dimethylfenylkarbamátem. Při dělení se uplatňuje tvorba vodíkových můstků a π - π interakcí.

Úkol:

1. Jaký je rozdíl ve struktuře celulózy a amylózy?

Propranolol



Název:

(2*RS*)-1-[isopropylamino-3-(naftalen-1-yloxy)]propan-2-ol

Charakteristika látky:

Propranololi hydrochloridum: bílý nebo téměř bílý prášek dobře rozpustný ve vodě a v 96% ethanolu. Teplota tání: 163 - 166° C.

Farmakologické vlastnosti a indikace:

Neselektivní β -blokátor (angina pectoris, hypertenze, dysrytmie, glaukom, infantilní hemangiom).

Příprava na analýzu:

Navažte 1 mg propranolol hydrochloridu do Eppedorfky a rozpusťte v 1 ml methanolu. Obsah nasajte do stříkačky a zfiltrujte přes stříkačkový filtr do vialky.

Parametry analýzy:

Kolona: Astec - Chirobiotic T 5 μ m, 150 mm \times 4.6 mm

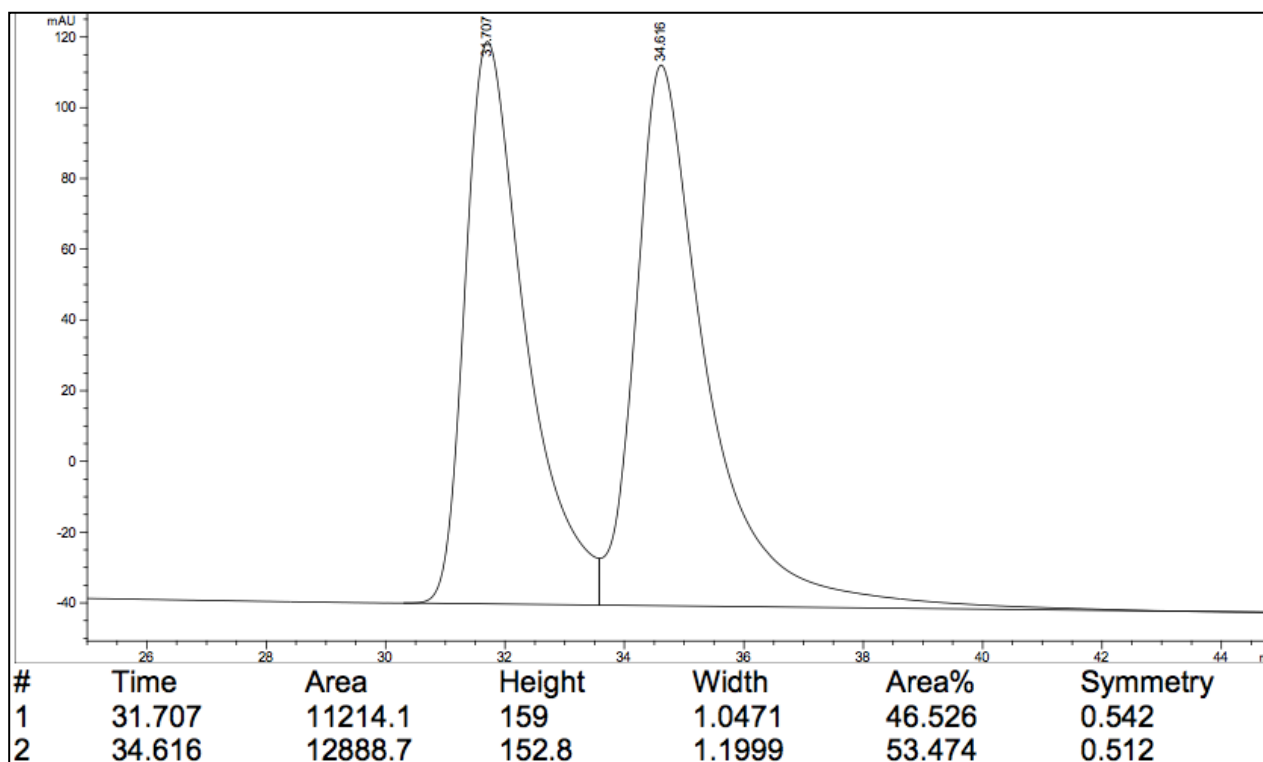
Mobilní fáze: 15mM mravenčan amonný v MeOH

Průtok: 0,1 ml/min

Teplota: 5° C

Detekce: UV - VIS - Vlnová délka: 230 nm

Chromatogram:



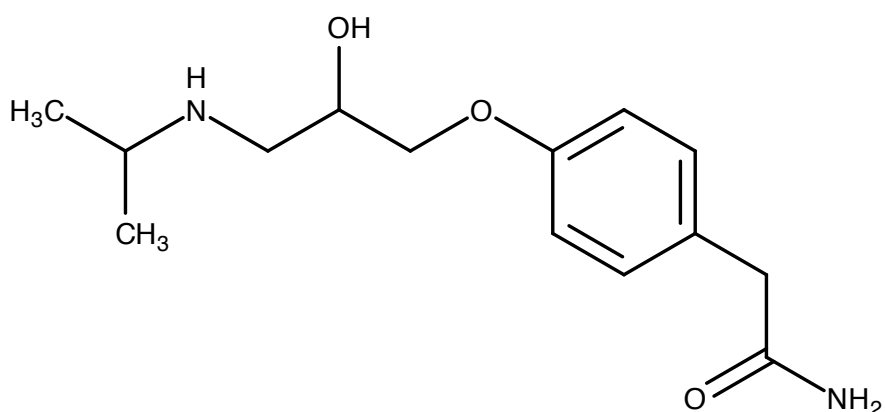
Poznámka:

Byla použita CSP na bázi makrocyclického glykoproteinu teikoplaninu. Při dělení v polárně - organickém módu se uplatňují elektrostatické interakce. Je to účinná CSP pro látky, které obsahují alespoň dvě skupiny schopné interakce, nacházející se v blízkosti stereogenního centra (hydroxylová, karbonylová, karboxylová, amino).

Úkol:

1. Navrhněte metodu identifikace jednotlivých enantiomerů.
2. Které části molekuly propranololu pravděpodobně interagují s CSP v methanolové fázi?
3. Je propranolol hydrochlorid v ČR registrován? Pokud ano, tak s jakou indikací?

Atenolol



Název:

2-{4-[(2*RS*)-2-hydroxy-3-(isopropylamino)propoxy]fenyl}acetamid

Charakteristika látky:

Atenololum: bílý nebo téměř bílý prášek mírně rozpustný ve vodě, dobře rozpustný v ethanolu bezvodém, těžce rozpustný v dichlormethanu. Teplota tání: 152 - 155° C

Farmakologické vlastnosti a indikace:

Selektivní β 1-blokátor (hypertenze, angina pectoris).

Příprava na analýzu:

Navažte 1 mg atenololu do Eppendorfky a rozpustěte v 1 ml methanolu. Obsah nasajte do stříkačky a zfiltrujte přes stříkačkový filtr do vialky.

Parametry analýzy:

Kolona: Astec - Chirobiotic T 5 μ m, 150 mm \times 4.6 mm

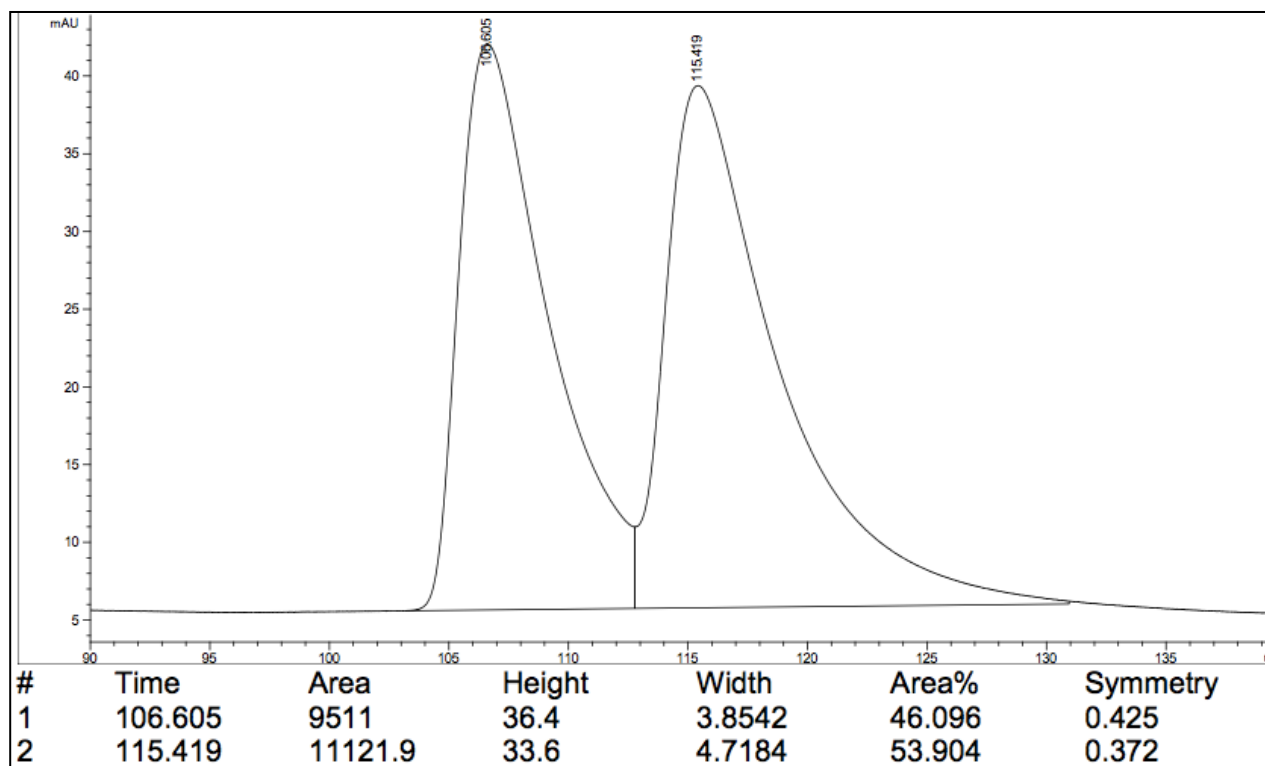
Mobilní fáze: 15mM mravenčan amonný v MeOH

Průtok: 0,1 ml/min

Teplota: 5° C

Detekce: UV - VIS - Vlnová délka: 230 nm

Chromatogram:



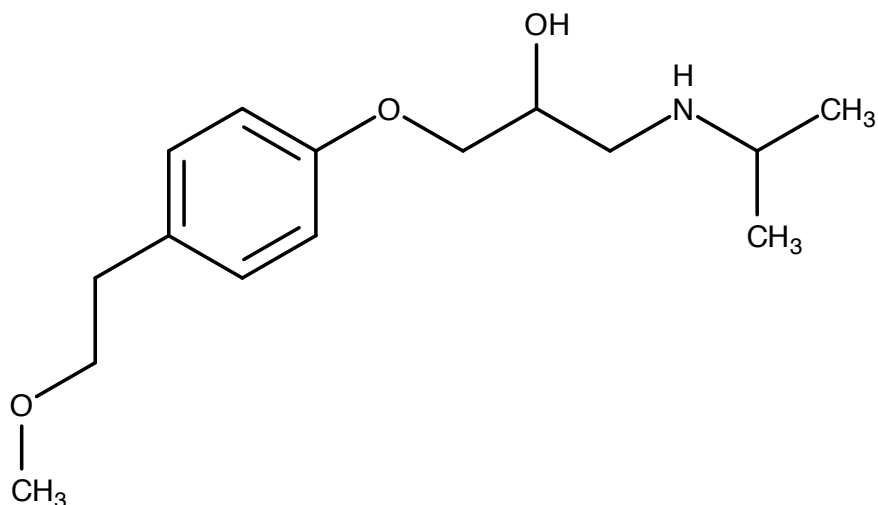
Poznámka:

Byla použita CSP na bázi makrocyclického glykoproteinu teikoplaninu. Při dělení v polárně-organickém módu se uplatňují elektrostatické interakce. Je to účinná CSP pro látky, které obsahují alespoň dvě skupiny schopné interakce a nacházejí se v blízkosti stereogenního centra (hydroxylová, karbonylová, karboxylová, amino).

Úkol:

1. Navrhněte metodu identifikace jednotlivých enantiomerů.
2. Které části molekuly atenololu pravděpodobně interagují s CSP v methanolové fázi?
3. Jak by se projevilo podání čistého enantiomeru?

Metoprolol



Název:

(2*RS*)-1-(isopropylamino)-3-[4-(2-methoxyethyl)-fenoxy]propan-2-ol

Charakteristika látky:

Metoprololi succinas: bílý nebo téměř bílý krystalický prášek snadno rozpustný ve vodě, dobře rozpustný v methanolu, těžce rozpustný v ethanolu 96%. Teplota tání: 136 - 137° C

Farmakologické vlastnosti a indikace:

Selektivní β 1-blokátor (hypertenze, angina pectoris, dysrytmie, migréna, hyperthyreóza).

Izolace:

Pět tablet přípravku Belatoc 25 mg (125 mg metoprololi succinas) rozetřete v třence a spláchněte celý obsah 100 ml vody do Erlenmeyerovy baňky. Za občasného promíchání nechte stát 15 min. Zfiltrujte do jiné Erlenmeyerovy baňky. Zalkalizujte nasyceným roztokem hydroxidu sodného a přidejte 4 lžičky NaCl. Roztok převedte do děličky a extrahujte 3 x 20 ml dichlormethanu. Organické fáze spojte, přidejte sušidlo (síran hořečnatý) a nechte stát 30 min. Roztok zfiltrujte do předem zvážené baňky s kulatým dnem a nechte odpařit na vakuové odparce.

Příprava na analýzu:

Obsah baňky rozpustíte v methanolu. Přidejte tolik methanolu, abyste dosáhli koncentrace 1 mg/ml. Odeberte pipetou 1 ml do Eppendorfky. Obsah nasajte do stříkačky a zfiltrujte přes stříkačkový filtr do vialky.

Parametry analýzy:

Kolona: Astec - Chirobiotic T 5 μm , 150 mm \times 4.6 mm

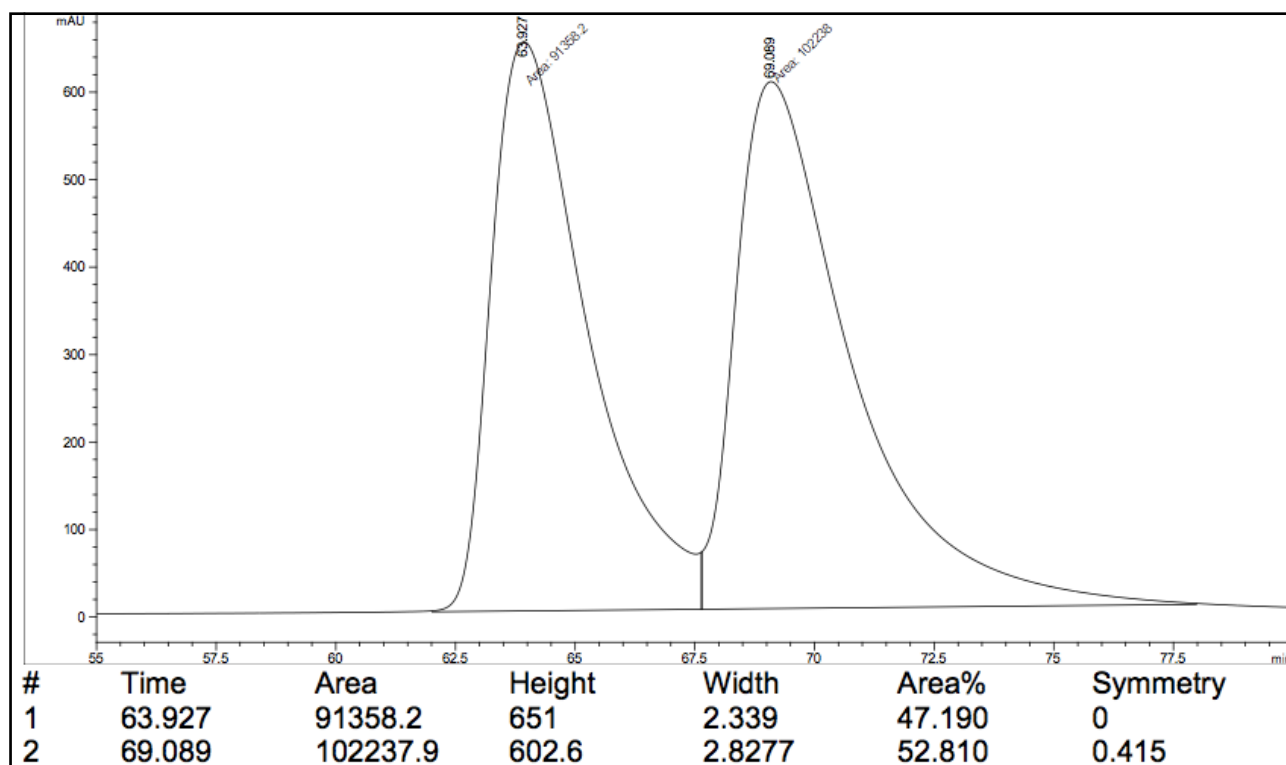
Mobilní fáze: 15mM mravenčan amonný v MeOH

Průtok: 0,1 ml/min

Teplota: 5° C

Detekce: UV - VIS - Vlnová délka: 230 nm

Chromatogram:



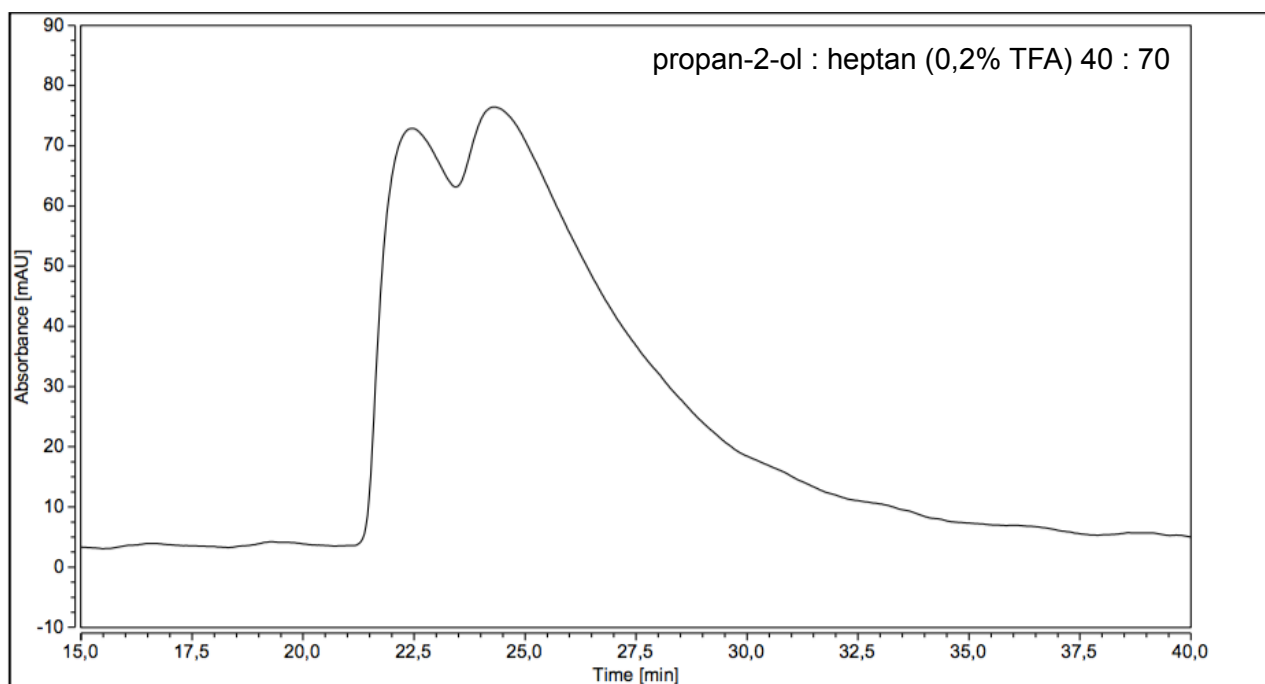
Poznámka:

Byla použita CSP na bázi makrocyclického glykoproteinu teikoplaninu. Při dělení v polárně - organickém módu se uplatňují elektrostatické interakce. Je to účinná CSP pro látky, které obsahují alespoň dvě skupiny schopné interakce, nacházející se v blízkosti stereogenního centra (hydroxylová, karbonylová, karboxylová, amino).

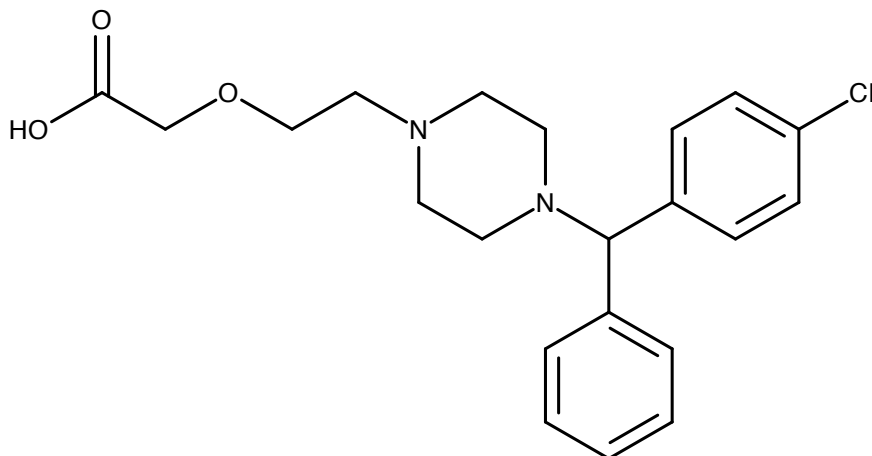
Úkol:

1. Porovnejte výsledky dělení na koloně Astec - Chirobiotic T a Chirex 3022 - Chirex® (S)-ICA a (R)-NEA (viz. níže).
2. Jaké jsou výhody dělení na teikoplaninové koloně?
3. Jaké se uplatňují interakce u obou typů kolon?

Chromatogram k úloze:



Cetirizin



Název:

kyselina (*RS*)-2-(2-{4-[(4-chlorfenyl)-fenylmethyl]piperazin-1-yl}ethoxy)octová

Charakteristika látky:

Cetirizini dihydrochloridum: bílý nebo téměř bílý prášek snadno rozpustný ve vodě, prakticky nerozpustný v acetonu a v dichlormethanu. Teplota tání: 110 - 115° C

Farmakologické vlastnosti a indikace:

H₁ - antihistaminikum (sezonní a celoroční alergická rhinitis, urticaria)

Izolace:

Dvacet tablet přípravku Analergin 10 mg (200 mg cetirizinu) rozetřete v třence. Převeďte do Erlenmeyerovy baňky. Přidejte 100 ml vody. Za občasného promíchání nechte stát 30 min. Zfiltrujte do jiné Erlenmeyerovy baňky, zalkalizujte nasyceným roztokem hydroxidu sodného a přidejte čtyři lžičky chloridu sodného. Převeďte do děličky a extrahujte 3 x 20 ml dichlormethanu. Spojte organické fáze a přidejte sušidlo (síran hořečnatý). Zfiltrujte do baňky s kulatým dnem na objem cca 5 ml. Pokud odparek neobsahuje pomocné látky (vizuální kontrola) pokračujte v odpařování, pokud však zaznamenáte stopy nerozpustných látek, připravte si krátkou kolonku z Pasteurovy pipety. Silikagel rozptylte v dichlormethanu. Do pipety dejte malý smotek vaty, navrstvěte mořským pískem a připraveným silikagelem. Kolonka nesmí vyschnout, proto mějte pod kontrolou hladinu mobilní fáze. Pod kolonku si připravte předem zvažnou baňku s kulatým dnem. Jakmile hladina mobilní fáze klesne 2 mm nad silikagel, okamžitě nalijte odparek s produktem. Propláchněte 3 x dichlormethanem. Produkt odpařte na vakuové odparce.

Ověření čistoty vzorku:

Provedte TLC izolovaného cetirizinu. Mobilní fáze: MeOH/DCM (1 : 9)

Příprava na analýzu:

Obsah baňky rozpustíte v methanolu. Přidejte tolik methanolu, abyste dosáhli koncentrace 1 mg/ml. Odeberte pipetou 1 ml do Eppendorfky. Obsah nasajte do stříkačky a zfiltrujte přes stříkačkový filtr do vialky.

Parametry analýzy:

Kolona: Astec - Chirobiotic T 5 μm , 150 mm \times 4.6 mm

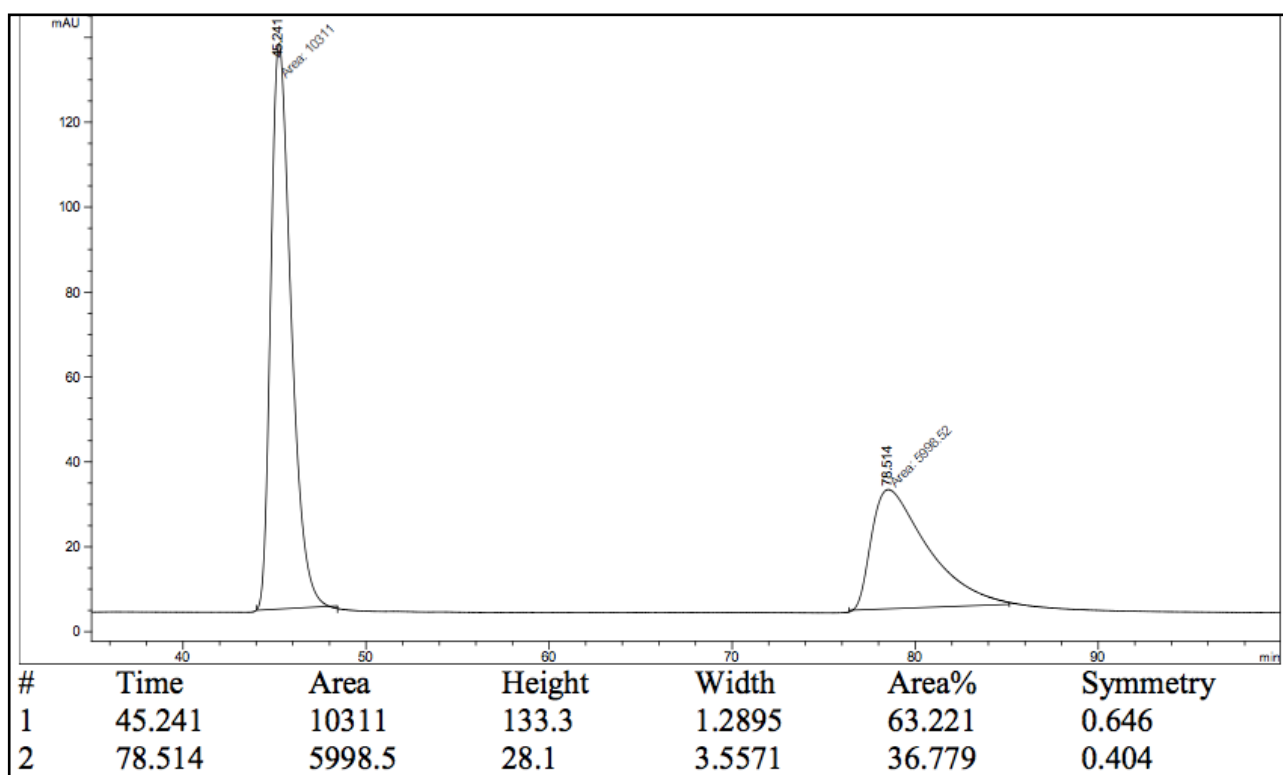
Mobilní fáze: 15mM mravenčan amonný v MeOH

Průtok: 0,1 ml/min

Teplota: 5° C

Detekce: UV - VIS - Vlnová délka: 230 nm

Chromatogram:



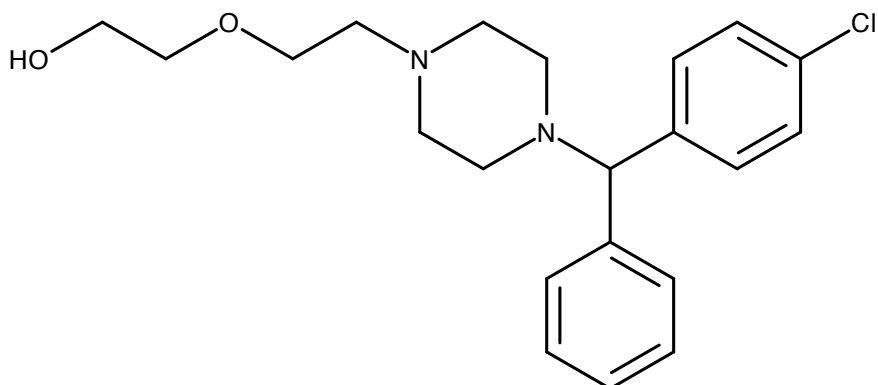
Poznámka:

Byla použita CSP na bázi makrocyclického glykoproteinu teikoplaninu. Při dělení v polárně - organickém módu se uplatňují elektrostatické interakce. Je to účinná CSP pro látky, které obsahují alespoň dvě skupiny schopné interakce, nacházející se v blízkosti stereogenního centra (hydroxylová, karbonylová, karboxylová, amino).

Úkol:

1. Jaký bude rozdíl mezi výsledkem TLC a chirální HPLC?
2. Jak se nazývá levotočivý enantiomer cetirizinu?
3. Pod jakým názvem je levotočivý enantiomer registrován v ČR? Jaké jsou jeho výhody?

Hydroxizin



Název:

(*RS*)-2-(2-{4-[(4-chlorfenyl)-fenylmethyl]piperazin-1-yl}ethoxy)ethanol

Charakteristika látky:

Hydroxyzini dihydrochloridum: bílý nebo téměř bílý krystalický hygroskopický prášek snadno rozpustný ve vodě a v lihu 96%, těžce rozpustný v acetonu. Teplota tání: 200° C za rozkladu látky

Farmakologické vlastnosti a indikace:

anxiolytikum, antihistaminikum (anxieta, pruritus)

Izolace:

Deset tablet přípravku Atarax 25 mg (250 mg hydroxyzinu) rozetřete v třence. Převedte do Erlenmeyerovy baňky. Přidejte 100 ml vody. Za občasného promíchání nechte stát 30 min. Zfiltrujte do jiné Erlenmeyerovy baňky, zalkalizujte nasyceným roztokem hydroxidu sodného a přidejte čtyři lžičky chloridu sodného. Převedte do děličky a extrahujte 3 x 20 ml dichlormethanu. Spojte organické fáze a přidejte sušidlo (síran hořečnatý). Zfiltrujte do předem zvážené baňky s kulatým dnem a nechte odpařit na vakuové odparce.

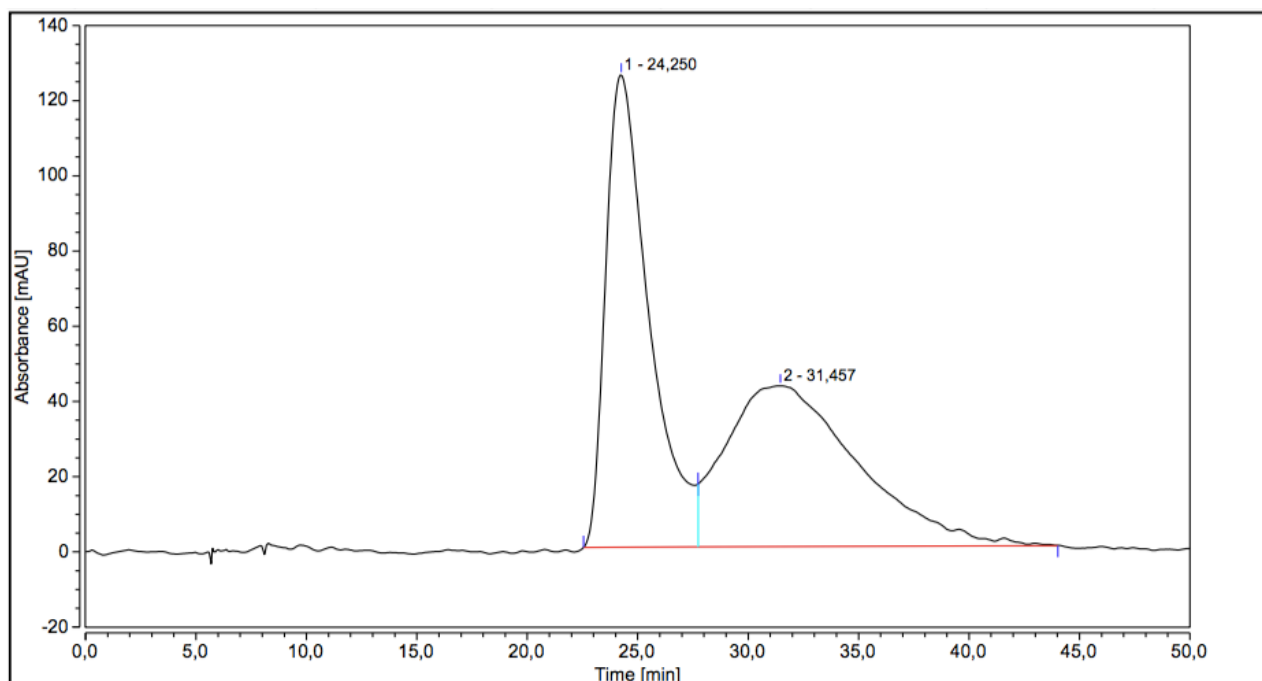
Příprava na analýzu:

Obsah baňky rozpustte v propan-2-olu. Přidejte tolik propan-2-olu, abyste dosáhli koncentrace 10 mg/ml. Odeberte pipetou 100 μ l a přidejte 900 μ l heptanu. Obsah nasajte do stříkačky a zfiltrujte přes stříkačkový filtr do vialky.

Parametry analýzy:

Kolona: Phenomenex Lux 3 μ m - Amylose - 2, 250 x 4,6 mm
Mobilní fáze: propan-2-ol - 0,1% DEA : heptan - 0,1% DEA (30 : 70), isokratická eluce
Průtok: 0,5 ml/min
Teplota: 5° C
Detekce: UV - VIS - Vlnová délka: 230 nm

Chromatogram:



Integration Results							
No.	Peak Name	Retention Time min	Area mAU*min	Height mAU	Relative Area %	Relative Height %	Amount n.a.
1		24,250	286,075	125,606	49,07	74,60	n.a.
2		31,457	296,900	42,768	50,93	25,40	n.a.
Total:			582,976	168,373	100,00	100,00	

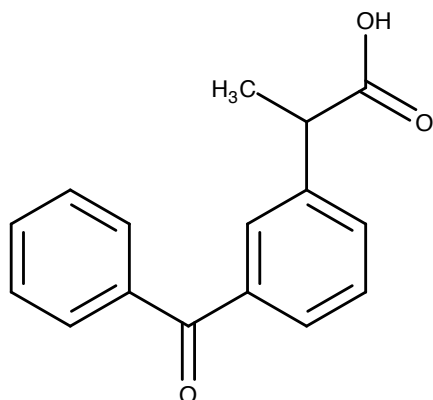
Poznámka:

Byla použita CSP Phenomenex Lux Amylose - 2. Jedná se o polysacharidovou CSP derivatizovanou 5-chloro-2-methylfenylkarbamátem. Analyt interaguje se selektorem za vzniku vodíkových můstků, dipólových interakcí a π - π interakcí. Helikální struktura amylozy zajišťuje stérické prostředí a vyšší enantioselektivitu

Úkol:

1. Jaký by byl rozdíl mezi výsledkem TLC a chirální HPLC?
2. Navrhněte metodu identifikace jednotlivých enantiomerů.

Ketoprofen



Název:

kyselina (2*RS*)-2-(3-benzoylphenyl)propanová

Charakteristika látky:

Ketoprofenum: bílý nebo téměř bílý krystalický prášek prakticky nerozpustný ve vodě , snadno rozpustný v acetonu, v ethanolu 96% a v dichlormethanu. Teplota tání: 94 - 96° C

Farmakologické vlastnosti a indikace:

Nesteroidní antiflogistikum a antirevmatikum (revmatoidní arthritida, osteoarthritis, akutní dna, muskuloskeletální poranění, pooperační bolesti, dysmenorrhoea)

Příprava na analýzu:

Navažte 1 mg ketoprofenu do Eppendorfky. Rozpusťte ve 200 µl propan-2-olu a doplňte 800 µl heptanu. Obsah nasajte do stříkačky a zfiltrujte přes stříkačkový filtr do vialky.

Parametry analýzy:

Kolona: Phenomenex Lux 5 µm - Amylose - 1, 250 x 4,6 mm

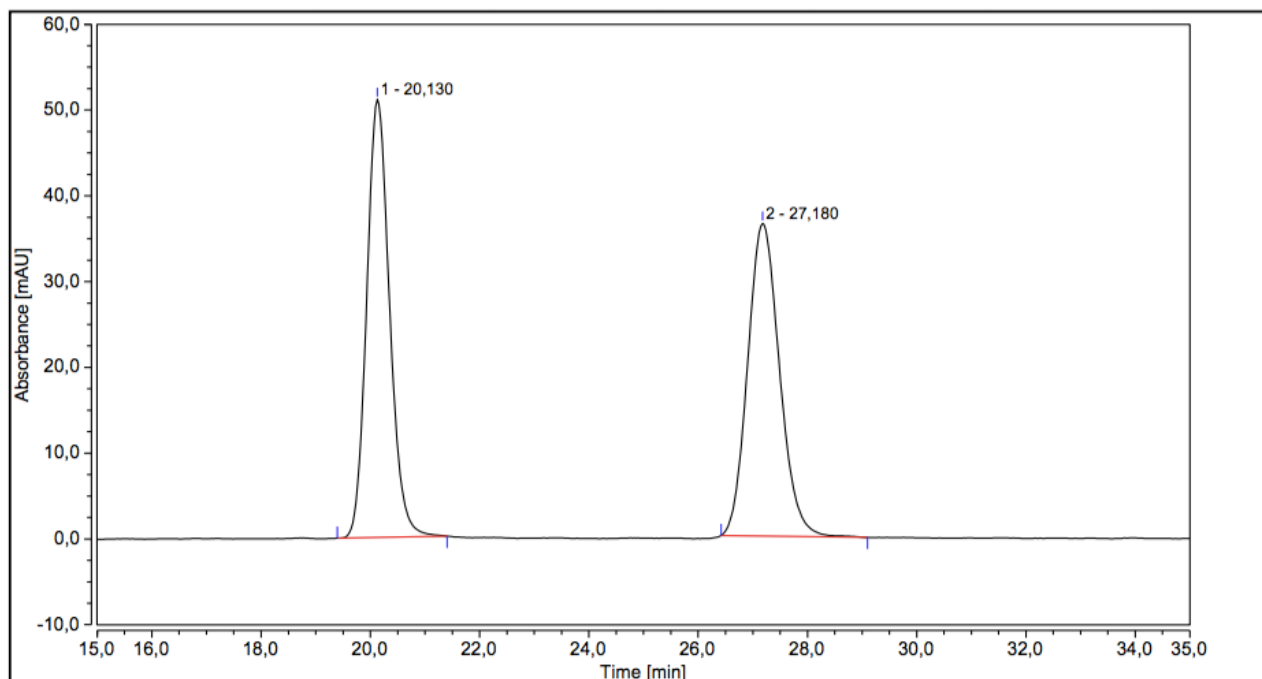
Mobilní fáze: Propan-2-ol : heptan (20 : 80), isokratická eluce

Průtok: 0,5 ml/min

Teplota: 5° C

Detekce: UV - VIS - Vlnová délka: 230 nm

Chromatogram:



Integration Results							
No.	Peak Name	Retention Time min	Area mAU*min	Height mAU	Relative Area %	Relative Height %	Amount n.a.
1		20,130	24,719	51,057	50,13	58,35	n.a.
2		27,180	24,591	36,451	49,87	41,65	n.a.
Total:			49,310	87,508	100,00	100,00	

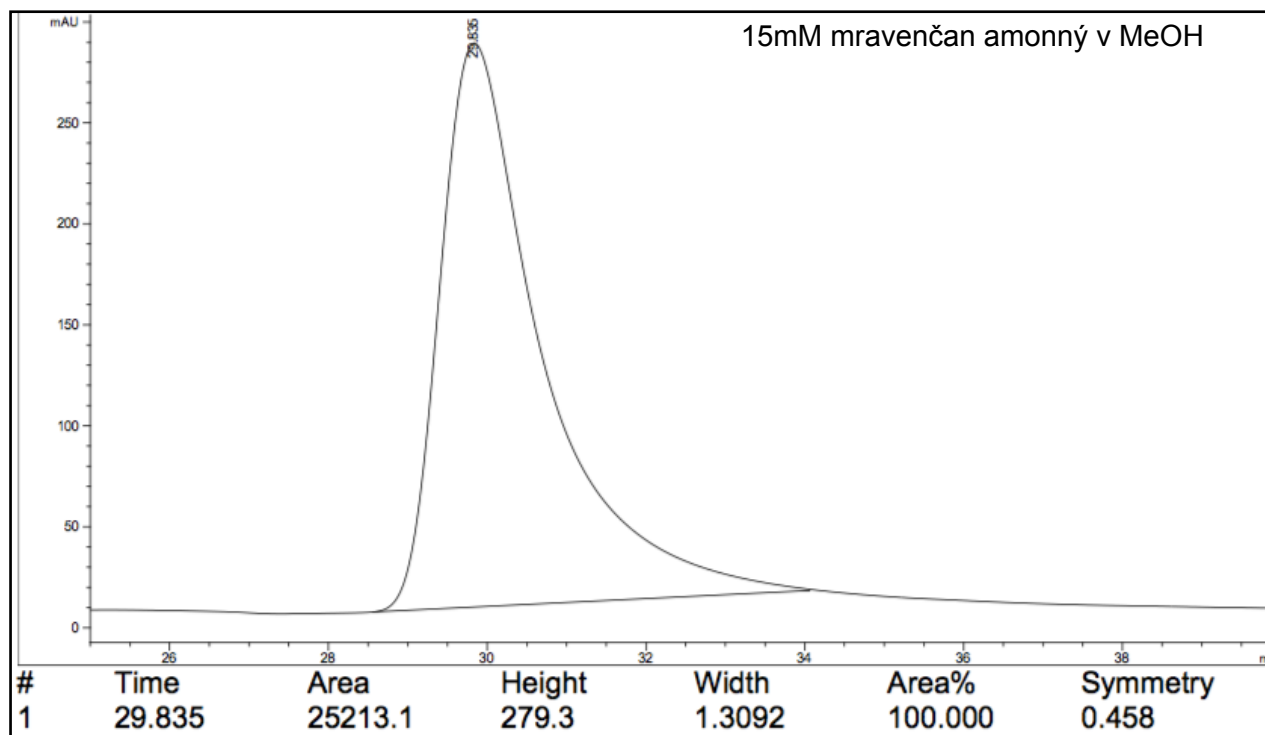
Poznámka:

Jako CSP byla použita Phenomenex Lux Amylose - 1. Jedná se polysacharidovou fázi derivatizovanou 3,5-dimetyfnylkarbamátem. Analyt interaguje se selektorem za vzniku vodíkových můstků, dipólových interakcí a π - π interakcí. Helikální struktura amylozy zajišťuje stericke prostředí a vyšší enantioselektivitu.

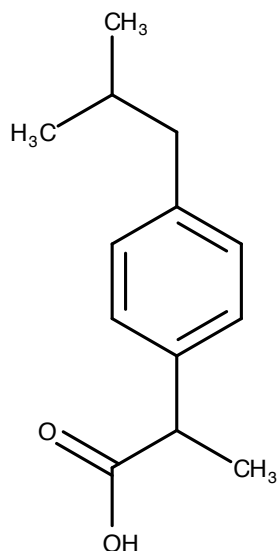
Úkol:

1. Porovnejte výsledky dělení na koloně Astec - Chirobiotic T (viz. níže) a Phenomenex Lux Amylose - 1.
2. Jaké se uplatňují interakce u obou typů kolon? A proč se dělení na polysacharidové CSP účinnější?

Chromatogram k úloze:



Ibuprofen



Název:

kyselina (2*RS*)-2-(4-isobutylfenyl)propanová

Charakteristika látky:

Ibuprofenum: bílý nebo téměř bílý krystalický prášek nebo bezbarvé krystaly prakticky nerozpustné ve vodě, snadno rozpustné v acetonu, v methanolu a v dichlormethanu. Teplota tání: 75 - 78° C

Farmakologické vlastnosti a indikace:

Nesteroidní antiflogistikum a antirevmatikum (revmatoidní arthritida, osteoarthritis, muskuloskeletální poranění, pooperační bolesti, dysmenorrhoea, bolesti hlavy)

Izolace:

Pět tablet přípravku Ibalgin 500 mg (2500 mg ibuprofenu) rozetřete a dejte do Erlenmeyerovy baňky. Přidejte 100 ml hexanu a nechte míchat při laboratorní teplotě 30 min. Poté zfiltrujte do předem zvážené baňky a filtrát odpařte na vakuové odparce.

Ověření čistoty vzorku:

Provedte TLC izolovaného ibuprofenu. Mobilní fáze: MeOH/DCM (1 : 9)

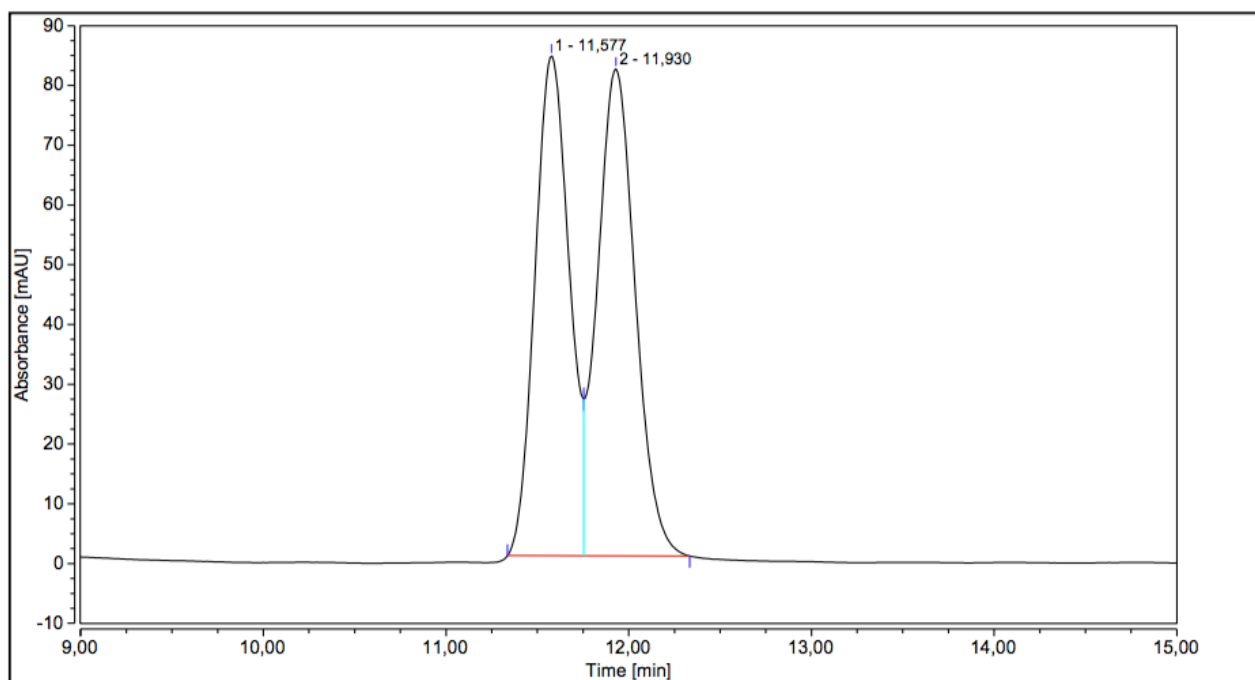
Příprava na analýzu:

Navážte 1 mg ibuprofenu do Eppendorfy. Rozpusťte ve 200 µl propan-2-olu a doplňte 800 µl heptanu. Obsah nasajte do stříkačky a zfiltrujte přes stříkačkový filtr do vialky.

Parametry analýzy:

Kolona: Phenomenex Lux 5 μm - Amylose - 1, 250 x 4,6 mm
Mobilní fáze: Propan-2-ol : heptan (20 : 80), isokratická eluce
Průtok: 0,5 ml/min
Teplota: 5° C
Detekce: UV - VIS - Vlnová délka: 230 nm

Chromatogram:



Integration Results							
No.	Peak Name	Retention Time min	Area mAU*min	Height mAU	Relative Area %	Relative Height %	Amount n.a.
1		11,577	18,136	83,654	48,04	50,65	n.a.
2		11,930	19,619	81,494	51,96	49,35	n.a.
Total:			37,755	165,148	100,00	100,00	

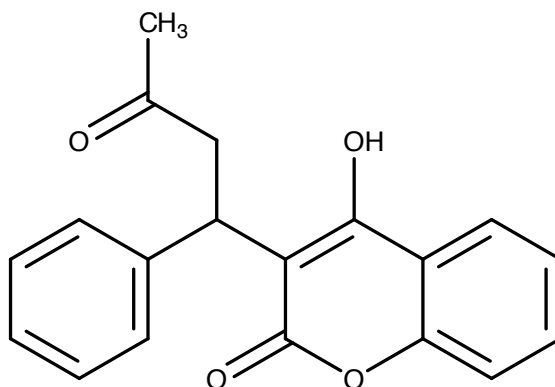
Poznámka:

Jako CSP byla použita Phenomenex Lux Amylose - 1. Jedná se polysacharidovou fázi derivatizovanou 3,5-dimethylfenylkarbamátem. Analyt interaguje se selektorem za vzniku vodíkových můstků, dipólových interakcí a π - π interakcí. Helikální struktura amylozy zajišťuje stérické prostředí a vyšší enantioselektivitu.

Úkol:

1. Který enantiomer ibuprofenu je účinnější?
2. Jaký bude rozdíl mezi výsledkem z TLC a chirální HPLC?

Warfarin



Název:

4-hydroxy-3-((1*R*S)-3-oxo-1-fenylbutyl)chromen-2-on

Charakteristika látky:

Warfarinum natricum: bílý nebo téměř bílý hygroskopický amorfní prášek velmi snadno rozpustný ve vodě a v ethanolu 96%, dobře rozpustný v acetonu, velmi těžce rozpustný v dichlormethanu. Teplota tání: 161° C

Farmakologické vlastnosti a indikace:

antikoagulancium, antagonistu vitamínu K (profylaxe a léčba tromboembolické choroby)

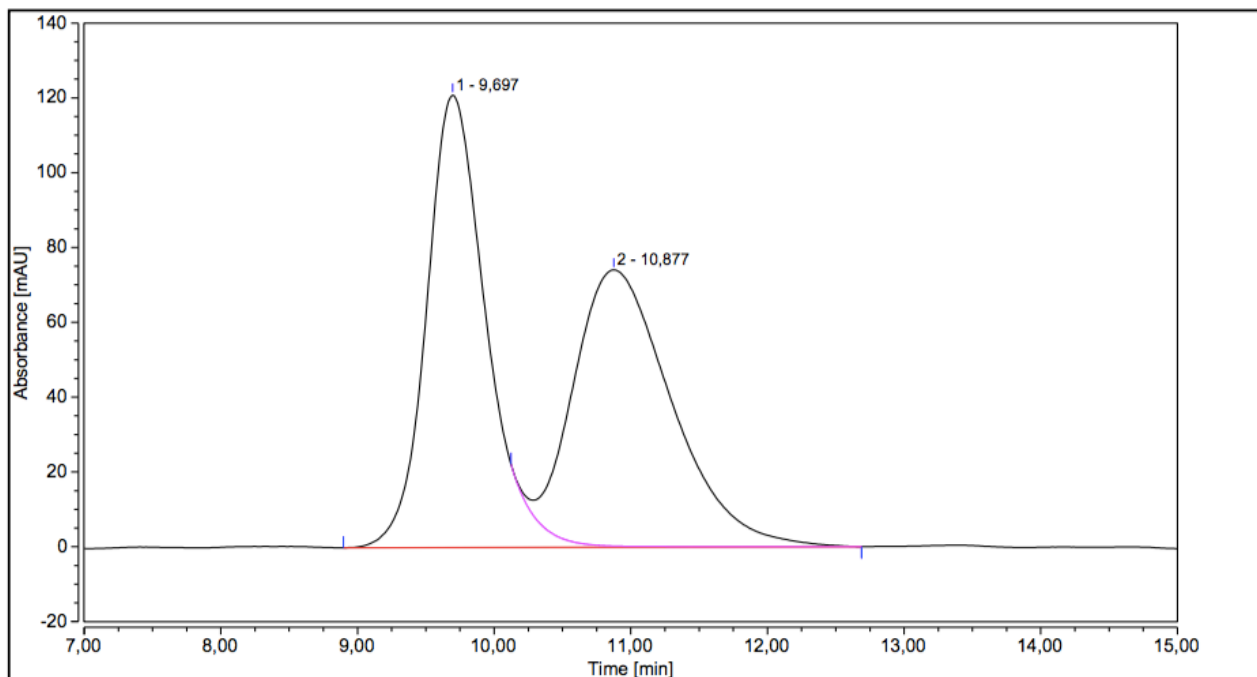
Příprava na analýzu:

Navažte 1 mg do Eppendorfky. Přidejte 200 µl ethanolu a 800 µl heptanu (0,2 % TFA)
Obsah nasajte do stříkačky a zfiltrujte přes stříkačkový filtr do vialky.

Parametry analýzy:

Kolona: Phenomenex Chirex 3022 - Chirex® (S)-ICA a (R)-NEA - ((S)-indolin)-2-karboxylová kyselina a (R)-1-(α-naftyl)ethylamine)
Mobilní fáze: ethanol : heptan - 0,2 % TFA (10 : 90), isokratická eluce
Průtok: 0,5 ml/min
Teplota: 5° C
Detekce: UV - VIS - Vlnová délka: 230 nm

Chromatogram:



Integration Results							
No.	Peak Name	Retention Time min	Area mAU*min	Height mAU	Relative Area %	Relative Height %	Amount n.a.
1		9,697	61,228	120,943	50,07	62,10	n.a.
2		10,877	61,058	73,823	49,93	37,90	n.a.
Total:			122,286	194,766	100,00	100,00	

Poznámka:

Jako CSP byla použita Chirex 3022 - Chirex® (S)-ICA a (R)-NEA. Jedná se na Pirklovu chirální stacionární fázi. Na silikagel je navázána (S)-indolin-2-karboxylová kyselina, (R)-1-(α -naftyl)ethylamin a močovinnový můstek.

Úkol:

1. Jaká významná interakce se uplatňuje při dělení na Pirklových fázích?
2. Které části molekuly warfarinu pravděpodobně interagují s CSP?

Použitá literatura:

1. Anzenbacher, P.; Jezdinský, J., Léčiva a chiralita. Klinická farmakologie a farmacie 2003, 148-150.
2. Appelgren, C. H.; Eskilsson, E. C., Metoprolol succinate. Google Patents: 1992.
3. Bilcer, G. M.; Devasamudram, T.; Ankala, S. V.; Lilly, J. C.; Liu, C.; Lei, H.; Ghosh, A. K.; Inoue, M., Pyrrolidine compounds as inhibitors of beta-secretase activity and their preparation and use in the treatment of Alzheimer's disease. PCT Int. Appl. 2010, (WO2010110817A1), 222.
4. Burdock, G. A., Fenaroli's Handbook of Flavor Ingredients, Sixth Edition. CRC Press: 2009.
5. Dohnal, J.; Grafnetterová, T.; Grünwaldová, V.; Havlíček, J.; Jampílek, J.; Opatřilová, R.; Pekárek, T.; Plaček, L.; Tisovská, L., Moderní přístupy k farmaceutické analýze. In 1. Analýza chirálních léčiv, Veterinární a farmaceutická univerzita Brno: Brno, 2009; Vol. 1., 122.
6. Domingo, C. A.; Comely, A.; Verdaguer, E. X.; Rafecas, J. L., A process for the preparation of the (s)-enantiomer of omeprazole. Google Patents: 2007.
7. Hampl, F.; Paleček, J., Farmakochemie. Vysoká škola chemicko-technologická v Praze: Praha, 2002; Vol. 1.
8. Honetschlägerová - Vadinská, M. Chirální separace biologicky významných látek pomocí vysokoúčinných separačních metod za využití makrocyclických antibiotik Univerzita Karlova, Praha, 2009.
9. Kazakevich, Y. V.; LoBrutto, R., HPLC for Pharmaceutical Scientists. Wiley: 2007.
10. McMurry, J., Organická chemie. VUT v Brně VŠCHT v Praze: Brno, Praha 2007; Vol. 1., 1270.
11. ČR, Ministerstvo zdravotnictví., Český lékopis 2009 – Doplněk 2013. Grada Publishing, a.s.: 2013.
12. Rang, H., P.; Ritter, J., M.; Flower, R., J.; Henderson, G., Rang and Dale's Pharmacology. 8th ed.; Elsevier Churchill Livingstone: London, 2015; 776.
13. Sabbah, D. A.; Saada, M.; Khalaf, R. A.; Bardaweel, S.; Sweidan, K.; Al-Qirim, T.; Al-Zughier, A.; Halim, H. A.; Sheikha, G. A., Molecular modeling based approach, synthesis, and cytotoxic activity of novel benzoin derivatives targeting phosphoinositide 3-kinase (PI3K α). Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters 2015, 25 (16), 3120-3124.

14. Sharp, V. S.; Stafford, J. D.; Forbes, R. A.; Gokey, M. A.; Cooper, M. R., Stereoselective high-performance liquid chromatography and analytical method characterization of evacetrapiib using a brush-type chiral stationary phase: A challenging isomeric separation requiring a unique eluent system. *Journal of Chromatography A* 2014, 1363, 183-190.
15. Svobodová, D. Chirální analýza residuí léčiv v odpadních vodách. Vysoké učení technické v Brně, Brno, 2011.
16. Yang, S.; Feng, K.; Zhu, Y.; Yang, B.; Guo, T.; Zhao, T.; Xie, G., Process for preparation of chloramphenicol. *Faming Zhuanli Shenqing* 2012, (CN102399160A), 7.
17. Chirální separace, Dostupné z: http://www.hplc.cz/Chiral/index.htm#_Cyclodextriny
18. Přírodovědci.cz. Dostupné z: <http://www.prirodovedci.cz/zeptejte-se-prirodovedcu/878>
19. National Center for Biotechnology Information. PubChem Compound Database. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pccompound>
20. SPC léčivých přípravků - SÚKL. Dostupné z: <http://www.sukl.cz>
21. Chirex Chiral HPLC Columns. Dostupné z: <http://www.phenomenex.com/chirex>
22. Polysaccharide Chiral Columns. Dostupné z: <http://www.phenomenex.com/Products/HPLCDetail/lux>
23. Astec CHIROBIOTIC® T Chiral HPLC Column. Dostupné z: <http://iss-store.co.uk/catalog/astec-hplc-columns/astec-chirobiotic-columns/astec-chirobiotic-t-chiral-hplc-column-12023ast>
24. Loukotková, L. Studium enantioseparace vybraných substituovaných binaftylů. Univerzita Karlova, Praha, 2009.