

Chirální separace pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie

Zadání úlohy:

a) Skupinové zadání

Porovnejte vliv složení mobilní fáze na chirální separace jednotlivých β -blokátorů na vankomycinové koloně (Chirobiotic V, resp. Chirobiotic V2). Diskutujte retenci, rozlišení a symetrii píků enantiomerů.

Na základě chemické struktury (viz obr. 1) diskutujte eluční obecné pořadí jednotlivých β -blokátorů.

Vankomycinové chirální stacionární fáze mohou být použity v různých chromatografických módech. Vyhledejte v literatuře, který mód je použit v této úloze. Pozor, úloha se nachází na rozhraní mezi dvěma módy.

Proveďte derivatizace vybrané aminokyseliny (alanin) fluorescenčním derivatizačním činidlem

b) Meziskupinové zadání

Porovnejte vliv pokrytí vankomycinových chirálních stacionárních fází (Chirobiotic V a V2) na enantioselektivní potenciál těchto fází pro vybrané β -blokátory (alprenolol, oxprenolol, propranolol).

Teoretický úvod:

Fenomén chiralit se vyskytuje u většiny přírodních látek a mnoha látek synteticky připravených. Levé a pravé formy (enantiomery, popř. atropisomery) se v achirálním prostředí nedají odlišit, zatímco v chirálním prostředí, jakým je například lidské tělo, vykazují odlišné vlastnosti. Mnohé metabolické cesty jsou stereoselektivní, proto je nutno se podrobně zabývat chirálními a prochirálními látkami, které do organismu vstupují. Jedním z důsledků rozdílných enantioselektivních interakcí v organismu jsou totiž odlišné terapeutické účinky enantiomerů léčiv.

Velkým impulsem pro sledování enantiomerní čistoty farmaceutických produktů byl všeobecně nechvalně známý případ thalidomidu, který způsobil v 60. letech minulého století velké problémy, zvláště ve Švédsku. Thalidomid byl prodáván jako racemát a podáván jako neškodný lék těhotným ženám proti ranní nevolnosti. Přitom R-enantiomer působí jako sedativum, zatímco S-enantiomer má teratogenní účinky.

Současné požadavky na čistotu farmaceutických přípravků zahrnují i nutnou studii na enantiomerní čistotu resp. znalost účinků obou enantiomerů, pokud je přípravek používán ve formě racemátu. Uvádí se, že v současné době je z 50 % chirálních léčiv na trhu asi 75 % v racemické podobě a pouze 25 % je tvořeno jedním enantiomerem. Lze však předpokládat, že bude docházet stále více k posunu ve prospěch čistých enantiomerů.

Jednou z nejpoužívanějších metod pro separaci enantiomerů je vysokoúčinná kapalinová chromatografie (High Performance Liquid Chromatography, HPLC). Tato metoda je založená na interakci enantiomerů analytu s chirální stacionární fází umístěné v chromatografické koloně. Protože je stacionární fáze chirální, jednotlivé enantiomery s ní interagují různými interakcemi a v různé míře. Důsledkem je pak odlišná retence (zadržení, zpoždění) enantiomerů na koloně, což vede k jejich separaci. Používaných chirálních stacionárních fází existuje velké množství. Mohou být založené na cyklických oligosacharidech (cyklodextrinové, cyklofruktanové), polysacharidech (amylosové, celulosové), crown-etherech a dalších sloučeninách. V neposlední řadě existují chirální stacionární fáze na bázi makrocyclických antibiotik, které budou využity v této úloze. Mezi neznámější makrocyclická antibiotika používaná jako chirální selektory patří teikoplanin, ristocetin a vankomycin (viz obr 2.). Poslední jmenovaný se osvědčil při chirálních separacích látek ze skupiny β - blokátorů, proto bude využit v této úloze.

Základní charakteristiky popisující chromatografický proces jsou:

Retenční faktor k

$$k = \frac{(t_R - t_M)}{t_M}$$

Kde t_R je retenční čas analytu (tj. doba od nadávkování vzorku po čas, kdy detektor zaznamená maximum píku), t_M je mrtvý čas (tj. retenční čas látky neinteragující se stacionární fází). Mrtvý čas je možné určit ze systémového píku po nástřiku metanolu,

Rozlišení R dvou píků

$$R = \frac{(t_{R2} - t_{R1})}{(w_2 + w_1)}$$

kde w_1 , w_2 jsou šířky píků při základně. Rozlišení $R = 1,5$ se obecně považuje za separaci látek až na základní linii, odpovídá 99,7% separaci látek.

Separční faktor α

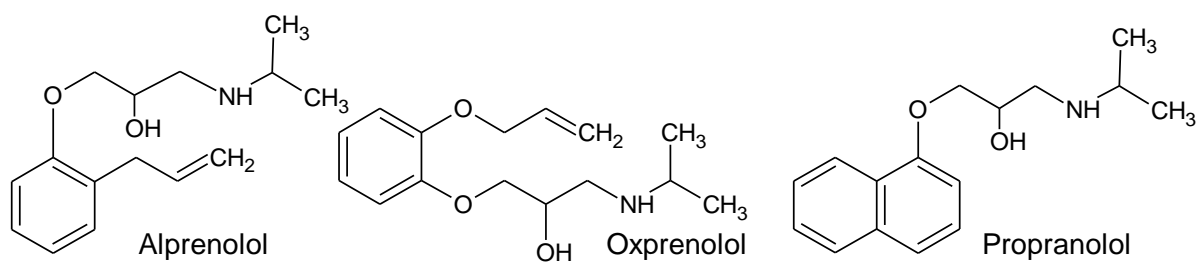
$$\alpha = \frac{k_2}{k_1}$$

kde k_1 , k_2 jsou retenční faktory jednotlivých píků.

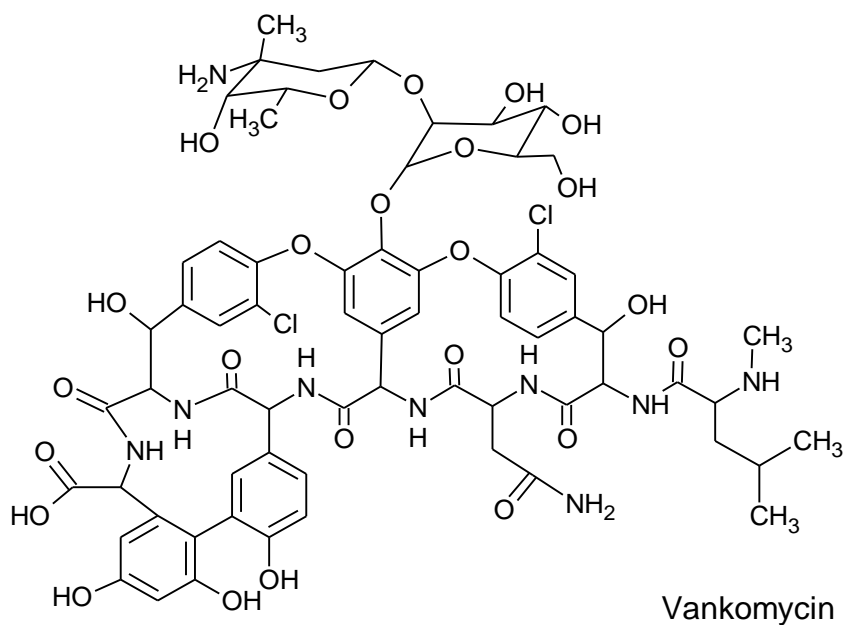
Symetrie píků, resp. asymetrický faktor A_s ,

$$A_s = B/A,$$

kde A, B jsou pološířky píku v 10 % jeho výšky ke kolmici na základnu spuštěné z vrcholu píku – z náběžné strany (A) a z druhé (často chvostující) (B).



Obr 1: Analyzovaná léčiva ze skupiny β -blokátorů.



Obr 2: Makrocyclické antibiotikum vankomycin, které tvoří základ chirálních stacionárních fází použitých v této úloze.

Přístroje:

HPLC s kolonou Chirobiotic V, resp. Chirobiotic V2. Detekce se provádí při vlnové délce 254 nm.

Ultrazvuk

Magnetická míchačka

pH-metr

Pomůcky a chemikálie:

roztoky standardů alprenololu, oxprenololu, propranololu, (1 mg/mL v MeOH)

D/L-alanin, standard

triethylamin, HPLC grade

kyselina octová, HPLC grade

9-fluorenylmethylchlorformen (FMOC-Cl), standard

methanol, HPLC grade

acetonitril, HPLC grade

deionizovaná voda

připravený 0,2 M roztok NaHCO₃, pH 8,5

zásobní láhve na mobilní fáze

odměrné válce

automatická pipeta a špičky

kádinky

Pracovní postup:

- 1) Pozorně si přečtete celý návod. V případě nejasností kontaktujte vedoucí praktika.
- 2) Kolona je již ekvilibrovaná mobilní fází 70/30 MeOH/TEEA (v/v), pH = 5, kde TEAA je vodný triethylamonium octanový pufr o koncentraci 0,5%. Seznamte se s ovládáním přístroje. Pro ověření funkčnosti systému proveďte dvakrát nadávkování MeOH, ze kterých určíte mrtvý čas systému.
- 3) Proveďte analýzu roztoků β -blokátorů (1 mg/mL). Každá analýza by se měla provést třikrát, ale vzhledem k nedostatku času proveďte dvakrát pouze analýzu prvního vzorku. Budou-li retenční časy shodné, proměřte následující dva vzorky pouze jednou.
- 4) Během bodu 2) připravte do zásobní láhve 300 ml vodného triethylamonium octanového pufru o koncentraci 0,5%, pH = 5. Připravený pufr vložte na 20 minut do ultrazvuku, aby z něj unikl plyn.
- 4) Za dozoru vedoucích praktika vyměňte lahve s mobilními fázemi a ekvilibrujte kolonu mobilní fází s připraveným pufrem MeOH/TEEA 90/10 (v/v), pH = 5, po dobu 30 minut.
- 5) Během ekvibrace kolony vyhodnoťte chromatogramy z bodu 2)
- 6) Proveďte analýzu roztoků β -blokátorů (1 mg/mL) v 90/10 MeOH/TEEA (v/v), pH = 5. V případě, že používáte Chirobitic V, proveďte první analýzu dvakrát. Budou-li se retenční časy shodovat, proměřte zbývající dva vzorky pouze jednou. V případě, že používáte Chirobitic V2, každou analýzu proveďte pouze jednou.
- 8) 1 mg D/L-alaninu rozpust'ete v 1 ml 0,2 M NaHCO₃ a nařeďte na koncentraci 2 μ g/ml, derivatizační činidlo připravte o koncentraci 1 mg FMOC-Cl v 1 ml acetonitrilu a pak ho nařeďte na koncentraci 20 μ g/ml. Poté smíchejte 500 μ l racemátu aminokyseliny s 500 μ l derivatizačního činidla. Směs intenzivně protřepávejte 2 minuty a pak centrifugujte při 500 ot/min po dobu 5 minut. Centrifugát analyzujte a získaný chromatogram interpretujte z hlediska dosaženého enantiorozlišení, doby analýzy a citlivosti detekce.
- 7) Nastavte promývání kolony dle pokynů vedoucích praktika a vyhodnoťte chromatogramy z bodu 6)

Chirobiotic V	Odhadovaný čas:
Příprava, seznámení se s ovládáním stroje	10 min
Nadávkování MeOH	7 min
MeOH/TEEA 70/30 (v/v)	42 min Alprenolol - 10 min X 2, $R = 0,2$ Oxprenolol - 10 min, $R = 0,5$ Propranolol -12 min, $R = 0,3$
Ekvilibrace kolony	40 min
MeOH/TEEA 90/10 (v/v)	61 min Alprenolol - 15 min X 2, $R = 1,37$ Oxprenolol - 15 min, $R = 1,1$ Propranolol -16 min, $R = 1,39$
Celková časová dotace:	160 min

Chirobiotic V2	Odhadovaný čas:
Příprava, seznámení se s ovládáním stroje	10 min
Nadávkování MeOH	7 min
MeOH/TEEA 70/30 (v/v)	52 min Alprenolol - 12 min X 2, $R = 1,22$ Oxprenolol - 12 min, $R = 0,4$ Propranolol -16 min, $R = 1,05$
Ekvilibrace kolony	40 min
MeOH/TEEA 90/10 (v/v)	69 min Alprenolol - 22 min, $R = 1,52$ Oxprenolol - 21 min, $R = 1,0$ Propranolol - 26 min, $R = 1,48$
Celková časová dotace:	178 min

Odhadované časy jsou nadhodnocené, skutečné analýzy jsou kratší.

Literatura:

1. Bosáková, Z., Cuřínová, E., Tesařová, E.: *J. Chromatogr. A* 1088 (2005) 94 - 103.
2. Vadinská, M., Srkalová, S., Bosáková, Z., Coufal, P., Tesařová, E.: *J.Sep.Sci* 32 (2009) 1704-1711.