

PŘEHLEDY A ODBORNÁ SDĚLENÍ

ČESKÁ A SLOVENSKÁ FARMACIE
Ročník LIV – Číslo 4 – ČERVENEC 2005

POKROKY V ENANTIOSELEKTIVNÍ TLC LÉČIV

ŠUBERT J., ŠLAIS K.¹

Veterinární a farmaceutická univerzita Brno, Farmaceutická fakulta, Ústav chemických léčiv
¹Akademie věd ČR Brno, Ústav analytické chemie

SOUHRN

Pokroky v enantioselektivní TLC léčiv

Enantioselektivní TLC je dosud se vyvíjející oblastí analýzy léčiv. V posledních letech byla podobně, jako je tomu v HPLC, publikována především přímá dělení enantiomerů bez jejich předchozí derivatizace. Přednostně k nim byly použity chirální stacionární fáze, dělení s chirálním selektorem v mobilní fázi byla méně častá. K širšímu využití enantioselektivní TLC v budoucnosti by mohl přispět větší výběr chirálních stacionárních fází komerčně dostupných.

Klíčová slova: enantiomery – TLC – léčiva

Čes. slov. Farm., 2005; 54, 159–162

SUMMARY

Advances in Enantioselective TLC of Therapeutic Agents

Enantioselective TLC represents a still developing field of analysis of therapeutic agents. In recent years, similarly as in HPLC, mainly direct separations of enantiomers without their preceding derivatization have been published, preferentially using chiral stationary phases, separations with a chiral selector in the mobile phase being less frequent. In the future, a larger choice of commercially available chiral stationary phases could contribute to a more widespread use of enantioselective TLC.

Key words: enantiomers – TLC – therapeutic agents

Čes. slov. Farm., 2005; 54, 159–162

Má

Chiralita je považována za jeden z nejdůležitějších stereochemických fenoménů v oblasti léčiv. Důvodem k tomu je při vysokém podílu chirálních léčiv zejména význam chiralit pro bezpečnost a účinnost jejich aplikace. Vzhledem k obvyklým rozdílům v biologické aktivitě enantiomerů je často nutné směsi enantiomerů či racemáty analyticky, anebo i preparativně dělit a zastoupení jednotlivých enantiomerů pokud možno i kvantifikovat. Přehled klasických i novějších metod používaných k dělení enantiomerů je podán např. v práci ¹⁾. Z analytických metod nevyžadujících předběžné oddělení enantiomerů probíhá již nějakou dobu zajímavý vývoj zejména v oblasti elektrochemických senzorů ²⁾, těžiště však stále spočívá v metodách chromatografických a elektromigračních ³⁾. Za základní metodu je stále považována HPLC, kterou lze (na roz-

díl od elektromigračních metod) používat i k preparativním dělením. Podstatně méně nákladnou, ale současně i méně účinnou možností je TLC, která je technikou dobře použitelnou i v této oblasti ⁴⁾. Pokroky v enantioselektivní TLC byly předmětem sdělení ^{5, 6)}, z nichž ⁵⁾ se omezuje na případy, kdy enantiomery nebyly před dělením chemickou reakcí derivatizovány na látky dělitelné snadněji. Autoři ⁷⁾ shrnuli výsledky dosažené v oblasti dělení enantiomerů aminokyselin na tenkých vrstvách impregnovaných chirálním selektorem. Obsahem našeho příspěvku je shrnutí pokroků v enantioselektivní TLC léčiv bez předchozí derivatizace enantiomerů publikovaných v posledních letech a v dělení enantiomerů léčiv po jejich derivatizaci od roku 1990.

Dělení enantiomerů léčiv bez jejich předchozí derivatizace na chirální stacionární fázi

Dělení enantiomerů léčiv s použitím chirální stacionární fáze (chiral stationary phase, dále CSP) je v enantioselektivní TLC, podobně jako v HPLC, trendem, přestože stále chybí větší výběr komerčně dostupných CSP a tenkých vrstev. Novější vývoj v oblasti stacionárních fází pro TLC včetně CSP shrnuje práce ⁸⁾. Z CSP nezahrnutých do citovaného přehledu je třeba zmínit tribenzoát celulosy, který je komerčně dostupný ve formě suspenze ⁹⁾. Použití CSP založené na tribenzoátu celulosy při enantioselektivní TLC léčiv bylo publikováno spolu s použitím CSP založených na tris(4-metybenzoátu) nebo tris(4-nitrobenzoátu) celulosy ¹⁰⁾. Dále byly k dělení enantiomerů léčiv použity CSP založené na tris(3,5-dinitrobenzoátu) ¹¹⁾ a tris(4-brombenzoátu) celulosy ¹²⁾. CSP založená na tris(4-brombenzoátu) celulosy může být použita jak v normálním modu, tak při chromatografii s obrácenými fázemi ¹²⁾. Společným problémem CSP na bázi benzoátů celulosy je vysoká absorpce ultrafialového záření samotnou vrstvou, která komplikuje obvyklou nedestruktivní detekci chromatogramů. Tento problém nevystupuje u CSP založených na tris-cyklohexylkarbamátech celulosy nebo amylosy ¹³⁾, které byly vyvinuty pro HPLC a doporučeny i pro TLC ¹³⁾. Další skupinou CSP v TLC nových a dříve prakticky nepoužívaných jsou cyklodextriny chemicky vázané na silikagelu ^{14, 15)}. Může jít o samotný β -cyklodextrin ¹⁴⁾, anebo o jeho fenylkarbamát ¹⁵⁾. Vhodnými mobilními fázemi byly směsi methanolu s vodou nebo s acetonitrilem s přísadkou triethylamonium-acetátu ¹⁴⁾ nebo směsi hexanu s 2-propanolem, či acetonitrilu s methanolem, rovněž s přísadkou triethylamonium-acetátu ¹⁵⁾.

Oproti očekávání nedošlo zatím k většímu rozšíření ve skupině CSP založených na molekulárně předtištěných polymerech (molecularly imprinted polymers, dále MIP). K dříve zveřejněným pracím přibýly příspěvky popisující použití CSP založené na polymeru předtištěném (-)-S-timololem ¹⁶⁾ a dále na polymeru předtištěném molekulami enantiomerů β -blokátoru (+)-R-propranololu, nebo (-)-S-atenololu, anebo nesteroidního antiflogistika (+)-S-naproxenu, či (+)-S-ibuprofenu ¹⁷⁾. Vzhledem k účinnosti těchto CSP bylo vyhovujících dělení dosahováno již na krátkých dráhách (6–7 cm) a při krátké době dělení. Vhodnými mobilními fázemi byly acetonitril obsahující 5 % kyseliny octové, případně i methanol obsahující 1 % kyseliny octové ¹⁶⁾ nebo směs heptanu s tetrahydrofuranem 1+1 obsahující 1 % kyseliny octové, či acetonitril s 5 % kyseliny octové ¹⁷⁾.

Několik dalších popisuje úspěšná dělení enantiomerů léčiv na CSP získaných impregnací achirální tenké vrstvy silikagelu vhodným chirálním selektorem ^{18–23)}. Tím byla zpravidla L-aminokyselina (L-arginin ²³⁾, L-asparagová kyselina ²⁰⁾, L-histidin ¹⁸⁾, L-serin ^{21, 22)}, L-threonin, nebo směs L-serinu s L-threoninem ²²⁾, méně často jiná látka, jako (-)-chinin ¹⁹⁾ nebo L-vinná kyselina ¹⁸⁾. Při použití těchto CSP je v některých případech nezbytnou podmínkou úspěšného dělení nalezení optimální teploty. Ta je v některých případech nižší, než je teplota obvyklá (např. byla 18 °C pro dělení enantiomerů valinu ¹⁹⁾ anebo

17 °C pro dělení všech analytů v práci ²⁰⁾). Mimořádně významná pro úspěšné dělení byla také hodnota pH suspenze pro přípravu tenké vrstvy jako stacionární fáze, která má být vhodná pro vznik diastereomerů interakcí chirálního selektoru a dělených látek. Například v práci ¹⁸⁾ bylo vhodné pH 7–8, v jiných případech ^{21, 22)} pH 6–7. Změna pH z 6–7 na 4–5 nebo 8–9 vedla ke zhoršení až úplné ztrátě rozdělení enantiomerů ²²⁾. Vhodnými mobilními fázemi byly směsi acetonitrilu s methanolem a s vodou ^{18, 20–22)}, nebo chloroformu s 1-butanolem a s kyselinou octovou, či ethylacetátu s tetrachlormethanem a s kyselinou propionovou ¹⁹⁾.

Mimoto byly hledány další možnosti použití komerčně dostupných CSP založených na chromatografii výměnou ligandu. Mezi tyto práce patří příspěvek zabývající se dělením enantiomerů léčiv ze skupiny 1,4-dihydropyridinů na deskách Chiralplate ²⁴⁾. Výsledky těchto dělení, vyjádřené jako rozdíl retenčních faktorů enantiomerů však nejsou příliš přesvědčivé.

Přehled úspěšných dělení enantiomerů léčiv s použitím CSP je v tabulce 1.

Systémy s chirálním selektorem v mobilní fázi

Novinkou v enantioselektivní TLC léčiv je použití 2-hydroxy-3-trimethylamoniumpropyl- β -cyklodextrinu, které umožnilo zkrácení doby rozdělení racemátu aminoglutethimidu ze 4 hodin při použití β -cyklodextrinu na 30 minut ²⁵⁾. Stacionární fází při tomto dělení byl silikagel, mobilní fází 50% methanol obsahující 30 % chirálního selektoru ²⁵⁾. Stále používaným a často úspěšným chirálním selektorem je D-10-kafrsulfonová kyselina ^{26–28)}. V posledních letech byla použita k rozdělení enantiomerů norsynefrinu a klorprenalinu ²⁶⁾, salbutamolu a timololu ²⁷⁾ a dalších dvou atypických léčiv (Bataroc a Labarol) ²⁸⁾. Mobilní fází byly směsi dichlormethanu s methanolem v různém poměru obsahující chirální selektor ^{26, 28)}, stacionární fází byl silikagel ^{26–28)}. Podmínkou úspěšného dělení podle ²⁷⁾ byla teplota 0 °C, podle ²⁸⁾ teplota 2–4 °C. Snaha o rozdělení enantiomerů thyroxinu za použití methyl- β -cyklodextrinu anebo hovězího sérového albuminu jako chirálních selektorů v mobilní fázi nevedla k přesvědčivým výsledkům ²⁹⁾.

Dělení enantiomerů léčiv po jejich derivatizaci

Derivatizací analytu se obvykle rozumí vznik kovalentní vazby mezi analytem a derivatizačním činidlem (reagentem). Prakticky je derivatizace využitelná pokud molekula analytu obsahuje snadno derivatizovatelnou skupinu, jako např. primární nebo sekundární aminoskupinu, hydroxyl, popř. karboxylovou skupinu. Reagenty jsou proto obvykle acylační činidla jako chloridy kyseliny, isothiokyanáty a esterifikační činidla. Derivatizace enantiomerních analytů pro chromatografickou separaci byly shrnuty v přehledu z roku 1990 ³⁰⁾. V tomto příspěvku zachycujeme vývoj v oblasti derivatizace enantiomerů léčiv pro TLC za posledních 15 let.

Cíle derivatizace pro chromatografickou separaci enantiomerů jsou:

Tab. 1. Novější dělení enantiomerů léčiv TLC s použitím CSP

Léčivo	chirální selektor	literatura
alanin	(-)-chinin	19
atenolol	tris(3,5-dinitrobenzoát) celulosy	11
	tris(4-brombenzoát) celulosy	12
	MIP tištěný S-timololem	16
	L-asparagová kyselina	20
atropin	L-histidin	18
efedrin	L-vinná kyselina	18
chlorochin	tris(4-methylbenzoát) celulosy	10
	tris(3,5-dinitrobenzoát) celulosy	11
ibuprofen	fenylkarbamát β -cyklodextrinu	15
	fenylkarbamát β -cyklodextrinu	15
ibuprofen	L-arginin	23
	L-serin	21
isoleucin	(-)-chinin	19
isoprenalin	β -cyklodextrin	14
karvedilol	β -cyklodextrin	14
ketokonazol	fenylkarbamát β -cyklodextrinu	15
	tris(3,5-dinitrobenzoát) celulosy	11
ketoprofen	MIP tištěný S-naproxenem	17
	L-serin	21,22
	L-serin + L-threonin	22
	L-threonin	22
leucin	(-)-chinin	19
methionin	(-)-chinin	19
metoprolol	L-asparagová kyselina	20
nimodipin	tris(4-brombenzoát) celulosy	12
	β -cyklodextrin	14
ofloxacin	tribenzoát celulosy	10
	tris(4-methylbenzoát) celulosy	10
	tris(4-nitrobenzoát) celulosy	10
	tris(3,5-dinitrobenzoát) celulosy	11
	β -cyklodextrin	14
pranoprofen	tris(3,5-dinitrobenzoát) celulosy	11
	L-serin	22
	L-serin + L-threonin	22
	L-threonin	22
promethazin	tribenzoát celulosy	10
	tris(4-methylbenzoát) celulosy	10
	tris(4-brombenzoát) celulosy	12
	β -cyklodextrin	14
	fenylkarbamát β -cyklodextrinu	15
propranolol	tribenzoát celulosy	10
	tris(4-methylbenzoát) celulosy	10
	tris(3,5-dinitrobenzoát) celulosy	11
	tris(4-brombenzoát) celulosy	12
	MIP tištěný S-timololem	16
	MIP tištěný R-propranololem	17
threonin	L-asparagová kyselina	20
	(-)-chinin	19
tiaprofenová kyselina	L-serin	21
	L-serin + L-threonin	22
timolol	MIP tištěný S-timololem	16
valin	(-)-chinin	19

a) Umožnění separace enantiomerů v achirálních chromatografických systémech, čehož se dosahuje reakcí enantiomerů s chirálním reagentem za vzniku diastereomerů. Tyto nejsou, na rozdíl od enantiomerů, ekvivalentní vzhledem k vazebným interakcím se stacionární fází, a mohou tudíž být odděleny i v separačním systému, který není chirální.

b) Zlepšení detegovatelnosti analytů.

Častá je kombinace obou hledisek, tj. použití chirální derivatizace k získání dobře separovatelných a dobře detegovatelných diastereomerů. Tato kombinace je významná zejména při sledování nízkých koncentrací enantiomerů. Na druhé straně představuje derivatizace zvýšení pracnosti a časové náročnosti, což poněkud stírá přednosti TLC, jakými jsou rychlost a jednoduchost.

LeFewre³¹⁻³⁵) systematicky studoval RP TLC separaci biogenních aminokyselin derivatizovaných dansyl skupinou pro dosažení citlivější detekce. Za použití β -cyklodextrinu jako chirálního selektoru v mobilní fázi dosáhl rozdělení enantiomerů všech proteinogenních aminokyselin kromě prolinu a tryptofanu³¹). Obdobný systém použil pro ¹⁴C značený L-valin³²) a další ¹⁴C značené aminokyseliny³³). Při studiu vztahu mezi strukturou a rozlišením 20 aminokyselin³⁴) pozoroval nárůst rozlišení enantiomerů s rostoucí délkou postranního řetězce aminokyseliny. TLC danylovaných aminokyselin použil i pro ověření enantiomerní čistoty léčiv gramicidinu, cyklosporinu a dalších malých peptidů po jejich rozštěpení³⁵).

Kombinaci přípravy diastereomerů a získání žlutého zbarvení vhodného pro optickou detekci v TLC umožňuje komerčně dostupný 1-fluoro-2,4-dinitrophenyl-5-L-alanin amid známý jako Marfeyovo činidlo. Činidlo bylo využito při RP TLC 17 aminokyselin po jejich derivatizaci³⁶) a bylo dosaženo dostatečného rozlišení a stability reakčních produktů vhodných pro kvantifikaci enantiomerů. Dále bylo Marfeyovo činidlo úspěšně použito pro rychlou RP TLC separaci enantiomerů jednoduchých aminoalkoholů a aminů včetně norefedrinu³⁷).

Molekula β -blokátoru pindololu má jedno asymetrické centrum a sekundární aminoskupinu vhodnou pro derivatizaci. K derivatizaci před RP TLC separací byl s výhodou použit 2,3,4,6-tetra-O-acetyl- β -D-glukopyranosylisothiokyanát³⁸).

ZÁVĚR

Enantioselektivní TLC má ve srovnání s HPLC všechny výhody a nevýhody tenké vrstvy ve srovnání s kolonou. Mimo jiné je její materiální zajištění vzhledem k obvyklé ceně kolon s chirální stacionární fází řádově levnější. Nejen proto by si zasloužila při analytických aplikacích větší pozornost, než se jí dosud dostalo. V rámci enantioselektivní TLC léčiv byla v posledních letech, podobně jako v HPLC, publikována především přímá dělení enantiomerů bez jejich předchozí derivatizace, přednostně s použitím chirálních stacionárních fází. Použití chirálních selektorů v mobilní fázi je méně časté. K širšímu využití enantioselektivní TLC by mohl v přispět větší výběr komerčně dostupných CSP, který je dosud minimální.

LITERATURA

1. Maier, N. M., Franco, P., Lindner, W.: J. Chromatogr. A, 2001; 906, 3-33.
2. Stefan, R.-I., van Staden, J. F., Aboul-Enein, H. Y.: Cryst. Eng., 2001; 4, 113-118.
3. Gubitz, G., Schmid, M. G.: Biopharm. Drug. Dispos., 2001; 22, 291-336.
4. Berezniński, Y., Thompson, R., O'Neill, E., Grinberg, N.: J. AOAC Int., 2001; 84, 1242-1251.
5. Šubert, J., Šlais, K.: Pharmazie, 2001; 56, 355-360.
6. Zhu, Q., Deng, Q., Zeng, L.: Yaowu Fenxi Zazhi, 2002; 22, 155-158.
7. Bhushan, R., Martens, J.: Biomed. Chromatogr., 2001; 15, 155-165.
8. Gocan, S.: J. Chromatogr. Sci., 2002; 40, 538-549.
9. Lepri, L., Del Bubba, M., Cincinelli, A., Boddi, L.: J. Planar. Chromatogr., 2001; 14, 134-136.
10. Xu, L., He, J., Liu, L., Deng, Q. Y.: Fenxi Ceshi Xuebao, 2003; 22 (2), 1-4.
11. Xu, L., Liu, L., He, J., Ma, G., Deng, Q.: Zhongshan Daxue Xuebao, Ziran Kexueban Guangzhou, 2002; 41, 115-117.
12. Xu, L., He, J., Liu, L., Ma, G., Deng, Q.: Fenxi Huaxue, 2003; 31, 537-540.
13. Kubota, T., Yamamoto, C., Okamoto, Y.: J. Am. Chem. Soc., 2000; 122, 4056-4059.
14. Zhu, Q., Yu, P., Deng, Q., Zeng, L.: J. Planar Chromatogr., 2001; 14, 137-139.
15. Zhu, Q., Ma, G., Deng, Q., Zeng, L.: Fenxi Huaxue, 2000; 28, 349-352.
16. Aboul-Enein, H. Y., El-Awady, M. I., Heard, C. M.: Pharmazie, 2002; 57, 169-171.
17. Suedee, R., Srichana, T., Saelim, J., Thavonpibulbut, T.: J. Planar Chromatogr., 2001; 14, 194-198.
18. Bhushan, R., Martens, J., Arora, M.: Biomed. Chromatogr., 2001; 15, 151-154.
19. Bhushan, R., Arora, M.: Ibid., 2001; 15, 433-436.
20. Bhushan, R., Arora, M.: Ibid., 2003; 17, 226-230.
21. Aboul-Enein, H. Y., El-Awady, M. I., Heard, C. M.: J. Pharm. Biomed. Anal., 2003; 32, 1055-1059.
22. Aboul-Enein, H. Y., El-Awady, M. I., Heard, C. M.: Biomed. Chromatogr., 2003; 17, 325-334.
23. Sajewicz, M., Pietka, R., Kowalska, I.: J. Planar Chromatogr., 2004; 17, 173-176.
24. Mielcarek, J.: Drug Dev. Ind. Pharm., 2001; 27, 175-179.
25. Aboul-Enein, H. Y., El-Awady, M. I., Heard, C. M.: J. Liq. Chromatogr., Rel. Technol., 2000; 23, 2715-2726.
26. Li, G., Huang, M., Yang, G. et al.: Shandong Daxue Xuebao, Ziran Kexueban, 2001; 36, 429-432.
27. Zhu, C., Zhao, J., Huang, M., Wang, M.: Shandong Xuebao, Lixueban, 2003; 86-88.
28. Li, G., Huang, M., Yang, G. et al.: Sepu, 1999; 17, 215-216.
29. Lepri, L., Boddi, L., Del Bubba M., Cincinelli, A.: Biomed. Chromatogr., 2001; 15, 196-201.
30. Görög, S.: In: Detection - Oriented Derivatization Techniques in Liquid Chromatography, Chromatogr. Sci. Ser., Vol. 48 (Lingeman, H., Underberg, W. J. M., eds.), New York and Basel, Marcel Dekker, 1990, s. 193-216.
31. LeFevre, J. W.: J. Chromatogr. A, 1993; 653, 293-302.
32. LeFevre, J. W.: J. Chem. Educ., 1998; 75, 1287-1290.
33. LeFevre, J. W., Bonzagni, N. J., Chappell, L. L. et al.: J. Labelled Compd. Radiopharm., 1998; 41, 477-489.
34. LeFevre, J. W., Rogers, E. D., Pico, L. L., Botting, C. L.: Chromatographia, 2000; 52, 648-652.
35. LeFevre, J. W., Gublo, E. J., Botting, C. et al.: J. Planar. Chromatogr., 2000; 13, 160-165.
36. Nagata, Y., Iida, T., Sakai, M.: J. Mol. Catal. B: Enzymatic, 2001; 12, 105-108.
37. Heuser, D., Meads, O.: J. Planar Chromatogr., 1993; 6, 324-325.
38. Spell, J. C., Stewart, J. T.: Ibid., 1997; 10, 222-224.

Došlo 10. 9. 2004.

Přijato ke zveřejnění 14. 12. 2004.

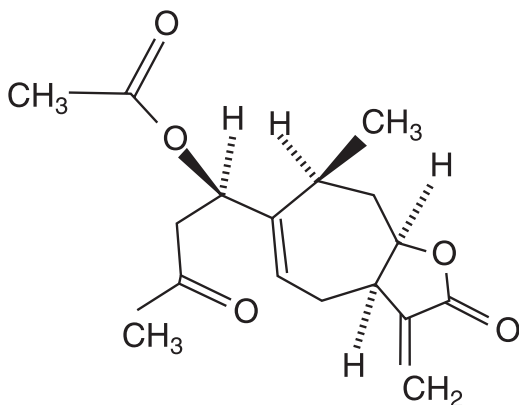
prof. RNDr. Jan Šubert, CSc.
Palackého 1-3, 612 42 Brno
e-mail: subertj@vf.u.cz

ERRATUM

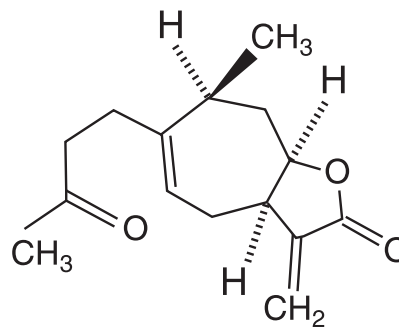
Redakce se omlouvá za chyby v dokumentaci k článku KLEČÁKOVÁ-KARLÍČKOVÁ J., JAHODÁŘ L.: XANTHIUM SPINOSUM L. – FYTOCHEMICKÁ STUDIE, který vyšel v časopisu Česká a slovenská farmacie číslo 3/2005.

Obrázky 2 a 3 na straně 142 měly vzájemně zaměněné vzorce; u obou vzorců také vypadlo vyznačení vazeb.

Správně:



Obr. 2. Xanthumin (K1)



Obr. 3. Deacetylxanthumin (K2)