

SEPARACE A KVANTIFIKACE NOVĚ SYNTETIZOVANÝCH THIODERIVÁTŮ AKRIDINU POMOCÍ KAPILÁRNÍ KAPALINOVÉ CHROMATOGRRAFIE

ZUZANA BOSÁKOVÁ^a, EVA TESAŘOVÁ^b,
PAVEL COUFAL^a, BOŽENA KAFKOVÁ^a
a JACQUES BARBE^c

^aKatedra analytické chemie, Přírodovědecká fakulta, e-mail: bosakova@natur.cuni.cz, ^bKatedra fyzikální a makromolekulární chemie, Přírodovědecká fakulta, Univerzita Karlova, Albertov 2030, 128 43 Praha 2, ^cGERCTOP UPRES A CNRS 6009, Faculty of Pharmacy, 27 Bd Jean-Moulin, 133 85 Marseille, France

Došlo dne 6.II.2001

Klíčová slova: kapilární kapalinová chromatografie, CLC, thioderiváty akridinu, separace, optimalizace, kvantifikace

Úvod

Deriváty akridinu patří do skupiny farmaceuticky významných chemoterapeutik, u nichž byl prokázán antibakteriální, antimykotický, a především antimalarický účinek¹. Řadu let se používají k léčbě protozoálního onemocnění, vyvolaného různými druhy mikroorganismů rodu *Plasmodium*². V posledních letech nabývají na významu i deriváty s antineoplastickými účinky³. Narůstající rezistence patogenů vůči dnes používaným chemoterapeutikům vede ke snaze produkovat nové deriváty se specifitějšími účinky. Současně roste i poptávka po citlivých a selektivních metodách určených k ověření čistoty léčiv a pro jejich detekci a stanovení v biologických matricích.

Z chemického hlediska jsou akridiny látky odvozené od struktury dibenzopyridinu, nesoucí ve své molekule minimálně jeden dusíkový atom jako součást aromatického cyklu. Vlastní akridin se chová ve vodném roztoku jako slabá báze (pK_b 8,4). Zachování bazických vlastností lze předpokládat i u syntetických derivátů a jejich degradačních produktů, s pouze malou změnou disociační konstanty, danou povahou a polohou substituentů⁴.

Při analýze akridinových derivátů se nejčastěji využívá technika vysokoučinné kapalinové chromatografie, zejména pro zkoušky totožnosti a kontrolu čistoty akridinových substancí⁵ a pro farmakologické a farmakokinetické studie⁶. Díky zmíněné bazicitě těchto látek byla úspěšně provedena jejich separace i metodou kapilární elektroforézy⁷. Elektrochemicky byl oxidován pouze nesubstituovaný akridin⁸. Metodou kapilární kapalinové chromatografie (CLC) nebyly deriváty akridinu dosud analyzovány.

Výhodou CLC oproti klasické HPLC je menší spotřeba organických rozpouštědel (velmi malý průtok mobilní fáze ~ jednotky $\mu\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$) a mnohem menší nároky na množství požadovaného vzorku⁹⁻¹⁰ (desítky nl). To je důležité např. při sledování metabolických produktů v tělních tekutinách nebo při určování obsahu hlavní komponenty a doprovodných nečistot

ze syntézy. Má-li se navíc zabezpečit věrohodnost analytických výsledků a dostát pravidlům správné laboratorní praxe (GLP), je třeba analýzu několikrát opakovat. Nezanedbatelnou výhodou CLC je i snazší spojení s detekcí hmotovou spektrometrií.

Z výše uvedených důvodů byla v této práci věnována pozornost vypracování analytické metody pro separaci a kvantifikaci nově syntetizovaných thioderivátů akridinu pomocí metody kapilární kapalinové chromatografie. Současně byla posouzena i možnost uplatnění této techniky pro kontrolu čistoty připravených substancí.

Experimentální část

Použité přístroje a chemikálie

Měření byla provedena na přístroji sestávajícím z ISCO pumpy 100 DM (Lincoln, NE, USA), LINEAR UV/VIS 205 fotometrického detektoru (San Jose, CA, USA) s CE detekční celou a dávkovacího ventilu Valco se 60 nl smyčkou (Schenkon, Švýcarsko). Získaná experimentální data byla zpracována na počítači Pentium III s CSW 1.7 programem se čtyřkanálovou kartou pro sběr dat od fy DataApex (Praha, Česká republika).

Látky byly separovány na křemenné kapilární koloně (vnitřní průměr 320 μm) naplněné v délce 360 μm stacionární fází Nucleosil 100-5 C18 o průměru zrna 5 μm . Kolona byla na výstupním konci opatřena fritou ze skelné vaty, kterou uvnitř kolony držela křemenná kapilára o vnitřním průměru 75 μm a vnějším průměru 280 μm a délce 55 μm , která byla vlepena epoxidovým lepidlem do kapilární kolony se stacionární fází. Druhý konec této křemenné kapiláry byl napojen pomocí převlečné teflonové trubičky na křemennou kapiláru o vnitřním průměru 220 μm a vnějším průměru 340 μm , na níž bylo vypáleno detekční okénko ve vzdálenosti 70 mm od spoje obou kapilár.

K měření pH vodné složky mobilní fáze byl použit pH-metr PHM 64 Radiometer (Copenhagen, Dánsko) s kombinovanou skleněnou elektrodou. Detekce probíhala současně při dvou vlnových délkách 214 nm a 230 nm, vybraných na základě proměřených UV spekter jednotlivých derivátů. Pracovalo se za laboratorní teploty 22 °C. Mrtvý čas byl určen pomocí vodného roztoku uracilu o koncentraci $1\cdot 10^{-3}$ mol. dm^{-3} a činil 5,1 min.

Pro přípravu mobilní fáze byly použity tyto chemikálie: acetonitril LiChrosolv, čistota pro gradientovou eluci, Merck (Darmstadt, SRN), kyselina octová a hydroxid sodný, čistota p.a. Lachema (Brno, Česká republika), deionizovaná voda (Milli-Q). Složení binární mobilní fáze bylo: acetonitril/deionizovaná voda s proměnlivým obsahem acetonitrilu nebo acetonitril/0,2 mol. dm^{-3} octanový pufr o pH 3,5 (90:10 v/v). Mobilní fáze byly odplyněny pomocí ultrazvuku.

Strukturální vzorce a kódová označení pěti analyzovaných derivátů akridinu, syntetizovaných v miligramových množstvích na Farmaceutické fakultě v Marseille (Francie), jsou uvedeny na obr. 1. Zásobní roztoky všech studovaných látek o koncentraci $1\cdot 10^{-3}$ mol. dm^{-3} , byly připraveny rozpuštěním příslušného množství látky v acetonitrilu.

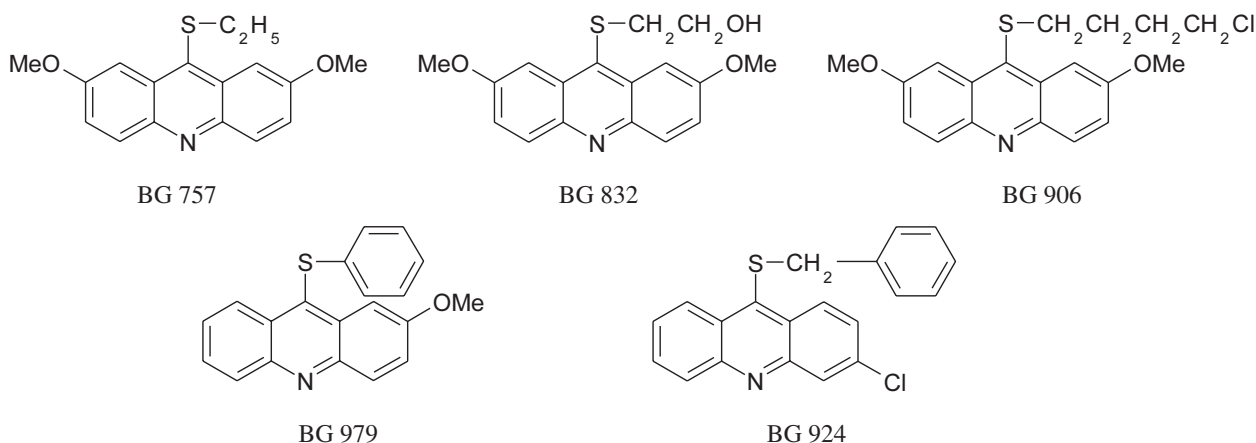
Všechny studované thioderiváty byly připraveny analogickým způsobem na Farmaceutické fakultě v Marseille v od-

dělení prof. J. Barbeho¹¹⁻¹³. Prvním krokem je příprava difenylaminokarboxylové kyseliny z aromatické halogenkarboxylové kyseliny a anilinu metodou podle Ullmanna¹¹. Ta se pomocí oxychloridu fosforečného zcyklizuje a získá se akridon. Ten se pomocí sulfidu fosforečného v pyridinu převede na thioakridon¹². Alkylací (arylací)¹³ thioakridonu se získá akridinový thioderivát (obr. 2).

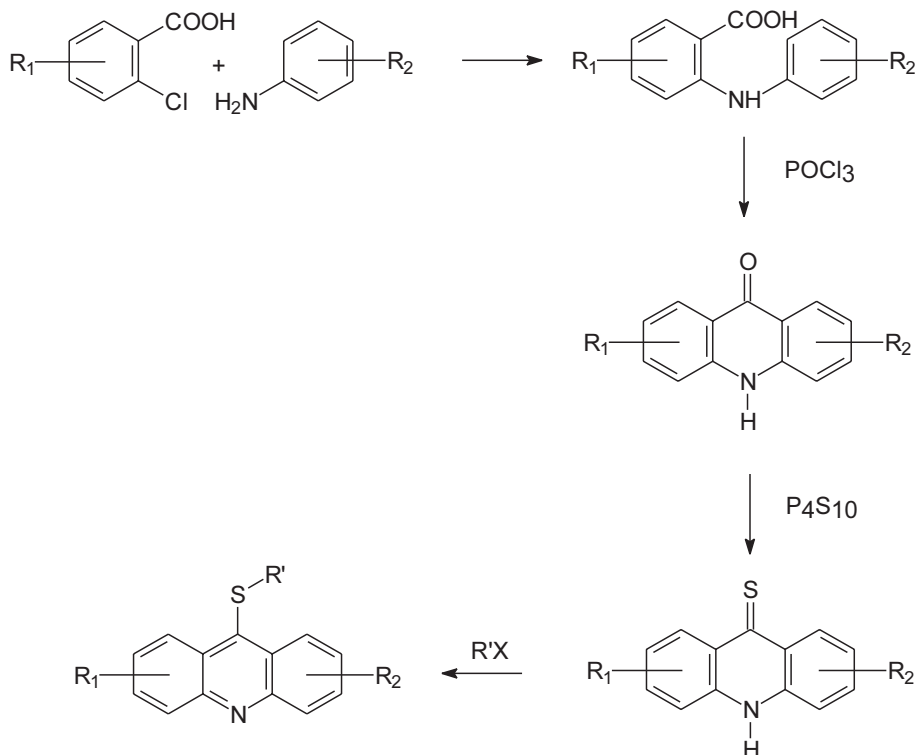
Výsledky a diskuse

Vzhledem k tomu, že studované thioderiváty akridinu

neměly deklarovanou čistotu, hledaly se nejprve vhodné separační podmínky pro získání dostatečného rozlišení mezi hlavní složkou a doprovodnými nečistotami ze syntézy. Byl proměřen vliv obsahu acetonitrilu na retenční chování jednotlivých derivátů v mobilní fázi acetonitril/voda s proměnlivým obsahem acetonitrilu v rozmezí 100 % až 60 % (v/v). Na obr. 3 je patrné, že už v mobilní fázi s 90 % acetonitrilem došlo téměř u všech derivátů k separaci hlavní složky od doprovodných nečistot. Další snižování obsahu acetonitrilu mělo za následek zvyšování hodnot retenčního (k) a asymetrického (As) faktoru a ani při nejnižším proměřovaném obsahu acetonitrilu nedošlo k oddělení dalších nečistot od majoritního píku. Účinnost se-



Obr. 1. Strukturální vzorce a kódová označení analyzovaných derivátů akridinu



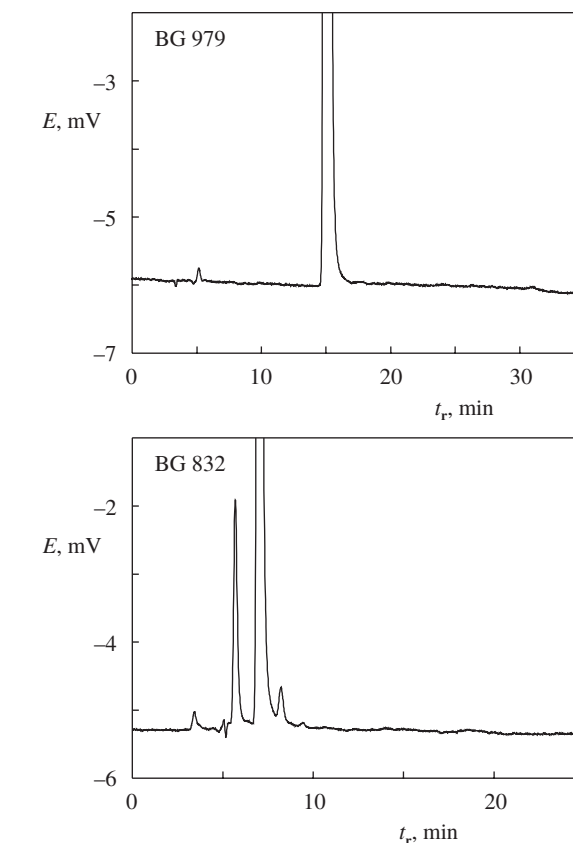
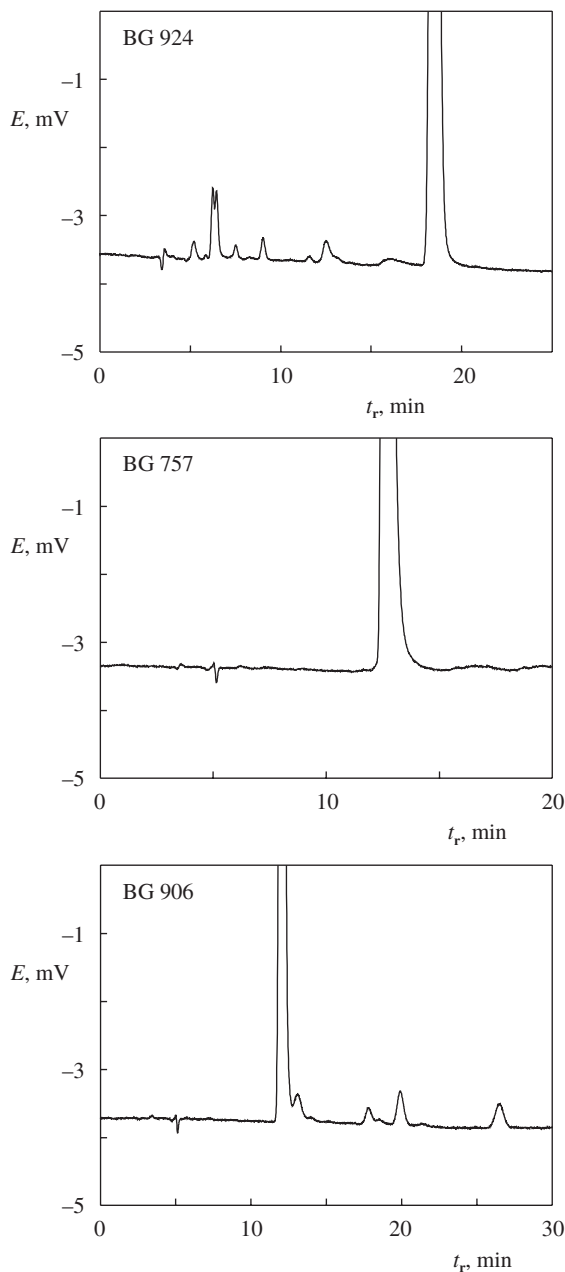
Obr. 2. Postup přípravy thioderivátů akridinu

Tabulka I

Retenční faktory (k), asymetrické faktory (As) a počet teoretických pater (N) studovaných derivátů v binární mobilní fázi acetonitril/voda s různým obsahem acetonitrilu, průtoková rychlost $4 \mu\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$, detekce při 230 nm

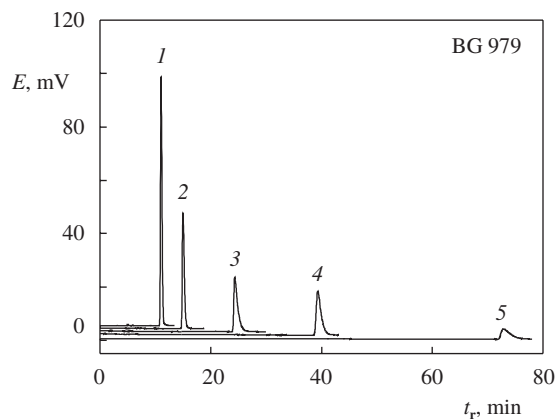
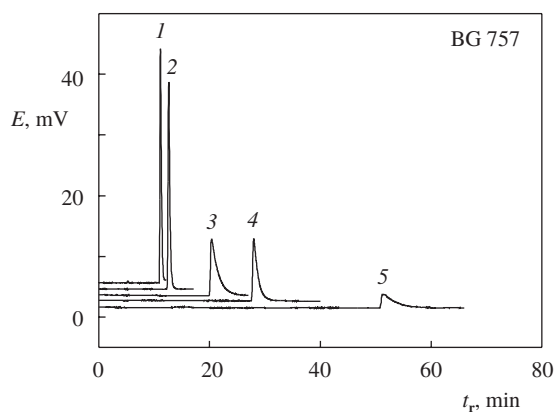
Derivát	90 %			80 %			70 %			60 %		
	k	As	N	k	As	N	k	As	N	k	As	N
BG 757	1,4	2,22	18800	2,8	7,9	4400	4,4	5,15	17100	8,8	8,23	8500
BG 832	0,3	1,63	12100	0,5	2,65	5600	0,7	1,88	10200	1,2	2,93	7700
BG 906	1,3	1,46	20400	2,8	3,72	14700	5,2	2,51	24200	10,9	5,56	21200
BG 924	2,5	1,36	29800	5,2	1,60	29200	11,6	1,51	26900	– ^a	– ^a	– ^a
BG 979	1,8	1,74	22800	3,5	3,77	17100	6,6	2,67	26900	13,0	3,75	26400

^a Neeluoval do 100 min



Obr. 3. Chromatogramy studovaných derivátů akridinu v mobilní fázi acetonitril/voda (90:10, v/v); průtok mobilní fáze $4 \mu\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$, detekce při 214 nm pro BG 924 a BG 979 a při 230 nm pro BG 757, BG 832 a BG 906 (E = odezva detektoru v mV, t_r = retenční čas v min)

parace, vyjádřená jako počet teoretických pater na metr délky kolony (N), byla s výjimkou derivátů BG 906 a BG 979 nejvyšší při 90% obsahu acetonitrilu (tab. I). V mobilní fázi s 80% obsahem acetonitrilu došlo u všech derivátů k výraznému zhoršení symetrie píků a ke snížení účinnosti separace; nejvíce u derivátu BG 757 (obr. 4), nejméně u derivátů BG 924 a BG 979 (obr. 4), jež obsahují v postranním řetězci fenylový substituent. Toto anomální chování bylo pozorováno i při 80% obsahu acetonitrilu v pufované mobilní fázi (viz kap. 3.1.).



Obr. 4. Vliv obsahu organického modifikátoru v binární mobilní fázi acetonitril/voda na retenční chování vybraných derivátů BG 757 a BG 979; průtok mobilní fáze $4 \mu\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$, detekce při 230 nm, obsah acetonitrilu v mobilní fázi 1 – 100 %, 2 – 90 %, 3 – 80 %, 4 – 70 % a 5 – 60 % (E a t_r viz obr. 3)

Tabulka II

Retenční faktory (k), asymetrické faktory (A_s) a počet teoretických pater (N) studovaných derivátů v binární mobilní fázi (90:10 v/v) acetonitril/voda, průtoková rychlost $4 \mu\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$ a acetonitril/0,2 mol. dm^{-3} octanový pufr o pH 3,5, průtoková rychlost $3 \mu\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$, detekce 230 nm

Derivát	Mobilní fáze					
	nepufrovaná ^a			pufrovaná ^b		
	k	A_s	$N\cdot\text{m}^{-1}$	k	A_s	$N\cdot\text{m}^{-1}$
BG757	1,4	2,22	18800	1,5	1,86	25138
BG832	0,3	1,63	12100	0,4	1,33	16422
BG906	1,3	1,46	20400	1,5	1,30	26162
BG924	2,5	1,36	29800	2,5	1,19	36683
BG979	1,8	1,74	22800	2,3	1,37	33041

Průtok ^a $4 \mu\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$, ^b $3 \mu\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$

Z tabulky I je zřejmé, že změna obsahu acetonitrilu měla podstatně menší vliv na retenční chování derivátu BG 832 než na ostatní deriváty, což je důsledek přítomnosti polární hydroxyskupiny v postranním alkylovém řetězci derivátu BG 832.

Nízké hodnoty retenčních faktorů doprovodných nečistot (s výjimkou nečistot u derivátu BG 906) ukazují na jejich značně polární charakter, patrně odpovídající výchozím složkám syntézy derivátu 9-(alkylthio)akridinu (obr. 1). Ze získaných experimentálních dat je patrné, že separace v mobilní fázi acetonitril/voda (90:10 v/v) z hlediska kontroly čistoty jednotlivých derivátů byla dostačující. Vzhledem k absenci standardů (pro majoritní složky i pro doprovodné nečistoty) byla čistota jednotlivých derivátů (prekurzorů léčiv) určena metodou vnitřní normalizace. Za daných experimentálních podmínek (detekce při 230 nm, průtoková rychlost $4 \mu\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$) byla stanovena čistota 100,0 % pro derivát BG 757, 90,2 % pro derivát BG 832, 92,9 % pro derivát BG 906, 92,3 % pro derivát 924 a 100,0 % pro derivát 979.

Optimalizace separačních podmínek za účelem kvantitativní analýzy

Z důvodu zvýšení citlivosti (zlepšení symetrie píků) při stanovení thioakridinových derivátů byl proměřen vliv acetátového pufru o pH 3,5 na separační chování jednotlivých derivátů. V mobilních fázích – acetonitril/0,2 mol. dm^{-3} octanový pufr o pH 3,5 s proměnlivým obsahem acetonitrilu došlo oproti vodně-acetonitrilovým mobilním fázím pouze k velmi malým změnám retence. Srovnávací měření byla prováděna při stejném průtoku mobilní fáze – tj. $4 \mu\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$.

Proměřením van Deemterovy křivky (2–5 $\mu\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$) v pufrované mobilní fázi s 90% obsahem acetonitrilu pro všechny deriváty bylo zjištěno, že účinnost kolony roste s klesajícím průtokem mobilní fáze. Pro měření kalibračních křivek byla tedy zvolena průtoková rychlost $3 \mu\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$ jako výsledek kompromisu mezi vyšší účinností a únosností doby analýzy, která nepřesáhla u žádného derivátu dobu 22 min (tab. II).

V mobilní fázi (90:10 v/v) acetonitril/0,2 mol. dm^{-3} octanový pufr o pH 3,5 a průtokové rychlosti $3 \mu\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$ byly pro všechny deriváty proměřeny kalibrační křivky při dvou vlnových délkách (214 a 230 nm) v koncentračním rozsahu $1\cdot 10^{-6}$ mol. dm^{-3} až $1\cdot 10^{-3}$ mol. dm^{-3} . Metodou lineární regrese byla vyhodnocována závislost jak plochy píku vs. molární koncentrace, tak výšky píku vs. molární koncentrace. Každá koncentrace příslušného derivátu byla proměřena 4x. Do kalibračních grafů byla vynášena průměrná hodnota plochy a výšky ze čtyř měření. V tabulce III a IV jsou uvedeny získané úseky, směrnice, korelační koeficienty (r) a lineární rozsahy kalibračních přímk (plocha vs. koncentrace) pro obě vlnové délky. Na obr. 5 je pro názornost uveden průběh závislosti log plochy píku na log molární koncentrace pro derivát BG 924 pro detekci při 214 nm.

Ze získaných parametrů kalibračních přímk je patrné, že detekce pro deriváty BG 757, BG 832 a BG 906 je citlivější při 230 nm, zatímco pro deriváty BG 924 a BG 979 je citlivější při 214 nm, což je v souladu s jejich strukturou. Nejvyšší hodnota směrnice, a tedy největší citlivost byla pozorována pro derivát BG 979 při 214 nm (viz tab. III). Úseky všech kalibračních přímk se neliší statisticky významně od nuly, a tudíž všechny tyto kalibrační přímk prochází nulou. U všech získa-

Tabulka III

Parametry kalibračních přímk a lineární rozsahy studovaných derivátů detegovaných při vlnové délce 214 nm

Derivát	Úsek ^a (SD ^b)	Směrnice ^c (SD ^b)	<i>r</i>	Lin. rozsah ^d
BG 757	0,034 (0,512)	280167 (1465)	0,9998	1.10 ⁻⁵ –8.10 ⁻⁴
BG 832	-0,001 (0,661)	182613 (2072)	0,9993	6.10 ⁻⁶ –8.10 ⁻⁴
BG 906	0,466 (1,738)	231656 (4973)	0,9981	1.10 ⁻⁵ –8.10 ⁻⁴
BG 924	1,306 (1,515)	447871 (3520)	0,9996	8.10 ⁻⁶ –1.10 ⁻³
BG 979	-1,351 (2,141)	600936 (5374)	0,9995	4.10 ⁻⁶ –1.10 ⁻³

^a mV.s, ^b SD – odhad směrodatné odchylky, ^c mV.s.dm³.mol⁻¹, ^d mol.dm⁻³

Tabulka IV

Parametry kalibračních přímk a lineární rozsahy studovaných derivátů detegovaných při vlnové délce 230 nm

Derivát	Úsek ^a (SD ^b)	Směrnice ^c (SD ^b)	<i>r</i>	Lin. rozsah ^d
BG 757	0,096 (0,725)	491191 (2074)	0,9999	1.10 ⁻⁵ –8.10 ⁻⁴
BG 832	-0,044 (0,838)	322043 (2626)	0,9996	6.10 ⁻⁶ –8.10 ⁻⁴
BG 906	0,658 (1,375)	405172 (4124)	0,9995	8.10 ⁻⁶ –8.10 ⁻⁴
BG 924	0,683 (1,198)	322749 (2784)	0,9996	8.10 ⁻⁶ –1.10 ⁻³
BG 979	-0,920 (1,629)	540494 (4089)	0,9996	4.10 ⁻⁶ –1.10 ⁻³

^a mV.s, ^b SD – odhad směrodatné odchylky, ^c mV.s.dm³.mol⁻¹, ^d mol.dm⁻³

Tabulka V

Hodnoty detekčních limitů (LOD) a limitů stanovení (LOS) měřených derivátů

Derivát	214 nm		230 nm	
	LOD (M) ^a	LOS (M) ^a	LOD (M) ^a	LOS (M) ^a
BG 757	7,8.10 ⁻⁶	2,6.10 ⁻⁵	5,9.10 ⁻⁶	2,0.10 ⁻⁵
BG 832	9,5.10 ⁻⁶	3,2.10 ⁻⁵	7,1.10 ⁻⁶	2,4.10 ⁻⁵
BG 906	7,6.10 ⁻⁶	2,5.10 ⁻⁵	5,4.10 ⁻⁶	1,8.10 ⁻⁵
BG 924	6,3.10 ⁻⁶	2,1.10 ⁻⁵	8,6.10 ⁻⁶	2,9.10 ⁻⁵
BG 979	5,3.10 ⁻⁶	1,8.10 ⁻⁵	6,0.10 ⁻⁶	2,0.10 ⁻⁵

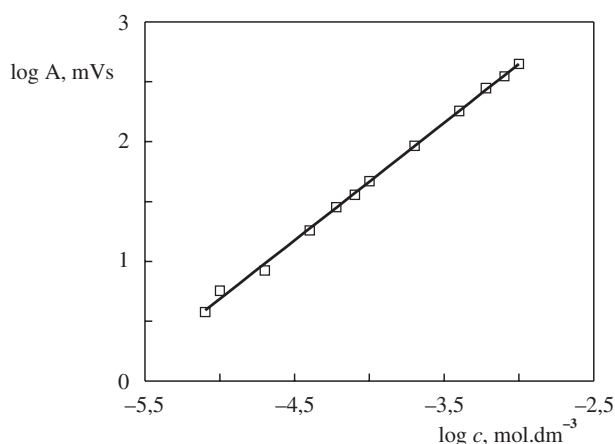
^a M – mol.dm⁻³

ných kalibračních přímk byl pozorován korelační koeficient velmi blízký 1,0000.

Detekční limit a limit stanovení byl vyhodnocován z regresních parametrů kalibračních přímk závislostí výšky píku na koncentraci. Pro detekci při 214 nm i při 230 nm se korelační koeficienty, získané pro jednotlivé deriváty, pohybovaly v rozsahu 0,9997 až 0,9998. Detekční limity (LOD) byly vypočítány jako trojnásobek absolutní hodnoty šumu, limity stanovení (LOS) byly vypočítány jako desetinásobek absolutní hodnoty šumu a jejich hodnoty jsou uvedeny v tabulce V.

Závěr

Byla vyvinuta metoda pro separaci a kvantifikaci pěti nových, farmaceuticky významných thioderivátů akridinu

Obr. 5. Závislost logaritmu plochy píku na logaritmu molární koncentrace derivátu BG 924 v koncentračním rozsahu 8.10⁻⁶–1.10⁻³ mol.dm⁻³ při 214 nm

pomocí kapilární kapalinové chromatografie. Byly nalezeny experimentální podmínky, zajišťující dobrou separaci vlastních látek a doprovodných nečistot. Pro všechny deriváty byly proměřeny kalibrační křivky při dvou vlnových délkách (214 a 230 nm). Lineární rozsah kalibračních přímk se pohyboval v oblasti 10⁻⁶ až 10⁻³ mol.dm⁻³ a detekční limity se pro jednotlivé deriváty pohybovaly v jednotkách až desítkách μmol.dm⁻³.

Práce na tomto projektu byla finančně podporována grantem GA ČR 203/00/1569 a byla součástí projektu COST Action

B 16. Autoři děkují paní Marcelé Aussenbergové za pomoc při experimentální práci na tomto projektu.

LITERATURA

1. Modr Z.: *Remedia* 2, 821 (1994).
2. Barbe J.: *Bulletin 1st Acrival Meeting on Chemotherapy of Trypanosomatidae*, str. 63. Marseille 1992.
3. Schofield P. C., Robertson I. G. C., Paxton J. W.: *Cancer Chemother. Pharmacol.* 44, 51 (1999).
4. Kováč J., Kováč Š.: *Organická chemia*. SNTL, Praha 1977.
5. Jurlina J. L., Paxton J. W.: *J. Chromatogr.* 342, 431 (1985).
6. Jayewardene A. L., Santoro J. E., Gambertoglio J. G.: *J. Chromatogr., B* 702, 203 (1997).
7. Košťálová I., Jelínek I., Zimová N., Barbe J.: *Chem. Listy* 91, 369 (1997).
8. Yakosouchi K., Taniguchi I., Yamaguchi H., Aeakawa K.: *J. Electroanal. Chem.* 121, 230 (1981).
9. Vissers J. P. C., Claessens H. A., Cramers C. A.: *J. Chromatogr., A* 779, 1 (1997).
10. Vissers J. P. C.: *J. Chromatogr., A* 856, 117 (1999).
11. Ulmann F.: *Liebigs Ann. Chem.* 355, 327 (1907).
12. Smolders R. R., Hanuise J., Coonians R., Proietto V., Voglet N., Waefelaer A.: *Synthesis* 1982, 493.
13. Bisiri N., Johnsos C., Kayiréné M.: *Ann. Pharm. Fr.* 54, 27 (1996).

Z. Bosáková^a, E. Tesařová^b, P. Coufal^a, B. Kafková^a, and J. Barbe^c (^a*Department of Analytical Chemistry, ^bDepartment of Physical and Macromolecular Chemistry, Faculty of Science, Charles University, Prague, ^cFaculty of Pharmacy, Méditerranée Université, Marseilles, France*): **Separation and Quantification of Acridine Thio Derivatives by Capillary Liquid Chromatography**

An analytical method for separation and quantification of five acridine thio derivatives by capillary liquid chromatography has been developed. A capillary column, 320 μm I.D., filled with the Nucleosil 100-5 C 18 stationary phase, particle size 5 μm , was used. The mobile-phase composition was optimized in order to obtain a reasonable separation of the main component of each reaction mixture from impurities from the synthesis and a good quantification. It was shown that all the derivatives studied were well separated in binary mobile phases, acetonitrile/water or acetonitrile/0.2 $\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ acetate buffer of pH 3.5, with high acetonitrile contents (90 %). Calibration curves for all the derivatives were measured at wavelengths of 214 and 230 nm in the mobile phase composed of acetonitrile/0.2 $\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ acetate buffer of pH 3.5 (90:10, v/v). The linear dynamic ranges of the calibration curves were between 1.0×10^{-6} and 1.0×10^{-3} $\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ and the detection limits for the compounds were in the $\mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ range.