

KONTROLA ENANTIOMERNÍ ČISTOTY LÉČIV

MILADA DOLEŽALOVÁ a MAGDA TKACZYKOVÁ

Státní ústav pro kontrolu léčiv, Šrobárova 48, 100 41 Praha 10, e-mail:dolezal@sukl.cz

Došlo dne 22.IX.1999

Klíčová slova: enantioselektivní HPLC, kapilární elektroforéza, levodopa, methylidopa, karbidopa

Obsah

1. Úvod
2. Čistota léčiv
3. Stanovení enantiomerní čistoty
4. Kontrola enantiomerní čistoty levodopy, methylidopy a karbidopy jako ilustrativní příklad
 - 4.1. Lékopisné polarimetrické metody
 - 4.2. Enantioselektivní HPLC metody
 - 4.3. Enantioselektivní CE metody
 - 4.4. Srovnání metod
5. Závěr

1. Úvod

S chiralitou se setkáme u více než poloviny užívaných léčiv. Ze skupiny syntetických chirálních léčiv je více než 80 % léčiv vyráběno a předepisováno ve formě racemátů, tj. ekvimolárních směsí enantiomerů. Obvykle pouze jeden z izomerů vykazuje žádoucí terapeutické účinky a druhý musí být považován za tzv. izomerní balast. Nežádoucí izomery mohou interagovat s odlišnými receptory nebo enzymy a vést ke vzniku rozdílných metabolitů a nežádoucích vedlejších účinků či toxicitě léčiva nebo „pouze“ zatěžují organismus vstupem neaktivní látky.

Přestože existence stereoizomerie u chemických sloučenin byla poznána před více než 100 lety, v klinické farmakologii a toxikologii byla donedávna tématem zcela opomíjeným. Teprve v polovině 80. let začali odborníci uvažovat nejednotný charakter chirálních léčiv a na racemát léčiva, který je nejčastějším případem chirálního léčiva, pohlížet jako na směs dvou látek, které se v chirálním prostředí živých organismů chovají rozdílně^{1,2}. Byla vyvolána široká diskuse o stereoselektivitě farmakokinetických a farmakodynamických vlastností léčiv a o nutnosti opustit ve farmakologických studiích nestereoselektivní analytické metody, které nedovedou rozlišovat mezi enantiomery¹. Intenzivní diskuse vědců a farmaceutických výrobců se účastnily i lékové regulační agentury a začátkem 90. let formulovaly svá stanoviska k problematice „enantiomer vs. racemát“, orientovaná ve prospěch enantiomerně čistých léčiv³⁻⁵.

Stimulem pro studium farmakologických vlastností enan-

tiomerů chirálních léčiv a vývoj enantiomerně čistých léčiv byl současně i mohutný rozvoj technik syntézy a izolace enantiomerů a stereoselektivní analytické metodologie.

Pod vlivem striktní politiky lékových agentur roste v současné době počet léčiv vyvinutých a vyráběných ve formě čistých enantiomerů. U takových léčiv se nežádoucí enantiomery řadí mezi ostatní organické nečistoty léčiva a jako takové by měly být také limitovány a kontrolovány.

2. Čistota léčiv

Čistota není exaktním pojmem. Je vždy dána použitou analytickou technikou a je tedy závislá na dosaženém rozvoji analytické metodologie, přičemž absolutní čistoty nemůže být dosaženo. Všechna léčiva nutně obsahují nečistoty a čistota léčiv a farmaceutických přípravků je proto stále předmětem dalšího studia a nikdy nekončícího zlepšování zkoušek a zpřísňování kritérií.

Zaměříme-li se pouze na chemické nečistoty léčiv (opomíjeje např. mikrobiologickou čistotu), můžeme rozdělit nečistoty u léčiv a farmaceutických přípravků na nečistoty organické, anorganické a zbytková rozpouštědla. Organické nečistoty zahrnují látky obsažené již v materiálu použitém pro výrobu léčiva, látky vznikající jako vedlejší produkty nebo meziprodukty při výrobě a degradační produkty.

Mezi tyto organické nečistoty je nutno řadit i nežádoucí stereoizomery přítomné v enantiomerně čistých léčivech.

Přípustné hladiny organických nečistot v léčivech jsou dány především jejich toxicitou, dále dostupností a finanční nákladností syntézy léčiva, analytickými možnostmi a v neposlední řadě i způsobem a dobou užívání a maximálními denními dávkami léčiva. Nedávno přijatá mezinárodní harmonizační směrnice⁶ požaduje, aby všechny nečistoty vyskytující se v množství nad 0,1 % byly identifikovány a limitovány a aby byla ověřena jejich biologická bezpečnost v toxikologických studiích. U zvláště toxických nebo farmakologicky účinných nečistot může být uvedený limit ještě nižší.

Enantiomerní nečistoty však byly z této směrnice vyňaty a pro jejich obsah zatím platí jen doporučení obsažené v novější směrnici pro specifikaci léčiv⁷, zabývající se souborem zkoušek, analytických postupů a vhodných kritérií u nových syntetických léčiv. V části o specifických zkouškách je doporučeno, aby se i k enantiomerním, případně diastereomerním nečistotám přistupovalo stejně jako k organickým nečistotám a jejich obsah byl limitován a kontrolován podle zásad směrnice pro nečistoty v léčivech⁶, pokud tomu nebrání technická omezení.

3. Stanovení enantiomerní čistoty

Klasickou metodou pro stanovení enantiomerních nečistot je polarimetrie neboli měření optické otáčivosti (v tomto případě můžeme pro čistotu použít termín optická čistota). Je to metoda univerzální a jednoduchá, ale zároveň málo selektivní a často nedostatečně citlivá a přesná, vyžaduje znalost specifické

optické otáčivosti čistého enantiomeru a nevýhodou může být i náročnost na množství vzorku potřebné pro stanovení.

Z neseparačních metod získává v poslední době na významu NMR spektroskopie, která je obecně metodou achirální a pro rozlišení enantiomerů využívá buď nepřímé metody s derivatizací chirálními činidly nebo metody přímé s chirálními solvatačními či posuvovými činidly⁸.

Nejširšího použití však doznaly v posledních dvou dekáдах enantioselektivní separační metody. Jsou založeny buď na přímých separacích, probíhajících v chirálním systému nebo na separacích nepřímých, které probíhají v achirálním systému, ale vlastní separaci předřazují derivatizaci chirálním činidlem. Z této velké skupiny moderních metod se při separacích a stanoveních enantiomerů léčiv nejúspěšněji a nejhojněji uplatňují metody HPLC⁹⁻¹² a kapilární elektroforézy (CE)¹³⁻¹⁶.

HPLC metodologie dává v současné době přednost přímým separacím na chirálních stacionárních fázích (CSP), jejichž výběr je velice pestrý^{9,17-19} a je stále obohacován vývojem CSP s novými chirálními selektory.

U CE metodologie je nejčastěji používanou enantioselektivní technikou přidávání chirálního selektoru k nosnému elektrolytu. V současné době je k dispozici velké množství chirálních selektorů nejrůznější povahy, přičemž nejpočetnější a v aplikacích nejúspěšnější selektory jsou cyklohextriny a jejich deriváty²⁰.

Ve srovnání s HPLC nabízí CE vyšší účinnost, větší pružnost a rychlost vývoje metody a v neposlední řadě i menší spotřebu vzorků a chirálních selektorů a nižší náklady. Nevýhodou však je, že často nedosahuje stejné citlivosti a reprodukovatelnosti jako HPLC.

Stanovení enantiomerní čistoty klade na použité separační metody přísnější požadavky než separace enantiomerů v racemátu, neboť se jedná o stanovení nízkých koncentrací enantiomerní nečistoty v přítomnosti majoritního enantiomeru. Rozlišení postačující pro úplnou separaci enantiomerů v racemátu není dostatečné pro citlivé stanovení enantiomerní čistoty. Obecně se uvádí, že musí být u racemátu dosaženo rozlišení nejméně 2, jestliže metoda má být použita pro stanovení enantiomerní nečistoty²¹.

Podobně jako u každého stanovení nečistot separační metodou je i v tomto případě důležité pořadí eluce majoritní a minoritní složky. Přesnějších a správnějších výsledků a výrazného zvýšení citlivosti je dosaženo, je-li pík enantiomerní nečistoty detegován před majoritním píkem enantiomerní účinné látky²².

Lékopisy i v současné době spoléhají ve většině případů kontroly enantiomerních nečistot na měření optické otáčivosti, třebaže se ukazuje, že polarimetrické metody neodpovídají současným požadavkům na kontrolu čistoty. Vzhledem k nedostatečné selektivitě polarimetrických metod mohou být zároveň s nežádoucím enantiomerem stanovovány i další organické nečistoty, které jsou opticky aktivní. Široká rozmezí optické otáčivosti uváděná v lékopisech u polarimetrických metod tolerují přítomnost i několika jednotek procent (2–5 %) enantiomerních nečistot²³⁻²⁶, zatímco ostatní organické nečistoty jsou běžně stanovovány na úrovni desetin procenta v souladu s požadavky mezinárodní harmonizační normy⁶ (viz část 2). Navíc může být toto rozmezí stanoveno nesprávně a v důsledku toho pak dochází k absurdní situaci, že enantiomer léčiva je „příliš“ čistý, a proto nevyhovuje požadavkům v lékopise²⁶.

Jak bylo zmíněno v úvodu, trend současné doby je používat léčiva ve formě jediného enantiomeru. Lékopisné články pro takováto nově vyvinutá léčiva již obsahují kvalitnější analytickou metodologii a s nimi začíná do lékopisů zvolna pronikat enantioselektivní HPLC. Např. Evropský lékopis a jeho doplňky²⁷ uvádějí tuto metodu ve třech článcích pro enantiomerně čistá léčiva, tři další články s enantioselektivní HPLC jsou připravovány²⁸⁻³⁰.

4. Kontrola enantiomerní čistoty levodopy, methyldopy a karbidopy jako ilustrativní příklad

Pro ilustraci problematiky diskutované v tomto článku uvedeme konkrétní příklady využití HPLC a CE metod pro stanovení enantiomerní čistoty tří chemicky příbuzných léčiv užívaných ve formě L-izomerů a porovnáme tyto metody s lékopisnými polarimetrickými metodami.

Levodopa (L-2-amino-3-(3,4-dihydroxyfenyl)propionová kyselina) je široce používána při léčbě Parkinsonovy nemoci a patří k té menšině syntetických chirálních léčiv, která jsou již mnoho let vyráběna jako čisté enantiomery. Důvodem bylo zjištění, že levodopa nevyvolává žádné vedlejší účinky (granulocytopenia), které byly pozorovány u dopy, jež je racemickou směsí obou enantiomerů³¹.

Ve formě čistého enantiomeru jsou užívány i methyldopa (L-2-amino-2-methyl-3-(3,4-dihydroxyfenyl)propionová kyselina), předepisovaná jako antihypertensivum a karbidopa (L-2-hydrazino-2-methyl-3-(3,4-dihydroxyfenyl)propionová kyselina) aplikovaná společně s levodopou jako antiparkinsonikum.

Tabulka I

Měření optické otáčivosti dle ČL 97 (levodopa a karbidopa) a ČSL 4 (methyldopa)

Léčivo	Přídavek D-izomeru [%]	Optická otáčivost ^a [°]	Lékopisem povolené rozmezí ^a [°]
Levodopa	0	-1,310	-1,27 až -1,34
	0,50	-1,313	
	1,00	-1,299	
	1,98	-1,278	
	5,02 ^b	-1,260 ^b	
Methyldopa	0	-15,42	-12,5 až -15,5
	0,50	-15,09	
	1,00	-14,84	
	1,97	-14,73	
	4,79	-13,91	
Karbidopa	0	-23,63	-22,5 až -26,5
	3,21	-22,52	
	5,33 ^b	-19,89 ^b	

^a U levodopy jsou uvedeny hodnoty změřeného úhlu optické otáčivosti α_D^{20} , které jsou limitovány lékopisem. U methyldopy a karbidopy jsou uvedeny hodnoty specifické optické otáčivosti $[\alpha]_D^{20}$, které jsou limitovány lékopisem, ^b hodnoty nevyhovující požadavkům lékopisu

Tabulka II

HPLC a CE metody separací enantiomerů levodopy, methyldopy a karbidopy a jejich využitelnost pro stanovení enantiomerní čistoty

Léčivo	Enantioselektivní separační metoda	Detekční limit ^a [%]	Validační studie	Komentář
Levodopa	LEC s dime-L-Phe	0,04	+	Vhodná pro citlivé stanovení enantiomerní čistoty. Vyžaduje dlouhé ustavování rovnováhy na koloně.
	LEC s L-Phe	–	–	Vhodná pro citlivé stanovení enantiomerní čistoty. Vyžaduje dlouhé ustavování rovnováhy na koloně.
	teikoplanin CSP RP LC	0,03	+	Robustní metoda pro citlivé, rutinní stanovení enantiomerní čistoty. Možnost doladit rozlišení obsahem ethanolu v mobilní fázi (test způsobilosti).
	teikoplanin CSP PO LC	–	–	Separace s nízkou účinností a dlouhými retenčními časy.
Methyldopa	CE s SBECD	0,02	–	Vhodná pro citlivé stanovení enantiomerní čistoty.
	LEC s dime-L-Phe	–	–	Stanovení nízkých koncentrací R-izomeru je znemožněno interferujícím negativním píkem. Není dosaženo úplné separace enantiomerů.
	teikoplanin CSP RP LC teikoplanin CSP PO LC	– 0,40	– +	Využitelná pro stanovení enantiomerní čistoty. Rozlišení enantiomerů nelze ovlivnit složením mobilní fáze, citlivé stanovení vyžaduje kolonu s vysokou účinností.
	CE s SBECD	0,05	+	Vhodná pro citlivé, rutinní stanovení enantiomerní čistoty. Možnost doladit rozlišení enantiomerů koncentrací SBECD (test způsobilosti).
Karbidopa	LEC s L-Phe	0,05	+	Vhodná pro citlivé stanovení enantiomerní čistoty. Vyžaduje dlouhé ustavování rovnováhy na koloně.
	CE s SBECD	0,10	–	Vhodná pro citlivé, rutinní stanovení enantiomerní čistoty. Možnost doladit rozlišení koncentrací SBECD (test způsobilosti).
	teikoplanin CSP RP LC	0,50	–	Nižší účinnosti separace vedou k nižším detekčním limitům.
	teikoplanin CSP PO LC	0,50	–	Nižší účinnosti separace vedou k nižším detekčním limitům.

^a Stanovený z poměru signál/šum a vyjádřený jako obsah D-izomeru vztahený k celkovému obsahu L+D-izomeru

4.1. Lékopisné polarimetrické metody

V tabulce I jsou uvedeny výsledky měření optické otáčivosti podle příslušných metod European Pharmacopoeia (Ph. Eur.)²⁷, které jsou zároveň i metodami Českého lékopisu (ČL 97)³². Pro měření byly namíchány směsi D- a L-izomerů o známém složení, uvedeném v prvním sloupci tabulky. Poslední sloupec pak obsahuje přípustná rozmezí optické otáčivosti udávaná v lékopisech.

U methyldopy jsme použili metodu dle Československého lékopisu (ČSL 4)³³, protože metoda podle Ph. Eur. a ČL 97 používá roztoky methyldopy v silně koncentrovaném, viskózním roztoku chloridu hlinitého a jsou známy experimentální potíže s prováděním této metody³⁴.

Podle očekávání dokládají výsledky nedostatečnou citlivost metod. Ve všech případech přestávají lékopisným limitům vyhovovat až směsi obsahující více jak 2 % D-izomeru jako nečistoty, u methyldopy zkoušené dle ČSL 4 dokonce vyhovuje i směs obsahující 4,79 % D-izomeru. Velkou šíří

přípustného rozmezí pro optickou otáčivost můžeme dokumentovat na případu karbidopy. Interval přípustných hodnot specifické otáčivosti karbidopy má podle Ph. Eur. i ČL 97 šíři 4,0°. Naše měření ukázala, že přidání i tak velkého množství jako je 5,3 % D-izomeru k L-karbidopě změnilo specifickou otáčivost o hodnotu menší než je uvedený interval (rozdíl mezi hodnotami specifické otáčivosti pro karbidopu s nulovým obsahem D-izomeru a s obsahem 5,33 % D-izomeru, uvedenými v tabulce I, je 3,74°).

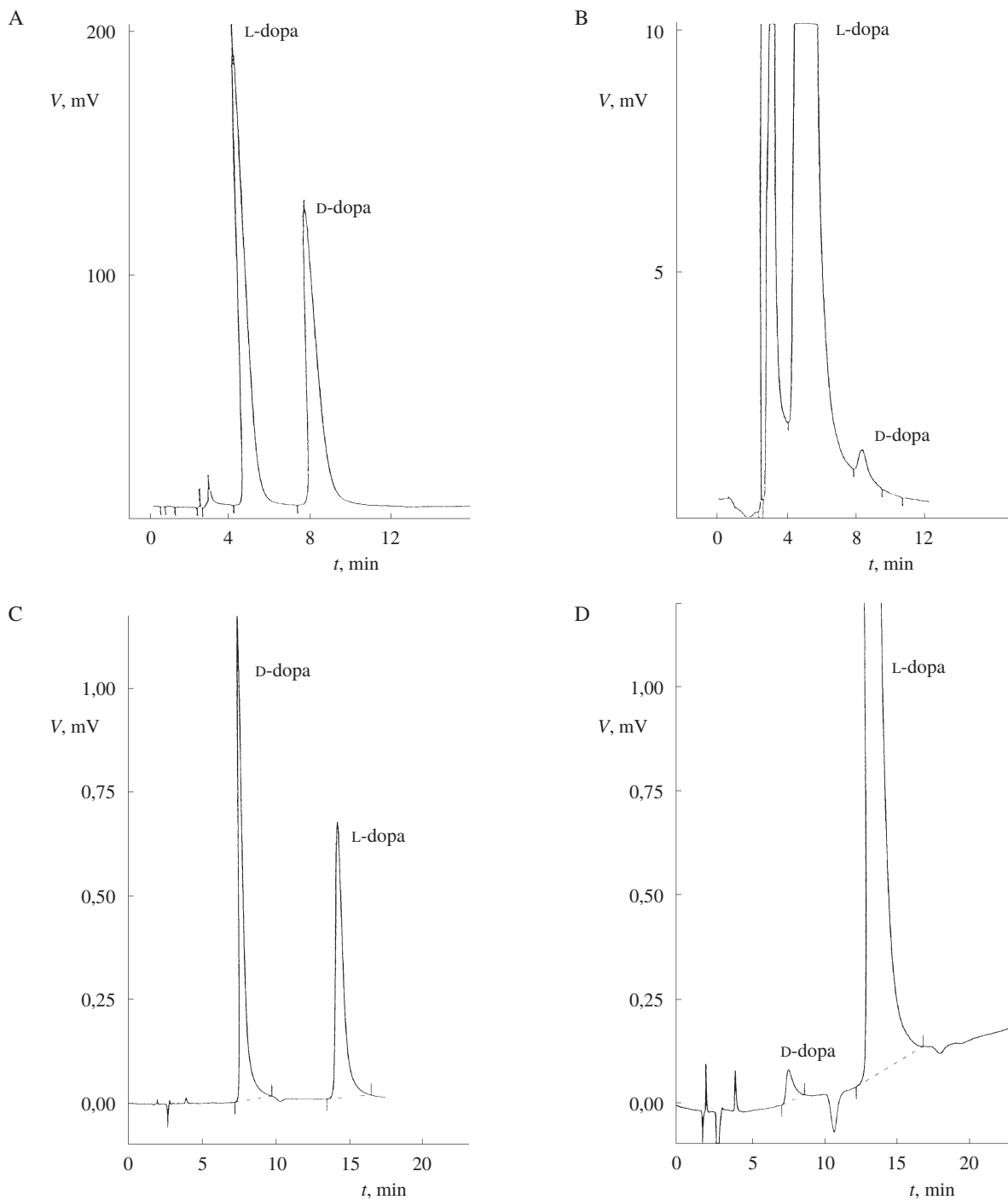
4.2. Enantioselektivní HPLC metody

Pro přímou separaci aromatických aminokyselin s primární aminovou skupinou, k nimž patří svým chemickým složením dopa i methyldopa, nabízí současná enantioselektivní HPLC metodologie několik možností: chromatografii s výměnou ligandů³⁵ (LEC), která je vůbec nejstarší enantioselektivní HPLC technikou, použití cyklických polyetherů v chirální stacionární nebo mobilní fázi^{36,37}, použití stacionární fáze s vá-

zaným α -cyklodextrinem³⁸ nebo nejnověji stacionární fáze s vázaným glykopeptidovým antibiotikem teikoplaninem^{39,40}.

Teikoplanin se ukázal být zvláště účinným chirálním selektorem pro enantioseparace aminokyselin, když bylo dosaženo separace u 45 racemátů z 55 zkoušených aminoky-

selin⁴⁰. Proto jsme podrobně prostudovali možnosti jeho použití pro separaci enantiomerů dopy, methyl dopy i karbidopy. Pracovali jsme v reverzním separačním módu (RP), používajícím jako mobilní fázi směs alkohol–voda i v módu s polárně organickou mobilní fází (PO), tvořenou směsí methanolu,



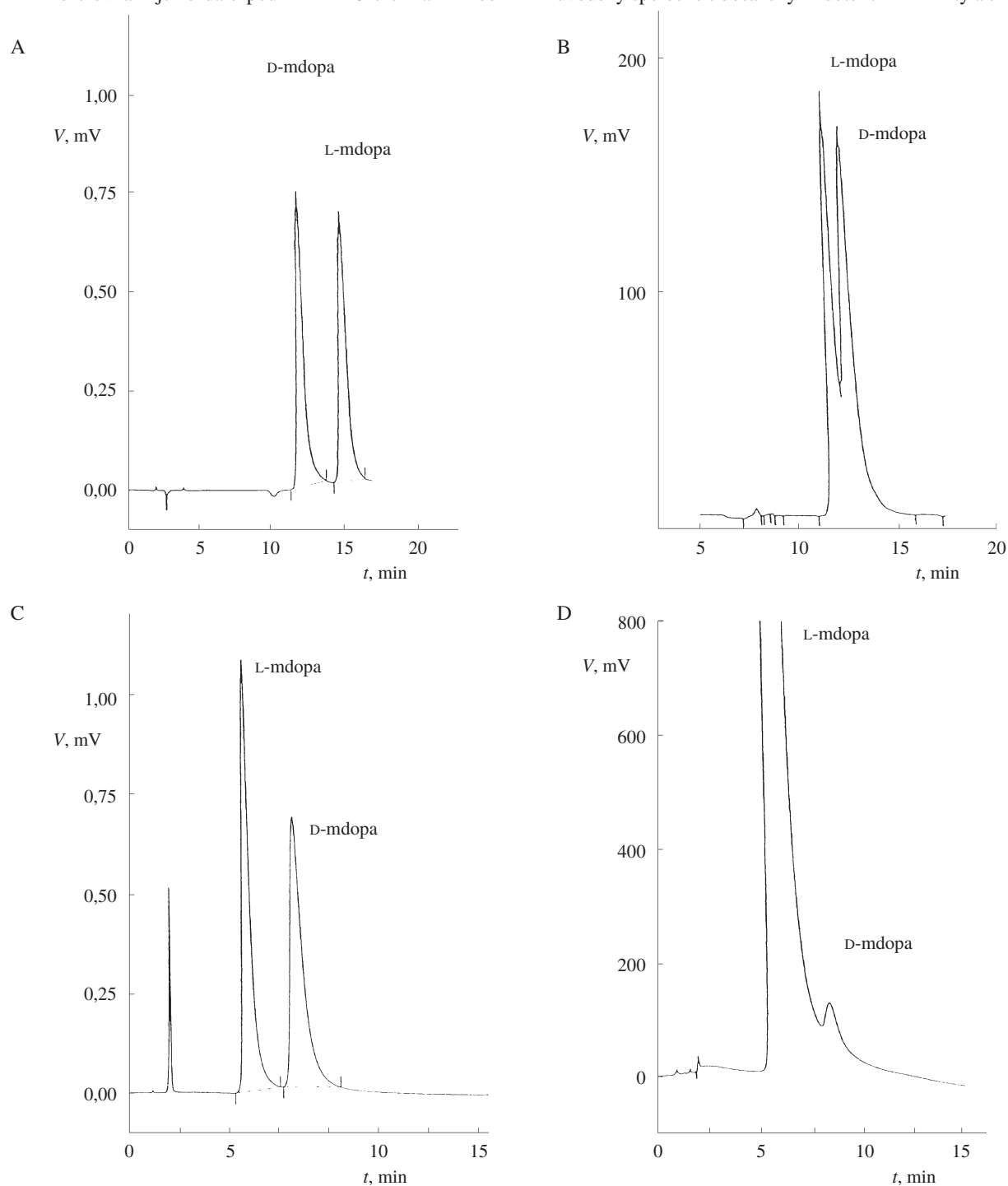
Obr. 1. Chromatografické záznamy separace racemátu dopy (A, C) a směsí enantiomerů dopy obsahující 0,1 % D-dopy (B) nebo 0,5 % D-dopy (D); A, B: teikoplaninová stacionární fáze (kolona o rozměrech 150×4,6 mm), mobilní fáze 65 % (v/v) ethanol – 35 % (v/v) voda, průtoková rychlost 0,7 ml.min⁻¹, UV detekce při 280 nm; C, D: chromatografie s výměnou ligandů na koloně C18, 250×4,6 mm, mobilní fáze 10 % (v/v) methanol – 90 % (v/v) octan měďnatý ($c = 1 \text{ mmol.l}^{-1}$) o pH 4,5 obsahující dime-L-Phe ($c = 2 \text{ mmol.l}^{-1}$), průtoková rychlost 0,8 ml.min⁻¹, UV detekce při 228 nm

triethylaminu a kyseliny octové^{25,41}. U dosažených separací enantiomerů byl dále zkoumán jejich potenciál pro stanovení enantiomerní čistoty L-izomerů^{24,25,41}.

Pro srovnání jsme dále použili i LEC s chirální mobil-

ní fází obsahující buď *N,N*-dimethyl-L-fenylalanin (dime-L-Phe)^{24,25} nebo L-fenylalanin (L-Phe)³⁴.

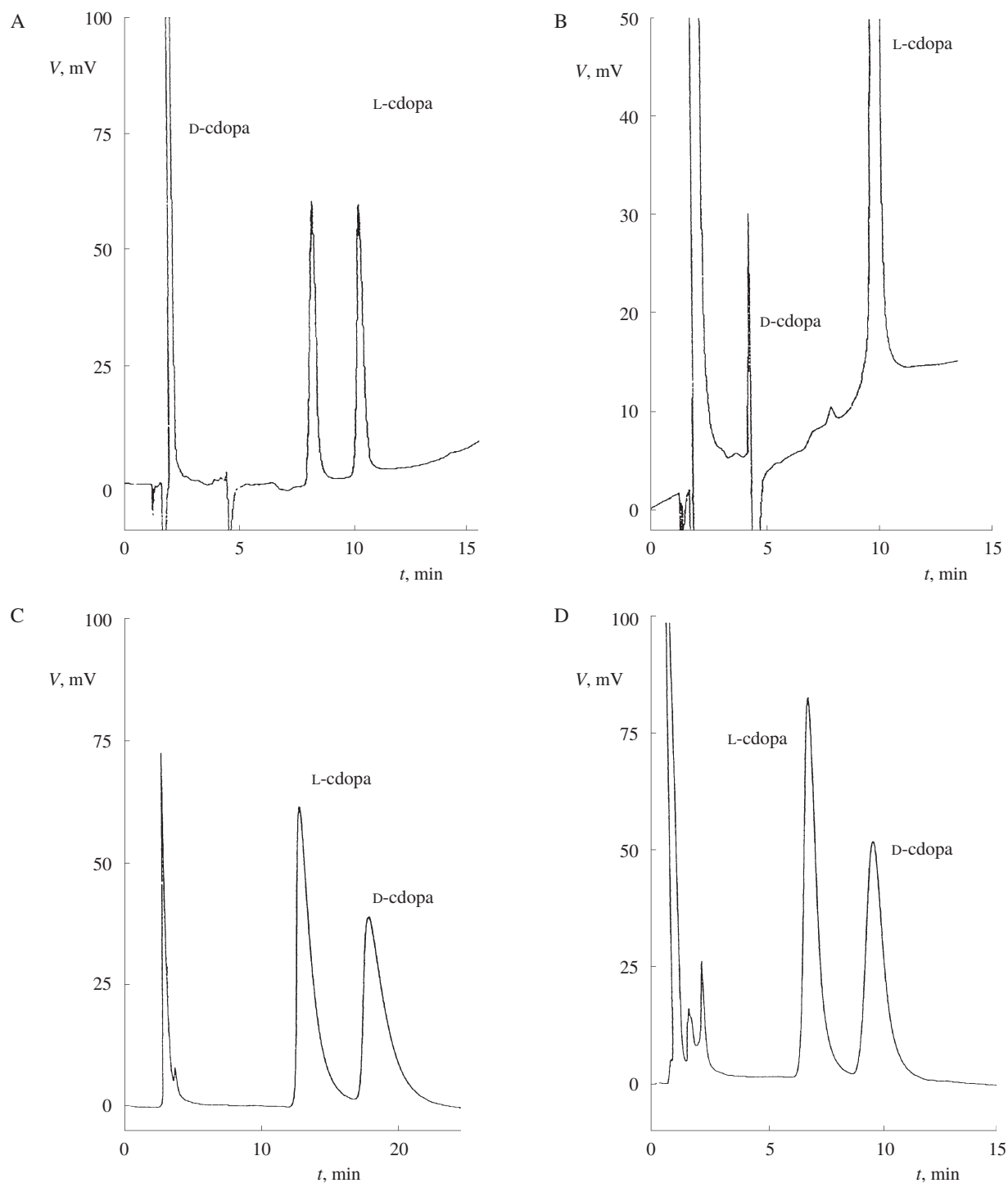
Použité HPLC metody enantioseparací jsou přehledně uvedeny společně s dosaženými detekčními limity a s kome-



Obr. 2. Chromatografické záznamy separace racemátu methyldopy (A, B, C) a směsi enantiomerů methyldopy obsahující 1 % D-methyldopy (D); A: chromatografie s výměnou ligandů na koloně C18, 250×4,6 mm, mobilní fáze 10 % (v/v) methanol – 90 % (v/v) octan měďnatý ($c = 1 \text{ mmol.l}^{-1}$) o pH 4,5 obsahující dime-L-Phe ($c = 2 \text{ mmol.l}^{-1}$), průtoková rychlost $0,8 \text{ ml.min}^{-1}$, UV detekce při 228 nm, B: chromatografie na teicoplaninové stacionární fázi (kolona o rozměrech 150×4,6 mm), mobilní fáze 65 % (v/v) ethanol – 35 % (v/v) voda, průtoková rychlost $0,7 \text{ ml.min}^{-1}$, UV detekce při 280 nm, C, D: jako B ale s polárním organickou mobilní fází obsahující směs 99,99 % (v/v) methanolu, 0,005 % (v/v) kyseliny octové a 0,005 % (v/v) triethylaminu, průtoková rychlost $0,9 \text{ ml.min}^{-1}$, UV detekce při 210 nm

tářem v tabulce II. Dosažené separace studovaných enantiomerů ilustrují obrázky 1–3, experimentální podmínky jsou uvedeny v textu pod obrázky. V tabulce III jsou ukázány

některé výsledky validačních studií těchto metod. Hodnoty validačních parametrů jsou srovnatelné s hodnotami běžně získávanými při stanovení čistoty léčiv pomocí HPLC a do-



Obr. 3. Chromatografické záznamy separace racemátu karbidopy (A, C, D) a směsi enantiomerů karbidopy obsahující 1 % D-karbidopy (B); A, B: separace dosaženy metodou chromatografie s výměnou ligandů na koloně C18, 250×4,6 mm, mobilní fáze 7,7 % (v/v) methanol – 92,3 % (v/v) octan měďnatý ($c = 3 \text{ mmol.l}^{-1}$) obsahující L-Phe ($c = 6 \text{ mmol.l}^{-1}$), průtoková rychlost 1 ml.min^{-1} , UV detekce při 280 nm, C: chromatografie na teikoplaninové stacionární fázi (kolona o rozměrech 150×4,6 mm), mobilní fáze 65 % (v/v) ethanol – 35 % (v/v) voda, průtoková rychlost $0,7 \text{ ml.min}^{-1}$, UV detekce při 280 nm, D: jako C ale s polární organickou mobilní fází obsahující methanol s 0,005 % (v/v) kyseliny octové, průtoková rychlost $0,9 \text{ ml.min}^{-1}$, UV detekce při 210 nm

kumentují dobrou přesnost, správnost a citlivost stanovení. Pouze u stanovení enantiomerní čistoty methyldopy za použití teikoplaninové CSP a PO mobilní fáze bylo dosaženo poněkud nižší citlivosti a správnosti, což je způsobeno problémy při vyhodnocování píku D-izomeru eluovaném na chvostu majoritního píku L-izomeru.

4.3. Enantioselektivní CE metody

V posledních letech jsou pro enantioselektivní CE separace stále více využívány deriváty cyklohexinu s vlastním nábojem⁴². Jedním z takovýchto chirálních selektorů je nedávno popsán polyaniontový derivát, sulfobutylether- β -cyklohexin (SBECD), který je charakterizován průměrným stupněm substituce 4 a který má, díky svým sulfonovým skupinám, negativní náboj v celém rozsahu pH běžném u CE^{43,44}.

Tento chirální selektor jsme použili při studiu separací enantiomerů dopy, methyldopy a karbidopy. Na základě zjištěné závislosti migračních časů a rozlišení enantiomerů na koncentraci SBECD byly nalezeny podmínky pro separace využitelné pro stanovení enantiomerní čistoty⁴⁵. Na obrázku 4

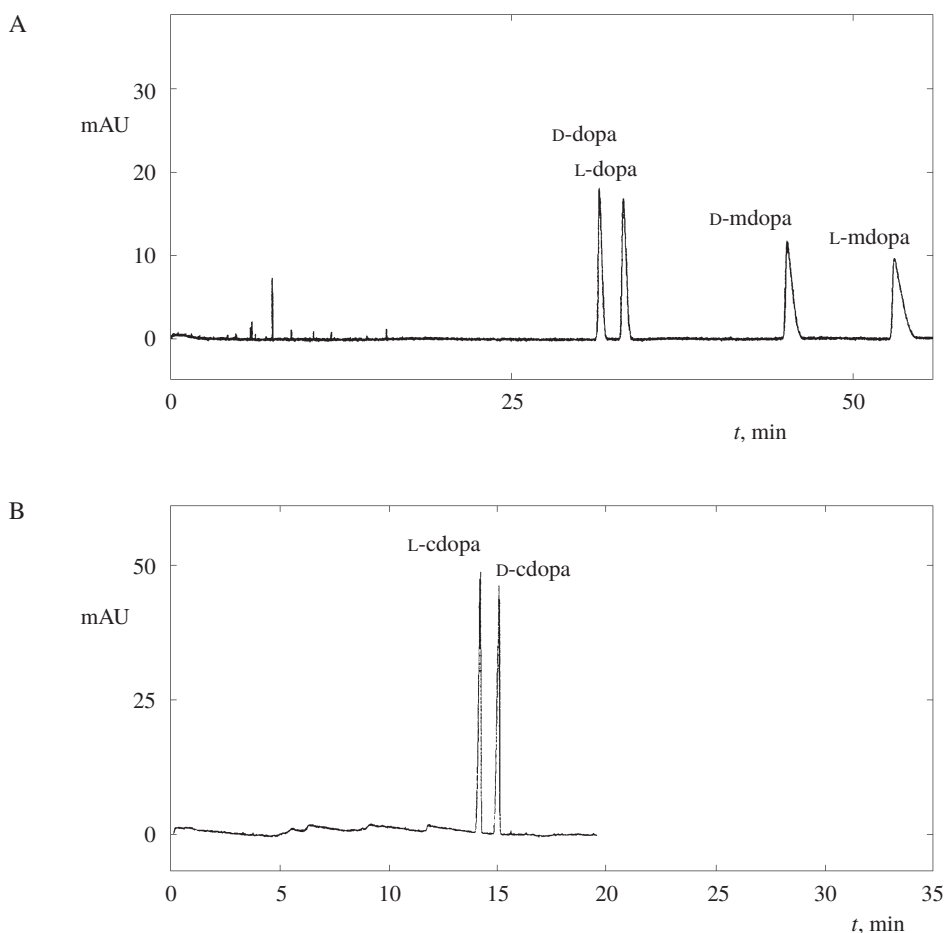
jsou pro ilustraci ukázány dva záznamy dosažených separací enantiomerů, experimentální podmínky jsou uvedeny v textu pod obrázkem.

Navržené CE metody jsou společně s HPLC metodami uvedeny v přehledu v tabulce II, do tabulky III je pro ilustraci zařazeno několik výsledků validace CE metody stanovení enantiomerní čistoty methyldopy.

4.4. Srovnání metod

Data uvedená v tabulkách I–III dokumentují nedostatečnou citlivost polarimetrických metod a přednosti enantioselektivních metod HPLC a CE. Pro každé ze tří studovaných léčiv byla vypracována nejméně jedna separační metoda, která umožňuje citlivé a selektivní stanovení nežádoucího D-izomeru a která je vhodná pro rutinní používání. Citlivost je ve srovnání s polarimetrickými metodami o 1–2 řády vyšší a naruždí od polarimetrických metod jsou tyto metody nejen selektivní, ale v některých případech umožňují i současné stanovení dalších organických nečistot²⁵.

Enantioselektivní CE se ukázala být dobrou alternativou k HPLC a její použití pro stanovení enantiomerní čistoty může



Obr. 4. Elektroforetické záznamy separace enantiomerů dopy, methyldopy a karbidopy získané při teplotě 20 °C za použití křemenné kapiláry o průměru 50 μm a celkové délce 47 cm (délka k detektoru 40 cm) a elektrolytového systému obsahujícího fosforečnanový pufr ($c = 40 \text{ mmol.l}^{-1}$, pH 2,50) a chirální selektor SBECD o koncentraci 3,06 mmol.l^{-1} (A) nebo 20,04 mmol.l^{-1} (B), UV detekce při 200 nm, separační napětí 18 kV normální polaroty (A) nebo obrácené polaroty (B)

Tabulka III
Validace HPLC a CE metod stanovení enantiomerní čistoty léčiv

Léčivo	Metoda	Přídavek D-izomeru [%]	RSD [%]		Výtěžnost [%]	Korelační koeficient	Rozsah linearity [$\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$]
			během dne	mezi dny			
Levodopa	LEC	0,50	2,3	5,7	99,4	0,9991	1–25
	s dime-L-Phe	1,19	1,4	3,5	102,7		
	teikoplaninCSP	0,50	1,0	1,4	104,3		
	RP LC	0,99	1,2	2,5	99,5		
Methylropa	teikoplaninCSP	1,47	1,8	1,5	83,2	0,9815	5–27
	PO LC	2,97	0,4	2,2	96,2		
	CE s SBECD	0,55	3,2	2,6	108,8		
		1,95	2,0	1,1	96,2		
Karbidopa	LEC s L-Phe	0,49	2,7	1,0	101,9	0,9999	1–50

být v některých případech výhodnější než použití HPLC, jak ukazuje příklad methylropy. Enantiomery této aminokyseliny jsou pro svoji α -methylovou skupinu na teikoplaninové stacionární fázi obtížněji rozlišitelné než enantiomery dopy⁴¹ a ani enantioselektivní LEC není v tomto případě aplikovatelná při vyšších citlivostech²⁵. Naproti tomu CE metoda se SBECD jako chirálním selektorem nabízí citlivé a spolehlivé stanovení čistoty (viz výsledky validací v tabulce III).

5. Závěr

Současný posun v používání syntetických chirálních léčiv ve prospěch čistých enantiomerů spolu se stále přísnějšími požadavky na čistotu léčiv klade větší nároky i na kontrolu enantiomerní čistoty léčiv a na metody pro tento účel používané. Klasické polarimetrické metody neodpovídají současným požadavkům na kontrolu čistoty a současnému vývoji enantioselektivní metodologie. Při použití enantioselektivních metod HPLC nebo CE lze kontrolovat enantiomerní čistotu léčiv na stejné úrovni, jaká je požadována pro sledování přítomnosti organických nečistot, zatímco polarimetrické metody zachycují přítomnost enantiomerních nečistot neselektivně a většinou až při obsahu převyšujícím výrazně 1 %. Použití metod enantioselektivní HPLC a CE v lékopisech zlepšilo úroveň článků pro enantiomerně čistá léčiva a přispěje ke změně v přístupu k enantiomerním nečistotám, které jsou zatím ze skupiny organických nečistot vyčleňovány.

Je však třeba zdůraznit, že při komplexnosti celého jevu chiralit a vzhledem ke skutečnosti, že trend ve vývoji léčiv jasně směřuje k většímu počtu stereogenních center v molekule syntetických chirálních léčiv, představuje obecně kontrola stereoizomerní čistoty léčiv náročný úkol pro moderní stereo-selektivní analytickou chemii.

Tato práce byla finančně podporována grantem MZ ČR (grant č. 3607-3).

LITERATURA

- Ariens E. J.: Eur. J. Clin. Pharmacol. 26, 663 (1984).
- Drayer D. E.: Clin. Pharmacol. Ther. 40, 125 (1986).
- FDA: Policy Statement for the Development of New Stereoisomeric Drugs. Chirality 4, 338 (1992).
- CPMP: Directive 75/318/EEC: Investigation of Chiral Active Substances (přijato 1993).
- Rauws A. G., Groen K.: Chirality 6, 72, 1994.
- ICH Tripartite Guideline Q3A: Impurities in New Drug Substances (přijato 1995).
- ICH Tripartite Guideline Q6A: Specifications for New Drug Substances and Products: Chemical Substances. Step 2, 1997.
- Dawson B. A., Mattok G. L.: Pharmeuropa 9, 347, 1997.
- Subramanian G. (ed.): A Practical Approach to Chiral Separations by Liquid Chromatography. VCH, New York 1994.
- Ahuja S. (ed.): Chiral Separation by Liquid Chromatography (ACS Symposium Series 471). American Chemical Society, Washington, DC 1991.
- Petersson C., Persson B. A., v knize: Handbook of HPLC (Katz E., Eksteen R., Schoemakers P., Miller N., ed.), str. 669. Marcel Dekker, New York 1998.
- Gilar M., Tesařová E., Patzelová V., Deyl Z.: Chem. Listy 88, 514 (1994).
- Wang F., Khaledi M. G., v knize: High Performance Capillary Electrophoresis (Khaledi M. G., ed.), str. 791. Wiley-Interscience Publications, New York 1998.
- Nishi H., Terabe S.: J. Chromatogr. A 694, 245 (1995).
- Fanali S.: J. Chromatogr. A 735, 77 (1996).
- Vespalec R., Boček B: Electrophoresis 18, 843 (1997).
- Däppen R., Arm H., Meyer V. R.: J. Chromatogr. 373, 1 (1986).
- Armstrong D. W., Tang Y., Chen S., Zhou Y., Bagwill Ch., Chen J.-R.: Anal. Chem. 66, 1473 (1994).
- Okamoto Y., Kaida Y.: Chromatogr. A 666, 403 (1994).
- Bressolle F., Audran M., Pham T.-N., Vallon J.-J.: J. Chromatogr. B 687, 303 (1996).
- Doyle T. D., v knize: Chiral Separations by LC (Ahuja S., ed.), str. 27. ACS, Washington, DC 1991.
- Perry J. A., Rateike J. D., Szczerba T. J.: J. Chromatogr. 389, 57 (1987).
- Blom Y., Ek M., Martin J. T., Stjernström: Pharmeuropa 5, 381 (1993).
- Doležalová M., Tkaczyková M.: Pharmeuropa 10, 322 (1998).

25. Doležalová M., Tkaczyková M.: *J. Pharm. Biomed. Anal.* 19, 555 (1999)
26. Rose U., Kaltenbach T.: *Pharmeuropa* 11, 16 (1999).
27. Council of Europe: *European Pharmacopoeia* 3rd Ed. (1996) a Supplement 2000 (1999), Strasbourg.
28. Anonym: *Pharmeuropa* 10, 198 (1998).
29. Anonym: *Pharmeuropa* 10, 243 (1998).
30. Anonym: *Pharmeuropa* 11, 77 (1999).
31. Cotzias G. C., Papavasiliow P. S., Gellene R.: *N. Engl. J. Med.* 280, 337 (1969).
32. *Český lékopis 1997 (Pharmacopoea Bohemica MCMXCVII)*. Grada Publishing, Praha 1997.
33. *Československý lékopis (Pharmacopoea Bohemoslovaca IV)*, 4. vydání. Avicenum, Praha 1987.
34. Gelber L. R., Neumeyer J. L.: *J. Chromatogr.* 257, 317 (1983).
35. Davankov V. A.: *J. Chromatogr. A* 666, 55 (1994).
36. Hilton M., Armstrong D. W.: *J. Liq. Chromatogr.* 14, 9 (1991).
37. Shinbo T., Yamaguchi T., Nishimura K., Sugiura M.: *J. Chromatogr.* 405, 145 (1987).
38. Armstrong D. W., Yang X., Han S. M., Menges R. A.: *Anal. Chem.* 59, 2594 (1987).
39. Armstrong D. W., Liu Y., Ekborgott K. H.: *Chirality* 7, 474 (1995).
40. Berthod A., Liu Y., Bagwill Ch., Armstrong D. W.: *J. Chromatogr.* 731, 123 (1996).
41. Doležalová M., Tkaczyková M.: *Chirality* 11, 394 (1999).
42. Chankvetadze B.: *J. Chromatogr. A* 792, 269 (1997).
43. Tait R. J., Thompson D. O., Stella V. L., Stobaugh J. F.: *Anal. Chem.* 66, 4013 (1994).
44. Desiderio C., Fanali S.: *J. Chromatogr.* 16, 183 (1995).
45. Doležalová M., Fanali S.: *23rd International Symposium on High Performance Liquid Phase Separations and Related Techniques HPLC'99*, Granada 1999. Book of Abstracts Vol. II, str. PB 6/7.

M. Doležalová and M. Tkaczyková (State Institute for Drug Control, Prague): Control of Enantiomeric Purity of Drugs

Due to the importance of stereoisomerism for drug efficacy and safety and due to the strict policy of regulatory authorities, pharmaceutical companies tend to produce chiral drugs in single enantiomeric forms. In drug control, the undesirable stereoisomers should be considered in the same manner as other organic impurities. The potential of enantioselective liquid-phase separation methods in determination of the enantiomeric purity is demonstrated for three structurally related drugs, levodopa, methyl dopa and carbidopa. Direct HPLC and capillary electrophoretic separations of the enantiomers of interest with the use of recently introduced chiral selectors, teicoplanin and sulfobutyl ether β -cyclodextrin, are described. In addition, ligand-exchange liquid chromatography with *N,N*-dimethyl-L-phenylalanine or L-phenylalanine in mobile phase is discussed. Results of measurement of optical rotation according to the European Pharmacopoeia are mentioned and inapplicability of polarimetric methods to assessment of enantiomeric impurities (D-isomers) at levels lower than 2 % is shown.