

UNIVERZITA KARLOVA  
Přírodovědecká fakulta

---

Studijní program: Klinická a toxikologická analýza



Bára Seidlová

## CHROMATOGRAFICKÁ CHARAKTERIZACE IONTOVĚ VÝMĚNNÉ KOLONY

Chromatographic Characterization of An Ion Exchange Column

Bakalářská práce

Vedoucí bakalářské práce: RNDr. Jana Sobotníková, Ph.D.

Praha 2018

## **Prohlášení**

Prohlašuji, že jsem tuto závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

Jsem si vědoma toho, že případné využití výsledků, získaných v této práci, mimo Univerzitu Karlovu je možné pouze po písemném souhlasu této univerzity.

V Praze dne

## Abstrakt

Při charakterizaci zvolené iontově výměnné kolony Phenosphere™ SCX byl zvolen následující postup. Nejdříve byla vybrána sada biologicky zajímavých analytů, která obsahovala několik bazických léčiv; konkrétně pět tricyklických antidepresiv (TCA), anestetikum prokain a látku s antimalarickým a antiarytmickým účinkem – chinidin. Pro tuto řadu bazických látek byly optimalizovány separační podmínky na charakterizované iontově výměnné koloně Phenosphere™ SCX. Byl studován vliv složení mobilní fáze, tedy vliv použitého pufru a jeho koncentrace, pH pufru a vliv přídavku organického modifikátoru (v tomto případě methanolu) na chromatografické chování vybraných léčiv. Za optimalizovaných chromatografických podmínek pro analýzu bazických léčiv pak byla iontově výměnná kolona charakterizována pomocí metody LSER (model lineárních vztahů solvatační energie). Bylo zjištěno chromatografické chování sady testovacích látek se známými hodnotami molekulárních deskriptorů a následně provedena vícenásobná lineární regrese mezi retenčními faktory testovacích látek a jejich molekulárními deskriptory. Výsledky vícenásobné lineární regrese byly diskutovány a poté byly vyhodnoceny interakce přispívající k retenci analytů na studované kationtově výměnné koloně Phenosphere™ SCX.

**Klíčová slova:** HPLC, iontově výměnná chromatografie, charakterizace, LSER, tricyklická antidepresiva

## **Abstract**

The following evaluation procedure was selected for the characterized ion-exchange column Phenosphere™ SCX. First of all, a set of biologically interesting analytes was selected. This set contained several basic drugs, specifically five tricyclic antidepressants (TCA), an anesthetic called procaine and a substance with antimalaric and antiarrhythmic effect – quinidine. For this set of basic substances were the separation conditions optimized on a characterized ion-exchange column Phenosphere™ SCX. The effect of the mobile phase composition on chromatographic behaviour of selected drugs was investigated, for instance the effect of used buffer and its concentration, buffer pH and the effect of addition of the organic modifier (in this case methanol). Under optimized chromatographic conditions for basic drugs analysis the ion-exchange column was characterized using LSER (Linear Solvation Energy Relationship). The chromatographic behaviour of the test substances with known molecular descriptors was found and then the multiple linear regression between retention factors of test substances and their molecular descriptors was done. The results of the multiple linear regression were discussed and then the interactions contributing to the analyte retention on the investigated cation-exchange column Phenosphere™ SCX were evaluated.

**Key words:** HPLC, ion-exchange chromatography, characterization, LSER, tricyclic antidepressants

## **Poděkování**

Ráda bych poděkovala své vedoucí bakalářské práce RNDr. Janě Sobotníkové, Ph.D. za trpělivost, ochotu a velmi cenné rady během laboratorního měření i následného písemného zpracování bakalářské práce.

Zároveň bych na tomto místě ráda poděkovala i své rodině, přátelům, a především pak mému partnerovi Lukášovi za bezmeznou psychickou podporu a důvěru, kterou ve mně vkládal po celou dobu studia.

## Obsah

1	Úvod .....	10
2	Teoretický úvod.....	11
2.1	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie .....	11
2.2	Iontově výměnná chromatografie.....	11
2.2.1	Stacionární fáze pro IEC.....	11
2.2.2	Mobilní fáze pro IEC .....	12
2.2.3	Detektory pro IEC .....	12
2.3	Model lineárních vztahů solvatační energie .....	13
2.4	Použitá bazická léčiva .....	15
2.4.1	Imipramin HCl.....	16
2.4.2	Amitriptylin HCl .....	16
2.4.3	Klomipramin HCl.....	16
2.4.4	Trimipramin maleinát.....	17
2.4.5	Desipramin HCl.....	17
2.4.6	Chinidin sulfát .....	17
2.4.7	Prokain HCl .....	17
2.4.8	Vlastnosti použitých bazických léčiv .....	18
2.5	Separační metody využívané pro analýzu vybraných bazických léčiv .....	20
3	Experimentální část .....	22
3.1	Použité chemikálie.....	22
3.2	Použité přístroje.....	22
3.3	Příprava vzorků .....	23
3.4	Podmínky měření pro modelové analyty.....	23
3.5	Podmínky měření pro LSER .....	23
4	Výsledky a diskuze.....	24

5	Závěr.....	35
	Použitá literatura.....	36

## Seznam zkratek a symbolů

<i>A</i>	celková kyselost vodíkové vazby analytu
$A_\lambda$	absorbance při dané vlnové délce
ACN	acetonitril
AMI	amitriptylin
<i>B</i>	celková bazicita vodíkové vazby analytu
CNS	centrální nervová soustava
DEA	diethylamin
DEAE	diethylaminoethyl
DES	desipramin
<i>E</i>	přebytková molární refrakce
ECL	elektrochemiluminiscenční
GC	plynová chromatografie (z angl. <i>Gas Chromatography</i> )
GIT	gastrointestinální trakt
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie (z angl. <i>High Performance Liquid Chromatography</i> )
IEC	iontově výměnná chromatografie (z angl. <i>Ion Exchange Chromatography</i> )
IMI	imipramin
KLO	klomipramin
LC	kapalinová chromatografie (z angl. <i>Liquid Chromatography</i> )
LSER	model lineárních vztahů solvatační energie (z angl. <i>Linear Solvation Energy Relationship</i> )
MF	mobilní fáze
MS	hmotnostní spektrometr (z angl. <i>Mass Spectrometer</i> )
PDA	diodové pole (z angl. <i>Photodiode Array</i> )
PRO	prokain
<i>S</i>	dipolarita/polarizovatelnost
SFC	superkritická fluidní chromatografie (z angl. <i>Supercritical Fluid Chromatography</i> )
SCX	silný měnič kationtů (z angl. <i>Strong Cation Exchanger</i> )
SF	stacionární fáze
SPME	mikroextrakce tuhou fází (z angl. <i>Solid Phase Microextraction</i> )

$t_R$	retenční čas
TCA	tricyklická antidepresiva
TRI	trimipramin
Tris	tris(hydroxymethyl)aminomethan
UHPLC	ultra vysokoúčinná kapalinová chromatografie (z angl. <i>Ultra-High Performance Liquid Chromatography</i> )
$V$	McGowanův charakteristický objem

# 1 Úvod

Cílem této práce je metodou LSER chromatograficky charakterizovat iontově výměnnou kolonu Phenosphere™ SCX (Phenomenex, USA).

Při chromatografické charakterizaci kationtově výměnné kolony bude nejdříve použita sada vybraných bazických léčiv, u nichž je předpoklad jejich retence na zvolené koloně. Pro tuto sadu bazických léčiv budou nejdříve optimalizovány separační podmínky tak, aby od sebe byly látky co nejlépe rozlišeny, a tyto separační podmínky poté budou použity pro metodu LSER jako takovou. Za daných experimentálních podmínek bude proměřena i sada látek pro LSER, jejichž retenční faktory a molekulární deskriptory budou následně podrobeny vícenásobné lineární regresi. Na závěr budou na základě výsledků regrese vyhodnoceny interakce přispívající k retenci analytů na koloně Phenosphere™ SCX.

## 2 Teoretický úvod

### 2.1 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie

Vysokoúčinná kapalinová chromatografie je základní instrumentální analytická metoda, která slouží k separaci, identifikaci a kvantifikaci sledovaných analytů. Látky, jež je možno touto metodou analyzovat, mohou být různé povahy a podle té se pak liší výběr kolony, stacionární fáze, mobilní fáze, detektoru atd.

V HPLC je využíváno vícero separačních mechanismů, které se různí podle způsobu zadržování a dělení analyzovaných látek. Při gelové permeační chromatografii (GPC) dochází k dělení molekul analytů v pórech gelu na základě jejich rozdílné velikosti; rozdělovací chromatografie (LLC) zajišťuje separaci látek na základě rozdílné rozpustnosti analytů mezi dvěma zcela nemísitelnými kapalinami; adsorpční chromatografie (LSC) využívá rozdílné adsorpce analytů na povrch tuhé fáze s aktivními centry a iontově výměnná chromatografie (IEC), která je založena na elektrostatické interakci mezi nabitým analytem a nabitou funkční skupinou stacionární fáze [1].

### 2.2 Ionově výměnná chromatografie

Ionově výměnná chromatografie je metoda, při níž dochází k separaci látek na základě rozdílné výměnné adsorpce iontů analytu na povrchu iontového nosiče [1].

#### 2.2.1 Stacionární fáze pro IEC

Stacionární fáze (= ionexy, z angl. *ion exchangers*) v IEC se mohou lišit podle chemického složení, podle skupenství nebo podle ionogenních skupin.

Podle chemického složení jsou SF děleny na anorganické, u nichž je k interakcím využívána krystalová mřížka, a organické, jejichž funkční skupiny jsou nerovnoměrně rozmístěny na polymerním řetězci. Mezi nejpoužívanější ionexy patří silikagel ( $\text{SiO}_2$ ), což je anorganická SF, která je využívána buď nemodifikovaná, poté slouží jako slabý katex [2], nebo je využívána pouze jako nosič vhodné funkční skupiny – anexové nebo katexové.

Stacionární fáze je dále možno dělit podle skupenství na pevné, pelikulární a kapalné. Pevné ionexy jsou nerozpustné látky, do jejichž pórů proniká voda, čímž dochází k bobtnání a vytvoření pružného gelu. Vyskytují se v různých formách – jako ionexové membrány, trubice, kapiláry atd. Pelikulární typ SF je tenká vrstva ionexu nanosená

na povrchu pevné inertní částice [3] a kapalné ionexy jsou látky obsahující iontové skupiny a nepolární části, které zajišťují rozpustnost v organických rozpouštědlech.

V neposlední řadě je možno SF dělit dle ionogenních skupin na anexy a katexy. Anex (z angl. *anion exchanger*) je nerozpustná polymerní polyvalentní báze, která uvolňuje a vyměňuje anionty. Anexy je možno dále dělit podle síly jejich funkční skupiny na silně bazické a slabě bazické, což určuje, které látky se na SF zachytí a které ne. Mezi slabě bazické iontoměniče patří aminy (primární, sekundární i terciární), mezi silné jsou pak řazeny amoniové soli [4], [5].

Katex (z angl. *cation exchanger*) je rovněž nerozpustná polymerní polyvalentní látka, konkrétně kyselina, uvolňující a vyměňující kationty. Stejně jako anexy je i katexy možno dělit podle síly funkční skupiny. Silně kyselý katex obsahuje sulfoskupinu navázanou na alkylový řetězec, slabý katex pak může obsahovat např. karboxy(methyl) skupiny [4], [5].

### **2.2.2 Mobilní fáze pro IEC**

Jako mobilní fáze jsou u IEC využívány roztoky pufrů, které je možno případně kombinovat s organickým modifikátorem. Jeho podíl má poté vliv na separaci, stejně tak jako pH MF, iontová síla pufru, teplota, velikost iontů pufru a jejich náboj. Rychlost eluce je ovlivňována zároveň teplotou, viskozitou roztoku a zrnitostí ionexu [2]. Eluci lze provádět izokraticky, kdy se složení MF nemění, nebo gradientově, kdy se během analýzy plynule mění určitá vlastnosti MF, např. iontová síla.

### **2.2.3 Detektory pro IEC**

Pro detekci v IEC se používají podobné detektory jako u HPLC. Nejčastěji je využíván UV/VIS detektor, kde je pomocí Lambert-Beerova zákona získána kvantitativní informace o analytu, následně PDA detektor, který funguje v podstatě na stejném principu jako UV/VIS detektor, ale s tím rozdílem, že snímá celé spektrum. Další variantou je vodivostní detektor, který měří elektrickou vodivost roztoku v průtokové cele [6]. Kvůli vysoké vodivosti MF je ale nutné před detektor předřadit supresor, což je zařízení potlačující vodivost MF [7]. V neposlední řadě je možné použít i elektrochemický detektor, jenž je využíván k detekci látek, které na rozhraní elektroda-MF podléhají elektrochemické reakci [8].

### 2.3 Model lineárních vztahů solvatační energie

Model lineárních vztahů solvatační energie (LSER) je založený na vztahu mezi fyzikálně-chemickými vlastnostmi látek a jejich strukturními charakteristikami odvozenými od molekulárních vlastností. Jedná se o semiempirický model, který kombinuje fyzikálně-chemické vlastnosti látek s empirickými parametry získanými z experimentálních dat. Původně byl model LSER používán pro popis solvatačního děje a interakcí mezi analytem a rozpouštědlem, ale v současnosti je model LSER využíván pro popis separačního děje v chromatografických technikách a využívá chemometrického zpracování dat vícenásobnou lineární regresí pro nalezení vztahu mezi retencí látky a jejími fyzikálně-chemickými vlastnostmi [9]. Model LSER je používán pro získání informací o rozdělovací rovnováze daného separačního systému v plynové chromatografii, superkritické fluidní chromatografii a kapalinové chromatografii [10], [11]. Popisuje způsob, jakým se dané látky zdržují v koloně podle svých chemických struktur a fyzikálně-chemických vlastností [12], tedy jednotlivé interakce separačního děje, a současně uvažuje i vliv separačního prostředí - SF a MF. Nejčastěji používaná forma LSER rovnice, tzv. Abrahamova rovnice či Abrahamův solvatační model, zahrnuje pět aditivních a na sobě navzájem nezávislých členů:

$$\log k = eE + sS + aA + bB + vV + c \quad (1)$$

kde  $k$  znamená retenční faktor dané látky, proměnné psané velkými písmeny ( $E$ ,  $S$ ,  $A$ ,  $B$ ,  $V$ ) jsou deskriptory molekuly, proměnné psané malými písmeny ( $e$ ,  $s$ ,  $a$ ,  $b$ ,  $v$ ) jsou systémové koeficienty a  $c$  je konstanta, která vždy charakterizuje daný systém za daných podmínek [10], ale nesouvisí s žádnou specifickou interakcí.

Molekulové deskriptory popisují charakteristické strukturální vlastnosti vždy jedné určité látky. Deskriptor  $E$ , přebytková molární refrakce, popisuje polarizovatelnost analytu ve srovnání se stejně velkou molekulou nepolárního alkanu. Parametr  $E$  je pro konkrétní molekulu vypočítán z experimentálně zjištěného indexu lomu a McGowanova charakteristického objemu. Deskriptor  $S$ , dipolarita či polarizovatelnost, popisuje polární vlastnosti analytu, konkrétně schopnost vytvářet permanentní dipól. Parametr  $S$  je pro konkrétní látku zpětně počítán ze solvatační rovnice na základě jeho retence na polárních stacionárních fázích v GC. Parametr  $A$  je celková kyselost vodíkové vazby analytu, která popisuje ochotu tvořit vodíkové vazby s rozpouštědlem. Při tvorbě vodíkové vazby je

analyt donorem vodíkového kationtu a rozpouštědlo jeho akceptorem. Hodnota deskriptoru  $A$  je získávána zpětným výpočtem ze solvatační rovnice na základě retence látek o různé kyselosti na polárních SF. Deskriptor  $B$  popisuje celkovou bazicitu vodíkové vazby analytu a vyjadřuje schopnost tvorby vodíkové vazby, kde je analyt akceptorem vodíkového kationtu a rozpouštědlo jeho donorem. Hodnota parametru  $B$  je opět zpětně počítána ze solvatační rovnice na základě retence analytů o různé bazicitě na polárních SF. Deskriptor  $V$  je označován jako McGowanův charakteristický objem nebo molární objem. Tento parametr udává rozměr molekuly analytu a je využíván v souvislosti s popisem tvorby kavity (dutiny) v rozpouštědle při solvataci analytu a také při popisu disperzních nepolárních interakcí analytu s rozpouštědlem. Tento parametr lze vypočítat ze znalosti molárních objemů jednotlivých atomů a počtu vazeb v molekule analytu. Pro izomery se stejným počtem atomů má parametr  $V$  totožnou hodnotu. McGowanův charakteristický objem tedy popisuje pouze objem molekuly, nikoliv její strukturní uspořádání. Deskriptory mohou být buď nalezeny v literatuře, nebo vypočítány pomocí predikčních počítačových softwarů.

Systemové koeficienty jsou regresními koeficienty Abrahamovy solvatační rovnice a popisují konkrétní typy interakcí probíhající v daném separačním systému. Při popisu retence v kapalinové chromatografii zohledňují vlastnosti SF a MF a jsou vyjadřovány jako rozdíl parametrů pro SF a pro MF. Nízká hodnota regresního koeficientu tedy vyjadřuje malý rozdíl mezi konkrétní vlastností stacionární a mobilní fáze. Regresní koeficienty jsou zjišťovány metodou vícenásobné lineární regrese mezi experimentálně zjištěnými retenčními charakteristikami látek (typicky retenční faktor v HPLC) a deskriptory analytů.

Regresní koeficient  $e$  souvisí se schopností SF a MF interagovat s analytem pomocí vazeb dipól-indukovaný dipól s využitím  $\pi$ - a  $n$ -elektronů, interakcemi volných elektronových párů a  $\pi$ - $\pi$  interakcemi. Koeficient  $s$  popisuje interakce typu dipól-dipól mezi SF, MF a analytem. Tento parametr bývá v LC záporný vlivem větší polarity MF. Regresní koeficient  $a$  charakterizuje schopnost tvorby vodíkové vazby mezi SF a MF a analytem, kde analyt je donor a fáze akceptory vodíkového protonu. Regresní koeficient  $b$  popisuje schopnost tvorby vodíkové vazby, kde MF a SF fungují jako donory vodíkového protonu a analyt jako jeho akceptor. Koeficient  $v$  popisuje míru disperzních (hydrofobních) interakcí mezi analytem a oběma fázemi. Zároveň charakterizuje

schopnost SF a MF vytvářet kavity pro analyt.

Pokud je znaménko před regresním koeficientem kladné, znamená to, že dochází k interakci se stacionární fází, a tím i k prodloužení retence dané látky. Pokud má regresní koeficient hodnotu zápornou, retence se snižuje, protože daná látka silněji interaguje s mobilní fází [12].

Bylo zjištěno, že rovnice (1) s pěti deskriptory není dostačující pro popis retence látek iontové povahy např. v HILIC separačním systému (hydrofilní interakční chromatografie), protože pro tento typ látek je potřeba zahrnout i příspěvek iontových (elektrostatických) interakcí. Základní solvatační rovnice proto byla rozšířena o další dva deskriptory [13], čímž vznikl následující tvar:

$$\log k = eE + sS + aA + bB + vV + d^-D^- + d^+D^+ + c \quad (2)$$

kde  $D^-$  odpovídá zápornému náboji, který je nesen aniontem nebo zwitteriontem, a  $D^+$  odpovídá kladnému náboji na kationtu nebo zwitteriontu. Tyto deskriptory, popisující stupeň disociace analytu vlivem pH použité MF, se získávají výpočtem z následujících vzorců [13]:

$$D^- = \frac{10^{(\text{pH}^* - \text{pK}^*)}}{1 + 10^{(\text{pH}^* - \text{pK}^*)}} \quad (3)$$

$$D^+ = \frac{10^{(\text{pK}^* - \text{pH}^*)}}{1 + 10^{(\text{pK}^* - \text{pH}^*)}} \quad (4)$$

kde je  $\text{pK}^*$  disociační konstanta kyseliny nebo báze ve vodně organické mobilní fázi, v praxi se používá příslušná hodnota  $\text{pK}$  ve vodném prostředí, a  $\text{pH}^*$  hodnota pH mobilní fáze, které bylo změřeno po smíchání vodného pufru s organickou složkou v daném poměru pomocí elektrody kalibrované na vodné pufrы [13]. Parametry  $d^+$  a  $d^-$  jsou regresní koeficienty popisující příspěvek SF a MF k iontovým interakcím. Tuto rozšířenou variantu LSER rovnice lze použít i pro popis retence analytů v IEC.

## 2.4 Použitá bazická léčiva

Látky, které v této práci sloužily jako modelové analyty a pro které byly optimalizovány separační podmínky, jsou ze skupiny bazických léčiv. Převážně byla vybrána tricyklická antidepressiva (TCA), ostatní dvě látky obsahují jiné struktury (viz pododдіl 2.4.8).

### 2.4.1 Imipramin HCl

Imipramin hydrochlorid je základní tricyklické antidepresivum (TCA), z něhož jsou vytvářena další antidepresiva (jeho analogy) – např. amitriptylin, klomipramin, trimipramin a další [14]. V těle se metabolizuje demethylací na desipramin, který je rovněž využíván jako antidepresivum [14].

Funkcí imipraminu je zvyšování koncentrace monoaminových neurotransmiterů, což jsou sloučeniny umožňující přenos vzruchů mezi neurony. Koncentrace monoaminových neurotransmiterů serotoninu a norepinefrinu je zvyšována pomocí neselektivní blokady jejich zpětného vychytávání [15]. Po podání působí imipramin na CNS a některé parasympatické nervy, čímž dochází k sedaci, tedy útlumu fyzické i duševní aktivity; zároveň může způsobit i snížení krevního tlaku. Imipramin je hojně využíván k léčbě deprese, bipolární poruchy, poruchy pozornosti a panické poruchy. Komerčně je znám pod názvem *Tofranil* [16] nebo *Melipramin* [17].

### 2.4.2 Amitriptylin HCl

Amitriptylin hydrochlorid je TCA, analog imipraminu, které brání v CNS stejně jako imipramin zpětnému vychytávání monoaminových neurotransmiterů - noradrenalinu a serotoninu, přičemž preferuje vychytávání serotoninu [15]. Zvýšená hladina těchto neurotransmiterů v mozku pak vede ke zlepšení nálady. Amitriptylin zároveň snižuje vedení bolestivých podnětů do CNS, funguje tedy jako analgetikum, a je používán i při léčbě insomnie [15]. V těle se metabolizuje na nortriptylin a obecně má silnější účinek než imipramin, díky čemuž je využíván například k léčbě neuropatických bolestí [14]. Komerční název pro tuto látku je v zahraničí *Elavil* nebo *Endep* [18], v České republice je prodáván pod názvem *Amitriptylin* [14].

### 2.4.3 Klomipramin HCl

Klomipramin hydrochlorid je analogem výše zmiňovaného imipraminu a řadí se tedy opět mezi TCA. Tato látka taktéž inhibuje zpětné vychytávání monoaminových neurotransmiterů, na rozdíl ale od ostatních zmíněných TCA preferuje serotonin [15]. Je tedy využíván k léčbě depresí, obsedantně-kompulzivní poruchy, fobií nebo také k usnadnění spánku a léčbě chronických bolestí. Díky svým účinkům, například na anticholinergní, antihistaminové a další receptory, má klomipramin široké uplatnění ve farmakologii, ale také velkou řadu nežádoucích účinků, mezi něž patří např. GIT

poruchy, poruchy nervového systému, poruchy ledvin a močových cest apod [19]. Klomipramin hydrochlorid je prodáván pod komerčním názvem *Anafranil* [20].

#### **2.4.4 Trimipramin maleinát**

Trimipramin maleinát je opět jako analog imipraminu řazen mezi TCA. Jeho účinky jsou shodné s výše zmíněnými léčivy, inhibuje zpětné vychytávání monoaminových neurotransmiterů, díky čemuž je využíván k léčbě depresí, nespavosti apod. Podobně jako klomipramin má též antihistaminové, anticholinergní a další účinky. Komerčně je znám pod jménem *Stangil* nebo *Surmontil* [14].

#### **2.4.5 Desipramin HCl**

Desipramin hydrochlorid jako metabolit imipraminu se také řadí mezi TCA. Rovněž brání zpětnému vychytávání norepinefrinu a serotoninu z CNS a má obdobné působení jako amitriptylin. Díky pomalejší eliminaci v těle mají jeho účinky delší trvání [14]. Prodává se pod komerčním názvem *Pertofran* [21].

#### **2.4.6 Chinidin sulfát**

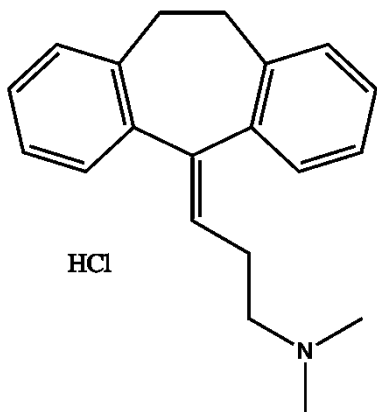
Chinidin sulfát je optickým izomerem chininu, který je získáván z kůry stromu chinovníku. Chinidin je používán k úpravě srdečního rytmu, ovlivňuje i činnost kosterních svalů a má antimalarické účinky. Jako antiarytmikum blokuje Na<sup>+</sup>-kanály, kde se váže na proteiny receptorů v otevřeném stavu, čímž blokuje výstup K<sup>+</sup> iontů z buňky [14]. Zároveň inhibuje Ca<sup>2+</sup>-kanály v srdečním svalu, a tím snižuje sílu jeho kontrakce [15]. Chinidin sulfát je prodáván pod komerčním názvem *Quinidex* [22].

#### **2.4.7 Prokain HCl**

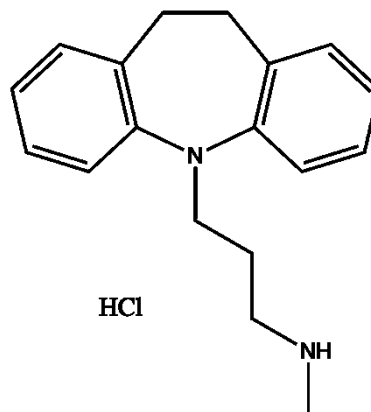
Prokain hydrochlorid je hojně využíván jako lokální anestetikum, které je přidáváno do injekční formy penicilinu pro snížení bolesti při intramuskulárním podání. Kvůli rychlé hydrolyze, které v tkáních podléhá, nemůže být prokain používán jako povrchové anestetikum [14]. Jeho využití ale spočívá i v tom, že jeho zavedením do molekuly G-penicilinu vzniká komplex prokain-G-penicilin, který má oproti klasickému G-penicilinu prodloužený účinek [15]. Prokain hydrochlorid je prodáván pod názvem *Novocain* nebo *Allocaïne* [23].

## 2.4.8 Vlastnosti použitých bazických léčiv

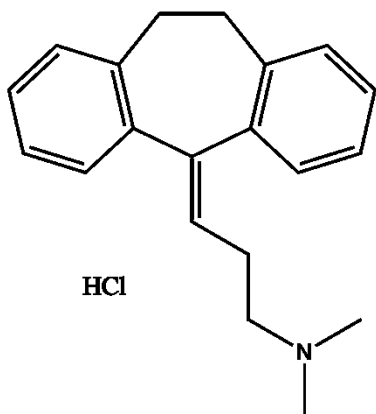
Veškeré níže uvedené struktury byly vytvořeny pomocí ChemDraw Professional 16.0.



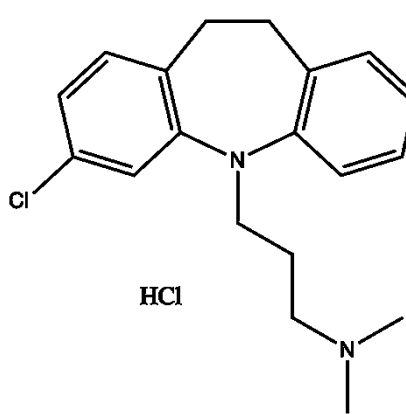
Obr. 1: Struktura amitriptylin hydrochloridu



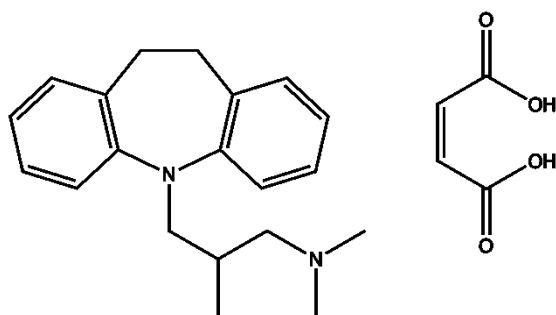
Obr. 1: Struktura desipramin hydrochloridu



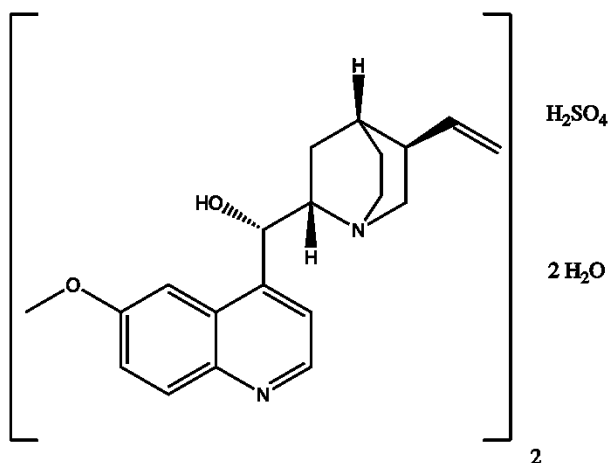
Obr. 2: Struktura imipramin hydrochloridu



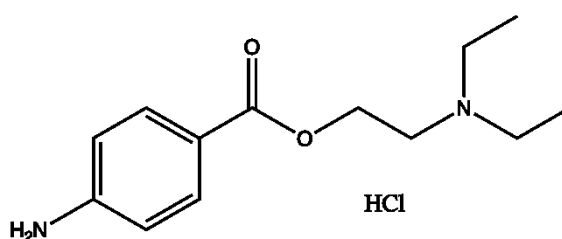
Obr. 3: Struktura klomipramin hydrochloridu



Obr. 4: Struktura trimipramin maleinátu



Obr. 5: Struktura chinidin sulfátu



Obr. 6: Struktura prokain hydrochloridu

Tabulka 1: Fyzikálně chemické vlastnosti vybraných bazických léčiv. Relativní molekulové hmotnosti a disociační konstanty převzaty z Chemaxom.com, informace o rozpustnosti a vzhledu látek převzaty z [24].

Látka	$M_r$	$pK_a$	Rozpustnost	Vzhled
<b>Amitriptylin HCl</b>	313,87	9,76	snadno rozpustný ve vodě, v 96% ethanolu a v dichlormethanu	bílý/téměř bílý prášek nebo bezbarvé krystaly
<b>Desipramin HCl</b>	302,85	10,20	dobře rozpustný ve vodě a v 96% ethanolu	bílý/téměř bílý krystalický prášek
<b>Imipramin HCl</b>	316,87	9,20	snadno rozpustný ve vodě a v 96% ethanolu	bílý/světle žlutý krystalický prášek
<b>Klomipramin HCl</b>	351,32	9,20	snadno rozpustný ve vodě a v dichlormethanu, dobře rozpustný v 96% ethanolu	bílý/světle žlutý krystalický prášek, slabě hygroskopický

Látka	$M_r$	$pK_a$	Rozpustnost	Vzhled
Trimipramin maleinát	410,51	9,42	těžce rozpustný ve vodě a 96% ethanolu	bílý/téměř bílý krystalický prášek
Chinidin sulfát	746,92	8,56	těžce rozpustný ve vodě, dobře rozpustný ve vroucí vodě a 96% ethanolu, prakticky nerozpustný v ethanolu	bílý/téměř bílý krystalický prášek nebo jemné bezbarvé jehličkovité krystaly
Prokain HCl	272,77	8,96	velmi snadno rozpustný ve vodě, dobře rozpustný v 96% ethanolu	bílý/téměř bílý krystalický prášek nebo bezbarvé krystaly

## 2.5 Separační metody využívané pro analýzu vybraných bazických léčiv

Vybraná bazická léčiva byla v minulosti analyzována mimo jiné následujícími separačními metodami:

Tabulka 2: Další separační metody a podmínky pro analýzu vybraných bazických léčiv. AMI = amitriptylin, DES = desipramin, IMI = imipramin, KLO = klomipramin, TRI = trimipramin, PRO = prokain, CHIN = chinidin, sulf. kys. = sulfonová kyselina, elchem. = elektrochemická, fluoresc. = fluorescenční.

Analyty	Metoda	SF	MF	Detekce	Zdroj
AMI, IMI, KLO	UHPLC	C18	10mM octan amonný obsahující 0,1 % mravenčí kyseliny ve směsi s ACN, gradient 20-60 obj. % ACN; průtok 0,3 ml/min	MS/MS	[25]
AMI, DES, IMI, KLO	SPME a LC	C18	LC: 50mM octan amonný + 0,1 % triethylaminu, pH = 5,5; v objemovém poměru s ACN 55:45; průtok 0,4 ml/min	UV/VIS, 214 nm	[26]

Analyty	Metoda	SF	MF	Detekce	Zdroj
AMI, DES, IMI, KLO, TRI	CE	-	křemenná kapilára, 0,2M octanový pufr, pH = 4,4 nebo 1M HAc a 50mM octan amonný v ACN	PDA, 215 nm	[27]
AMI, CHIN, DES, IMI	HPLC	sulf. kys.	35mM chloristan amonný v roztoku s hydroxidem sodným a methanolem, pH* = 6,0 - 7,5; průtok MF 0,5 ml/min	UV/VIS, 240 nm	[28]
IMI, TRI	CE	-	křemenná kapilára, 20mM Tris pufr, pH 2,0 ve směsi s ACN 80:20 (v/v)	ECL	[29]
CHIN	RP- HPLC	C18	triethylamin fosfátový pufr (pH 3,0; 50mM) + ACN v poměru 88:12 (v/v), průtok 0,4 ml/min	fluoresc.	[30]
CHIN	SFC	DEA	CO <sub>2</sub> a 0,8% DEA ve směsi s 10% ACN a 90% methanolem 97,7:2,3 (v/v)	PDA, 275 nm	[31]
PRO	HPLC	C18	30mM dihydrogenfosforečnan draselný (0,16 % triethylamin), pH 4,9 ve směsi s ACN 63:37 (v/v)	UV/VIS, 210 a 290 nm	[32]
PRO	LC	C18	10mM octan amonný, pH 5,4 ve směsi s ACN, gradient 40-65 % pufru, průtok MF 0,2 ml/min	MS/MS	[33]

U TCA je často prováděna HPLC, GC, spektrofotometrie apod, ale je možné provést také kvantitativní analýzu z moči pomocí imunochemických metod za použití laboratorních kitů přímo od daných výrobců [34].

Prokain byl v minulosti často stanovován spektrofotometricky, mimo jiné například spolu s dalšími anestetiky za použití *p*-benzochinonu [35] nebo za použití hematoxylinu [36].

## 3 Experimentální část

### 3.1 Použité chemikálie

- Methanol CHROMASOLV®, gradient grade, for HPLC, ≥99,9% (Honeywell, USA)
- Octan sodný, p.a. (Lachema, n.p., Česká republika)
- Octan amonný, 99,7% (Lach-ner, s.r.o., Česká republika)
- Kyselina octová, p.a. (Lachema, n.p., Česká republika)
- Hydroxid sodný, p.a. (Lachema, n.p. Česká republika)
- Amoniak – vodný roztok 25%, p.a. (Lach-ner, s.r.o., Česká republika)
- Vzorky bazických léčiv:
  - Chinidin sulfát, ≥80% (Sigma-Aldrich, Německo)
  - Prokain HCl, čistý (Merck, Německo)
  - Desipramin HCl, ≥98% (TLC) (Sigma-Aldrich, Německo)
  - Trimipramin maleinát, ≥98% (TLC) (Sigma-Aldrich, Německo)
  - Amitriptylin HCl, ≥98% (TLC) (Sigma-Aldrich, Německo)
  - Imipramin HCl, ≥99% (TLC) (Sigma-Aldrich, Německo)
  - Klomipramin HCl, ≥98% (TLC) (Sigma-Aldrich, Německo)
- Vzorky látek pro LSER, 97-99% čistota (Sigma-Aldrich, Německo)
- Deionizovaná voda (Ultra-pure water system Mili-Q plus, Merck Millipore, Německo)

### 3.2 Použité přístroje

- Přístroj pro HPLC Alliance 2690 Separations Module s 996 PDA detektorem (Waters, USA), kolona LC column 150×4,6 mm PhenoSphere™ 5 μm SCX 80 Å (Phenomenex, USA)
- Analytické váhy 2004 MP (Sartorius, Německo)
- Analytické váhy Nimbus® NBL 254-i (Adam Equipment, USA)
- Jenway 4330 Conductivity & pH Meter
- Automatické pipety (Biohit, Finsko a Sartorius, Německo)

### 3.3 Příprava vzorků

Vzorky bazických léčiv byly připraveny o koncentraci 1 mg/ml - 5 mg látky bylo rozpuštěno v 1 ml methanolu a doplněno do 5 ml deionizovanou vodou.

Většina roztoků analytů pro LSER byla připravena o koncentraci 1 mg/ml (vždy rozpuštěno v čistém methanolu). Výjimkou byly roztoky 2-amino-4-pikolinu; 2-fenylethylaminu a 2,6-dimethylchinolinu, které byly připraveny o koncentraci 10 mg/ml, a roztoky tyrosinu a theobrominu, které byly kvůli špatné rozpustnosti připraveny o koncentraci 0,5 mg/ml (5 mg látky rozpuštěno v 5 ml methanolu a 5 ml deionizované vody).

### 3.4 Podmínky měření pro modelové analyty

Pro optimalizaci podmínek separace bazických léčiv jakožto modelových analytů byla použita kolona LC column Phenosphere™ 5  $\mu\text{m}$  SCX 80 Å o rozměrech 150×4,6 mm (Phenomenex, USA), na počátku nevytemperovaná, později o teplotě 35 °C. Jako pufrů byly použity roztoky octanu sodného a octanu amonného o koncentracích 10-200 mmol/l. Nejprve byla zkoušena MF bez přidání organického modifikátoru, později pak směs pufru a methanolu od 70:30 (v/v) až po 20:80 (v/v). Průtok MF byl používán v rozsahu 0,5-1,2 ml/min a pH mobilní fáze mezi hodnotami 4,0 a 6,7. Pufrů byly upravovány na potřebnou hodnotu pH pomocí zředěné kyseliny octové a hydroxidu sodného nebo amoniaku. Pomocí autosampleru byly dávkovány vzorky o objemu 2-10  $\mu\text{l}$ . Absorpční spektrum látek bylo PDA detektorem sbíráno v rozmezí 210-400 nm, přičemž k vyhodnocení byly využity vlnové délky odečtené z absorpčních maxim nebo v jejich těsné blízkosti. Pro PRO, TRI, IMI a KLO činila hodnota absorpčního maxima 261 nm, pro CHIN, DES a AMI to byla hodnota 245 nm. Vyhodnocení naměřených dat bylo prováděno pomocí měřicího a vyhodnocovacího softwaru Empower (Waters, USA).

### 3.5 Podmínky měření pro LSER

Pro metodu LSER byly použity následující experimentální podmínky: octan amonný o koncentraci 20 mmol/l (pH 6,7) v poměru 35:65 (v/v) s methanolem; průtok MF 1,2 ml/min, teplota kolony 35 °C. Dávkovaný objem analytů byl 5  $\mu\text{l}$ , přičemž každý vzorek byl dávkován dvakrát a v případě nedostatečné shody retenčních časů byla analýza zopakována.

## 4 Výsledky a diskuze

Při výběru počátečních experimentálních podmínek pro analýzu modelových analytů (bazických léčiv) byla využita publikace M. Tsunody a T. Funatsu [37], která se zabývá separací bazických látek na silném katexu.

V článku R. J. Flanagan a spol. [38] jsou pak shrnuty poznatky o efektech různých podmínek měření na retenci bazických léčiv. Mezi články, jejichž informace jsou v tomto přehledovém článku shrnuty, patří např. publikace K. Croese a spol. [39], kteří sledovali změny retence na základě změn vlastností MF. Byl zjišťován např. vliv pH mobilní fáze, vliv podílu vody v MF, vliv iontové síly apod. Při optimalizaci složení MF byly tedy čerpány informace především z výše zmíněných publikací; byly použity různé pufrы (s odlišným typem protiontu), různé koncentrace, pH a podíl organického modifikátoru.

Na počátku byl jako MF použit roztok octanu sodného o koncentraci 65 mmol/l a pH 3,5; průtoková rychlost činila 0,5 ml/min a objem nástřiku 5  $\mu$ l. Většina z modelových analytů byla příliš silně zadržována v koloně; jejich průchod detektorem nebyl zaznamenán do 60 minut.

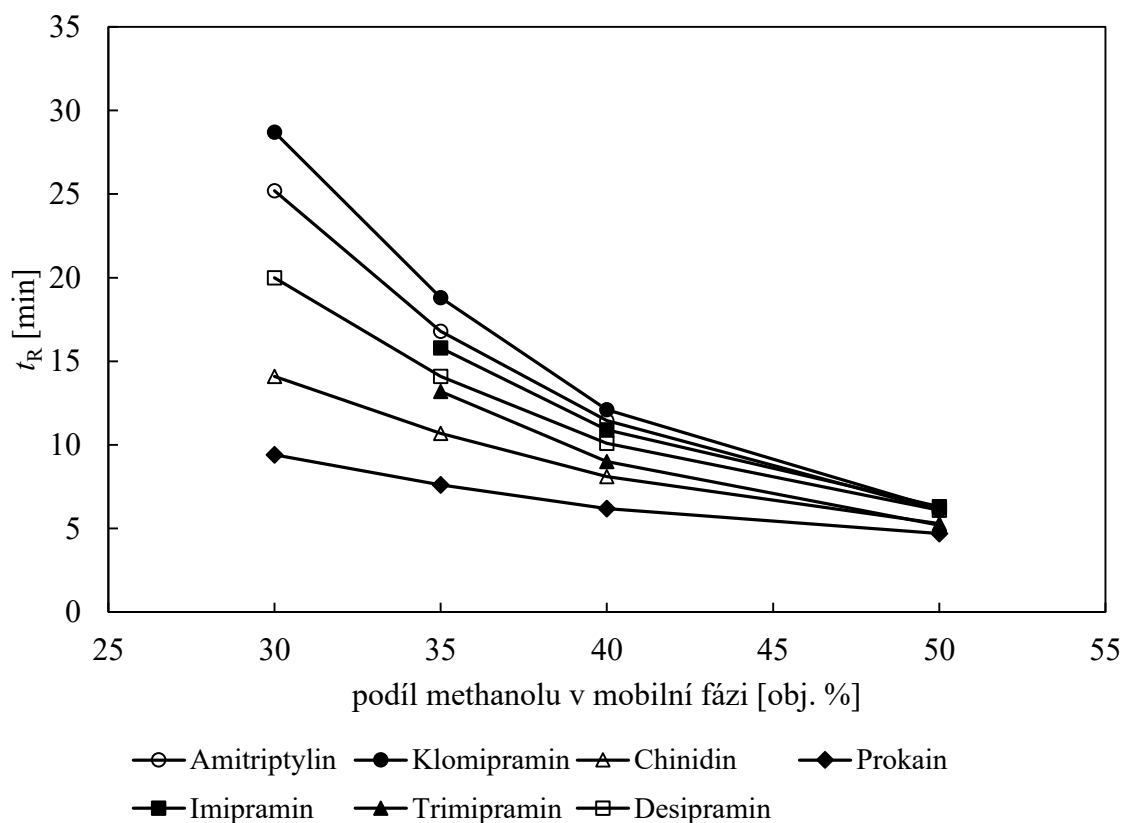
Pro zkrácení retence byl v následujícím kroku zvýšen průtok na 0,7 ml/min a kolona zahřáta na 35 °C. Zároveň byl snížen objem nástřiku na 2  $\mu$ l. Na začátku chromatogramu byl pozorován šum způsobený pravděpodobně tím, že vzorek nebyl rozpuštěn v MF, ale pouze v methanolu. Retenční časy analytů byly opět příliš dlouhé.

Dalším krokem optimalizace bylo zvýšení koncentrace pufru na 150 mmol/l a upravení jeho pH na hodnotu 4,9; ostatní parametry byly ponechány nezměněné. Některé analyty se podařilo detekovat v relativně krátkých retenčních časech, některé se opět zadržovaly příliš dlouho. Eluci analytů z kolony bylo potřeba opět urychlit, tudíž byl zvýšena hodnota pH pufru na 6,7; ostatní parametry zůstaly totožné s předchozím krokem. Podařilo se snížit retenci všech analytů natolik, aby byly do 60 minut detekovány.

Následujícím krokem bylo přidání methanolu jako organického modifikátoru do MF. Při použití směsi 100 mmol/l octanu sodného o pH 6,7 a methanolu v objemovém poměru 70:30 se retenční časy analytů výrazně zkrátily, nicméně se stále pohybovaly v řádu desítek minut. Ani zvýšení průtokové rychlosti MF na 1,0 ml/min nezkrátilo retenční časy separovaných látek.

Při zvýšení koncentrace octanového pufru na 150 mmol/l ve vodně methanolické MF došlo ke snížení retenčních časů cca o 5-10 minut; všechny analyty se podařilo detekovat do 30 minut.

Dalším postupem byla změna zastoupení methanolu v MF (viz Graf 1), vliv obsahu methanolu v mobilní fázi byl studován v rozsahu 30 až 50 obj. %. Při zvýšení obsahu methanolu v MF na 50 obj. % byly zaznamenány retenční časy kratší než 10 minut, ale rozlišení jednotlivých analytů nebylo dostatečné.



Graf 1: Závislost retenčních časů analytů na podílu methanolu v MF. Experimentální podmínky: octan sodný o koncentraci 150 mmol/l, pH = 6,7; průtok MF 1,0 ml/min, teplota kolony 35 °C.

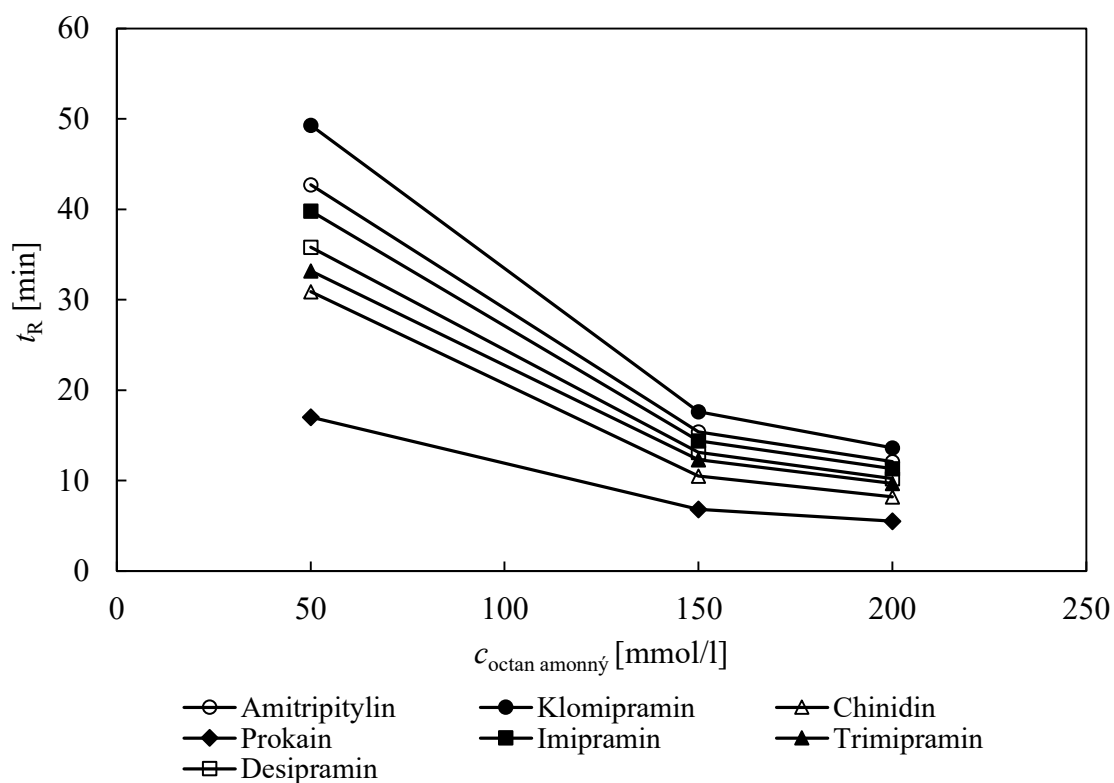
Následně byl pufr smíchán s methanolem v objemových poměrech 60:40 a 65:35. Hodnoty retenčních časů byly od 10 do 15 minut pro MF obsahující 40 obj. % methanolu a od 10 do 22 minut pro MF s 35 obj. % methanolu, jak je možné vidět ve výše uvedeném Grafu 1. Hodnoty retenčních časů u druhé z variant byly uspokojivé, ale šířky píků dosahovaly několika minut. Bylo proto nutné provádět další změny ve složení MF, aby bylo dosaženo menšího rozmytí píků separovaných látek.

Za účelem zmenšení šířky píků bylo vyzkoušeno zvýšení koncentrace octanového pufru na hodnotu 200 mmol/l při zachování ostatních podmínek (pH 6,7; objemový

poměr pufr:methanol 65:35, průtok 1,0 ml/min, teplota kolony 35 °C) a následně také zvýšení průtokové rychlosti MF na hodnotu 1,2 ml/min. Ani jeden z výše uvedených kroků nevedl ke zlepšení tvaru píků. Proto byl v dalších krocích optimalizace složení MF vyměněn roztok octanu sodného za roztok octanu amonného, protože amonný kation by měl vykazovat lepší afinitu k použité SF než ion sodný, a tedy by měl mít oproti sodnému kationtu i větší eluční sílu.

Následně byl tedy použit roztok octanu amonného o koncentraci 200 mmol/l, s hodnotou pH 6,7 ve směsi s methanolem v poměru 65:35 (v/v). Průtok MF byl 1,2 ml/min a teplota kolony 35 °C. Retenční časy analytů se pohybovaly přibližně ve stejných hodnotách jako při použití pufru se sodným iontem, stejně tak tvar píků byl srovnatelný.

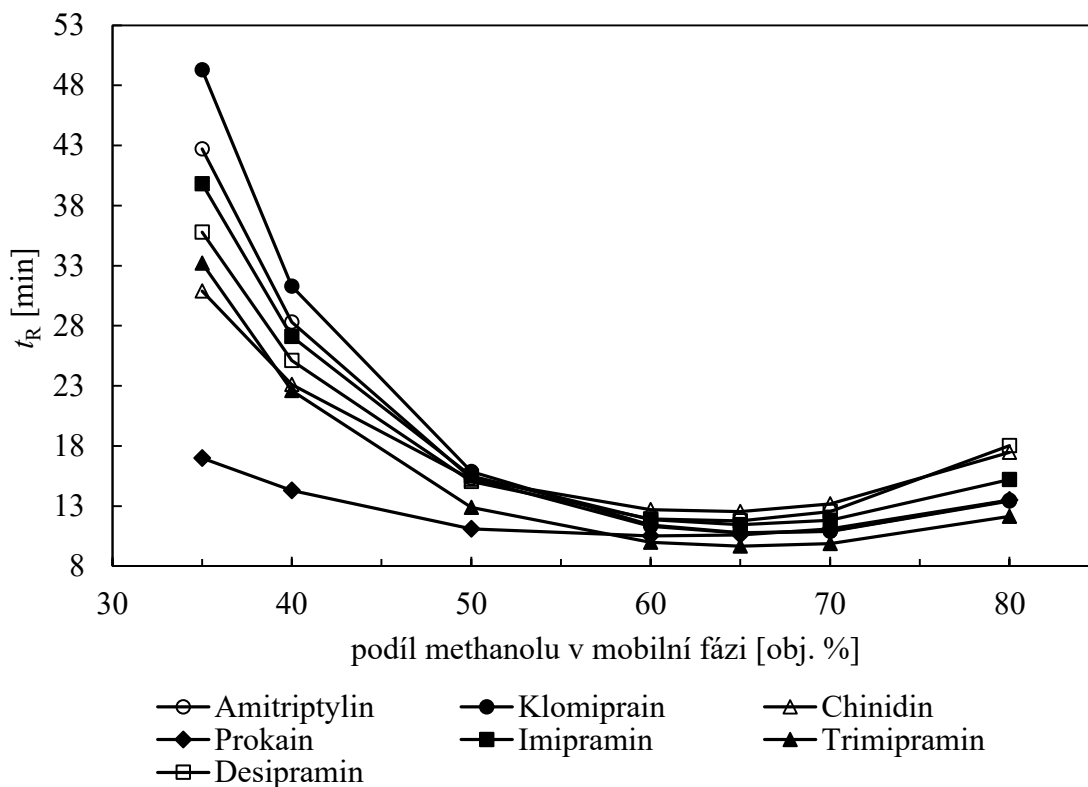
V dalších optimalizačních krocích byla měněna koncentrace pufru octanu amonného od hodnoty 200 mmol/l do hodnoty 50 mmol/l. Změna koncentrace pufru ovlivňovala retenční časy analytů, jak je vidět v Grafu 2; ke zlepšení tvaru píků ale bohužel nedošlo.



Graf 2: Závislost retenčních časů analytů na koncentraci octanu amonného. Experimentální podmínky: octan amonný ve směsi s methanolem v poměru 65:35 (v/v), pH = 6,7; průtok MF 1,2 ml/min, teplota kolony 35 °C.

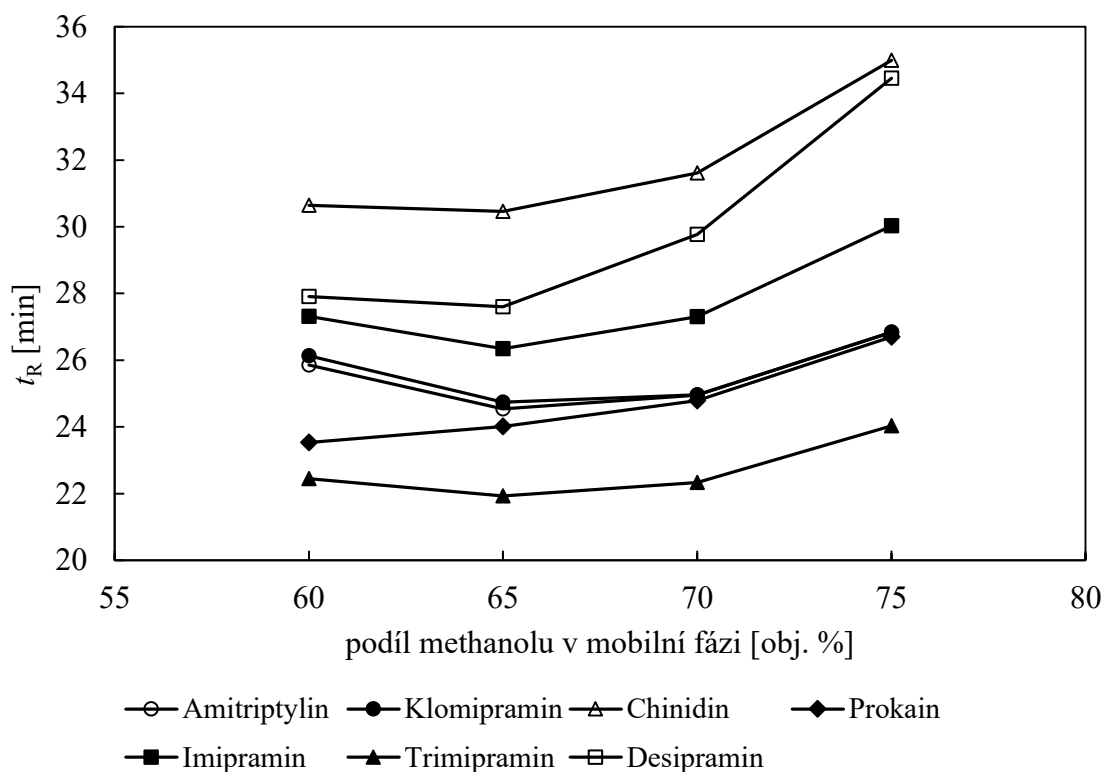
V dalším kroku byl použit octan amonný o koncentraci 50 mmol/l a byl měněn obsah

methanolu v MF od 35 obj. % do 80 obj. %. Závislost retenčních časů separovaných analytů na obsahu methanolu v MF je znázorněna v Grafu 3. Změna obsahu methanolu v MF v systému IEC výrazně ovlivňuje retenční časy studovaných analytů. Ve studovaném rozsahu objemového zastoupení methanolu v MF mění eluční pořadí látek, pro některé analyty má závislost retenčního času na obsahu methanolu tvar připomínající parabolu, ale k optimalizaci tvaru píků tento faktor výrazně nepřispívá.



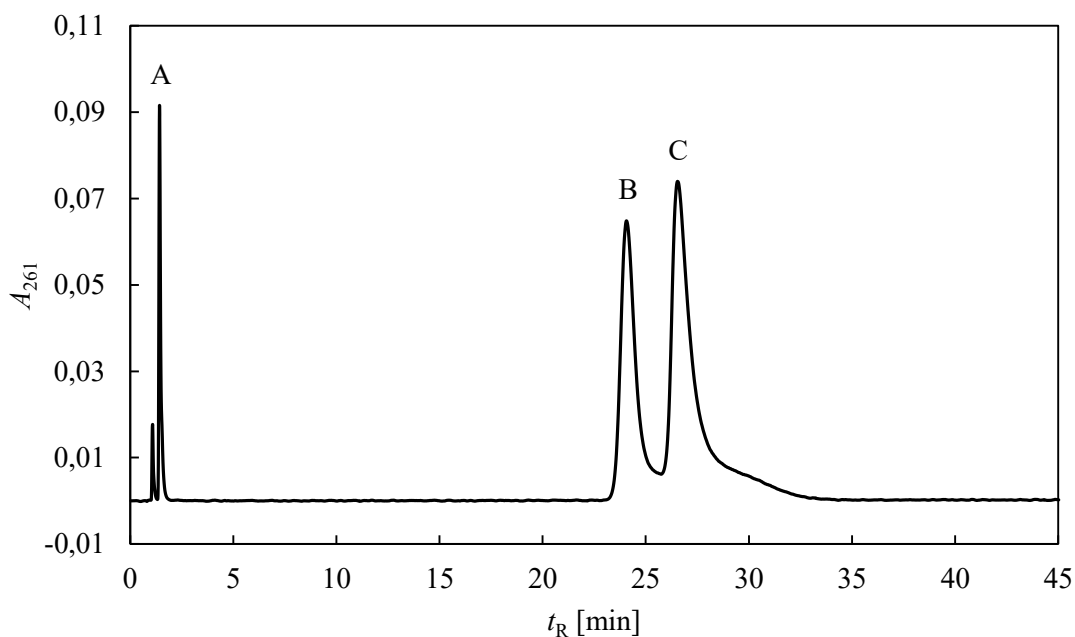
Graf 3: Závislost retenčních časů analytů na podílu methanolu v MF. Experimentální podmínky: octan amonný, koncentrace 50 mmol/l, pH = 6,7; průtok MF 1,2 ml/min, teplota kolony 35 °C.

Ve snaze dosáhnout separace vybraných bazických léčiv v rozumném čase, s dostatečným rozlišením a uspokojivým tvarem píků, byl ještě použit pufr o koncentraci 20 mmol/l; ostatní parametry zůstaly stejné. Nejprve byl vyzkoušen poměr pufru ku methanolu 40:60 (v/v), kdy se retenční časy analytů pohybovaly do 30 minut a tvary píků se zlepšily, poté s použitým poměrem 35:65 (v/v) došlo k mírnému zkrácení retence a zlepšení tvaru píků a na závěr byly proměřeny ještě objemové poměry 25:75 a 20:80, kdy se retenční časy opět začaly prodlužovat (viz Graf 4).

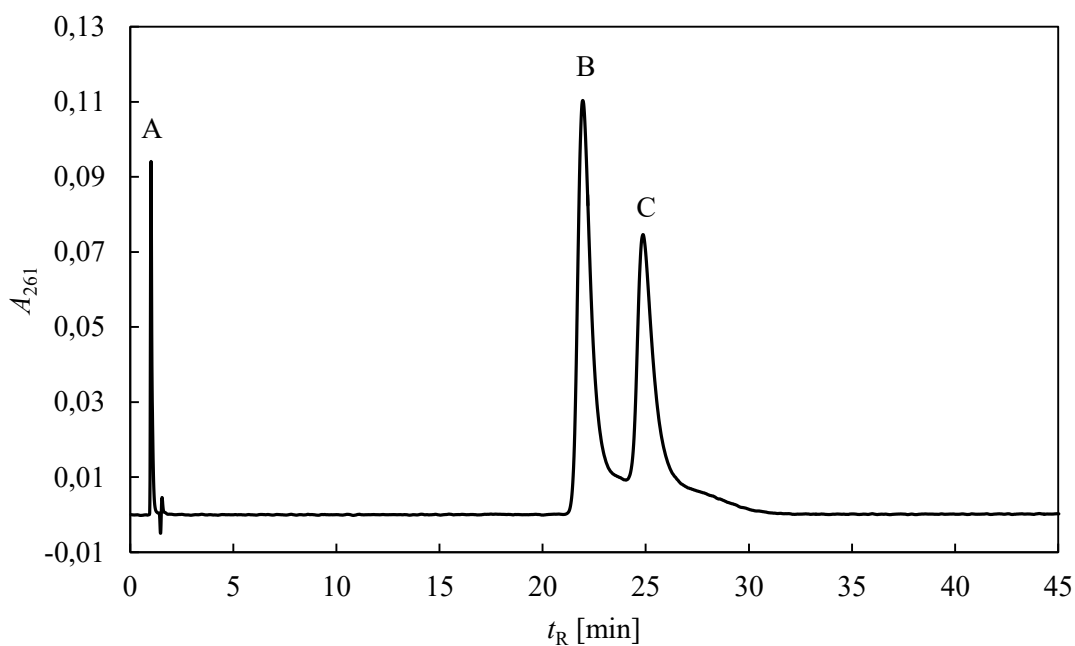


Graf 4: Závislost retenčních časů analytů na podílu methanolu v MF. Experimentální podmínky: octan amonný o koncentraci 20 mmol/l, pH = 6,7; průtok MF 1,2 ml/min, teplota kolony 35 °C.

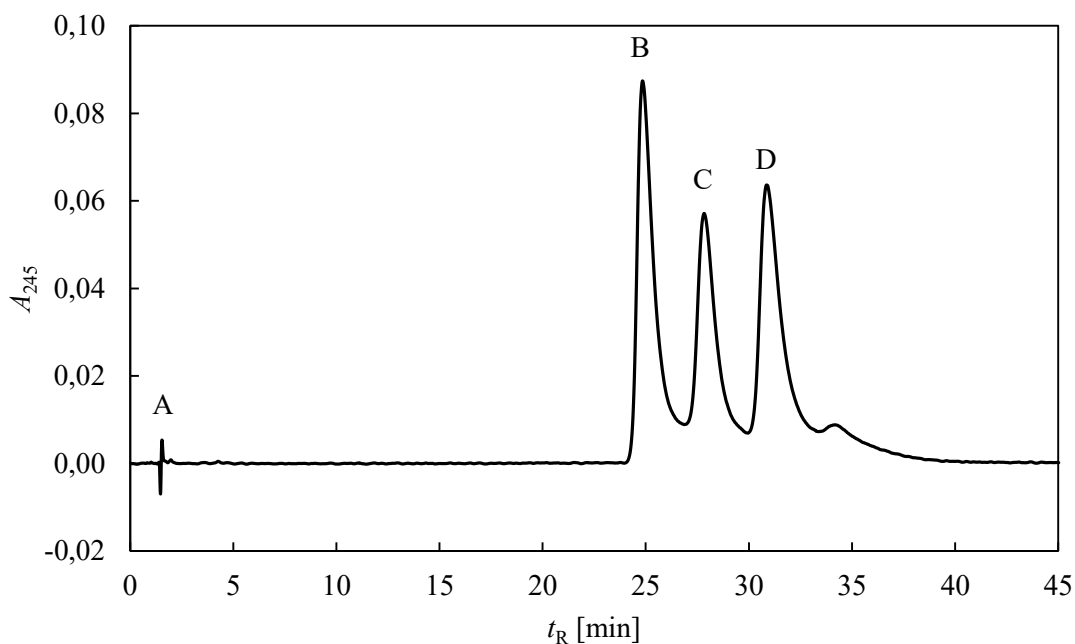
Jako nejvhodnější MF pro separaci bazických léčiv byla nakonec zvolena směs octanu amonného o koncentraci 20 mmol/l a pH = 6,7; v poměru s methanolem 35:65 (v/v), průtok MF 1,2 ml/min a teplota kolony 35 °C. Hodnota pH vodně organické mobilní fáze byla 7,3 (změřeno elektrodou kalibrovanou pro vodné pufrů [13]). V Grafech 5, 6 a 7 jsou uvedeny chromatogramy modelových bazických analytů změřené při optimalizovaných experimentálních podmínkách.



Graf 5: Separace směsi prokainu a imipraminu. Experimentální podmínky: octan amonný o koncentraci 20 mmol/l a pH 6,7; v objemovém poměru s methanolem 35:65, průtok MF 1,2 ml/min, teplota kolony 35 °C. Koncentrace jednotlivých látek ve vzorku 0,5 mg/ml, objem nástřiku 10  $\mu$ l. Absorbance měřena při 261 nm. A = systémový pík; B = prokain; C = imipramin.



Graf 6: Separace směsi trimipraminu a klomipraminu. Experimentální podmínky: octan amonný o koncentraci 20 mmol/l a pH 6,7; v objemovém poměru s methanolem 35:65, průtok 1,2 ml/min, teplota kolony 35 °C. Koncentrace jednotlivých látek ve vzorku 0,5 mg/ml, objem nástřiku 10  $\mu$ l. Absorbance měřena při 261 nm. A = systémový pík, B = trimipramin, C = klomipramin.



Graf 7: Separace směsi chinidinu, desipraminu a amitriptylinu. Experimentální podmínky: octan amonný o koncentraci 20 mmol/l a pH 6,7; v objemovém poměru s methanolem 35:65, průtok 1,2 ml/min, teplota kolony 35 °C. Koncentrace jednotlivých látek ve vzorku 0,3 mg/ml, objem nástřiku 10  $\mu$ l. Absorbance měřena při 245 nm. A = systémový pík, B = amitriptylin, C = desipramin, D = chinidin.

Po zjištění vhodných separačních podmínek pro modelové analyty, vybraná bazická léčiva, byla změřena ve zvolené MF sada látek pro LSER a získány tak jejich retenční časy a retenční faktory. V literatuře pak byly dohledány potřebné molekulové deskriptory (viz Tabulka 3), výjimkou byl McGowanův charakteristický objem 2,4,6-kolidinu, který byl vypočítán, a veškeré hodnoty deskriptorů  $D^-$  a  $D^+$ . Pokud některý z deskriptorů nebyl nalezen, nebyla látka zařazena do konečné vícenásobné lineární regrese. Mrtvý čas použitý ve výpočtu retenčního faktoru byl získán vypočtením aritmetického průměru z osmi časů systémových píků změřených během měření látek pro LSER. Pomocí průměru mrtvého času a naměřených retenčních časů látek pro LSER byly vypočítány jejich retenční faktory.

Tabulka 3: Experimentálně zjištěné retenční faktory látek pro LSER a jejich molekulární deskriptory, kde je  $t_R$  retenční čas,  $k$  retenční faktor,  $E$  přebytková molární refrakce,  $S$  dipolarita/polarizovatelnost,  $A$  celková kyselost vodíkové vazby analytu,  $B$  celková bazicita vodíkové vazby analytu,  $V$  McGowanův charakteristický objem,  $pK_{a,1}$  disociační konstanta kyselých funkčních skupiny dané látky,  $pK_{a,2}$  disociační konstanta bazické funkční skupiny dané látky,  $D_{7,3}^-$  záporný náboj nesený aniontem/zwitteriontem při pH MF 7,3 a  $D_{7,3}^+$  kladný náboj nesený kationtem/zwitteriontem při pH MF 7,3.

Látka	$t_R$ [min]	$k$	$E$	$S$	$A$	$B$	$V$	$pK_{a,1}$	$pK_{a,2}$	$D_{7,3}^-$	$D_{7,3}^+$
Adenin	1,52	0,04	1,68	1,80	0,70	1,13	0,923	10,29	3,66	0,00	0,00
Cytosin	1,83	0,25	1,43	1,90	0,60	1,02	0,793	9,98	0,00	0,00	0,00
Uracil	1,52	0,04	0,81	1,00	0,44	1,00	0,752	8,80	0,00	0,03	0,00
Uridin	1,52	0,04	1,88	2,35	0,90	2,29	1,582	9,70	0,00	0,00	0,00
2-Deoxyuridin	1,46	0,00	1,65	2,14	0,74	1,92	1,524	7,57	0,00	0,35	0,00
Fenylalanin	1,74	0,19	0,95	1,39	0,78	1,02	1,313	2,47	9,45	1,00	0,99
Tyrosin	1,75	0,19	1,18	1,60	1,28	1,29	1,372	2,00	9,19	1,00	0,99
Tyramin	33,21	21,68	1,01	1,17	0,71	0,94	1,157	10,41	9,66	0,00	1,00
Tryptofan	1,85	0,26	1,62	1,80	1,09	1,23	1,543	2,54	9,40	0,23	0,99
Theofylin	1,44	-0,02	1,50	1,60	0,54	1,34	1,222	7,82	0,00	0,01	0,00
Theobromin	1,46	0,00	1,50	1,60	0,50	1,38	1,222	9,24	0,00	0,00	0,00
Kofein	1,43	-0,02	1,50	1,60	0,00	1,33	1,364	0,00	0,00	0,00	0,00

Látka	$t_R$ [min]	$k$	$E$	$S$	$A$	$B$	$V$	$pK_{a,1}$	$pK_{a,2}$	$D_{7,3}^-$	$D_{7,3}^+$
Toluen	1,40	-0,05	0,60	0,52	0,00	0,14	0,857	0,00	0,00	0,00	0,00
1,4-Xylen	1,39	-0,05	0,61	0,52	0,00	0,16	0,998	0,00	0,00	1,00	0,00
Benzoová kyselina	1,03	-0,03	0,73	0,90	0,59	0,40	0,932	4,08	0,00	0,00	0,00
Anilin	1,46	1,06	0,96	0,96	0,26	0,41	0,816	0,00	4,64	0,00	0,00
1,2-Toluidin	1,45	0,99	0,97	0,92	0,23	0,45	0,957	0,00	4,48	0,00	0,00
1,4-Toluidin	1,50	0,92	0,92	0,95	0,23	0,45	0,957	0,00	4,99	0,00	0,00
Chlorbenzen	1,41	0,85	0,72	0,65	0,00	0,07	0,839	0,00	0,00	0,00	0,00
1,2,3-Trichlorbenzen	1,41	0,78	1,03	0,86	0,00	0,00	1,084	0,00	0,00	0,02	0,00
4-Chlorfenol	1,40	0,71	0,92	1,08	0,67	0,21	0,898	8,96	0,00	0,00	0,00
Benzamid	1,45	0,64	0,99	0,50	0,49	0,67	0,973	0,00	0,00	0,00	0,00
Hydrochinon	1,41	0,57	1,00	1,00	1,16	0,60	0,834	9,68	0,00	0,00	0,00
Dibenzothiofen	1,45	0,50	1,96	1,31	0,00	0,18	1,379	0,00	0,00	0,00	0,00
Pyridin	1,53	0,43	0,63	0,84	0,00	0,52	0,675	0,00	5,12	0,00	0,01
2-Aminopyridin	7,75	0,36	0,98	1,10	0,32	0,63	0,775	0,00	6,84	0,00	0,26
4-Aminopyridin	49,19	32,58	0,90	1,21	0,23	0,71	0,775	0,00	8,95	0,00	0,98
3-Aminopyridin	2,19	0,49	-	-	-	0,78	0,775	0,00	5,75	0,00	0,03

Látka	$t_R$ [min]	$k$	$E$	$S$	$A$	$B$	$V$	$pK_{a,1}$	$pK_{a,2}$	$D_{7,3}^-$	$D_{7,3}^+$
2-Amino-4-pikolin	16,42	10,21	-	-	-	-	-	0,00	7,62	0,00	0,68
2-Pikolin	1,70	0,16	0,60	0,75	0,00	0,58	0,816	0,00	5,81	0,00	0,03
3-Pikolin	1,58	0,08	0,63	0,81	0,00	0,54	0,816	0,00	5,63	0,00	0,02
2,6-Lutidin	2,40	0,64	0,61	0,70	0,00	0,63	0,957	0,00	6,54	0,00	0,15
2,4,6-Kolidin	6,41	3,37	0,63	0,72	0,00	-	1,098	0,00	7,31	0,00	0,51
<i>N</i> -Ethylanilin	1,46	-0,01	0,95	0,85	0,17	0,43	1,098	0,00	4,91	0,00	0,00
<i>N,N</i> -Dimethylanilin	1,45	-0,01	0,96	0,81	0,00	0,41	1,098	0,00	5,02	0,00	0,01
2-Fenylethylamin	39,59	26,03	-	-	-	-	-	0,00	9,79	0,00	1,00
Chinolin	1,46	0,00	1,27	0,97	0,00	0,54	1,7044	0,00	4,50	0,00	0,00
2,6-Dimethylchinolin	1,55	0,06	1,32	-	0,00	-	-	0,00	5,30	0,00	0,01

Po získání všech potřebných dat byla z 33 hodnot retenčních faktorů látek a jejich molekulárních deskriptorů pomocí softwaru NCSS provedena vícenásobná lineární regrese (viz Tabulka 4), čímž byly získány regresní koeficienty Abrahamovy solvatační rovnice (viz strana 15 v kapitole 2 Teoretická část) pro konkrétní chromatografické podmínky, a to stacionární fázi v koloně Phenosphere™ SCX a mobilní fázi s hodnotou  $pH^*$  7,3 složenou z octanu amonného o koncentraci 20 mmol/l a methanolu v objemovém poměru 35:65.

Tabulka 3: Hodnoty regresních koeficientů Abrahamovy solvatační rovnice pro dané experimentální podmínky získané vícenásobnou lineární regresí. Koeficient determinace vícenásobné lineární regrese  $R^2$  je roven hodnotě 0,7044.

Deskriptor	Hodnota regresního koeficientu	Standardní chyba
$E$	1,325	5,309
$S$	1,461	5,269
$A$	-2,793	3,065
$B$	1,044	3,319
$V$	-8,055	5,822
$D_{7,3}^-$	-10,980	3,622
$D_{7,3}^+$	19,270	2,673
$c$ (úsek)	5,738	4,040

Jak je ze získaných hodnot patrné, největší vliv na retenci analytů na této iontové výměnné koloně mají deskriptory  $D_{7,3}^-$  a  $D_{7,3}^+$ , čímž byl potvrzen předpoklad z publikace R. I. Chirity a spol. [13]. Jelikož se jedná o kolonu se silnou katexovou funkční skupinou, je největší příspěvek k prodloužení retence analytů dán deskriptorem  $D_{7,3}^+$ ; naopak deskriptor  $D_{7,3}^-$  působí největší měrou na snížení retence analytů. Prokazatelný vliv na snížení retence má zároveň i deskriptor  $V$ , tedy McGowanův charakteristický objem. Znamená to tedy, že při separaci na této koloně je retence nejvíce ovlivňována iontovými (elektrostatickými) interakcemi mezi analytem, SF a MF a určitou měrou se podílejí i disperzní nepolárními interakcemi. Vliv ostatních deskriptorů (koeficienty  $E$ ,  $S$ ,  $A$ ,  $B$ ) na retenci analytů je neprůkazný, protože hodnota standardní chyby daného koeficientu je větší než samotný regresní koeficient.

Koeficient determinace provedené vícenásobné lineární regrese je roven hodnotě 0,7044. Pro zlepšení hodnoty koeficientu determinace bude nutné upravit testovací sadu LSER analytů tak, aby bylo zastoupeno více látek s ionogenním charakterem, které budou při zvoleném pH MF nést náboj.

## 5 Závěr

Cílem této bakalářské práce bylo pro modelové látky, v tomto případě bazická léčiva, optimalizovat experimentální podmínky pro jejich separaci na koloně Phenosphere™ SCX, následně pomocí metody LSER tuto kolonu chromatograficky charakterizovat a zjistit hodnoty jednotlivých regresních koeficientů Abrahamovy solvatační rovnice, které jsou charakteristické přímo pro určitý typ interakcí v separačním systému tvořeném zvolenou stacionární a mobilní fází.

Bylo zvoleno sedm bazických léčiv jako modelových látek, pro něž byla experimentálně zjištěna vhodná MF - směs 20mM octanu amonného a methanolu o objemovém poměru 35:65, zdánlivé pH\* mobilní fáze je rovno hodnotě 7,3; průtok MF 1,2 ml/min a teplota kolony 35 °C. Tyto experimentální podmínky byly následně použity pro metodu LSER, při níž byl u 33 látek zjištěn retenční faktor a potřebné molekulové deskriptory. Hodnoty byly poté podrobeny vícenásobné lineární regresi, jejímž výsledkem byly regresní koeficienty Abrahamovy solvatační rovnice:  $e = 1,325$ ;  $s = 1,461$ ;  $a = -2,793$ ;  $b = 1,044$ ;  $v = -8,055$ ;  $d^- = -10,980$ ;  $d^+ = 19,270$  a úsek  $c = 5,738$ . Bylo zjištěno, že retenci nejvíce ovlivňují deskriptory  $D_{7,3}^-$  a  $D_{7,3}^+$ , tedy elektrostatické interakce mezi nabitou částí molekuly analytu a katexovou funkční skupinou stacionární fáze Phenosphere™ SCX.

## Použitá literatura

- [1] prof. RNDr. Pavel Coufal, Ph.D., „HPLC“, 02-bře-1996. [Online]. Dostupné z: <http://web.natur.cuni.cz/~pcoufal/hplc.html>. [Viděno: 25-čvc-2018].
- [2] RNDr. Jana Sobotníková, Ph.D., „Iontově výměnná chromatografie“, prezentováno v Přednáška z předmětu Separální metody (kata), Chemický ústav PřF UK, 2017.
- [3] doc. RNDr. Josef Cvačka, Ph.D., „Úvod do vysokoúčinné kapalinové chromatografie“, prezentováno v Přednáška z předmětu Vysokoúčinná kapalinová chromatografie, Chemický ústav PřF UK, 10-2017.
- [4] J. Schwellenbach, F. Taft, L. Villain, a J. Strube, „Preparation and characterization of high capacity, strong cation-exchange fiber based adsorbents“, *J Chromatogr A*, roč. 1447, s. 92–106, kvě. 2016.
- [5] C. B. Hollabaugh, L. H. Burt, a A. P. Walsh, „Carboxymethylcellulose. Uses and Applications“, *Ind. Eng. Chem.*, roč. 37, č. 10, s. 943–947, říj. 1945.
- [6] „Vodivostní HPLC detektory“. [Online]. Dostupné z: [http://www.hplc.cz/Teorie/COND\\_detector.html](http://www.hplc.cz/Teorie/COND_detector.html). [Viděno: 25-čvc-2018].
- [7] „Kapalinová chromatografie“. [Online]. Dostupné z: [https://is.mendelu.cz/eknihovna/opory/zobraz\\_cast.pl?cast=52970](https://is.mendelu.cz/eknihovna/opory/zobraz_cast.pl?cast=52970). [Viděno: 25-čvc-2018].
- [8] „Elektrochemické HPLC detektory - Electrochemical detectors HPLC.CZ“. [Online]. Dostupné z: [http://www.hplc.cz/Teorie/EC\\_detector.html](http://www.hplc.cz/Teorie/EC_detector.html). [Viděno: 25-čvc-2018].
- [9] Richard F. Gunst a Robert L. Mason, *Regression Analysis and its Application: A Data-Oriented Approach*. CRC Press, 1980.
- [10] D. Sykora, J. Vozka, a E. Tesarova, „Chromatographic methods enabling the characterization of stationary phases and retention prediction in high-performance liquid chromatography and supercritical fluid chromatography“, *J. Sep. Science*, roč. 39, č. 1, s. 115–131, led. 2016.
- [11] C. F. Poole a S. K. Poole, „Column selectivity from the perspective of the solvation parameter model“, *J. Chromatogr. A*, roč. 965, č. 1–2, s. 263–299, srp. 2002.

- [12] L. Taraba, T. Křížek, O. Hodek, K. Kalíková, a P. Coufal, „Characterization of polyaniline-coated stationary phases by using the linear solvation energy relationship in the hydrophilic interaction liquid chromatography mode using capillary liquid chromatography", *J. Sep. Sci.*, roč. 40, č. 3, s. 677–687, úno. 2017.
- [13] R.-I. Chirita, C. West, S. Zubrzycki, A.-L. Finaru, a C. Elfakir, „Investigations on the chromatographic behaviour of zwitterionic stationary phases used in hydrophilic interaction chromatography", *Journal of Chromatography A*, roč. 1218, č. 35, s. 5939–5963, zář. 2011.
- [14] H. Lullmann, K. Mohr, a M. Wehling, *Farmakologie a toxikologie*. Grada, 2009.
- [15] J. Martínková, *Farmakologie pro studenty zdravotnických oborů*. Grada Publishing a.s., 2007.
- [16] „Imipramine Hydrochloride", *National Cancer Institute Thesaurus*, zima-2018. [Online]. Dostupné z: [https://ncit-nci-nih-gov.ezproxy.is.cuni.cz/ncitbrowser/ConceptReport.jsp?dictionary=NCI\\_Thesaurus&ns=NCI\\_Thesaurus&code=C29116](https://ncit-nci-nih-gov.ezproxy.is.cuni.cz/ncitbrowser/ConceptReport.jsp?dictionary=NCI_Thesaurus&ns=NCI_Thesaurus&code=C29116). [Viděno: 15-kvě-2018].
- [17] Státní ústav pro kontrolu léčiv, „Souhrn údajů o přípravku Melipramin". 12-2015.
- [18] „Amitriptyline Hydrochloride", *National Cancer Institute Thesaurus*, zima-2018. [Online]. Dostupné z: [https://ncit-nci-nih-gov.ezproxy.is.cuni.cz/ncitbrowser/ConceptReport.jsp?dictionary=NCI\\_Thesaurus&ns=NCI\\_Thesaurus&code=C28819](https://ncit-nci-nih-gov.ezproxy.is.cuni.cz/ncitbrowser/ConceptReport.jsp?dictionary=NCI_Thesaurus&ns=NCI_Thesaurus&code=C28819). [Viděno: 15-kvě-2018].
- [19] Státní ústav pro kontrolu léčiv, „Souhrn údajů o přípravku Anafranil". 25-čer-2015.
- [20] „Clomipramine Hydrochloride", *National Cancer Institute Thesaurus*, zima-2018. [Online]. Dostupné z: [https://ncit-nci-nih-gov.ezproxy.is.cuni.cz/ncitbrowser/ConceptReport.jsp?dictionary=NCI\\_Thesaurus&ns=NCI\\_Thesaurus&code=C47458](https://ncit-nci-nih-gov.ezproxy.is.cuni.cz/ncitbrowser/ConceptReport.jsp?dictionary=NCI_Thesaurus&ns=NCI_Thesaurus&code=C47458). [Viděno: 15-kvě-2018].
- [21] „Desipramine Hydrochloride", *National Cancer Institute Thesaurus*, 39. 4-2018. [Online]. Dostupné z: [https://ncit-nci-nih-gov.ezproxy.is.cuni.cz/ncitbrowser/ConceptReport.jsp?dictionary=NCI\\_Thesaurus&ns=NCI\\_Thesaurus&code=C28979](https://ncit-nci-nih-gov.ezproxy.is.cuni.cz/ncitbrowser/ConceptReport.jsp?dictionary=NCI_Thesaurus&ns=NCI_Thesaurus&code=C28979). [Viděno: 15-kvě-2018].

- [22] „Quinidine Sulfate”, *National Cancer Institute Thesaurus*, zima-2018. [Online]. Dostupné z: [https://ncit-nci-nih.gov.ezproxy.is.cuni.cz/ncitbrowser/ConceptReport.jsp?dictionary=NCI\\_Thesaurus&ns=NCI\\_Thesaurus&code=C48014](https://ncit-nci-nih.gov.ezproxy.is.cuni.cz/ncitbrowser/ConceptReport.jsp?dictionary=NCI_Thesaurus&ns=NCI_Thesaurus&code=C48014). [Viděno: 15-kvě-2018].
- [23] „Procaine Hydrochloride”, *National Cancer Institute Thesaurus*, zima-2018. [Online]. Dostupné z: [https://ncit-nci-nih.gov.ezproxy.is.cuni.cz/ncitbrowser/ConceptReport.jsp?dictionary=NCI\\_Thesaurus&ns=NCI\\_Thesaurus&code=C47688](https://ncit-nci-nih.gov.ezproxy.is.cuni.cz/ncitbrowser/ConceptReport.jsp?dictionary=NCI_Thesaurus&ns=NCI_Thesaurus&code=C47688). [Viděno: 15-kvě-2018].
- [24] Ministerstvo zdravotnictví ČR, *Český lékopis 2017, Tištěná verze (1.-4. díl)*. Grada, 2017.
- [25] L.-H. Sheng *et al.*, „Simultaneous Determination of 24 Antidepressant Drugs and Their Metabolites in Wastewater by Ultra-High Performance Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry”, *Molecules*, roč. 19, č. 1, s. 1212–1222, led. 2014.
- [26] C. Alves, C. Fernandes, A. J. Santos-Neto, J. C. Rodrigues, M. E. Costa Queiroz, a F. M. Lancas, „Optimization of the SPME parameters and its online coupling with HPLC for the analysis of tricyclic antidepressants in plasma samples”, *J. Chromatogr. Sci.*, roč. 44, č. 6, s. 340–346, čvc. 2006.
- [27] Y. Sasajima, L. W. Lim, T. Takeuchi, K. Suenami, K. Sato, a Y. Takekoshi, „Simultaneous Determination of Antidepressants by Non-aqueous or Quasi-non-aqueous Capillary Electrophoresis”, *Anal. Sci.*, roč. 26, č. 6, s. 693–698, čer. 2010.
- [28] P. E. Morgan, V. Manwaring, a R. J. Flanagan, „HPLC of basic drugs using non-aqueous ionic eluents: evaluation of a 3  $\mu$  m strong cation-exchange material”, *Biomed. Chromatogr.*, roč. 24, č. 3, s. 318–323, bře. 2010.
- [29] C. Yu, H. Du, a T. You, „Determination of imipramine and trimipramine by capillary electrophoresis with electrochemiluminescence detection”, *Talanta*, roč. 83, č. 5, s. 1376–1380, úno. 2011.
- [30] R. Gatti, M. G. Gioia, a V. Cavrini, „Determination of Cinchona alkaloids and Vitamin B6 by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection”, *Analytica Chimica Acta*, roč. 512, č. 1, s. 85–91, čer. 2004.

- [31] A. Muraier a M. Ganzera, „Quantitative determination of major alkaloids in Cinchona bark by Supercritical Fluid Chromatography“, *Journal of Chromatography A*, roč. 1554, s. 117–122, čer. 2018.
- [32] W. Qin *et al.*, „Simultaneous determination of procaine, lidocaine, ropivacaine, tetracaine and bupivacaine in human plasma by high-performance liquid chromatography“, *Journal of Chromatography B*, roč. 878, č. 15, s. 1185–1189, kvě. 2010.
- [33] K. Tonooka *et al.*, „Sensitive liquid chromatography/tandem mass spectrometry method for the simultaneous determination of nine local anesthetic drugs“, *Forensic Science International*, roč. 265, s. 182–185, srp. 2016.
- [34] S. E. F. Melanson, E. L. Lewandrowski, D. A. Griggs, a J. G. Flood, „Interpreting tricyclic antidepressant measurements in urine in an emergency department setting: Comparison of two qualitative point-of-care urine tricyclic antidepressant drug immunoassays with quantitative serum chromatographic analysis“, *J. Anal. Toxicol.*, roč. 31, č. 5, s. 270–275, čer. 2007.
- [35] A. S. Amin a A. M. El-Didamony, „Colorimetric determination of benzocaine, lignocaine and procaine hydrochlorides in pure form and in pharmaceutical formulations using p-benzoquinone“, *Anal. Sci.*, roč. 19, č. 10, s. 1457–1459, říj. 2003.
- [36] G. Saleh a H. Askal, „Spectrophotometric Determination of Certain Local-Anesthetics in Pharmaceutical Preparations“, *Anal. Lett.*, roč. 28, č. 15, s. 2663–2671, 1995.
- [37] M. Tsunoda a T. Funatsu, „Catecholamine analysis with strong cation exchange column liquid chromatography–peroxyoxalate chemiluminescence reaction detection“, *Anal Bioanal Chem*, roč. 402, č. 3, s. 1393–1397, led. 2012.
- [38] R. J. Flanagan, E. J. Harvey, a E. P. Spencer, „HPLC of basic drugs on microparticulate strong cation-exchange materials — a review“, *Forensic Science International*, roč. 121, č. 1, s. 97–102, zář. 2001.
- [39] K. Croes, P. T. McCarthy, a R. J. Flanagan, „HPLC of basic drugs and quaternary ammonium compounds on microparticulate strong cation-exchange materials using methanolic or aqueous methanol eluents containing an ionic modifier“, *Journal of Chromatography A*, roč. 693, č. 2, s. 289–306, úno. 1995.