

Univerzita Karlova v Praze

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra biofyziky a fyzikální chemie

**CHROMATOGRAFICKÉ STANOVENÍ
ALBENDAZOLU A JEHO METABOLITŮ**

**Chromatographic Determination of Albendazole and
Its Metabolites**

Diplomová práce

Diploma thesis

Vedoucí diplomové práce: Ing. Vladimír Kubíček, CSc.

Hradec Králové 2011

Iva Coufalová

Prohlášení:

Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány.

14. 4. 2011

Poděkování:

Tímto bych chtěla vyjádřit poděkování svému školiteli Ing. Vladimíru Kubíčkoví, CSc. za odbornou pomoc a spolupráci při tvorbě mé diplomové práce.

Abstrakt:

Univerzita Karlova v Praze
Farmaceutická fakulta v Hradci Králové
Katedra biofyziky a fyzikální chemie

Kandidát: Iva Coufalová

Konzultant: Ing. Vladimír Kubíček, CSc.

Název diplomové práce: Chromatografické stanovení albendazolu a jeho metabolitů

Tato diplomová práce se zabývá studiem chromatografického stanovení albendazolu a jeho dvou metabolitů, albendazolsulfoxidu a albendazolsulfonu, isokratickou HPLC.

Cílem bylo pokusit se najít vhodné podmínky pro separaci těchto látek za použití kolony Ascentis Express C18, tedy kolony plněné core-shell částicemi, a zároveň vyhledat vhodný vnitřní standard. Jako mobilní fáze se zkoumal nejprve fosfátový pufr ve směsi s acetonitrilem, ale vzhledem k neuspokojivým výsledkům byl po té nahrazen kyselinou octovou ve směsi s methanolem a acetonitrilem.

S touto mobilní fází bylo dosaženo přijatelných výsledků, které ovšem nejsou úplně ideální a mohly by být námětem k dalšímu výzkumu.

Jednoznačně pozitivním výsledkem je, že se během těchto pokusů jako vnitřní standard osvědčil oxibendazol.

Abstract:

Charles University in Prague
Faculty of Pharmacy in Hradec Králové
Department of Biophysics and Physical Chemistry

Candidate: Iva Coufalová

Consultant: Ing. Vladimír Kubiček, CSc.

Title of Thesis: Chromatographic Determination of Albendazole and Its Metabolites

This diploma thesis deals with a study of chromatographic determination of albendazole and its two metabolites, albendazole-sulphoxide and albendazole-sulphone, by isocratic HPLC.

The aim of this work was to find suitable conditions for the separation of these substances with a use of Ascentis Express C18 as a chromatography column, hence the column packed by core-shell particles, and also to find an appropriate internal standard. A mobile phase consisting of phosphate buffer and acetonitrile was tested as the first choice, but because of unsatisfactory results it was then substituted by a mixture of acetic acid and methanol or acetonitrile.

There were achieved acceptable results with the latter mobile phase, but the results are not considered as perfect and should be a subject of next research.

The obviously positive result of the experiments is that oxibendazole proved to be an internal standard.

Obsah:

1. ZADÁNÍ PRÁCE.....	4
2. TEORETICKÁ ČÁST.....	6
2.1 Anthelmintika.....	7
2.2 Benzimidazoly.....	7
2.2.1 Albendazol.....	8
2.2.2 Oxibendazol.....	10
2.3 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie.....	10
2.3.1 HPLC na reverzních fázích.....	14
2.3.2 Možnosti zkrácení času analýzy.....	14
2.3.3 HPLC kolony s pelikulárními částicemi.....	15
2.4 Dosud publikované metody HPLC separace albendazolu a jeho metabolitů.....	16
3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	18
3.1 Použité chemikálie.....	19
3.2 Použité přístroje.....	21
3.3 Příprava jednotlivých roztoků.....	22
3.4 Nástřik.....	22
3.5 Podmínky chromatografické detekce.....	23
4. VÝSLEDKOVÁ ČÁST.....	24
4.1 Pokusy s mobilní fází, která obsahovala fosfátový pufr o pH = 3,0.....	25
4.2 Pokusy s mobilní fází, která obsahovala fosfátový pufr o pH = 2,8.....	26
4.3 Pokusy s mobilní fází, která obsahovala fosfátový pufr o pH = 2,6.....	27
4.4 Pokusy s mobilní fází, která obsahovala kys. octovou o koncentraci 0,01 mol/l.....	29
4.5 Pokusy s mobilní fází, která obsahovala kys. octovou o koncentraci 0,05 mol/l.....	37
5. DISKUZE.....	40
6. ZÁVĚR.....	43
7. SEZNAM LITERATURY.....	45

1. ZADÁNÍ PRÁCE

Při studiu rezistence helmintů vůči benzimidazolovým anthelmintikům je třeba zjišťovat koncentrace metabolitů i parentních látek v biologickém materiálu. Mezi anthelmintika, která jsou z tohoto pohledu studována na katedře biochemických věd Farmaceutické fakulty UK, patří albendazol. Stanovení albendazolu a jeho metabolitů v biologických vzorcích vyžaduje vhodnou analytickou separační metodu, kterou je v daném případě HPLC. Katedra biochemických věd spolupracuje při HPLC stanoveních s katedrou biofyziky a fyzikální chemie.

Původní metoda stanovení albendazolu a jeho metabolitů používaná na spolupracujících katedrách byla založena na separaci pomocí klasické kolony se zcela porézními částicemi a navíc se nepodařilo vyvinout metodu tak, aby mohl být ke směsi přidáván vhodný vnitřní standard. Z literární rešerše vyplývá, že tento úkol není při použití klasických kolon nikterak snadný, vzhledem ke značné rozdílnosti polarity (lipofility) albendazolu a jeho metabolitů. Teprve v poslední době se objevily práce, které využívají rychlé chromatografie na krátkých kolonách s velmi jemným zrněním stacionární fáze (1,7 μm) a gradientové metody. Takovýto přístup ovšem vyžaduje použití speciálních chromatografických systémů, které jsou schopny pracovat za velmi vysokých tlaků, do 1200 barů. Běžné chromatografické systémy pracují při tlacích do 400 barů. Kompromisem je využití kolon, které jsou plněny částicemi s pevným jádrem, tzv. core-shell kolony, které umožňují za běžných chromatografických tlaků, tedy s využitím stávajících chromatografických systémů, dosažení účinností srovnatelných s kolonami s jemným zrněním.

Tato diplomová práce měla vytčené dva cíle:

- 1.) Otestovat možnost isokratické separace albendazolu a jeho metabolitů pomocí core-shell kolony Ascentis Express C18.
- 2.) Nalézt pro tuto separaci vhodný vnitřní standard.

2. TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Anthelmintika

Anthelmintika [1, 2] patří mezi látky, které se používají k léčbě helmintóz. Helmintózy jsou považovány za infekční onemocnění a mohou být jimi postiženy všechny druhy obratlovců. Způsobují je červi nebo jejich infekční vývojová stádia.

Léčba helmintóz může být někdy velmi obtížná, záleží totiž na vývojovém cyklu daného parazita. Někteří helminti mají jednoduchý životní cyklus, kdy celý vývoj (od vajíčka, přes larvu až po dospělého jedince) probíhá pouze v určité tkáni jednoho hostitele (např. ve střevě), jiní mají složitý vývoj, který probíhá v jednom i více mezihostitelích přes několik stádií. Prevence a léčba helmintóz tedy spočívá jednak ve využívání různých zoohygienických opatření a jednak v podávání anthelmintik, která jsou většinou syntetického, někdy ale i biosyntetického původu.

2.2 Benzimidazoly

Benzimidazoly [3] jsou veterinární léčiva široce používaná k prevenci a léčbě parazitických infekcí v zemědělství a vodním hospodářství. Některé benzimidazoly díky své antimykotické aktivitě také našly uplatnění v předsklizňovém nebo posklizňovém ošetření polních plodin, skladovaného ovoce a zeleniny.

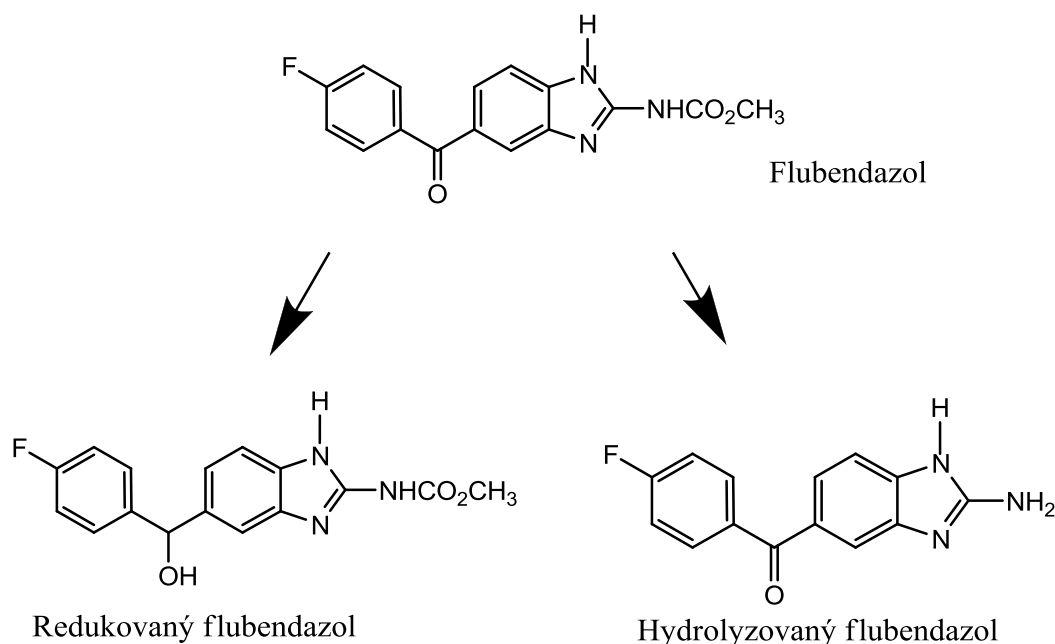
Význam benzimidazolů [4] je patrný z faktu, že jde o jednu z pouhých tří skupin látek, které se ve veterinárním lékařství používají k léčbě helmintóz. Kromě benzimidazolů jsou to ještě imidothiazoly a makrocyclické laktony.

Mechanismus účinku [2] benzimidazolů spočívá v inhibici β -tubulinových subjednotek, které jsou nezbytné pro tvorbu mikrotubulů v buňkách parazitů. Tím, že se poruší jejich tvorba, dojde k poškození funkce celé parazitární buňky a následně k autolýze. Některé benzimidazoly (např. flubendazol) kromě svého přímého účinku způsobují také oslabení červů, kteří se tím stávají náchylnější k útoku imunitního systému hostitele. Značnou výhodou je, že afinita benzimidazolů k β -tubulinu parazita je mnohonásobně vyšší než k β -tubulinu buněk hostitele. Tato skutečnost umožňuje podávat dostatečně vysoké dávky benzimidazolů, aniž by došlo k výskytu vedlejších nežádoucích účinků u léčených zvířat.

Většina léčiv této skupiny je účinná proti vývojovým i dospělým stádiím helmintů, některé látky působí dokonce i ovocidně.

Anthelmintická aktivita závisí zejména na tom, jak dlouho budou ve tkáních a tělních tekutinách přetrvávat terapeutické koncentrace léčiva. Pokles této koncentrace je způsoben jednak přirozeným vylučováním anthelmintika z těla savce a jednak metabolizací anthelmintika působením obranných mechanismů helminta, který je tím převádí na neúčinnou formu.

Na obr. 1 je jako příklad uvedeno schéma vzniku hlavních metabolitů flubendazolu. V organismu se flubendazol metabolizuje na redukovanou formu a hydrolyzovanou formu, které jsou již anthelminticky neúčinné.



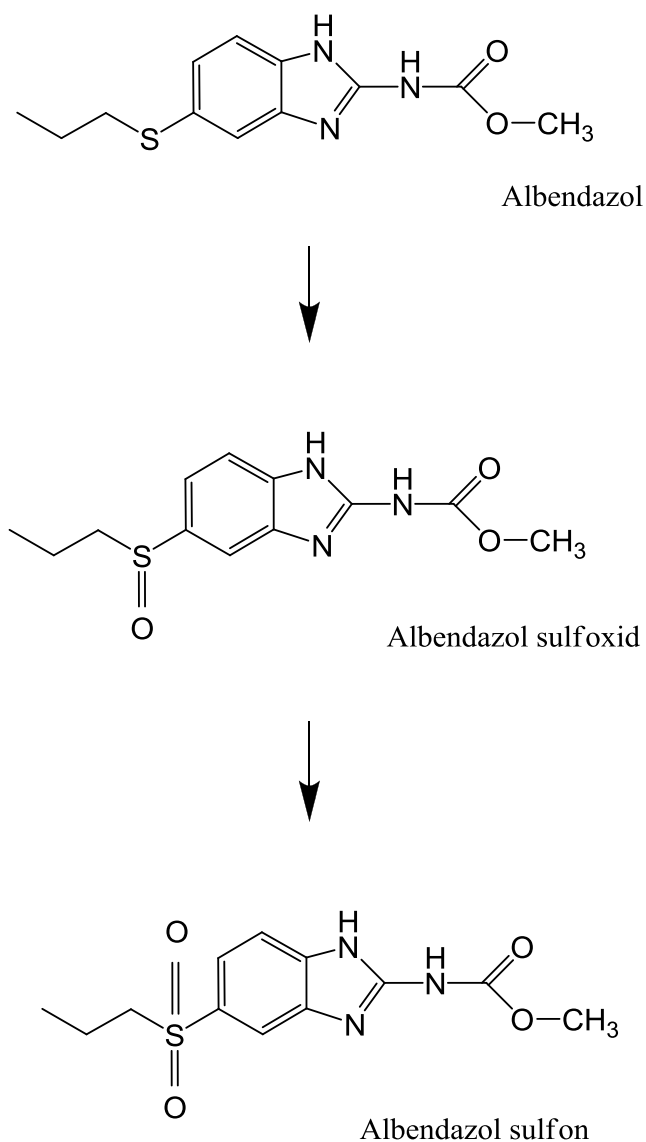
Obr. 1: Schéma vzniku hlavních metabolitů flubendazolu

2.2.1 Albendazol

Albendazol (ABZ) [1] patří mezi tzv. širokospektrá anthelmintika, je totiž účinný na všechna vývojová stádia helmintů. Pravděpodobný mechanismus účinku této látky se vysvětluje degenerací mikrotubulů střevních buněk. V konečném důsledku dochází ke snížení tvorby ATP s následným nedostatkem energie, čímž hynou dospělí paraziti i jejich vývojová stádia.

Albendazol [3] je účinný při léčbě hlístic, ale i plicních parazitů, tasemnic a dospělých stádií motolice jaterní.

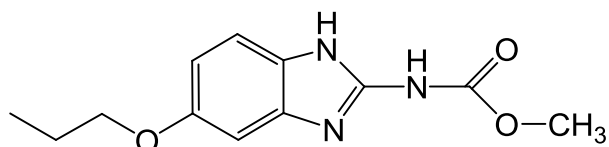
Látka se používá jak ve veterinární, tak i v humánní medicíně. Z gastrointestinálního traktu člověka [1] se velmi slabě vstřebává, její absorpci lze zvýšit současným podáním jídla bohatého na tuky. Pokud se dostane do organismu, váže se ze 70 % na bílkoviny krevní plazmy a dobře se v organismu distribuuje. Dostává se do nitra cyst a do mozkomíšního moku a je vylučována mlékem. V játrech se metabolizuje na albendazol sulfoxid (ABZSO), který je rovněž anthelminticky účinný a vylučuje se žlučí. Eliminační poločas je přibližně 8 - 12 hodin. Další oxidací ABZSO vzniká albendazol sulfon (ABZSO₂), který je již anthelminticky neaktivní. Na obr. 2 je znázorněna postupná metabolizace albendazolu.



Obr. 2: Schéma metabolizace albendazolu

2.2.2 Oxibendazol

Oxibendazol (OXI) je strukturně velmi podobný ABZ (obr. 3). Existuje [3] pouze velmi málo informací o metabolismu oxibendazolu, ale studie [5, 6] ukazují, že léčivo se významně metabolizuje v játrech a v ledvinách. V moči a ve tkáních byly identifikovány dva metabolity: 5-hydroxy-oxibendazol a 6-hydroxy-oxibendazol. Tyto metabolity ale tvoří pouze 15 - 20% celkových reziduí (zbytek není identifikován) [6].



Oxibendazol

Obr. 3: Struktura oxibendazolu

2.3 Vysokoučinná kapalinová chromatografie

Vysokoučinná kapalinová chromatografie - High Performance Liquid Chromatography (HPLC) [7] je v současné době jedna z nejprogressivnějších analytických metod, která nachází stále větší uplatnění ve všech oblastech analýzy léčiv.

Významný rozvoj [8] HPLC začal v 70. letech. Tato metoda umožňuje analyzovat tepelně nestálé nebo netěkavé látky a polymery a odstraňuje tak hlavní nevýhodu plynové chromatografie. Rychlý rozvoj HPLC byl umožněn nalezením vhodných vysoce účinných stacionárních fází a citlivých detektorů.

Výhody HPLC [7]:

- 1.) Ve své podstatě se jedná o separační metodu, která umožňuje kvalitativně i kvantitativně hodnotit jednotlivé složky směsi.
- 2.) Výhodou je také rychlost analýzy a citlivost stanovení (v závislosti na použitém detektoru).
- 3.) Velkým přínosem rovněž je, že pro analýzu postačuje minimální množství vzorku.
- 4.) Tuto metodu lze snadno automatizovat. V současné době jsou k dispozici moderní HPLC chromatografy, které mají automatické dávkovače analyzovaného vzorku, takže mohou po vhodném nastavení příslušných parametrů provádět desítky analýz bez obsluhy operátora.

5.) Prakticky ve všech výše uvedených ukazatelích je HPLC srovnatelná s plynovou chromatografií (GC); avšak vzhledem k tomu, že většina léčiv není těkavá, je HPLC právě v analýze léčiv mnohem použitelnější technikou než GC.

Princip [8] této separační metody spočívá v rozdělování látek mezi stacionární fázi naplněnou v koloně a mobilní fázi procházející kolonou za vysokého tlaku. Protože k dělení látek lze při tom využít všech vratných dvoufázových separačních mechanismů (adsorpce, rozdělování, iontová výměna, síťový efekt gelu), je možné nalézt selektivní a účinný chromatografický systém k dělení směsi prakticky všech organických látek rozpustných ve vodě, zředěných kyselinách nebo organických rozpouštědlech.

Klasické HPLC [7] chromatografické kolony pro analytické účely mají většinou délku 10 – 25 cm a vnitřní průměr 3 – 5 mm. Většinou jsou zhotoveny z nerezové oceli nebo ze skla. Kolony jsou naplněny vhodnými sorbenty. V HPLC se nejčastěji používají tzv. chemicky vázané stacionární fáze. Na hydroxylové skupiny na povrchu silikagelových zrnků jsou vhodnou chemickou reakcí navázány různé radikály:

a) ve většině případů se jedná o uhlovodíkové řetězce, které obsahují zpravidla 18 (popř. 8) atomů uhlíku. Tyto nepolární chemicky vázané fáze se také někdy nazývají reverzní fáze.

b) radikál také může být tvořen tříuhlíkatým řetězcem, na jehož konci jsou navázány skupiny: - NH₂, - CN aj. V tomto případě jde o středně polární fáze.

Chemicky vázané stacionární fáze se komerčně vyrábějí ve velmi širokém sortimentu. Jako nosič radikálů se kromě silikagelu používají i jiné materiály, například vhodné pryskyřice.

Jako HPLC sorbenty se také používají silikagel a oxid hlinitý (polární sorbenty), ale v mnohem menším měřítku než chemicky vázané stacionární fáze. Pro potřeby iontové výměnné chromatografie se jako sorbenty používají vhodné ionexy.

V současné době jsou rovněž komerčně dostupné různé typy chirálních stacionárních fází, což umožňuje chromatografickou analýzu enantiomerů léčiv.

HPLC analýza může probíhat za konstantního složení mobilní fáze během celé analýzy – jedná se o tzv. isokratickou eluci. Tato metoda se používá nejčastěji. Druhá možnost spočívá v programově měněném složení mobilní fáze – tzv. gradientová eluce.

Pro získání úspěšné HPLC metody je důležité optimalizovat chromatografické podmínky tak, aby jednotlivé separované složky směsi vzorku poskytovaly ostré a symetrické chromatografické píky, rozdělené pokud možno až na základní linii.

Jak již bylo řečeno, HPLC umožňuje kvalitativní i kvantitativní hodnocení separovaných složek směsi. Kvalitativní charakteristikou je retenční (eluční) čas t_R , což je doba, která uplyne od nástřiku vzorku na kolonu až do dosažení maxima chromatografického píku. Nejčastějším důkazem totožnosti je shoda retenčních časů chromatografického píku léčiva v analyzovaném vzorku s retenčním časem píku standardu. UV detektory s diodovým polem dokonce umožňují v maximu chromatografického píku změřit UV spektrum; shoda UV spekter vzorku a standardu je další identifikační charakteristikou.

Kvantitativní charakteristikou v HPLC je plocha (popř. výška) chromatografického píku. Cílem [9] chromatografické analýzy je dosáhnout dobrého rozdělení analyzovaných látek v co nejkratším čase. Rozdělení může být úplné, částečné, nedokonalé.

Míra separace dvou látek se nazývá chromatografické rozlišení (R_{12}) a lze jej vypočítat podle vzorce (1):

$$R_{12} = \frac{1,18 (t_{R2} - t_{R1})}{b_1 + b_2}, \quad (1)$$

v němž t_{R1} a t_{R2} jsou retenční časy píků ($t_{R1} < t_{R2}$), jejichž rozlišení je počítáno, a b_1 a b_2 jsou šířky těchto píků v polovině jejich výšky. Separace píků se považuje za dostatečnou, jestliže hodnota rozlišení je 1,5 nebo větší.

Hodnotu rozlišení lze ovlivnit:

- změnou stacionární fáze
- změnou mobilní fáze
- současnou změnou obou fází
- změnou rychlosti průtoku mobilní fáze (v případě klasických HPLC kolon).

Účinnost chromatografického procesu závisí, mimo jiné, na účinnosti chromatografické kolony, která se vyjadřuje počtem teoretických pater n :

$$n = 5,54 \left(\frac{t_R}{b} \right)^2. \quad (2)$$

V rovnici (2) je význam symbolů stejný, jako v rovnici (1).

Citlivost a selektivita [7] chromatografické analýzy závisí na použitém detektoru. Existuje celá řada různých detektorů – např. spektrofotometrické, elektrochemické, refraktometrické nebo fluorescenční. Naposled zmíněné detektory se nejčastěji využívají

tam, kde analyzovaná látka vykazuje fluorescenci. Ovšem látky, které nefluoreskují lze derivatizací s vhodnými činidly převést na fluoreskující deriváty. Fluorescenční detektory jsou sice méně univerzální, než ostatní detektory, ale zato vykazují velmi dobrou citlivost (10^{-9} až 10^{-12} g/ml), jsou dostatečně selektivní a lze je použít i při gradientové eluci.

Princip [10] těchto detektorů spočívá v měření sekundárního záření (emisního), které látka vydá po absorpci primárního elektromagnetického záření (excitačního). Absorpcí tohoto záření přecházejí molekuly látek ze základního elektronového stavu do různých vibračních hladin excitovaného elektronového stavu. Absorbovanou energii může excitovaná molekula opět vyžářit jako fluorescenci nebo ji přeměnit jiným mechanismem na energii vibrační nebo ji předat jiným molekulám. Ztrátou vibrační energie (vibrační relaxací) přejde molekula nejprve do základního vibračního stavu a pak emituje fluorescenční záření, jehož vlnová délka je větší než vlnová délka excitačního záření právě v důsledku vibrační relaxace.

Pro kvantifikaci jednotlivých složek ve směsi se nejčastěji používají dvě metody [11]:

- A) Metoda vnějšího standardu – spočívá ve dvou krocích (dvojím dávkování). Nejprve se na kolonu nastříkne roztok analyzovaného vzorku a zaregistruje se chromatografický záznam. Po té následuje nastříknutí roztoku vnějšího standardu a opět se zaregistruje jeho chromatogram. Jako vnější standard se zpravidla používá u substancí standard stanovované látky, označovaný jako CRL (chemická referenční látka), nebo u složených lékových přípravků jedna z analyzovaných složek směsi. Koncentrace stanovovaných složek směsi se pak vypočítá z poměrů ploch (výšek) píků jednotlivých stanovovaných látek a plochy píku vnějšího standardu.
- B) Metoda vnitřního standardu – ke známému objemu roztoku vzorku se přidá definovaný objem roztoku vhodného vnitřního standardu a po promíchání se nastříkuje na kolonu. Koncentrace stanovovaných látek se opět vypočítá z poměru ploch (výšek) píků jednotlivých separovaných složek a plochy píku vnitřního standardu. Tato metoda je méně časově náročná a hlavně přesnější, protože není zatížena chybou dvojího nástřiku. Výběr vhodného vnitřního standardu však klade značné nároky na odborné znalosti a zkušenosti operátora, zejména při stanovení vícesložkových směsí. Vnitřní standard musí být eluován v blízkosti píků, které budou vyhodnocovány, musí mít podobnou koncentraci jako látky, jejichž obsah je zjišťován a musí být chemicky inertní. Stanovení obsahu se provede opakovanými nástřiky

porovnávacích a zkoušených roztoků. Ze získaných chromatografických záznamů se vypočítá obsah hodnocených látek. Metoda vnitřního standardu je vhodná při analýzách biologického materiálu, kdy umožňuje eliminovat systematické chyby (například nedokonalou extrakci), k nimž dochází během zpracování vzorku před vlastní analýzou.

2.3.1 HPLC na reverzních fázích

Chemicky modifikované stacionární fáze [8] mají výhodu v tom, že při působení vysokého tlaku nedochází k jejich narušení. Tyto fáze se připravují silylací silikagelu s různými skupinami. V závislosti na vázané skupině mají chemicky modifikované fáze různou polaritu. Nepochární, vysoce hydrofobní skupiny, se využívají pro systém tzv. obrácených fází (reverzní fáze), což je systém, kdy stacionární fáze je méně polární než fáze mobilní. Jedná se zejména o skupiny - C₁₈H₃₇ a - C₈H₁₇. Mobilní fáze, která se nejčastěji používá pro dělení látek na reverzních fázích, je voda nebo vhodný pufr ve směsi s methanolem nebo acetonitrilem.

2.3.2 Možnosti zkrácení času analýzy

Moderní použití chromatografie [12] v současné době si žádá rychlejší a mnohem lepší výkon, než jaký postačoval v minulosti. Středem pozornosti vědeckých i průmyslových výzkumů se stává hlavně zkrácení doby separace. Prioritou ve zvýšení rychlosti je především správný výběr vhodné stacionární fáze. Složení mobilní fáze má také významný vliv na rychlost a je rovněž velmi důležité pro získání dostatečné citlivosti.

Analýzu můžeme zrychlit několika různými způsoby. Jedním z nich je změna velikosti částic stacionární fáze. Tato myšlenka [13] byla díky van Deemterovi známa již v 50. letech 20. století. Malé částice [12] stacionární fáze zlepšují rychlost přenosu hmoty a také snižují efekt vířivé difuze. Výsledkem je zmenšení výšky teoretického patra a optimální průtoková rychlost. Ukázalo se, že u částic s průměrem menším než 2 μm (sub-2μm částice) se sice čas analýzy podstatně zkrátil, aniž by došlo k snížení rozlišení nebo citlivosti, musel ale být použit výrazně vyšší tlak.

Další možností, jak zkrátit analýzu, je zvýšení teploty. Vysoká teplota totiž snižuje viskozitu mobilní fáze a zvyšuje transfer hmoty. Ovšem vyšší teplota většinou negativně ovlivní chromatografické rozlišení píků.

Třetí způsob zlepšení separační rychlosti spočívá ve zvýšení porozity částic stacionární fáze. Tím se redukuje odpor proudění kapaliny v koloně. Výzkumem monolitických částic (jsou porézní v celém svém objemu) se zabývalo v minulosti mnoho vědců, což vedlo k velkému rozvoji velmi výkonných a dnes už komerčně dobře dostupných polymerních nebo silikagelových monolitických kolon. Čas analýzy u těchto kolon může být zkrácen zvýšením průtoku mobilní fáze.

Revoluční myšlenka vývoje stacionárních fází tvořených částicemi s pevným (neporézním) jádrem byla poprvé uvedena v práci Horvatha et al. [14, 15]. Horvath použil ve svém výzkumu skleněné kuličky o velikosti 50 μm pokryté vrstvou pryskyřice na bázi styren-divinylbenzenu se zakotvenými ionexovými skupinami. Tento výsledný produkt se označuje jako pelikulární obalový materiál. Později Kirkland [16] došel k závěru, že 30 - 40 μm velké částice s porézním povrchem poskytují mnohem lepší rozlišení v porovnání s velkými porézními částicemi používanými v kapalinové chromatografii dříve. S postupem času docházelo k vylepšování vlastností částic stacionární fáze. Rozměry jádra byly zmenšeny a aktivní porézní vrstva byla zredukována na 0,5 μm . Tyto částice byly používány pro separaci peptidů a proteinů [17].

V praxi si tedy můžeme pro vysokorychlostní separaci vybrat ze tří typů kolon:

- sub-2 μm kolony
- monolitické kolony
- kolony s pelikulárními částicemi

Všechny typy těchto kolon mají svá určitá experimentální omezení a používaný chromatografický systém je také limitován, zejména maximálním přípustným provozním tlakem.

2.3.3 HPLC kolony s pelikulárními částicemi

V současnosti [13] jsou k dispozici kolony s různě velkými pelikulárními částicemi (1,7; 2,7 a 5 μm). Částice o rozměrech 2,7 μm se skládají z 1,7 μm velkého pevného jádra a z 0,5 μm silné porézní silikagelové vrstvy se zakotvenou vlastní stacionární fází. Částice s velikostí 5 μm mají 4,5 μm velké jádro a vrstvu o tloušťce 0,25 μm .

Kolony s pelikulárními částicemi oplývají celou řadou výhod. V porovnání s částicemi, které jsou porézní v celém svém objemu, mají díky pevnému jádru mnohem kratší difúzní dráhu. Tato částečná porozita redukuje podélnou difúzi analyzovaných látek a minimalizuje rozšíření píku.

Kolony [13] s těmito částicemi vykazují účinnost podobnou částicím pod 2 μm , a proto se staly jejich vhodnou alternativou. Navíc oproti sub-2 μm částicím vytváří částice s pevným jádrem a porézním povrchem přibližně poloviční protitlak, často menší než 400 bar, což je maximální konstrukční tlak klasických HPLC systémů. Tato skutečnost dovoluje použít delší kolony a vyšší průtokovou rychlost ve srovnání se sub-2 μm částicemi. Oproti tradičním 3 μm částicím jsou dokonce dvojnásobně účinné.

Použitím kolony s pelikulárními částicemi lze během měření za stejných podmínek získat ostřejší píky ve srovnání s kolonami plněnými 3 μm a 5 μm částicemi.

Kombinace malých rozměrů částic, jejich úzké velikostní distribuce a výrazně zkrácené difúzní vzdálenosti má za následek vyšší účinnost kolony (kratší retenční čas) a lepší rozlišení chromatografických píků. Zvýšená účinnost poskytuje výhodu – vysokou citlivost, jelikož vyšší účinnost vede k výrazně užším a vyšším píků. Tím je možné detekovat nižší koncentrace analytů.

V porovnání se sub-2 μm a 3 μm částicemi mají pelikulární kolony delší životnost. Kvůli malé velikosti částic a jejich úzké distribuci může být totiž použit předkolonový filtr s nepatrnými 2 μm póry, díky němuž dochází k minimálnímu znečištění kolony, nezvyšuje se protitlak a nedochází tím ke štěpení píků.

Tím, že existuje možnost zvýšit výkon této chromatografické kolony, nezkrátí se pouze doba analýzy, ale výrazně se sníží i spotřeba rozpouštědel.

Pelikulární chromatografické kolony mají široké uplatnění nejen ve farmacii, ale i v toxikologii, v oblastech hodnocení kvality a bezpečnosti potravin nebo v životním prostředí.

2.4 Dosud publikované metody HPLC separace albendazolu a jeho metabolitů

Vzhledem k tomu, že albendazol je léčivo vyvinuté před několika desítkami let a jeho monitorování a výzkum jsou stále aktuální, byla publikována celá řada metod stanovení této látky a jejích metabolitů. Mezi těmito metodami je právě HPLC zcela jasně preferována. Protože náplně kolon pro HPLC (stacionární fáze) prodělaly v minulém desetiletí velmi

prudký rozvoj, jsou v následujícím přehledu uvedeny některé zajímavé práce z tohoto posledního období.

Kitzmann [18] publikoval účinnou metodu stanovení albendazolu a jeho metabolitů v plazmě na fenylové koloně s UV detekcí. Volba UV detekce je zde poněkud překvapující vzhledem k její nízké citlivosti. Jako vnitřní standard byl v této práci použit oxibendazol. Zongde a spolupracovníci [19] se věnovali chirální separaci albendazol sulfoxidu na chirálních stacionárních fázích na bázi tris (3,5-dimethylfenylkarbamát) amylozy. Mirfazaelian a spol. [20] publikovali rovněž HPLC metodu stanovení albendazolu a jeho metabolitů v plazmě na koloně s náplní C8, přičemž kombinovali UV a fluorescenční detekci a jako vnitřní standard použili mebendazol. V článku Wu a spol. [21] je popisováno HPLC stanovení těchto látek v ovčí plazmě. Autoři prováděli separaci na koloně s náplní C18 a používali UV detekci a vnitřní standard oxfendazol. Je zajímavé, že jako mobilní fázi použili ternární směs acetonitril + methanol + fosfátový pufr (pH = 6,8) v poměru 22:22:56. Hledání vyhovující mobilní fáze a vnitřního standardu s vhodnou lipofilitou (logP) je zde popisováno jako poměrně složitá záležitost. Sarin R. a spol. [22] použili kolonu Discovery RP Amide C16, UV detekci a opět mebendazol v roli vnitřního standardu. Na C18 koloně prováděli separaci metabolitů albendazolu autoři jiné práce [23], kteří použili fluorescenční detekci a pracovali metodou vnějšího standardu.

V poslední době se rovněž objevily čtyři práce, v nichž je analýza albendazolu a jeho metabolitů prováděna pomocí UPLC (Ultra Performance Liquid Chromatography), což je metoda, která využívá kolony plněné sub 2- μ m částicemi. Ve všech čtyřech pracích je k separacím použit chromatograf Acquity firmy Waters s MS/MS detekcí a speciální kolony téže firmy. V publikacích [24] a [25] probíhaly separace na koloně BEH C18, v dalších dvou článcích [26], [27] na koloně HSS T3. V obou případech tedy jde o stacionární fázi typu C18, ale povrch silikagelového nosiče je vždy speciálně upraven. Zkratka BEH znamená „bridged ethylene hybrid“ a označuje silikagelový nosič, v němž je siloxanový povrch chráněn a zároveň zpevněn ethylenovými můstky. To zlepšuje účinnost náplně a rozšiřuje použitelný rozsah pH mobilní fáze. Zkratka HSS označuje „high strength silica“, což je náplň odolná tlakům až 1000 barů. Symbolem T3 označuje firma Waters náplň určenou pro separace látek se značně rozdílnou polaritou. Použitelnost uvedených náplní dokumentuje skutečnost, že v publikacích [25], [26] a [27] byla na těchto fázích separována celá řada léčiv, nejen benzimidazolových.

3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Použité chemikálie

Údaje o použitých benzimidazolech jsou uvedeny v následující tabulce:

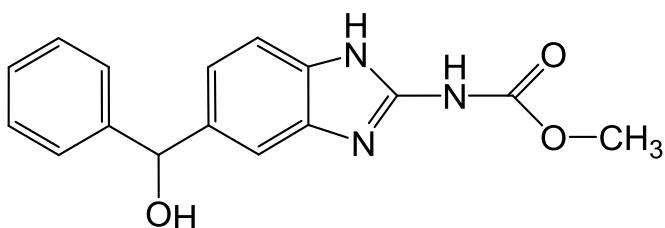
Tab. 1: Přehled použitých benzimidazolů:

Látka	Zkratka	Dodavatel	Systematický název	M (g/mol)
Albendazol	ABZ	Sigma	methyl <i>N</i> -(5-propylsulfanyl-1 <i>H</i> -benzimidazol-2-yl)karbamát	265,34
Albendazol sulfoxid	ABZSO	Toronto Research Chemicals	methyl <i>N</i> -(5-propylsulfinyl-1 <i>H</i> -benzimidazol-2-yl)karbamát	281,33
Albendazol sulfon	ABZSO ₂	Toronto Research Chemicals	methyl <i>N</i> -(5-propylsulfonyl-1 <i>H</i> -benzimidazol-2-yl)karbamát	297,33
Oxibendazol	OXI	Sigma	methyl <i>N</i> -(5-propoxy-1 <i>H</i> -benzimidazol-2-yl)karbamát	249,30
Carbendazim	MBC	Riedel-de Haën	methyl <i>N</i> -(1 <i>H</i> -benzimidazol-2-yl)karbamát	191,19
Thiabendazol	TBZ	Riedel-de Haën	4-(1 <i>H</i> -benzimidazol-2-yl)-1,3-thiazol	201,25
Mebendazol redukovaný	MBZ-R	Jansen Pharmaceutica	methyl <i>N</i> -[5-(1-fenyl-1-hydroxymethyl)-1 <i>H</i> -benzimidazol-2-yl]karbamát	297,30
2-aminobenzimidazol	2-AB	Aldrich	1 <i>H</i> -benzimidazol-2-amin	133,15
Benomyl	BEN	Aldrich	methyl <i>N</i> -[1-(butylkarbamoyl)-1 <i>H</i> -benzimidazol-2-yl]karbamát	290,32

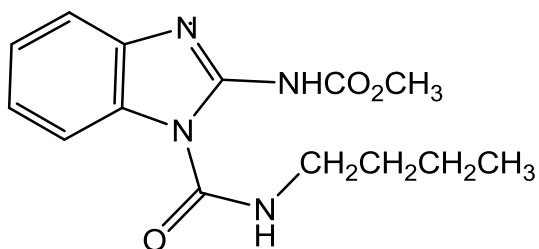
Dále byly v práci použity tyto chemikálie:

- Methanol for gradient elution (Aldrich)
- Acetonitril for gradient elution (Aldrich)
- Dihydrogenfosforečnan draselný p. a. (Lachema Brno)
- Kyselina fosforečná 85% p. a. (Lachema Brno)
- Kyselina octová 99% p. a. (Lach-Ner, s. r. o.)
- Dimethylsulfoxid for UV-spectroscopy (Fluka)
- Ultračistá voda připravená reverzní osmózou (FaF UK)

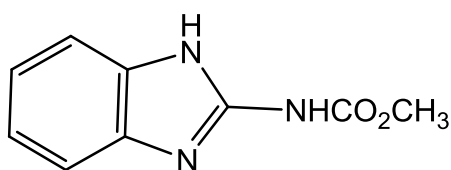
Struktury albendazolu, albendazol sulfoxidu a albendazol sulfonu jsou patrné z obr. 2, struktura oxibendazolu je znázorněna na obr. 3. Obr. 4 - 8 uvádějí struktury ostatních použitých benzimidazolů.



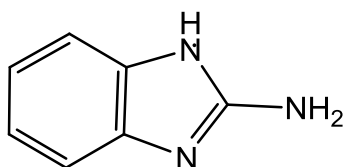
Obr. 4: Struktura redukovaného mebendazolu



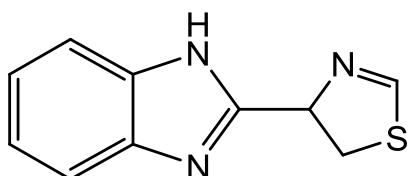
Obr. 5: Struktura benomylu



Obr. 6: Struktura carbendazimu



Obr. 7: Struktura 2-aminobenzimidazolu



Obr. 8: Struktura thiabendazolu

3.2 Použité přístroje

Během měření byly použity tyto přístroje:

- Kapalinový chromatograf Shimadzu sestávající z degaseru GT-154, vysokotlakého čerpadla LC-10ADvp, autosampleru SIL-10ADvp, kolonového termostatu CTO-10Avp, UV/VIS diode-array detektoru SPD-M10Avp, fluorescenčního detektoru RF-10AXL a řídicí jednotky SCL-10Avp. Chromatograf byl ovládán z počítače pomocí chromatografického software CLASS-VP. Byla používána kolona Ascentis Express C18 o rozměrech 100 x 3,0 mm plněná core-shell částicemi o průměru 2,7 μm s předkolonou 20 x 4,0 mm plněnou zcela porézními částicemi Ascentis C18 o průměru 3,0 μm. Při všech experimentech v této práci byla kolona termostatována na 25 °C.
- pH-metr inoLab 720 s pH elektrodou Sentix 61 (WTW)
- Membránová vývěva KNF, typ N810 (KNF Neuberger)
- Digitální analytické váhy (Sartorius)

3.3 Příprava jednotlivých roztoků

Příprava roztoků benzimidazolů:

Navážka příslušného benzimidazolu byla v 50 ml kádince rozpuštěna v minimálním nutném množství dimethylsulfoxidu a doplněna na 3 ml acetonitrilem. Navážka byla volena tak, aby tímto postupem vznikl roztok o koncentraci 1 mmol/l. Tento roztok byl poté 100x zředěn v 50 ml odměrné baňce směsí fosfátový pufr (pH = 3,0; 0,025 mol/l) + acetonitril (70:30, obj.), čímž vznikl roztok o koncentraci 10 μ mol/l, který byl znovu 100x zředěn stejným postupem na roztok o koncentraci 100 nmol/l. Takto připravené roztoky byly používány k analýzám.

Příprava fosfátového pufru (pH = 3,0; 0,025 mol/l):

Fosfátový pufr (0,025 mol/l, pH = 3,0) byl připraven rozpuštěním 3,40 g dihydrogenfosforečnanu draselného p. a. v 995 ml ultračisté vody. Za použití pH-metru bylo pH tohoto roztoku upraveno 85% kyselinou fosforečnou na hodnotu 3,0. Poté byl v odměrné baňce doplněn objem roztoku na 1000 ml ultračistou vodou. Pufr byl následně přefiltrován na filtračním zařízení (Supelco) spojeném s KNF membránovou vývěvou přes filtr Nylon66 s póry o velikosti 0,45 μ m (Supelco).

Pokud byl používán fosfátový pufr o nižším pH, byl připravován z fosfátového pufru pH = 3,0 přidavkem 85% kyseliny fosforečné.

Příprava roztoku kyseliny octové 0,01 mol/l:

580 μ l koncentrované kyseliny octové (99%) bylo v 1 000 ml odměrné baňce naředěno ultračistou vodou a doplněno po rysku.

Příprava roztoku kyseliny octové 0,05 mol/l:

2 900 μ l koncentrované kyseliny octové (99%) bylo v 1 000 ml odměrné baňce naředěno ultračistou vodou a doplněno po rysku.

3.4 Nástřik

Při všech experimentech v této práci bylo nastřikováno 10 μ l vzorku.

3.5 Podmínky chromatografické detekce

Během analýz byl diode-array detektor používán pouze pro snímání spekter sledovaných píků v rozmezí 190 – 380 nm. Vlastní detekce byla prováděna pomocí detektoru fluorescenčního. Všechny píky byly snímány při excitační vlnové délce $\lambda_{ex} = 290$ nm a emisní vlnové délce $\lambda_{em} = 320$ nm.

4. VÝSLEDKOVÁ ČÁST

4.1 Pokusy s mobilní fází, která obsahovala fosfátový pufr o pH = 3,0

Výchozí chromatografické podmínky byly nastaveny následovně:

Jako mobilní fáze byla použita směs fosfátového pufru o pH = 3,0 a koncentraci 0,025 mol/l s acetonitrilem v poměru 65/35. Průtok byl nejprve nastaven na 0,9 ml/min.

V dalších experimentech se zkoušely různé podmínky analýzy – měnil se průtok nebo složení mobilní fáze.

Nastříkována byla směs ABZSO + ABZSO₂ + ABZ připravená smícháním stejných objemů roztoků (s koncentrací 100 nmol/l) těchto tří látek.

Výsledky shrnuje následující tabulka.

Tab. 2: Výsledné retenční časy směsi ABZSO + ABZSO₂ + ABZ s mobilní fází obsahující pufr o pH = 3,0 za různých podmínek analýzy:

Průtok mobilní fáze (ml/min)	Poměr pufr/acetonitril	Retenční čas ABZSO (min)	Retenční čas ABZSO ₂ (min)	Retenční čas ABZ (min)
0,9	65/35	1,10	1,49	3,34
0,7	65/35	1,33	1,83	4,00
0,5	65/35	1,78	2,44	5,40
0,5	70/30	2,01	3,07	8,62
0,6	70/30	1,67	2,60	7,21

4.2 Pokusy s mobilní fází, která obsahovala fosfátový pufr o pH = 2,8

Nastříkována byla stejná směs ABZSO + ABZSO₂ + ABZ jako v předchozím pokusu a obdobným způsobem byly hledány nejvhodnější podmínky analýzy.

Výsledky shrnuje tabulka 3.

Tab. 3: Výsledné retenční časy směsi ABZSO + ABZSO₂ + ABZ s mobilní fází obsahující pufr o pH 2,8 za různých podmínek analýzy:

Průtok mobilní fáze (ml/min)	Poměr pufr/acetonitril	Retenční čas ABZSO (min)	Retenční čas ABZSO ₂ (min)	Retenční čas ABZ (min)
0,6	70/30	1,69	2,57	6,27
0,5	70/30	1,97	3,03	7,18
0,5	65/35	1,92	2,98	5,88

Za podmínek uvedených v posledním řádku tabulky 3 byly dále nastříkovány roztoky šesti benzimidazolů, které byly testovány jako vnitřní standardy. Koncentrace těchto roztoků měla vždy hodnotu 100 nmol/l.

Výsledky uvádí tabulka 4.

Tab. 4: Výsledné retenční časy benzimidazolů (průtok mobilní fáze: 0,5 ml/min, poměr pufr/acetonitril = 65/35):

Látka	Retenční čas (min)
TBZ	1,76
MBC	1,66
BEN	2,25
MBZ-R	2,90
2-AB	1,48
OXI	2,44

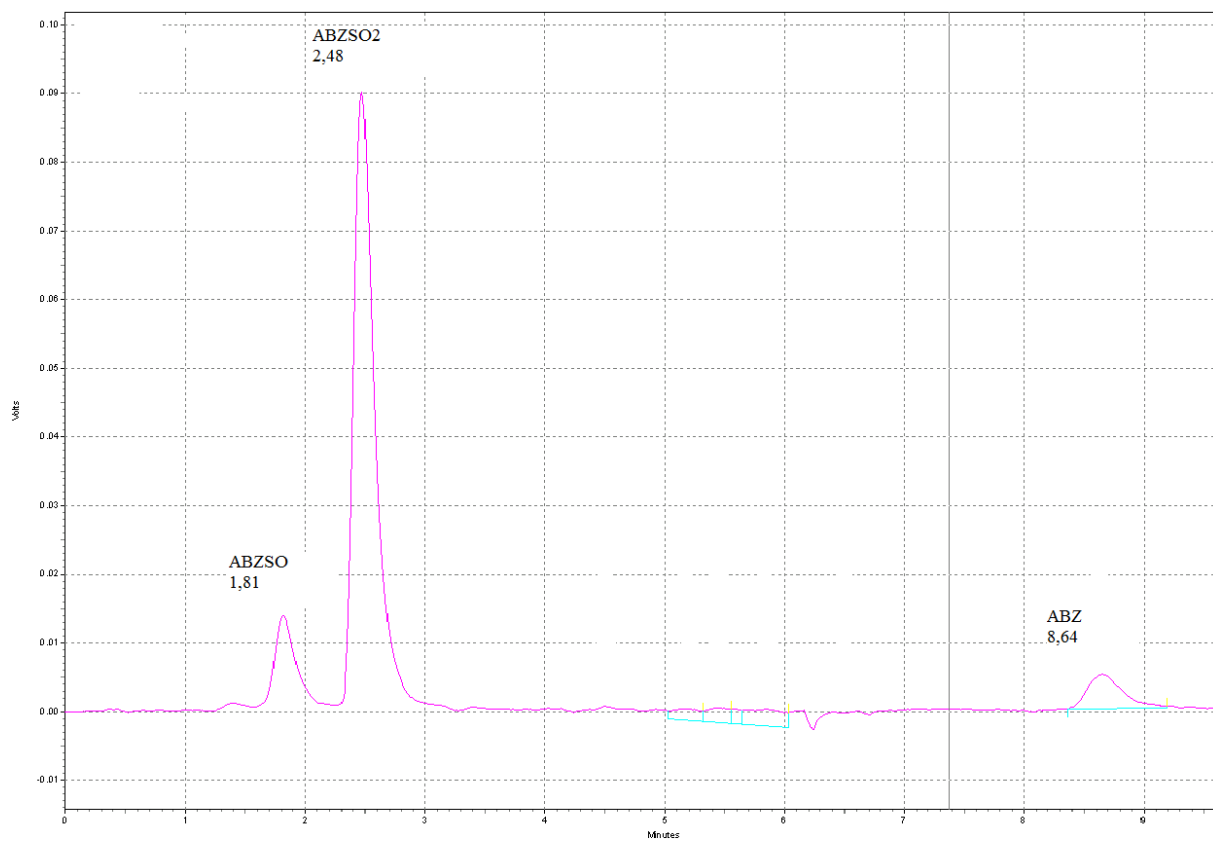
4.3 Pokusy s mobilní fází, která obsahovala fosfátový pufr o pH = 2,6

Nastříkována byla opět směs ABZSO + ABZSO₂ + ABZ připravená smícháním stejných objemů roztoků (s koncentrací 100 nmol/l) těchto tří látek (výsledný chromatogram je znázorněn na obrázku 9) a následně všech šest dalších benzimidazolů (viz tab. 4), přičemž poměr složek mobilní fáze a průtok byl ponechán na stejných hodnotách jako v předchozím pokusu, tj. průtok mobilní fáze: 0,5 ml/min, poměr pufr/acetonitril = 65/35.

Výsledné hodnoty retenčních časů shrnuje tabulka 5.

Tab. 5: Výsledné retenční časy všech benzimidazolů (průtok mobilní fáze: 0,5 ml/min, poměr pufr/acetonitril = 65/35):

Látka	Retenční čas (min)
ABZSO	1,81
ABZSO ₂	2,48
ABZ	8,64
OXI	2,26
2-AB	2,26
MBZ-R	1,89
BEN	1,59
MBC	1,61
TBZ	1,69



Obr. 9: Výsledný chromatogram směsi ABZSO + ABZSO₂ + ABZ (průtok mobilní fáze: 0,5 ml/min, poměr pufr/acetonitril = 65/35)

4.4 Pokusy s mobilní fází, která obsahovala kys. octovou o koncentraci 0,01 mol/l

Dále byla jako mobilní fáze zkoušena směs kyseliny octové o koncentraci 0,01 mol/l s acetonitrilem v poměru 70/30, průtok byl nejprve nastaven na 0,5 ml/min.

Zjištěné hodnoty retenčních časů jsou uvedeny v následující tabulce.

Tab. 6: Výsledné retenční časy všech benzimidazolů (průtok mobilní fáze: 0,5 ml/min, poměr kyselina octová/acetonitril = 70/30):

Látka	Retenční čas (min)
ABZSO	2,0
ABZSO ₂	3,1
ABZ	10,2
OXI	3,8
2-AB	1,5
MBZ-R	2,6
BEN	1,9
MBC	1,9
TBZ	2,1

V dalších experimentech byl vyřazen diode-array detektor a mobilní fáze byla vedena z kolony přímo na fluorescenční detektor patnácticentimetrovou PEEK kapilárou o vnitřním průměru 0,25 mm (0,010 palce).

Vzhledem k výsledkům z předchozích experimentů byl dále používán jako vnitřní standard OXI.

Z důvodu velkého rozdílu retenčního času ABZ a ostatních tří látek, byl do mobilní fáze přidán methanol (MeOH).

Po úpravě se tedy mobilní fáze skládala z kyseliny octové o koncentraci 0,01 mol/l, methanolu a acetonitrilu (ACN) v poměru 70/5/25, průtok byl ponechán na hodnotě 0,5 ml/min.

Ta těchto podmínek byl ovšem retenční čas ABZ delší než 15 minut (nebyl proto dále měřen, chromatogram po 15 minutách ukončen).

Proto byl pro analýzu použit stejný poměr směsi mobilní fáze (kyselina octová (0,01 mol/l) + MeOH + ACN = 70/5/25), ale průtok byl zvýšen na 0,7 ml/min.

Hodnoty retenčních časů shrnuje následující tabulka.

Tab. 7: Výsledné retenční časy benzimidazolů (průtok mobilní fáze: 0,7 ml/min, poměr kyselina octová (0,01 mol/l) + MeOH + ACN = 70/5/25):

Látka	Retenční čas (min)
ABZSO	1,7
ABZSO ₂	2,9
OXI	3,7
ABZ	12,9

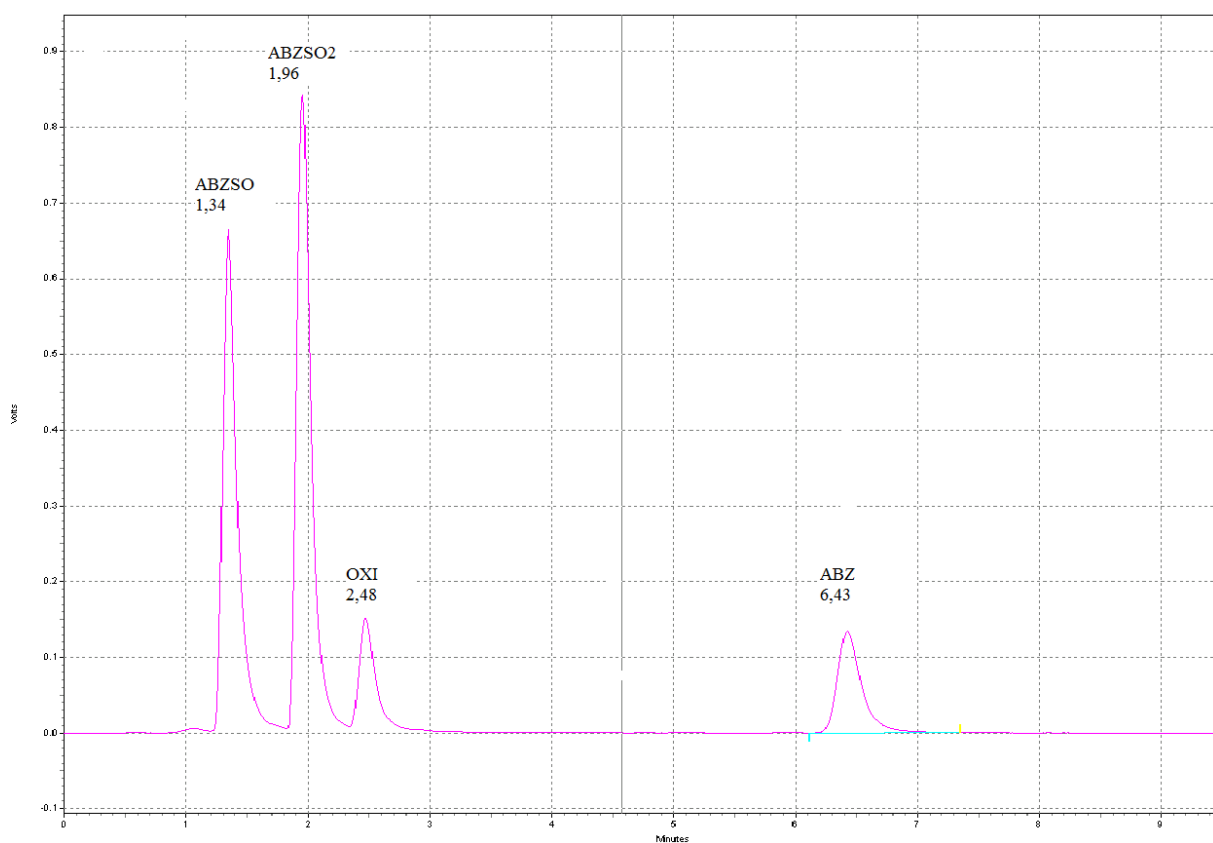
Z výše uvedených hodnot je patrné, že sice bylo dosaženo dobrého rozlišení, ale přesto doba analýzy zůstala stále příliš dlouhá vzhledem k retenčnímu času ABZ. Teoreticky by bylo možné ještě více zvýšit průtok, ale to by zase zhoršilo separaci prvních tří píků. Proto tato varianta nebyla prakticky provedena.

Místo toho byl upraven poměr jednotlivých složek mobilní fáze (kyselina octová o koncentraci 0,01 mol/l, methanol a acetonitril) na hodnoty 65/5/30. Průtok byl ponechán na hodnotě 0,7 ml/min.

Zjištěné retenční časy jsou uvedeny v tabulce 8 a na obrázku 10 znázorněn výsledný chromatogram.

Tab. 8: Výsledné retenční časy benzimidazolů (průtok mobilní fáze: 0,7 ml/min, poměr kyselina octová (0,01 mol/l) + MeOH + ACN = 65/5/30):

Látka	Retenční čas (min)
ABZSO	1,34
ABZSO ₂	1,96
OXI	2,48
ABZ	6,43



Obr. 10: Chromatogram směsi ABZSO + ABZSO₂ + ABZ spolu s vnitřním standardem OXI (průtok mobilní fáze: 0,7 ml/min, kyselina octová (0,01 mol/l) + MeOH + ACN = 65/5/30)

Na chromatogramu jsou patrné chvostující píky, a proto bylo složení mobilní fáze mírně pozměněno.

Výsledné složení po té vypadalo následovně:

Kyselina octová 0,01 mol/l + MeOH + ACN = 63/7/30.

Průtok byl opět ponechán na hodnotě 0,7 ml/min.

Retenční časy shrnuje následující tabulka.

Tab. 9: Výsledné retenční časy benzimidazolů (průtok mobilní fáze: 0,7 ml/min, poměr kyselina octová (0,01 mol/l) + MeOH + ACN = 63/7/30):

Látka	Retenční čas (min)
ABZSO	1,34
ABZSO ₂	1,89
OXI	2,44
ABZ	6,11

Z hodnot uvedených v tabulce 9 je však zřejmé, že první tři píky jsou příliš blízko u sebe, proto byla provedena ještě drobná změna složení mobilní fáze.

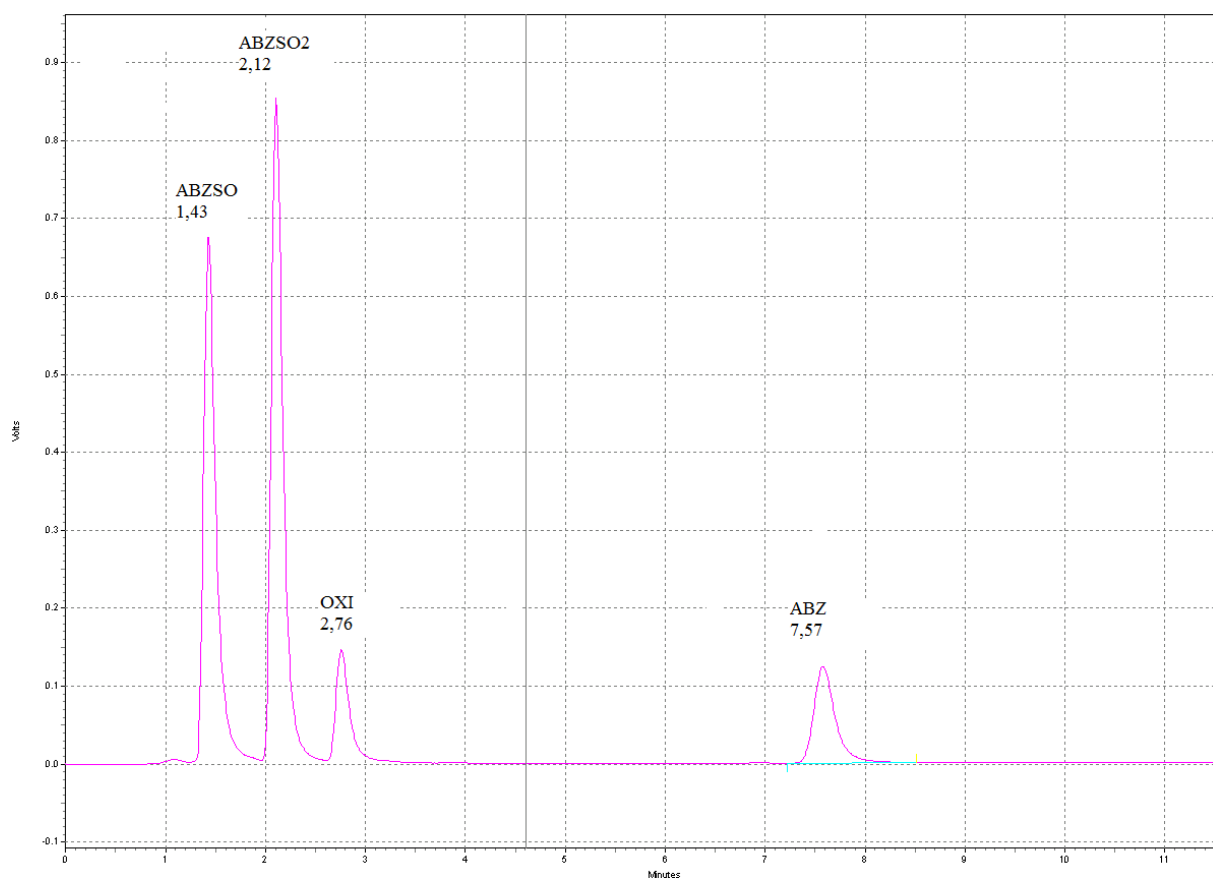
Kyselina octová, methanol a acetonitril byly smíchány v poměru 65/7/28. Průtok zůstal na hodnotě 0,7 ml/min.

Hodnoty retenčních časů uvádí tabulka 10.

Tab. 10: Výsledné retenční časy benzimidazolů (průtok mobilní fáze: 0,7 ml/min, poměr kyselina octová (0,01 mol/l) + MeOH + ACN = 65/7/28):

Látka	Retenční čas (min)
ABZSO	1,43
ABZSO ₂	2,12
OXI	2,76
ABZ	7,57

Z tabulky 10 vyplývá, že toto složení mobilní fáze poskytuje již celkem uspokojivý chromatogram, který je znázorněn na následujícím obrázku.



Obr. 11: Chromatogram směsi ABZSO + ABZSO₂ + ABZ spolu s vnitřním standardem OXI (průtok mobilní fáze: 0,7 ml/min, kyselina octová (0,01 mol/l) + MeOH + ACN = 65/7/28)

Dále byl proveden pokus s vyšším obsahem MeOH v mobilní fázi.

Složení mobilní fáze po té vypadalo následovně:

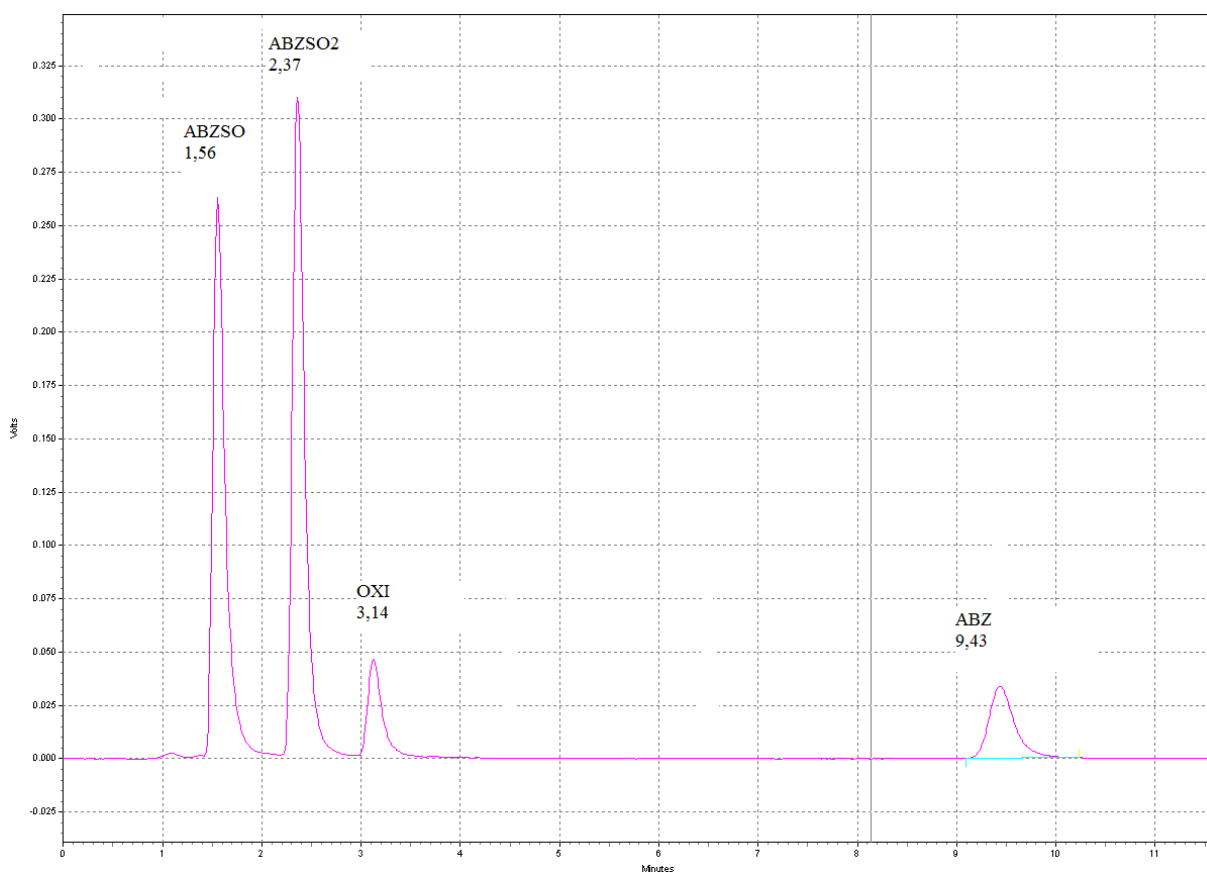
Kyselina octová 0,01 mol/l + MeOH + ACN = 65/10/25

Průtok byl stále ponechán na hodnotě 0,7 ml/min.

Výsledné retenční časy jsou uvedeny v tabulce 11 a chromatogram znázorněn na obrázku 12.

Tab. 11: Výsledné retenční časy benzimidazolů (průtok mobilní fáze: 0,7 ml/min, poměr kyselina octová (0,01 mol/l) + MeOH + ACN = 65/10/25):

Látka	Retenční čas (min)
ABZSO	1,56
ABZSO ₂	2,37
OXI	3,14
ABZ	9,43



Obr. 12: Chromatogram směsi ABZSO + ABZSO₂ + ABZ spolu s vnitřním standardem OXI (průtok mobilní fáze: 0,7 ml/min, kyselina octová (0,01 mol/l) + MeOH + ACN = 65/10/25)

Z chromatogramu na obr. 12 vyplývá, že separace se po zvýšení množství methanolu v mobilní fázi zlepšila, bohužel však na úkor hodnot retenčních časů, zejména v případě ABZ.

Proto byl proveden pokus o jistý kompromis a obsah methanolu v mobilní fázi se nepatrně snížil.

Poměr složek mobilní fáze (kyselina octová o koncentraci 0,01 mol/l, methanol a acetonitril) se upravil na 67/8/25. Průtok byl ponechán na 0,7 ml/min.

Výsledky shrnuje následující tabulka.

Tab. 12: Výsledné retenční časy benzimidazolů (průtok mobilní fáze: 0,7 ml/min, poměr kyselina octová (0,01 mol/l) + MeOH + ACN = 67/8/25):

Látka	Retenční čas (min)
ABZSO	1,59
ABZSO ₂	2,51
OXI	3,27
ABZ	10,24

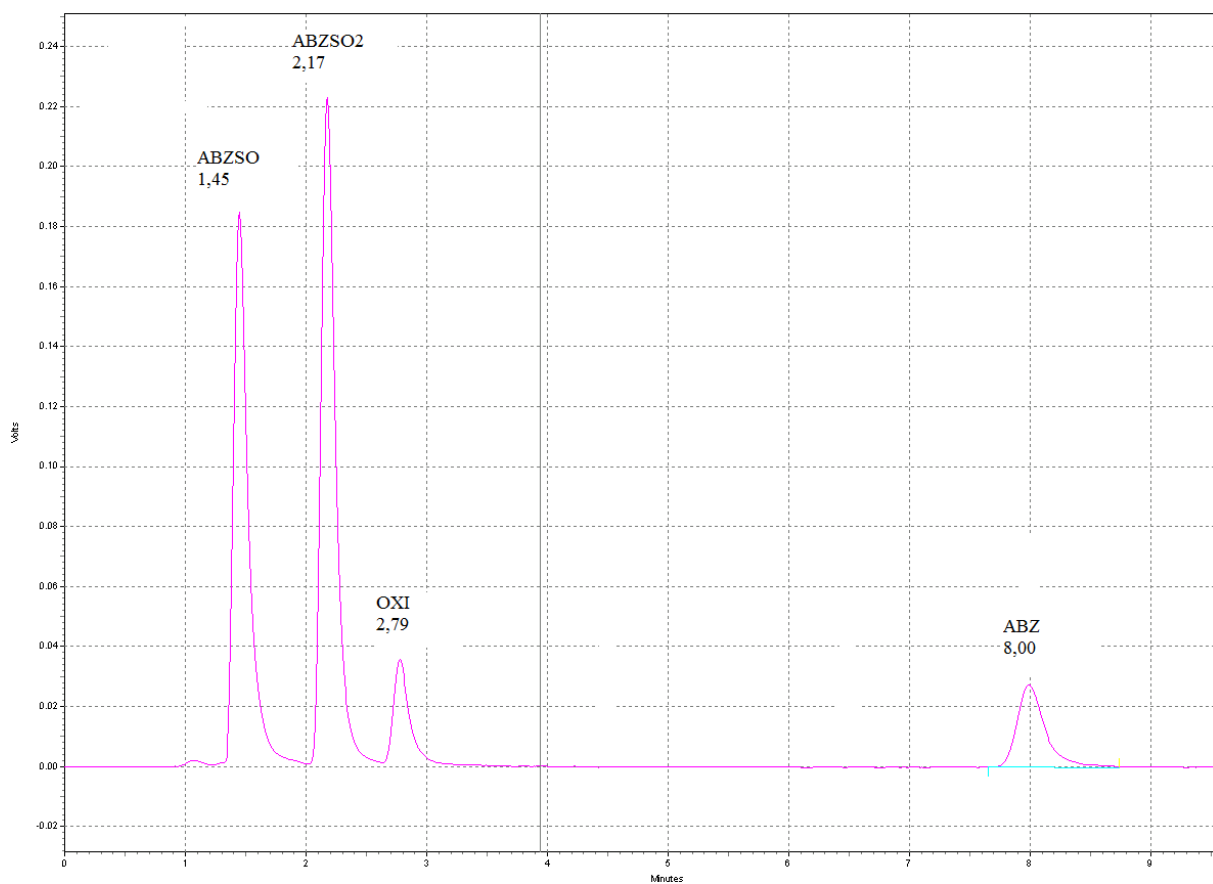
Tato úprava ale zlepšila separaci jen mírně a navíc se retenční čas, zejména u ABZ, ještě více prodloužil.

Z tohoto důvodu byl proveden ještě jeden pokus, při kterém se poměr mobilní fáze (kyselina octová o koncentraci 0,01 mol/l, metanol a acetonitril) upravil na 65/8/27. Průtok zůstal na 0,7 ml/min.

Výsledky lze vyčíst z tabulky 13. Chromatogram znázorňuje obrázek 13.

Tab. 13: Výsledné retenční časy benzimidazolů (průtok mobilní fáze: 0,7 ml/min, poměr kyselina octová (0,01 mol/l) + MeOH + ACN = 65/8/27):

Látka	Retenční čas (min)
ABZSO	1,45
ABZSO ₂	2,17
OXI	2,79
ABZ	8,00



Obr. 13: Chromatogram směsi ABZSO + ABZSO₂ + ABZ spolu s vnitřním standardem OXI (průtok mobilní fáze: 0,7 ml/min, kyselina octová (0,01 mol/l) + MeOH + ACN = 65/8/27)
Hodnoty těchto retenčních časů již vypadají celkem uspokojivě.

4.5 Pokusy s mobilní fází, která obsahovala kys. octovou o koncentraci 0,05 mol/l

Další pokusy byly prováděny s vyšší koncentrací kyseliny octové, a sice 0,05 mol/l. Průtok mobilní fáze a poměr jejích složek (kyselina octová, methanol a acetonitril) se ponechal na předchozích hodnotách - 0,7 ml/min, 65/8/27.

Výsledky jsou shrnuty v následující tabulce.

Tab. 14: Výsledné retenční časy benzimidazolů (průtok mobilní fáze: 0,7 ml/min, poměr kyselina octová (0,05 mol/l) + MeOH + ACN = 65/8/27):

Látka	Retenční čas (min)
ABZSO	1,40
ABZSO ₂	splývá s OXI ve 2. minutě
OXI	
ABZ	6,00

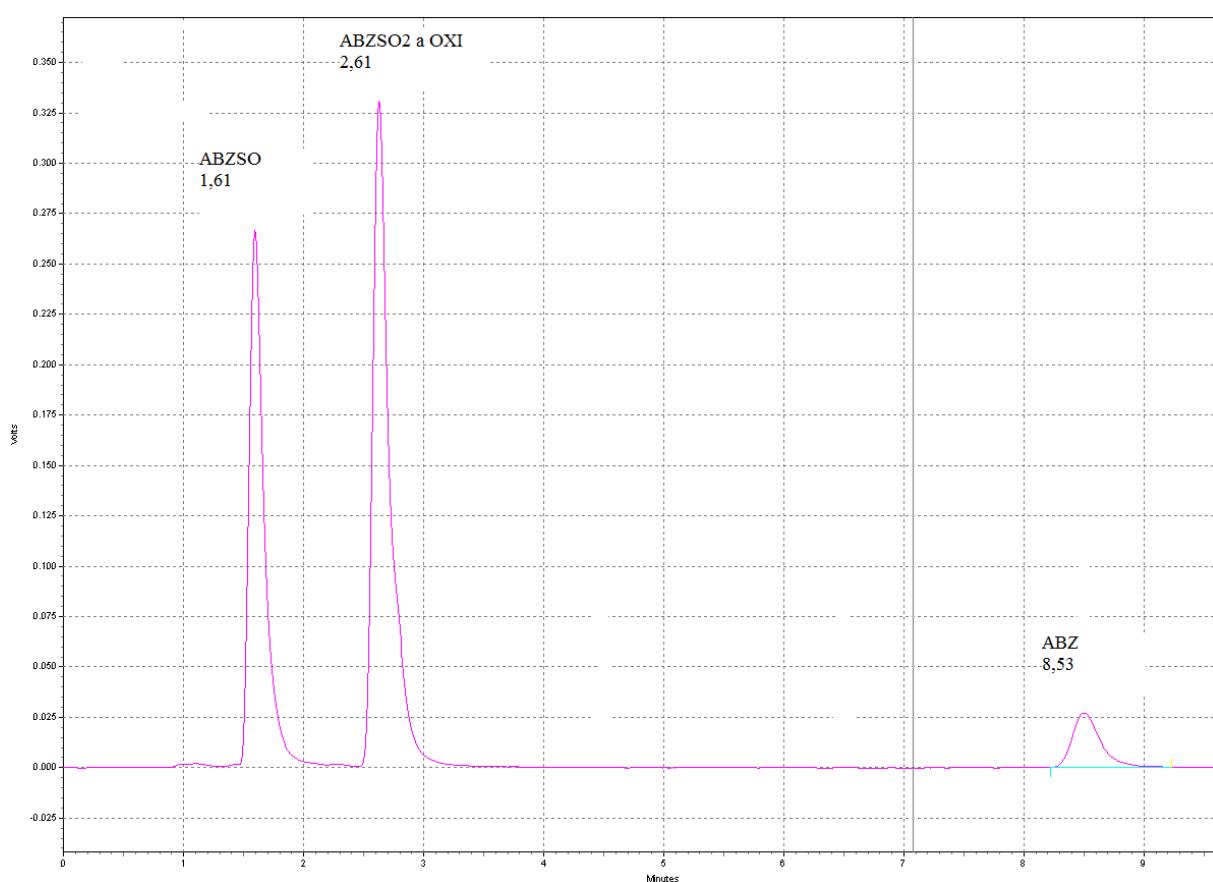
Jelikož píky ABZSO₂ a OXI spolu splývaly, bylo upraveno složení mobilní fáze tak, aby kyselina octová o koncentraci 0,05 mol/l, methanol a acetonitril byly v poměru 60/8/32. Průtok zůstal nezměněn (0,7 ml/min).

Při tomto složení mobilní fáze však byla separace velmi špatná a píky ABZSO₂ a OXI se opět neoddělily.

Proto byl proveden ještě poslední pokus s úpravou složení mobilní fáze. Kyselina octová o koncentraci 0,05 mol/l, methanol a acetonitril byly smíchány v poměru 68/8/24. Průtok se neměnil (0,7 ml/min). Hodnoty jsou uvedeny v tabulce 15.

Tab. 15: Výsledné retenční časy benzimidazolů (průtok mobilní fáze: 0,7 ml/min, poměr kyselina octová (0,05 mol/l) + MeOH + ACN = 68/8/24):

Látka	Retenční čas (min)
ABZSO	1,61
ABZSO ₂	splývá s OXI v čase 2,61
OXI	
ABZ	8,53



Obr. 14: Chromatogram směsi ABZSO + ABZSO₂ + ABZ spolu s vnitřním standardem OXI (průtok mobilní fáze: 0,7 ml/min, kyselina octová (0,05 mol/l) + MeOH + ACN = 68/8/24)
Ze zjištěných údajů je zřejmé, že tato varianta (s kyselinou octovou o koncentraci 0,05 mol/l) nevedla k dobrým výsledkům.

U tří nejnadějnějších složení mobilní fáze bylo podle vzorce (1) vypočítáno chromatografické rozlišení a podle vzorce (2) počet teoretických pater kolony.

Výsledné hodnoty udává následující tabulka.

Tab. 16: Hodnoty chromatografického rozlišení ($R_{1,2}$) a počet teoretických pater kolony (n):

	65/7/28			65/10/25			65/8/27		
Látka	b_{0,5} (min)	R_{1,2}	n	b_{0,5} (min)	R_{1,2}	n	b_{0,5} (min)	R_{1,2}	n
ABZSO	0,13		670	0,135		740	0,17		403
ABZSO2	0,12	3,26	1729	0,12	3,75	2161	0,15	2,67	1159
OXI	0,16	2,70	1648	0,15	3,36	2428	0,16	2,36	1685
ABZ	0,13	19,57	18785	0,14	25,59	25135	0,16	19,21	13850

5. DISKUZE

Albendazol a jeho metabolity (albendazolsulfoxid a albendazolsulfon) byly v této diplomové práci stanovovány pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie, při které byla jako stacionární fáze použita kolona Ascentis Express C18 plněná core-shell částicemi. Jako mobilní fáze byl nejprve zvolen fosfátový pufr ve směsi s acetonitrilem. V průběhu jednotlivých měření se různě měnil průtok a poměr jednotlivých složek mobilní fáze s cílem dosáhnout vhodného chromatografického rozlišení.

V prvním pokusu byl smíchán fosfátový pufr o $\text{pH} = 3,0$ s acetonitrilem v poměru 65/35. Z výsledných hodnot retenčních časů ABZ, ABZSO a ABZSO₂ (tab. 2) vyplývá, že rozlišení píků ABZSO a ABZSO₂ není příliš dobré. Proto následoval pokus s fosfátovým pufrem o $\text{pH} = 2,8$. Ale ani tato možnost nevedla k lepším výsledkům. Přesto byly za podmínek posledního pokusu (tab. 3) s touto mobilní fází proměřeny i jednotlivé benzimidazoly s cílem vybrat vhodný vnitřní standard. Retenční časy těchto benzimidazolů (tab. 4) se však velmi podobaly retenčním časům ABZSO a ABZSO₂, tudíž ani jedna látka nebyla za těchto podmínek vhodná. Z tohoto důvodu byla dále jako mobilní fáze vyzkoušena směs fosfátového pufru o $\text{pH} = 2,6$, rovněž s acetonitrilem. Výsledky (tab. 5) však opět nenaplnily očekávání, což lze posoudit i z chromatogramu na obr. 9.

Zvyšování kyselosti fosfátového pufru mělo vést k výraznějšímu omezení silanolových interakcí, a tím ke zlepšení tvaru píků a jejich rozlišení. Vedlejším efektem snižování pH pufru bylo zvýšení jeho pufrací kapacity, což však patrně nemělo na separaci vliv. Při snižování pH nebylo možné překročit hodnotu $\text{pH} = 2$, což je mezní hodnota kyselosti mobilní fáze, kterou připouští výrobce kolony. Při hodnotách $\text{pH} < 2$ by mohlo docházet k eliminaci funkčních skupin, kterými je kolona endcapovaná.

Jako mobilní fáze byla po té zkoušena kyselina octová o koncentraci 0,01 mol/l ve směsi s acetonitrilem. Roztok kyseliny octové o koncentraci 0,01 mol/l má $\text{pH} = 3,4$. Tato hodnota byla získána výpočtem a ověřena pomocí pH -metru. Průtok byl nastaven na 0,5 ml/min. Po získání prvního chromatogramu a přeměření dalších benzimidazolů bylo jasné, že tato mobilní fáze je výhodnější než fosfátový pufr, a proto byla dále používána. Vzhledem k výhodnému retenčnímu času (tab. 6) byl zvolen jako vnitřní standard OXI.

ABZ měl však dlouhý retenční čas, proto byl do směsi mobilní fáze přidán na úkor množství acetonitrilu methanol. Přídavek methanolu měl zlepšit separaci za cenu jistého prodloužení retenčních časů. Při zachování stejných podmínek měření (zejména průtoku) se retenční čas ABZ skutečně prodloužil, bylo tedy nutné parametry analýzy mírně pozměnit. Průtok se proto zvýšil na 0,7 ml/min a v závěru opravdu došlo ke zkrácení retenčního času ABZ, ale i přesto byl mezi tímto časem a časem ostatních benzimidazolů poměrně velký rozdíl. Teoreticky bylo

možné průtok ještě o něco zvýšit, ale mohlo by dojít k horší separaci píků ostatních benzimidazolů. Místo toho bylo proto zvýšeno množství kyseliny octové v mobilní fázi.

Tato varianta výrazně zkrátila retenční čas ABZ, ale bohužel také vedla k chvostujícím píkům (obr. 10), což je zřejmě způsobeno silanolovými interakcemi při relativně vysoké hodnotě pH. Po drobných úpravách mobilní fáze byl konečně získán celkem uspokojivý chromatogram. Tento výhodný poměr složek mobilní fáze měl pro kyselinu octovou, methanol a acetonitril hodnoty 65/7/28. Výsledné retenční časy shrnuje tab. 10. Na obr. 11 je znázorněn výsledný chromatogram.

V dalších stanoveních byla zkoušena mobilní fáze s vyšším obsahem methanolu, poměr byl upraven na 65/10/25. To vedlo k ještě lepší separaci píků, nicméně se mírně prodloužil retenční čas ABZ (tab. 11 a obr. 12). Po dalších úpravách (na výsledný poměr 65/8/27) se dospělo k podobně příznivým výsledkům (tab. 13 a obr. 13).

Další pokusy pak byly prováděny s kyselinou octovou o koncentraci 0,05 mol/l. Poměr složek mobilní fáze i průtok byl ponechán (0,7 ml/min, 65/8/27). Tato varianta zkrátila retenční časy všech analyzovaných benzimidazolů, ale vedla také k horší separaci. Píky ABZSO₂ a OXI spolu dokonce splývaly. Ani další úprava složení mobilní fáze tento nedostatek neodstranila, jak vyplývá z obr. 14.

U tří nejvíce slibných chromatogramů bylo vypočítáno podle vzorce (1) chromatografické rozlišení a podle vzorce (2) počet teoretických pater kolony. Z údajů uvedených v tab. 16 vyplývá, že pro zvolenou kolonu je nejvhodnější mobilní fáze o složení: kyselina octová + methanol + acetonitril v poměru 65/10/25. Při tomto složení bylo dosaženo nejvyššího počtu teoretických pater kolony, ale také relativně dlouhých retenčních časů. Nicméně všechny hodnoty rozlišení uváděné v tab. 16 jsou velmi dobré.

Je ovšem třeba říci, že i vybraná nejlepší složení mobilní fáze neposkytují ideální separační systém, neboť i nadále přetrvává velký rozdíl mezi retenčními časy ABZSO, ABZSO₂ a OXI na jedné straně a retenčním časem ABZ na straně druhé. To je důsledek velmi odlišné polarity (lipofility) ABZ od polarity (lipofility) ostatních látek. Právě polarita separovaných látek hraje při použití HPLC kolon s náplní C18 klíčovou roli, neboť separace probíhá na základě hydrofobních interakcí analytů s kolonou.

6. ZÁVĚR

Cílem této diplomové práce bylo pokusit se najít vhodné separační podmínky pro HPLC analýzu albendazolu a jeho dvou metabolitů na koloně Ascentis Express C18 včetně vyhledání vhodného vnitřního standardu. Z provedené literární rešerše vyplývá, že nejde o úkol snadný. Bylo testováno několik složení mobilní fáze a z pokusů vyplynulo, že uspokojivého výsledku lze dosáhnout, pokud mobilní fáze obsahuje kyselou vodnou složku, 0,01 mol/l kyseliny octovou, a dva organické modifikátory, acetonitril a methanol. To je jistá odchylka od empirického pravidla: „Čím jednodušeji, tím lépe.“, avšak pro studovanou směs patrně jednodušší mobilní fáze pro isokratickou eluci na náplni C18 není k dispozici. Bylo by ještě možné uvažovat o zvýšení pH mobilní fáze použitím vhodného pufru, což má ovšem dvě úskalí. Prvním z nich je to, že analyty obsahující bazické skupiny, k nimž je benzimidazoly nutné počítat, za takovýchto podmínek významně chvostují díky silanolovým interakcím. Druhým úskalím je snížená životnost kolon při používání vyšších hodnot pH [28, 29]. Za vyloženě kladný výsledek této práce je možné považovat ověření použití oxibendazolu v roli vnitřního standardu.

Jak již bylo v předchozím textu naznačeno, nelze nalezené podmínky HPLC separace považovat za ideální. Pro další vylepšení HPLC analýzy albendazolu a jeho metabolitů lze doporučit dva možné směry. Prvním je upuštění od isokratické eluce a vývoj vhodné gradientové metody. Při tomto řešení by bylo snad možné zjednodušit mobilní fázi na dvousložkovou. Gradientová eluce se v případě látek s rozdílnou polaritou nabízí. Druhým možným směrem je použití chromatografické kolony se stacionární fází, jejíž separační mechanismus bude vycházet z jiných principů než je hydrofobní interakce. Zde je možné uvažovat například o koloně s náplní PFP (pentafluorophenyl), která nabízí kromě zmíněné hydrofobní interakce ještě separaci na základě tzv. shape selectivity, tedy rozlišení analytů podle tvaru molekuly, π - π interakcí a iontově-výměnného mechanismu [30].

7. SEZNAM LITERATURY

- [1] Lincová D., Farghali H. et al.: Základní a aplikovaná farmakologie, Galén, Praha 2007, 536-538.
- [2] Lamka J., Ducháček L.: Veterinární léčiva pro posluchače farmacie, Karolinum, Praha 2008, 61-65.
- [3] Danaher M., De Ruyck H., Crooks S.R.H., Dowling G., O'Keeffe M.: J. Chromatogr. B, 845 (2007) 1-37.
- [4] Besier R. B., Love S. C. J.: Aust. J. Exp. Agric. 2003, 43, 1383-1391.
- [5] Theodorides V.J., DiCuillo C.J., Nawalinski T., Miller C.R., Murphy J.R., Freeman J.F., Killeen J.C., Knapp W.R., Am. J. Vet. Res. 38 (1977) 809.
- [6] Gottschall D.W., Wang R., Vet. Parasitol. 64 (1996) 83.
- [7] Klimeš a kol., Kontrola léčiv I., Karolinum, Praha 2008, 33-35.
- [8] Karlíček a kol., Analytická chemie pro farmaceuty, Karolinum, Praha 2007, 276.
- [9] Zýka a kol.: Analytická příručka, 3. Vydání, SNTL Praha, Alfa Bratislava 1979, 166-174.
- [10] http://www.hplc.cz/Teorie/FL_detector.html /fluoresc. detektor/
- [11] Klimeš a kol., Kontrola léčiv II., Karolinum, Praha 2007, 73-74.
- [12] Fekete S., Fekete J., Ganzler K.: J. Pharm. Biomed. Anal. 50 (2009) 703-709.
- [13] Cunliffe J. M., Maloney T. D.: J. Sep. Sci 2007, 30, 3104-3109.
- [14] Horvath C., Preiss B.A., Lipsky S.R., Anal. Chem. 39 (1967) 1422-1428.
- [15] Horvath C., Lipsky S.R., J. Chromatogr. Sci. 7 (1969) 109-116.
- [16] Kirkland J.J., Anal. Chem. 41 (1969) 218-220.
- [17] Kirkland J.J., Truszkowski F.A., Dilks Jr. C.H., Engel G.S., J. Chromatogr. A 890 (2000) 3-13.
- [18] Kitzmann D., Cheng K., Fleckenstein L.: J. Pharm. Biomed. Anal. 30 (2002), 801-813.
- [19] Zongde Z., Xingping L., Xiaomei W., Hong Z., Yanping S., Liren Ch., Yongmin L.: J. Biochem. Biophys. Methods 62 (2005), 69-79.
- [20] Mirfazaelian A., Dadashzadeh S., Rouini M. R.: J. Pharm. Biomed. Anal. 30 (2002), 1249-1254.
- [21] Wu Z., Medlicott N.J., Razzak M., Tucker I.G.: J. Pharm. Biomed. Anal. 39 (2005), 225-232.
- [22] Sarin R., Dash A.P., Dua V.K.: J. Chromatogr. B 799 (2004), 233-238.
- [23] Batzias G. C., Delis G.A.: J. Chromatogr. B 805 (2004), 267-274.
- [24] Xia X., Dong Y., Luo P., Wang X., Li X., Ding S., Shen J.: J. Chromatogr. B 878 (2010), 3174-3180.

- [25] French G., Aguilera Luis M. M., Vidal J.L.M., Romero-Gonzalez R.: *Anal. Chim. Acta* 661 (2010), 150-160.
- [26] Kinsella B., Whelan M., Cantwell H., McCormack M., Furey A., Lehotay S. J., Danaher M.: *Talanta* 83 (2010), 14-24.
- [27] Whelan M., Kinsella B., Furey A., Moloney M., Cantwell H., Lehotay S. J., Danaher M.: *J. Chromatogr. A* 1217 (2010), 4612-4622.
- [28] Kirkland J.J., Van Straten M.A., Claessens H.A.: *J. Chromatogr. A* 691 (1995), 3-19.
- [29] Claessens H.A., Van Straten M.A., Kirkland J.J.: *J. Chromatogr. A* 728 (1996), 259-270.
- [30] Snyder L.R., Dolan J. W., Carr P.W.: *J. Chromatogr. A* 1060 (2004), 77-116.