

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

KATEDRA ANALYTICKÉ CHEMIE

**SLEDOVÁNÍ RETENČNÍCH „U“ PROFILŮ
VYBRANÝCH LÁTEK NA PENTAFLUOROFENYLOVÉ
STACIONÁRNÍ FÁZI**

RIGORÓZNÍ PRÁCE

Vedoucí rigorózní práce Doc. RNDr. Dalibor Šatínský PhD.

Hradec Králové 2012

Mgr. Michaela Havlátová

Děkuji Doc. RNDr. Daliborovi Šatínskému PhD. za jeho odborné vedení, cenné rady a pomoc při vypracování této rigorózní práce.

Prohlašuji, že tato rigorózní práce je mým autorským dílem, které jsem vypracovala samostatně. Literatura a zdroje, z nichž jsem při zpracování práce čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury. Tato práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

Abstrakt

Univerzita Karlova v Praze

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra analytické chemie

Kandidát: Mgr. Michaela Havlátová

Konzultant: Doc. RNDr. Dalibor Šatínský PhD.

Název rigorózní práce: Sledování retenčních „U“ profilů vybraných látek na pentafluorofenylové stacionární fázi

Byly sledovány retenční „U“ profily na pentafluorofenylové stacionární fázi u vybraných látek. Jako testované látky byly vybrány látky ze skupiny tetracyklinových antibiotik (oxytetracyklin, minocyklin), neuroleptik (thioridazin, perphenazin), lokálních anestetik (lidokain, prilokain), derivátů methylxantinu (kofein, theofylin), β -sympatolytik (acebutolol, bopindolol) a anilin. Při analýze byly sledovány retenční profily testovaných látek v závislosti na charakteru mobilní fáze s obsahem methanolu.

U všech látek z vybraných skupin byly provedeny tři série analýz, kdy pro sérii analýz č. 1 byla použita mobilní fáze methanol – voda, pro sérii analýz č. 2 mobilní fáze methanol – kyselina fosforečná 0,085% a pro sérii analýz č. 3 mobilní fáze methanol – acetátový pufr pH 7. Při každé jednotlivé analýze bylo současně měněno procentuální zastoupení methanolu v mobilní fázi.

Z testovaných látek vybraných skupin vykazovaly retenční profil ve tvaru „U“ tetracyklinová antibiotika oxytetracyklin, minocyklin v sérii analýz č. 2 a minocyklin i v sérii analýz č. 3, neuroleptika thioridazin, perphenazin v sérii analýz č. 2 a perphenazin i v sérii analýz č. 3, lokální anestetika lidokain, prilokain v sérii analýz č. 2, β – sympatolytika acebutolol, bopindolol v sérii analýz č. 2 a č. 3.

Abstract

Charles University in Prague

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Analytical Chemistry Department

Candidate: Mgr. Michaela Havlátová

Consultant: Doc. RNDr. Dalibor Šatínský, PhD.

Rigorous Thesis Title: Retention „U“ profiles testing of selected substances on pentafluorophenyl stationary phase

Retention „U“ profiles were examined on pentafluorophenyl stationary phase at selected substances. For testing there were chosen substances from the group of tetracycline antibiotics (oxytetracycline, minocycline), neuroleptics (thioridazine, perphenazine), local anesthetics (lidocaine, prilocaine), methylxanthine derivates (caffeine, theophylline), β -sympatholytics (acebutolol, bopindolol) and aniline. During the analysis the retention profiles of the tested substances were observed as influenced by the character of methanol mobile phase.

Three analysis series were carried out at all of the tested substances. In analysis series number 1 the mobile phase methanol – water was used. For analysis series number 2 it was the mobile phase methanol – phosphoric acid 0,085% and for analysis series number 3 it was the mobile phase methanol – acetate buffer solution pH 7. In each analysis the methanol percentage in the mobile phase was changed.

In the group of the tested substances the U-shaped retention profile was shown by the tetracycline antibiotics oxytetracycline, minocycline in analysis series 2 and minocycline in analysis series 3 as well, neuroleptics thioridazine, perphenazine in analysis series 2 and perphenazine in analysis series 3 as well, local anesthetics lidocaine, prilocaine in analysis series 2, β -sympatholytics acebutolol, bopindolol in analysis series 2 and 3.

Obsah

OBSAH.....	6
SEZNAM ZKRATEK.....	8
1 ÚVOD.....	9
2 CÍL A ZADÁNÍ RIGORÓZNÍ PRÁCE	10
3 TEORETICKÁ ČÁST	11
3.1 CHROMATOGRRAFIE	11
3.1.1 Základní principy chromatografických metod.....	11
3.1.2 Vysokoučinná kapalinová chromatografie (High Performance Liquid Chromatography) – HPLC	11
3.1.3 Typy HPLC.....	12
3.1.4 Schéma kapalinového chromatografu	13
3.1.5 Charakteristiky HPLC	15
3.1.6 Stacionární fáze.....	16
3.1.7 Pentafluorofenylová stacionární fáze HS F5	20
3.1.8 Problematika analýzy polárních bazických látek.....	24
3.2 TESTOVANÉ SKUPINY LÁTEK	27
3.2.1 β -SYMPATOLYTIKA.....	27
3.2.2 NEUROLEPTIKA	31
3.2.3 LOKÁLNÍ ANESTETIKA	35
3.2.4 TETRACYKLINOVÁ ANTIBIOTIKA	39
3.2.5 DERIVÁTY METHYLYXANTINU	43
3.2.6 ANILIN	47
3.2.7 Shrnutí fyzikálních a chemických vlastností testovaných látek	48
4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	49
4.1 MATERIÁLY A POMŮCKY	49
4.1.1 Standardy, vzorky a chemikálie.....	49
4.1.2 Přístroje, podmínky separace.....	49

4.2	PŘÍPRAVA ROZTOKŮ STANDARDŮ TESTOVANÝCH SKUPIN LÁTEK.....	50
4.3	PŘÍPRAVA MOBILNÍ FÁZE	51
4.3.1	Mobilní fáze pro sérii analýz č. 1: Methanol – voda	51
4.3.2	Mobilní fáze pro sérii analýz č. 2: Methanol – kyselina fosforečná H ₃ PO ₄ 0,085%	51
4.3.3	Mobilní fáze pro sérii analýz č. 3: Methanol – acetátový pufr pH 7	51
4.4	POPIS PRÁCE.....	52
4.5	VÝSLEDKY ANALÝZ A DISKUSE	53
4.5.1	Testovaná skupina látek č. 1: β-SYMPATOLYTIKA.....	53
4.5.2	Testovaná skupina látek č. 2: NEUROLEPTIKA	56
4.5.3	Testovaná skupina látek č. 3: LOKÁLNÍ ANESTETIKA.....	59
4.5.4	Testovaná skupina látek č. 4: TETRACYKLINOVÁ ANTIBIOTIKA.....	62
4.5.5	Testovaná skupina látek č. 5: DERIVÁTY METHYLYXANTINU.....	65
4.5.6	Testovaná skupina látek č. 6: ANILIN.....	70
4.5.7	Přehled látek vykazujících tzv. retenci ve tvaru U	73
5	SHRNUTÍ A DISKUSE.....	74
6	ZÁVĚR.....	78
7	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....	79

Seznam zkratek

ACN	acetonitril
ATC	anatomicko-terapeuticko-chemická klasifikace léčiv
C18	oktadecylová fáze
cAMP	cyklický adenosinmonofosfát
CNS	centrální nervová soustava
DAD	Diode Array detektor
HILIC	chromatografie hydrofilních interakcí
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
HS F5	pentafluorofenylová fáze
CHOPN	Chronická obstrukční plicní nemoc
ICHS	Ischemická choroba srdeční
ISA	Intrinsic sympatomimetic activity
MeOH	methanol
MF	mobilní fáze
MRSA	meticilin rezistentní stafylokokus aureus
MS	hmotnostní spektrometrie
RNA	ribonukleová kyselina
RP – HPLC	chromatografie na reverzních fázích
UV	ultrafialová oblast
UV/VIS	ultrafialová/viditelná oblast

1 Úvod

HPLC je v současné době jedna z nejprogresivnějších analytických metodik, která nachází stále větší uplatnění ve všech oblastech analýzy léčiv. Cílem vývoje této analytické metody je dosažení separace s co nejvyšší účinností, v co nejkratším čase a s co nejvyšší citlivostí. Rozvoj HPLC tak zaznamenává jak oblast instrumentální, tak i oblast vývoje dostupných druhů stacionárních fází. Právě vývoj nových stacionárních fází je jedním z velice důležitých trendů, který pomáhá rozšířit možnosti při analýze léčiv za použití HPLC. Dostupnost stacionárních fází založených na polymerních sorbentech, na částicích s pevným jádrem, sorbentech jiného než silikagelového charakteru či chemicky modifikovaných alternativních stacionárních fázích o jiné polaritě než konvenční C-8 a C-18 fáze používané v RP-HPLC pak umožňuje dosažení účinnějších separací komplikovaných směsí látek velice podobných struktur, či látek polárního charakteru. Polární a bazické látky patří z hlediska analýzy k velmi problematickým analytům v kapalinové chromatografii. Dosažení retence polárních analytů a tak i jejich stanovení umožňuje také pentafluorofenylová stacionární fáze, která je zatím poměrně málo používanou alternativní stacionární fází. Její testování pro analýzu polárních a bazických analytů bylo náplní této rigorózní práce, přičemž u některých vybraných látek byly sledovány retenční profily ve tvaru „U“.

2 Cíl a zadání rigorózní práce

Cílem a zadáním této rigorózní práce je sledování retenčních „U“ profilů vybraných látek na pentafluorofenylové stacionární fázi. Jako testované látky byly vybrány látky ze skupiny tetracyklinových antibiotik (oxytetracyklin, minocyklin), neuroleptik (thioridazin, perphenazin), lokálních anestetik (lidokain, prilokain), derivátů methylxantinu (kofein, theofylin), β -sympatolytik (acebutolol, bopindolol) a anilin. Při analýze byla sledována retence testovaných skupin látek v závislosti na charakteru mobilní fáze s měnící se koncentrací methanolu a hodnotou pH. Cílem bylo zjistit, které látky z vybraných skupin vykazují retenci ve tvaru „U“. Získané poznatky je možné uplatnit pro analytické stanovení bazických a polárních látek na HS F5 stacionární fázi, kdy je možné vyšším přídatkem methanolu do mobilní fáze dosáhnout značného zvýšení retence tohoto problematického typu látek a tak je úspěšně separovat a analyzovat.

3 Teoretická část

3.1 Chromatografie

3.1.1 Základní principy chromatografických metod

Chromatografické metody jsou vysoce účinné separační metody, které jsou určeny k oddělení analyzovaných složek směsi a zároveň k jejich kvalitativní i kvantitativní analýze.

Při chromatografických metodách dochází k postupnému, mnohokrát opakovanému vytváření rovnovážných stavů dělených látek mezi dvěma vzájemně nemísitelnými fázemi. Jedna nepohyblivá, stacionární fáze, má schopnost zadržovat součásti analyzované směsi, druhá pohyblivá, mobilní fáze, vymývá (eluuje) tyto součásti z nepohyblivé fáze a odnáší je ve směru toku různou rychlostí, čímž dojde k oddělení složek směsi. Rychlost postupu látky závisí na sorpční rovnováze, tzn. čím pevněji se látka sorbuje na stacionární fázi, tím pomaleji v chromatografickém systému postupuje.

Chromatografické metody můžeme rozdělit z hlediska:

- » podstaty separačního děje (chromatografie adsorpční, rozdělovací, iontovýměnná, na molekulových sítích)
- » uspořádání stacionární fáze (chromatografie kolonová, plošná (papírová, tenkovrstvá))
- » způsobu vyvíjení (chromatografie eluční, vytěšňovací, frontální analýza)
- » podle charakteru mobilní fáze (chromatografie plynová, kapalinová)

[1], [2], [3].

3.1.2 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (High Performance Liquid Chromatography) – HPLC

HPLC je v současné době jedna z nejprogressivnějších analytických metodik, která nachází stále větší uplatnění ve všech oblastech analýzy léčiv. HPLC je široce využívána ve všech moderních lékopisných monografiích [2].

Hlavní přednosti HPLC:

- a) Možnost kvalitativního i kvantitativního hodnocení separovaných složek směsi.
- b) Rychlost analýzy, citlivost stanovení (v závislosti na použitém detektoru).
- c) Spotřeba minimálního množství vzorku.
- d) Možnost automatizace [2].
- e) Použití pro separaci tepelně nestálých i netěkavých sloučenin (je možno pracovat za laboratorní teploty bez nutnosti převádět vzorek na plyn na rozdíl od plynové chromatografie) [3].

Separační účinnost kapalinové kolonové chromatografie závisí na velikosti částic stacionární fáze. Čím menší a stejnoměrnější jsou částice stacionární fáze, tím větší je účinná plocha a separační účinnost. Pro dostatečně rychlý průtok mobilní fáze je však nutné protlačit ji kolonou pomocí čerpadla pod vysokým tlakem. K dělení látek lze využít všech vratných dvoufázových separačních mechanismů (adsorpce, rozdělování, iontová výměna, síťový efekt gelu), a proto je možné nalézt selektivní a účinný chromatografický systém k dělení směsi prakticky všech organických látek rozpustných ve vodě, zředěných kyselinách nebo organických rozpouštědlech [1].

Využití HPLC v praxi je velmi široké, zejména pro hodnocení steroidů, cukrů, vitaminů, pesticidů, barviv. HPLC se využívá také v analýze léčivých přípravků – při identifikaci léčiv, stanovení obsahu a čistoty látek, při řešení problematiky stability léčiv, při analýze přírodních léčiv v rostlinných materiálech a při monitorování léčiv a jejich metabolitů v tělních tekutinách [1], [2].

3.1.3 Typy HPLC

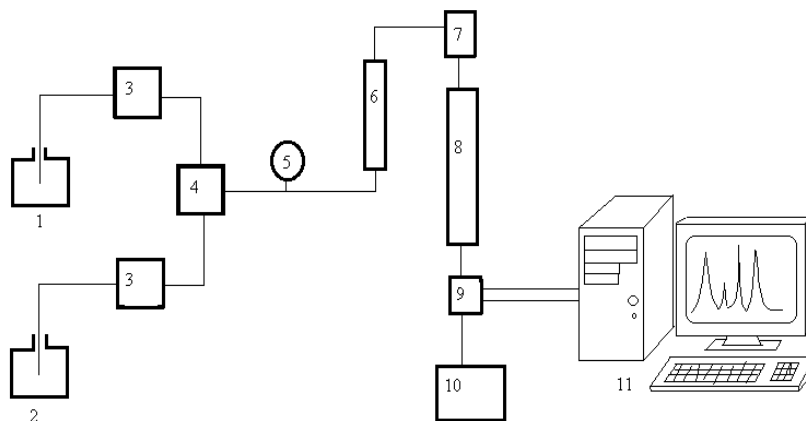
Dle procesu separace rozlišujeme následující typy HPLC:

- a) s normální fází – k analýze používá polární stacionární fázi a nepolární mobilní fáze
- b) s reverzní fází – vzhledem k polaritě fází je obrácená k HPLC s normální fází
- c) iontovýměnná – stacionární fází je zde měnič iontů. Dochází tak k výměně iontů mezi fází stacionární a mobilní. Přitom se uplatňují elektrostatické přitažlivé síly mezi ionty opačného náboje (Coulombovy síly)

- d) gelová permeační – kde jsou molekuly separovány dle své velikosti, přičemž nedochází k interakci molekul analytu se stacionární fází
- e) afinitní – využívá výjimečné biologické schopnosti některých látek specificky a reversibilně vázat jiné látky [3], [4], [5], [6]

3.1.4 Schéma kapalinového chromatografu

Obrázek 1 – blokové schéma kapalinového chromatografu – 1, 2 – mobilní fáze – eluční činidla;
 3 – vysokotlaká čerpadla; 4 – směšovač; 5 – manometr; 6 – dávkovač;
 7 – předkolona; 8 – kolona; 9 – detektor; 10 – sběrač frakcí; 11 – počítač [1]

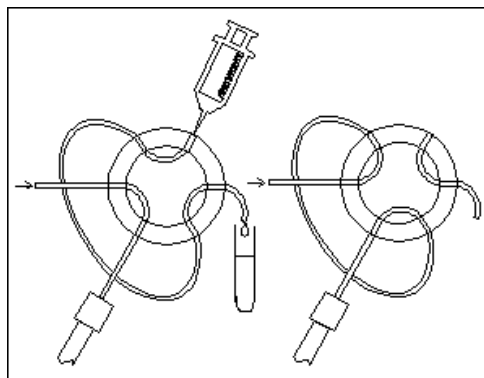


Mobilní fáze je při chromatografii čerpána z 1 – 3 zásobníků vysokotlakým čerpadlem konstantním bezpulzním tokem o malé rychlosti (0,1-10 ml/min.) za tlaku až 40 MPa. Materiál čerpadla (nerezová ocel, keramika, plast) nesmí být narušován mobilní fází a nesmí do ní uvolňovat žádné látky. Ventily řídící tok eluentu jsou často zhotoveny z pryže nebo safíru.

Čerpadlo je spojeno s naprogramovaným směšovacím zařízením. To umožňuje nastavení složení mobilní fáze. Při dělení směsi látek, jejichž eluční parametry se příliš neliší, se používá izokratická eluce jedinou mobilní fází, jejíž složení se během chromatografie nemění. Jestliže se však jednotlivé složky některých směsí látek význačně liší svými elučními parametry a nelze tak u nich dosáhnout optimálního dělení, s výhodou se využívá gradientové eluce, při které se k jedné mobilní fázi plynule přimíchává rostoucí množství druhé mobilní fáze s větším elučním účinkem. Vytváří se tak plynulý koncentrační gradient mobilní fáze. Obdobným způsobem lze pro eluci využít i gradient pH.

Vzorek se dávkuje buď injekční mikrostříkačkou, nebo dávkovacím kohoutem. V případě injekční mikrostříkačky lze pomocí ručního i automatického ovládání dávkovat různé objemy. Existují ale nevýhody z hlediska těsnosti, udržení tlaku a vnášení stop materiálu, a proto musí být zařízení zhotovena z inertních materiálů – nerezová ocel, titan, některé polymery. Byly vyvinuty techniky označované jako dávkování při zastavení toku (*stop-flow injection*), které odstraňují některé nedostatky. Dávkovacím kohoutem lze dávkovat pevně daný objem roztoku (dávkovací smyčka s obsahem 10 nebo 20 μl), avšak mnohem přesněji. Menší vzorky řádu zlomků μl jsou aplikovány na kolonách malých vnitřních průměrů (*micro-bore columns*) pomocí speciálních mikroinjektorů. Dnes jsou však již výhradně používány moderní autosamplery pro několik desítek až stovek vzorků.

Obrázek 2 – dávkovací kohouty s dávkovací smyčkou [5]



K rozdělení směsi na jednotlivé složky, které jsou unášeny mobilní fází do detektoru, dojde na chromatografické koloně. Pro analytické účely jsou kolony zhotoveny zpravidla z nerezové oceli či skla a jsou naplněny vhodnými sorbenty. Jako ochrana hlavní kolony jsou hojně používány předkolony umístěné mezi dávkovací zařízením a analytickou kolonu. Způsobují jen malé rozšíření píků a chrání kolonu před nečistotami a nerozpustnými materiály.

Detektor indikuje průtok separované složky detekční celou, přenáší upravený signál do počítače, který ho zpracuje, umožní výstup na tiskárnu a zároveň řídí chod celého chromatografu. Používají se detektory spektrofotometrické (UV, UV/VIS, DAD), fluorimetrické, elektrochemické a refraktometrické. Pro detekci léčiv je v poslední době využíváno též spojení HPLC s hmotnostní spektrometrií (MS). Na detektory pro HPLC jsou kladeny požadavky vysoké citlivosti (detekce látek v roztoku v koncentracích ng/ml až $\mu\text{g/ml}$), reprodukovatelnosti a linearitě odezvy, nezávislosti

odezvy na změnu složení mobilní fáze při gradientové eluci a univerzálnosti (detekce všech oddělených složek vzorku).

Většina separací HPLC probíhá při laboratorní teplotě. Některé se významně zlepší zvýšením teploty při termostatování. Programová změna teploty se během HPLC analýzy nevyužívá.

Mobilní fáze, které jsou používány při HPLC, musí být velmi čisté a zbavené rozpuštěných plynů probubláváním heliem nebo působením ultrazvuku za vakua. K získání přiměřených elučních parametrů je nutný výběr vhodné mobilní fáze. Podle rostoucí eluční účinnosti jsou rozpouštědla seřazena do eluotropní řady: heptan < cyklohexan < tetrachlormethan < toluen < éter < chloroform < aceton < acetonitril < ethanol < methanol < octová kyselina < voda. Při RP – HPLC eluotropní řada platí v obráceném pořadí a polární methanol má zde vyšší eluční účinnost než voda. Pro zlepšení dělení kyselých a bazických látek se do organického rozpouštědla přidává malé množství kyseliny, zásady nebo pufru [1], [2], [3], [7].

3.1.5 Charakteristiky HPLC

Chromatogram představuje záznam odezvy detektoru, koncentrace eluované látky nebo jiné veličiny použité jako měřítko této koncentrace v závislosti na čase, objemu nebo vzdálenosti. Idealizovaný chromatogram představuje řada gaussovských piků rozdělených na základní linii [8].

Kvalitativní analýza

Základní kvalitativní charakteristikou pro každou separovanou látku v daném systému je eluční (retenční) čas t_R nebo eluční (retenční) objem V_R . Retenční čas je doba, která uplyne od nástřiku vzorku do dosažení maxima eluční křivky a retenční objem je proteklý objem kolonou za tuto dobu. Mezi retenčním časem a retenčním objemem existuje vztah [7]:

$$V_R = t_R \cdot v \quad , \text{ kde}$$

t_R – retenční čas;

v – průtoková rychlost mobilní fáze [8]

Kvantitativní analýza

Kvantitativní charakteristikou HPLC je plocha pod křivkou, resp. výška píku. Pro kvantitativní vyhodnocování na základě kalibrační závislosti nebo metody standardního přidavku je výhodnější použít plochu pod píkem, pouze u symetrických píků lze využít k vyhodnocení výšku píku [9].

3.1.6 Stacionární fáze

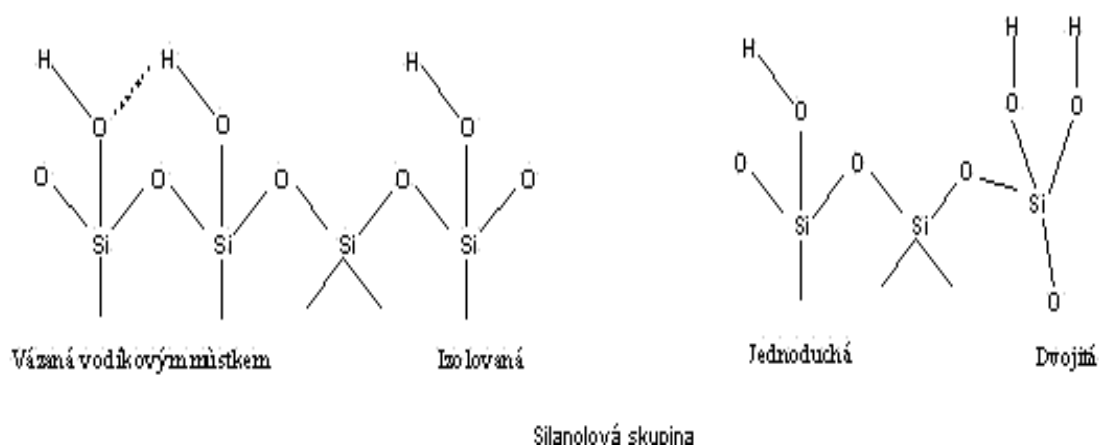
Kvalita stacionární fáze – velikost, tvar, porozita, stejnoměrnost a struktura má hlavní podíl na kvalitě separace. Stacionární fáze, která tvoří náplň kolony pro HPLC, musí být homogenní (čím pravidelnější tvar částice mají, tím je účinnost kolony vyšší). Zajímavý typ kolon představují tzv. monolitické kolony, které jsou tvořeny vysoce čištěným polymerním silikagelem, resp. jeho modifikacemi. Na rozdíl od konvenčních stacionárních fází, které se skládají z jednotlivých částic sorbentu o definované velikosti, monolitické HPLC kolony tvoří jediný kus pórovitého materiálu, který zcela zaplňuje vnitřek separační kolony [10], [11].

V závislosti na studované látce lze vybírat ze stacionárních fází klasických, reverzních a chirálních. Většina komerčních stacionárních fází je silikagelové povahy s možností různých modifikací základního silikagelu, ale v současnosti se objevují i alternativy na bázi aluminových, zirkoniových, titaniových, resp. organických polymerů [10].

Typy stacionárních fází dostupných pro HPLC separaci:

➤ Pro separaci látek na základě adsorpce se využívá nemodifikovaný silikagel, na jehož volně přístupné skupiny Si-OH na povrchu se polární látky adsorbují prostřednictvím vodíkových vazeb. Oxid hlinitý je vhodnějším adsorbentem zejména pro méně polární látky. Pro separaci s normálními fázemi lze dále pak použít oxidu zirkoničitého či porézního grafitu [1], [10].

Obrázek 3 – několik rozdílných typů silanolových skupin (aktivními centry na povrchu silikagelu jsou hydroxylové skupiny resp. silanolové skupiny Si-OH) [7]



➤ Při rozdělovací chromatografii je kapalná stacionární fáze zakotvena na vhodném nosiči. Mechanicky zakotvená kapalná fáze není však pro HPLC příliš vhodná, protože při vysokém tlaku dochází k jejímu narušení. V HPLC se proto používají tzv. chemicky vázané stacionární fáze, kdy na povrchu silikagelových zrněk jsou vhodnou chemickou reakcí navázány různé radikály. Dle vázané skupiny mají chemicky modifikované fáze různou polaritu od nepolárních, vysoce hydrofobních (například klasická oktylová C8 či oktadecylová C18 stacionární fáze), které se používají pro obrácený systém fází (reversed phase RP) až po polární. Pro separaci s reverzními fázemi se nabízí chemicky modifikovaný silikagel, oxid zirkoničitý, porézní grafit nebo syntetické polymery [1], [2], [10].

➤ Pro dělení látek iontového charakteru ve vodě rozpustných léčiv, vitamínů, aminokyselin jsou určeny stacionární fáze s vlastnostmi iontoměničů – pryskyřice, polymery s kyselými nebo bazickými skupinami [1], [8].

➤ Porézní silikagel nebo polymery jako je například dextran (Sephadex) jsou používány ve vylučovací chromatografii a jsou tedy vhodné k dělení vysokomolekulárních molekul – například bílkovin a polysacharidů [1], [8].

➤ V chirální chromatografii pro stanovení optických izomerů se uplatňují speciální chemicky modifikované stacionární fáze, např. deriváty celulosy nebo amylosy, bílkoviny nebo peptidy, cyklodextriny [8].

Silikagelové kolony patří k nejčastěji používaným, jejich nevýhodou je však skutečnost, že jsou stabilní jen v úzkém rozsahu hodnot pH. Degradace silikagelu se také zvyšuje s rostoucí teplotou, kdy jako limitní se udává teplota 70 °C. Pokud není výrobcem uvedeno jinak, předpokládá se, že kolony pro chromatografii s obrácenými fázemi s náplní na bázi silikagelu jsou stabilní v mobilních fázích o zdánlivém pH 2,0 – 8,0. Nejčastější velikost částic náplně jsou 3, 5 a 10 µm. Pro výše zmíněná omezení se nabízí použití stacionární fáze, kde je nosičem chemicky vázané fáze oxid zirkoničitý, oxid titaničitý nebo různě modifikované organické polymery [7], [8], [10].

Příklady vybraných alternativních stacionárních fází

Stacionární fáze na bázi oxidu zirkoničitého

Kolony se stacionární fází na bázi oxidu zirkoničitého jsou užívány jak při normální HPLC, tak i při HPLC s obrácenými fázemi. Podobně jako silikagel může být stacionární fáze oxidu zirkoničitého na povrchu chemicky modifikována. Při analýze látek se pak uplatňují polární i nepolární interakce.

Oproti silikagelu má tato fáze řadu výhod. Vyznačuje se velkým povrchem, který lze reprodukovatelně připravit. Tvar jeho částic je sférický a velikost částic se nachází v úzkém intervalu 3-25 µm. Vykazuje neobyčejnou chemickou a mechanickou stabilitu a odolnost. V závislosti na modifikaci stacionární fáze mohou být zirkoniové kolony stabilní v celém rozsahu pH (1-14) a při teplotách až do 200°C [10], [12], [13], [14].

Polymerní stacionární fáze

Polymerní stacionární fáze jsou stacionární fáze na bázi polymeru, nejčastěji polystyrendivynylbenzenu nebo polymethakrylátu. Vyznačují se velkým adsorpčním povrchem, stabilitou v celém rozsahu hodnot pH (1-14) a teplotní stabilitou při teplotách až do 200°C. Stabilita těchto fází je však limitována stabilitou funkčních skupin polymeru. Polymerní stacionární fáze jsou omezeny maximálním pracovním tlakem na koloně, který je 20 MPa.

V závislosti na typu polymeru, který fázi tvoří, se polymerní stacionární fáze užívají k separaci látek charakteru sacharidů, cukerných alkoholů, proteinů, peptidů, malých proteinů, organických kyselin a tetracyklinů [15], [16], [17], [18].

Stacionární fáze pro hydrofilní interakční kapalinovou chromatografii (Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography) - HILIC

Hydrofilní interakční kapalinová chromatografie (HILIC) je určena pro separaci silně polárních a hydrofilních sloučenin, které mají často nízkou nebo vůbec žádnou retenci na reverzní fázi kolony.

Ze stacionárních fází lze pro HILIC použít stacionárních fází primárně určených pro HPLC na normálních fázích nebo pro RP-HPLC, které obsahují aminoskupiny nebo hydroxyskupiny. Alternativou jsou pak speciální stacionární fáze určené přímo pro HILIC. Ty se můžou dělit na:

- a) neutrální stacionární fáze
- b) elektricky nabitě stacionární fáze
- c) „zwitterionické“ stacionární fáze (ZIC-HILIC, ZIC-pHILIC)

Jedná se o stacionární fáze na bázi silikagelu (ZIC-HILIC) nebo polymeru (ZIC-pHILIC) s kovalentně vázanou vysoce polární „zwitterionickou“ funkční skupinou (hybridní iontová skupina), která zaručuje vyšší stabilitu a robustnější HILIC separaci než konvenční fáze silikagelu nebo amino fáze [19], [20], [21], [22].

Hybridní stacionární fáze

Hybridní anorganicko-organické stacionární fáze kombinují nejlepší vlastnosti silikagelu, tj. vysokou účinnost a vynikající mechanickou stabilitu, s nejlepšími vlastnostmi polymerních sorbentů, tj. mimořádnou pH stabilitou a sníženým efektem reziduálních silanolů. Z hybridních stacionárních fází jsou v současné době na trhu dostupné například analytická kolona Gemini Phenomenex, Analytická kolona Pathfinder Shimadzu, Analytická kolona XTERRA Waters nebo Analytická kolona XBridge Waters [23], [24], [25], [26].

Další podrobná charakteristika uvedených alternativních fází je podrobně rozepsána v dané diplomové práci [27].

3.1.7 Pentafluorofenylová stacionární fáze HS F5

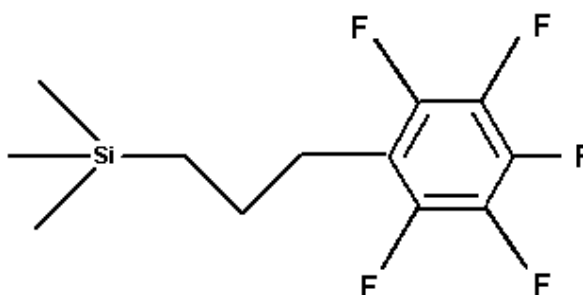
Pentafluorofenylová stacionární fáze je v současnosti nejdůležitější komerčně dostupnou fluorovanou stacionární fází v kapalinové chromatografii. Její význam v HPLC stoupá díky její jedinečné selektivitě, kterou se liší od klasických stacionárních fází (C8, C18) běžně užívaných v RP–HPLC. Tato selektivita umožňuje analýzu chemicky příbuzných látek, například přírodních sloučenin a jejich metabolitů v biologických matricích, které většinou na oktadecylové fázi C18 nelze stanovit nebo jen velmi těžce [28], [29], [30].

Charakteristiky HS F5 kolony [29]

<i>USP Kód:</i>	L43
<i>Navázaná fáze:</i>	Pentafluorophenylpropyl
<i>Endcap:</i>	Ano
<i>Nosič SF:</i>	Silikagel
<i>Tvar částic:</i>	Sférický
<i>Čistota částic:</i>	<10ppm kovových částic
<i>Velikost částic:</i>	3, 5, a 10 μm
<i>Velikost pórů:</i>	120 Å
<i>Plocha povrchu:</i>	300 m^2/g
<i>Zastoupení uhlíku:</i>	12 %
<i>Rozsah:</i>	4 $\mu\text{mol}/\text{m}^2$
<i>Rozmezí pH:</i>	2 až 8
<i>Teplotní rozmezí:</i>	<70°C

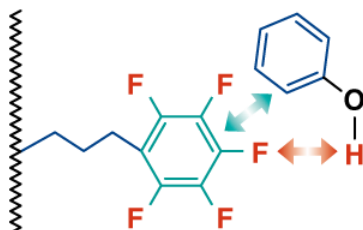
Struktura HS F5 kolony

Obrázek 4 – struktura HS F5 [7]



HS F5 stacionární fáze obsahuje pentafluorofenylový ligand, který je na silikagel navázán přes propylový můstek. Přestože struktura HS F5 je tvořena aromatickým jádrem (fenyl), je retence i selektivita od fenylové fáze odlišná. Příčinou je přítomnost atomů fluoru, které jsou navázané na fenylové jádro. Tyto atomy fluoru jsou elektronegativní, což způsobuje, že se HS F5 chová jako silná Lewisova kyselina. Prostřednictvím tvorby vodíkových vazeb mezi elektronegativními atomy fluoru HS F5 fáze a funkčními skupinami molekul jako jsou například $-OH$, $-NH_2$, $-SH$ se tak uplatňují polární interakce, které umožňují analýzu polárních látek, jež jsou pak na této koloně více zadržovány. Při analýze látek se za použití pentafluorofenylové fáze uplatňuje hned několik selektivních mechanismů. Zatímco při použití klasické C18 fáze je separace analytů založena výlučně na hydrofobních interakcích, u HS F5 kolony se na separaci látek podílí mimo hydrofobních interakcí běžných pro RP-HPLC i interakce polární, interakce typu dipól – dipól a π - π interakce [28], [31].

Obrázek 5 – mechanismus separace analytů za použití HS F5 fáze [28]



Výborný tvar píků, vysoká reprodukovatelnost výsledků a možnost použití pro transparentní systém LC/MS jsou dalšími výhodami, které HS F5 stacionární fáze oproti C18 fázi nabízí. S výhodou lze tuto fázi použít pro separaci obtížně separovatelných sloučenin včetně vysoce polárních sloučenin, halogenovaných sloučenin, aromatických sloučenin, polohových izomerů a komplexních přírodních produktů. Pentafluorofenylová kolona je pak vhodná svou retencí a selektivitou zejména pro halogenované a bazické látky, přičemž bazické látky jsou na HS F5 zadržovány více než na C18 [29], [32], [33].

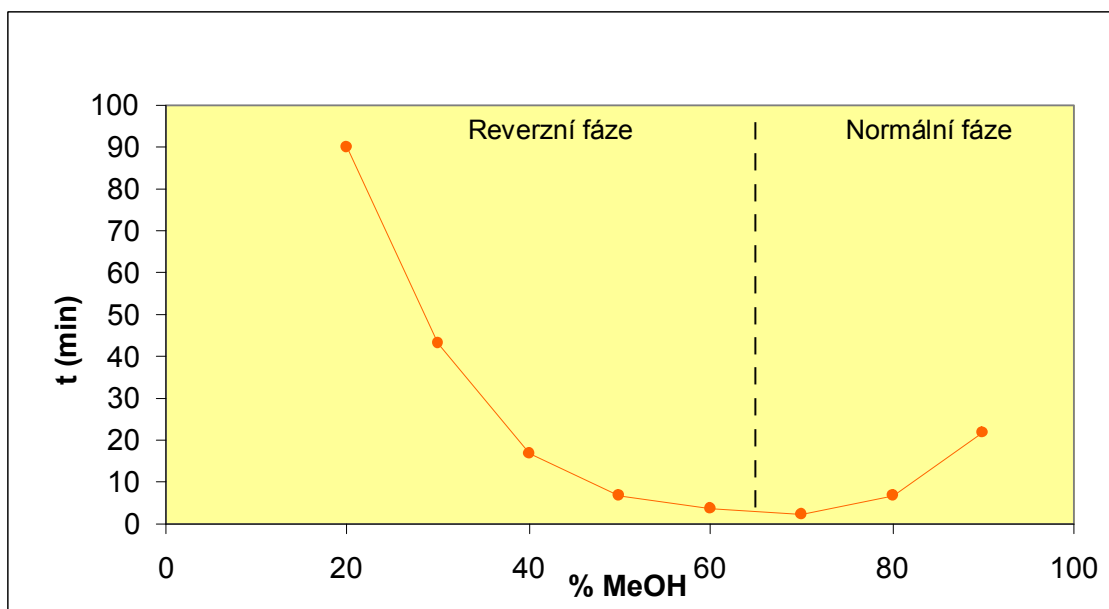
V závislosti na parametrech analýzy pracuje jako fáze normální nebo jako fáze reverzní. Retence a selektivita HS F5 stacionární fáze je ovlivňována charakterem mobilní fáze, zejména pH mobilní fáze a koncentrací a typem pufrů [29], [30], [32].

„U“ profily

Při analýze látek na pentafluorofenylové fázi je sledována změna retence v závislosti na měnícím se charakteru mobilní fáze. Některé látky vykazují tzv. retenci ve tvaru „U“, která popisuje skutečnost, že HS F5 se za určitých podmínek chová jako fáze normální (polární), v jiném případě pak jako fáze reverzní [30].

Při zkoumání „U“ profilů na HS F5 koloně, byla sledována retence současně u látek kyselých, neutrálních a látek bazických. Významná retence ve tvaru „U“ byla poskytována pouze látkami bazickými [34].

Obrázek 6 - schéma znázorňující závislost retenčního času analyzované látky v souvislosti s měnícím se procentuálním zastoupením methanolu v mobilní fázi



Oblast na schématu, kde se HS F5 fáze chová jako fáze normální, je dána iontovou silou mobilní fáze [34].

Příklady využití pentafluorofenylové stacionární fáze k analýze konkrétních látek v praxi

Možnost využití pentafluorofenylové stacionární fáze pro rychlou separaci fenylethylaminových alkaloidů ((±)-oktopamin, (±)-synephrin, tyramin, N-methyltyramin and hordenin) vyskytujících se v plodech a kůře citrusových rostlin různých druhů, v extraktech a v dietních doplňcích stravy údajně obsahujících složky z těchto rostlin prokazuje studie *Fast high-performance liquid chromatography*

analysis of phenethylamine alkaloids in Citrus natural products on a pentafluorophenylpropyl stationary phase. Použití HS F5 eliminovalo problém analýzy fenylethylaminových alkaloidů, tj. chvostování píků, nízká retence a špatné rozlišení. Tato vyvinutá analytická metoda tak může být vhodná pro kontrolu kvality rostlinného materiálu citrusů a komerčních produktů [35].

Ve studii *Determination of ephedrine alkaloids in Ephedra natural products using HPLC on a pentafluorophenylpropyl stationary phase* se autoři opět zabývají stanovením fenylethylaminových alkaloidů obsažených v rostlinných produktech, konkrétně v rostlinách rodu Ephedra. Byla vyvinuta metoda, která umožňuje kvalitativní i kvantitativní stanovení alkaloidů efedrinu, kdy při daných analytických podmínkách, je maximální doba analýzy 16 minut. Navíc umožňuje současné stanovení alkaloidů efedrinu a fenylethylaminových alkaloidů rostliny Citrus aurantium, které nahrazují efedrin v přípravcích k terapii obezity [36].

Díky pentafluorofenylové fázi byla vyvinuta a validována nová bioanalytická HPLC metoda pro stanovení ciprofloxacinu a norfloxacinu, který sloužil jako vnitřní standard, ve vzorcích plazmy. Tato skutečnost je popsána v práci *High-performance liquid chromatographic determination of ciprofloxacin in plasma samples.* Použití pentafluorofenylpropylové fáze eliminovalo nedostatky dříve publikované metody pro stanovení ciprofloxacinu metodou RP-HPLC za použití klasické C18 stacionární fáze, kdy se před stanovením přidávalo do mobilní fáze činidlo z důvodu zabránění chvostování píků. Nová validovaná bioanalytická HPLC metoda byla použita ve farmakokinetických studiích [37].

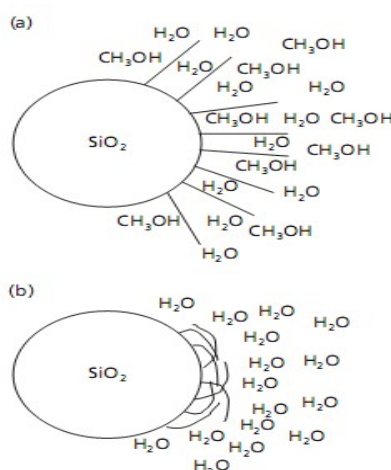
Cílem studie *HPLC methods for determination of two novel thiosemicarbazone anti-cancer drugs (N4mT and Dp44mT) in plasma and their application to in vitro plasma stability of these agents* bylo vyvinout a validovat HPLC metody pro stanovení dvou nových thiosemikarbazonových cytostatik v plazmě. K analýzám byla použita pentafluorofenylová fáze. Validované metody byly úspěšně použity pro určení stability účinných látek in vitro v plazmě, kdy bylo prokázáno, že obě thiosemikarbazonová cytostatika vynikají význačně vyšší stabilitou in vitro v plazmě než-li jejich arylhydrazonoví předchůdci [38].

3.1.8 Problematika analýzy polárních bazických látek

Polární a bazické látky patří z hlediska analýzy k velmi problematickým analytům v kapalinové chromatografii. To platí, zejména pokud jsou k analýze těchto látek použity konvenční metody kapalinové chromatografie, kam patří i široce používaná chromatografie na reverzních fázích, kdy je stacionární fáze nepolární a mobilní fáze polární.

Silně polární a iontové látky se na nepolárních fázích zadržují velmi málo nebo vůbec a eluují s mrtvým objemem kolony nebo dříve, než odpovídá mrtvému objemu kolony, což je jev tzv. iontové výluky. Aby docházelo k retenci polárních látek na základě interakce s nepolární stacionární fází, muselo by být například použito pouze vodné mobilní fáze. Tato možnost je však nevhodná hned z několika důvodů. Vodná mobilní fáze není vhodným médiem pro ionizaci elektrosprejem u detekce za pomoci hmotnostní spektrometrie. Dále v některých případech zejména u malých polárních molekul nemusí vést použití této vodné mobilní fáze k uspokojivé retenci, tyto látky jsou stále vymývány s mrtvým retenčním objemem. Navíc v případě použití C18 jako stacionární fáze, která je běžně pro RP-HPLC používána, by mohlo dojít k tzv. hydrofobnímu kolapsu jinak také nazývanému fázový kolaps (Phase Collapse). Při něm dochází ke zhroucení C18 řetězců a narušení funkce stacionární fáze [39].

Obrázek 7 – fázový kolaps v RP-HPLC: a) mobilní fáze MeOH-H₂O, b) mobilní fáze H₂O [39]



Reverzní stacionární fáze pro analýzu polárních látek s využitím prakticky vodných mobilních fází, kde obsah vodné složky je často vyšší než 95%, musí tedy ve své struktuře obsahovat některou z následujících složek:

- krátké alkylové řetězce bez „endcappingu“
- hydrofilní, polárně „endcappovaná“ stacionární fáze
- vložená polární fáze
- dlouhé alkylové řetězce
- velký průměr pórů stacionární fáze [7], [40], [41]

Tato možnost docílení retence polárních analytů prostřednictvím použití chromatografie na reverzní fázi a mobilní fáze s vysokým obsahem vodné složky je relativně vhodná i z hlediska rozpustnosti polárních analytů [39].

Pro zvýšení retence polárních molekul při RP-HPLC na klasické C18 koloně se nabízí například možnost derivatizace polárních molekul na molekuly méně polární. Tento časově náročný přístup však může vést ke vzniku vedlejších produktů. Jinou možností by mohla být tvorba nepolárních komplexů polárních analytů s reaktantem, který se přidá do mobilní fáze. Obě varianty však často vedou k metodám, které postrádají robustnost a reprodukovatelnost. Omezuje se i možnost použití detekce prostřednictvím hmotnostní spektrometrie [6].

Aby mohlo docházet k interakci analytu s nepolární stacionární fází a tak k retenci látek pomocí rozdělovacího mechanismu, je nutné, aby byl analyt co nejvíce hydrofobní, v neionizovaném stavu. Chromatografické chování iontových látek lze ovlivnit úpravou pH mobilní fáze, kdy změnou pH dochází k potlačení disociace slabých kyselin či slabých bází. V důsledku toho je zvýšena retence a zamezeno chvostování píku analyzované látky. Problém ale nastává v případě polárních bazických látek, u kterých je potlačena disociace zvýšením pH na hodnotu asi pH 7-8. Při použití silikagelu jako stacionární fáze pro analýzu těchto analytů tak dochází při pH > 8,5 k jeho rozpouštění [7], [42].

Pro analýzu v širokém rozmezí pH s rozšířeným aplikačním potenciálem do oblasti bazických látek je tak k dispozici několik druhů stacionárních fází [43]:

- stacionární fáze na bázi silikagelu s rozšířenou chemickou stabilitou
- silikagel pokrytý polymerem
- polymerní stacionární fáze
- hybridní stacionární fáze
- stacionární fáze na bázi kovových oxidů
- stacionární fáze na bázi grafitického uhlíku

V současné době je tedy v praxi k dispozici několik vhodných speciálních technik, které řeší problematiku analýzy polárních látek. Mezi takové přístupy patří i dynamicky se rozvíjející směr kapalinové chromatografie chromatografie hydrofilních interakcí (HILIC) či iontově vylučovací chromatografie. Jak docílit retence a tak i stanovení polárních analytů lze dále dosáhnout použitím již zmíněných speciálních typů stacionárních fází, kam se řadí i pentafluorofenylová stacionární fáze.

3.2 Testované skupiny látek

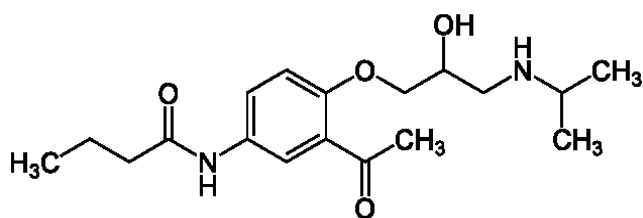
3.2.1 β -SYMPATOLYTIKA

β -sympatolytika (také zvaná β -adrenolytika nebo β -blokátory) jsou velice významnou farmakoterapeutickou skupinou látek, které prostřednictvím blokády β -receptorů, tlumí některé funkce sympatického nervového systému. β -sympatolytika reagují jak s β_1 -receptory, tak i s β_2 -receptory. Jejich farmakologický účinek a tím i terapeutické použití jsou dány vyřazením přednostně receptorů β_1 . Na srdci oslabují pozitivně inotropní, pozitivně chronotropní, pozitivně batmotropní, pozitivně dromotropní účinek sympatiku a stejně i zvýšení spotřeby kyslíku. Po podání β -sympatolytik proto klesá tepová frekvence, snižuje se excitabilita srdce, redukuje se maximální síla kontrakce i spotřeba kyslíku myokardem. Účinek je tím výraznější, čím silněji byl tonus sympatiku zvýšen. β -sympatolytika se vyznačují i metabolickými účinky, které jsou dány kompetitivním antagonismem β_2 -receptorů.

Mezi hlavní indikace β -sympatolytik patří léčba arteriální hypertenze, ischemické choroby srdeční, srdeční nedostatečnosti, srdeční arytmie, infarktu myokardu a profylaxe reinfarktu. Dále jsou používány k terapii hyperthyreózy, úzkostných stavů, profylaxi migrény a k lokální léčbě glaukomu [44], [45], [46].

Acebutolol

Obrázek 8 – strukturní vzorec acebutololu



Sumární vzorec: C₁₈H₂₈N₂O

Chemický název: N-(3-acetyl-4-{2-hydroxy-3-[(propan-2-yl)amino]propoxy}phenyl)butanamid

CAS: 37517-30-9

Molární hmotnost: 336,426 g/mol

pK_a: 9,4

log P: 1,7

[47]

Fyzikální a chemické vlastnosti:

Acebutolol se vyskytuje v pevném skupenství a jeho rozpustnost ve vodě je 259 mg/l. Teplota tání je mezi 119-123 °C [47].

Ve formě hydrochloridu je to bílý nebo téměř bílý krystalický prášek, který je snadno rozpustný ve vodě a v ethanolu 96%, velmi těžce rozpustný v acetonu a dichlormethanu. Taje při teplotě tání asi 143 °C [8].

Hodnota pK_a acebutololu je 9,4, log P je 1,7 [47].

Farmakologické vlastnosti:

Farmakoterapeutická skupina: antihypertenzivum, kardiakum, antiarytmikum

ATC kód: C07AB04 [48]

Acebutolol je kardioselektivní, tj. β_1 selektivní blokátor, s částečným agonistickým účinkem (mírnou ISA) a význačným stabilizačním působením na membrány a antiarytmickou aktivitou. Kombinace kardioselektivity a ISA vede k intenzifikaci vazodilatačních účinků, a proto se látky této skupiny někdy nazývají β -blokátory s vasodilatačními účinky [48], [49], [50].

Po perorálním podání je acebutolol rychle a téměř kompletně absorbován. Z důvodu efektu prvního průchodu játry je však jeho biologická dostupnost pouhých 40%. Maximální plazmatická koncentrace je dosažena přibližně po 2-4 hodinách. U dětí je maximální plazmatická koncentrace mírně vyšší než u dospělých. Většina acebutololu je metabolizována v játrech na aktivní N-acetylovaný diacetolol. Maximální plazmatická koncentrace diacetololu je dosahována za 4 hodiny a plazmatická koncentrace diacetololu představuje dvojnásobek koncentrace acebutololu. Vazba na plazmatické bílkoviny je slabá. Poločas eliminace z plazmy je pro acebutolol přibližně 3-4 hodiny a 8-13 hodin pro diacetolol. Obě látky jsou pak z cirkulace vylučovány převážně ledvinami. Acebutolol díky své lipofilitě prochází placentární bariérou a do mateřského mléka [48].

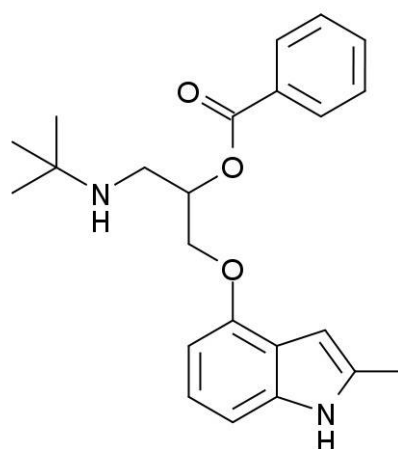
Terapeutické indikace:

Acebutolol je indikován k léčbě esenciální a renální hypertenze všech stupňů, případně v kombinaci s thiazidovými diuretiky nebo i jinými antihypertenzivy, k

dlouhodobé léčbě poruch srdečního rytmu jak supraventrikulárních (tachykardie, flutter a fibrilace síní, nodální tachykardie), tak ventrikulárních (komorové extrasystoly, komorová tachykardie). Dále je profylakticky podáván jako prevence záchvatů námahové anginy pectoris. Je určen i k dlouhodobé léčbě po infarktu myokardu, kde snižuje riziko recidiv infarktu myokardu, zejména riziko náhlého úmrtí [48].

Bopindolol

Obrázek 9 –strukturní vzorec bopindololu



Sumární vzorec: C₂₃H₂₈N₂O₃

Chemický název: 1-(terc-butylamino)-3-[(2-methyl-1H-indol-4-yl)oxy]propan-2-yl benzoat

CAS: 69010-88-4

Molární hmotnost: 380,48 g/mol

pK_a: -

log P: 4,7

[47]

Fyzikální a chemické vlastnosti:

Bopindolol je látka pevného skupenství, jejíž rozpustnost ve vodě je ve formě soli s kyselinou jablečnou 3,3 mg/ml a teplota tání činí 152-153 °C [47].

Hodnota pK_a bopindololu se neuvádí. Bopindolol je proléčivo. Jeho účinným metabolitem je pindolol, jehož pK_a je 16,66. Log P bopindololu činí 4,7 [47].

Farmakologické vlastnosti:

Farmakoterapeutická skupina: antihypertenzivum, β -blokátor

ATC kód: C07AA17 [48]

Bopindolol je proléčivo, jehož hlavní metabolit pindolol je vysoce účinný neselektivní β -blokátor s mírnou vlastní sympatomimetickou aktivitou. Chrání srdce před nadměrnou β -adrenergní stimulací v klidu i při zátěži. Nepůsobí nadměrný pokles srdeční frekvence a srdečního výdeje za klidu. Snižuje zvýšený krevní tlak a zvýšenou srdeční frekvenci, aniž přitom ovlivňuje cirkadiánní rytmus. Snížením reakce na β -adrenergní stimulaci zvyšuje schopnost zátěže u nemocných anginou pectoris, což vede ke snížení jejich symptomů. Účinek bopindololu se postupně zvyšuje během prvních 2-3 týdnů terapie a po jednorázovém podání trvá po dobu 24 hodin. Kromě účinků kardiálních se bopindolol vyznačuje díky neselektivní blokádě β -receptorů i účinky bronchokonstrikčními a metabolickými, které jsou nežádoucí [48], [49], [51].

Po perorálním podání se bopindolol rychle vstřebává. Jeho biologická dostupnost je 60-70%. Po vstřebání se hydrolyticky odštěpuje esterová vazba a tento první metabolit je farmakologicky aktivní. Váže se na plazmatické proteiny asi ze 60-65% a maximálních plazmatických hladin dosahuje za 2 hodiny po podání. Biotransformuje se, 40-60% se vylučuje ledvinami a z toho většina v podobě aktivního metabolitu. Biologický poločas eliminace je přibližně 4 hodiny pro fázi alfa, 14 hodin pro fázi beta [48].

Terapeutické indikace:

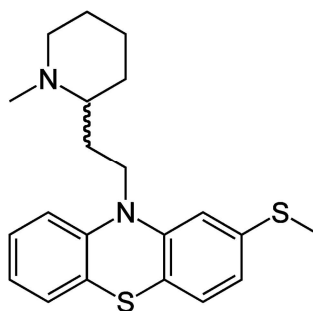
Bopindolol je užíván k léčbě esenciální hypertenze a profylaktické léčbě anginy pectoris [48].

3.2.2 NEUROLEPTIKA

Neuroleptika (antipsychotika) jsou látky, které při dlouhodobém podávání potlačují psychotické symptomy (především bludy a halucinace) u schizofrenie, schizoafektivních psychóz a manické fáze maniodepresivní psychózy. Upravují chorobně narušené myšlení, vnímání, chování a jednání. Látky jednotlivých chemických skupin se od sebe liší nejen intenzitou účinku, ale i farmakodynamickými vlastnostmi [51].

Thioridazin

Obrázek 10 – strukturní vzorec thioridazinu



Sumární vzorec: C₂₁H₂₆N₂S₂

Chemický název: 10-[2-(1-methylpiperidin-2-yl)ethyl]-2-(methylsulfanyl)-10H-fenothiazin

CAS: 50-52-2

Molární hmotnost: 370,577 g/mol

pK_a: 9,5

log P: 5,9

[47]

Fyzikální a chemické vlastnosti:

Thioridazin je bílý nebo téměř bílý prášek, který je prakticky nerozpustný ve vodě, velmi snadno rozpustný v dichlormethanu, snadno rozpustný v methanolu a dobře rozpustný v ethanolu 96%. Teplota tání thioridazinu je 73°C [8], [47].

Hodnota pK_a činí 9,5, log P thioridazinu je 5,9 [47].

Farmakologické vlastnosti:

Farmakoterapeutická skupina: neuroleptikum

ATC skupina: N05AC02 [48]

Thioridazin je fenothiazinový derivát s piperidinovým řetězcem. Jako všechny fenothiazinové deriváty ze skupiny neuroleptik má široké rozmezí účinku. Působí tlumivě na CNS, blokuje α -adrenergní aktivitu a tlumí dopaminergní funkce. V nižších dávkách působí anxiolyticky a antidepresivně. Antipsychotické účinky se dostaví po dávkách vyšších, přičemž mechanismus antipsychotického účinku thioridazinu spočívá v blokádě postsynaptických dopaminergních receptorů v mesolimbickém systému mozku. V důsledku neselektivního působení ale dochází zároveň i k blokádě dopaminových receptorů v hypofýze, α -adrenergních receptorů a v malé míře i receptorů cholinergních, což má za následek mnoho nežádoucích účinků.

Ve srovnání s ostatními zástupci fenothiazinových neuroleptik je hypotenzní účinek thioridazinu mírný až silný, anticholinergní účinek mírný, sedativní účinek středně silný, extrapyramidový a antiemetický účinek slabý [44], [51], [52].

Thioridazin se po perorálním podání rychle a dobře vstřebává, Z důvodu prvního průchodu játry je však jeho systémová biologická dostupnost jen asi 60%. Maximální plazmatické koncentrace dosahuje za 2-4 hodiny po jeho podání. Thioridazin se silně váže na plazmatické bílkoviny. Metabolizuje se v játrech, přičemž řada metabolitů má obdobné farmakologické vlastnosti jako původní látka. Thioridazin částečně podléhá enterohepatální cirkulaci, vylučuje se převážně stolicí. Močí se vylučuje jen asi 35% a to převážně ve formě metabolitů. Thioridazin prochází přes placentární bariéru a vylučuje se do mateřského mléka [52].

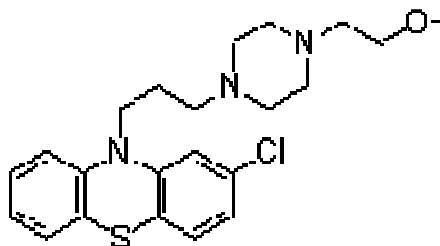
Terapeutické indikace:

Thioridazin se používá při neklidu, úzkosti, strachu, napětí, poruchách myšlení při duševních onemocněních, při těžší úzkosti a depresi při neurózách, dále při neklidu a stavech vzrušenosti ve stáří. Rovněž se používá při závažných poruchách chování u dětí, které jsou spojené s agresivitou, neklidem, poruchami koncentrace a náladovostí [51], [52].

Bylo také prokázáno, že thioridazin je účinný i proti multirezistentním formám *Mycobacterium tuberculosis* a meticilin-rezistentnímu *Staphylococcus aureus* (MRSA) [51], [53].

Perphenazin

Obrázek 11 – strukturní vzorec perphenazinu



Sumární vzorec: C₂₁H₂₆ClN₃OS

Chemický název: 2-{4-[3-(2-chloro-10H-fenothiazin-10-yl)propyl]piperazin-1-yl}ethan-1-ol

CAS: 58-39-9

Molární hmotnost: 403,97 g/mol

pK_a: 7,94

log P: 3,9

[47]

Fyzikální a chemické vlastnosti:

Bílý nebo nažloutle bílý krystalický prášek, který se ve vodě prakticky nerozpouští. Je snadno rozpustný v dichlormethanu, dobře rozpustný v ethanolu 96% a rozpouští se ve zředěných roztocích kyseliny chlorovodíkové [8].

Hodnota pK_a perphenazinu je 7,94, log P je 3,9 [47].

Farmakologické vlastnosti:

Farmakoterapeutická skupina: neuroleptikum

ATC skupina: N05AB03 [48]

Perphenazin se řadí mezi fenothiazinová neuroleptika substituovaná piperazinem. Jedná se tedy o neuroleptikum první generace, které je při vztažení na dávku neurolepticky a antiemeticky účinnější než chlorpromazin. Antipsychotické působení je velmi silné. Přes všeobecné zklidnění vyvolává ospalost slaběji než

izoefektivní dávky látek nesubstituovaných piperazinem a na rozdíl od chlorpromazinu působí antiemeticky i při kinetózách [44].

Biologická dostupnost perphenazinu po perorálním podáním je okolo 40% a biologický poločas se pohybuje od 8 do 12 hodin (někdy až do 20 hodin). Obvykle je podáván ve dvou až třech rozdělených dávkách každý den. Je možné užívat pouhou třetinu denní dávky ráno a zbylé dvě třetiny až na noc pro maximalizaci hypnotického účinku v noci a minimalizaci sedace během dne bez ztráty terapeutického účinku [51].

Perphenazin enantát je depotní přípravek, kdy při intramuskulárním podání dochází k pomalému uvolňování neuroleptika z depa, čímž je zaručeno udržení dostatečné terapeutické hladiny po několik týdnů [44].

Terapeutické indikace:

Perphenazin je vhodný k léčbě psychóz, kdy v případě schizofrenie ovlivňuje pozitivní a údajně i negativní příznaky spojené s tímto onemocněním. Účinný je i při terapii deprese, mánie u bipolárních poruch, při terapii závislosti na lécích, alkoholu či jiných drogách. Dále se používá jako účinné antiemetikum. Cennou off-label indikací perphenazinu je pak možnost použití pro krátkodobou terapii hyperemesis gravidarum u těhotných žen [51].

Depotní přípravky perphenazinu jsou vhodné pro udržování antipsychotické terapie u ambulantních pacientů [44].

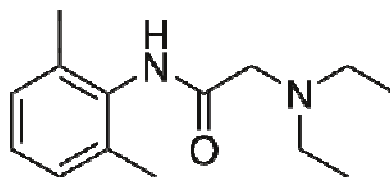
3.2.3 LOKÁLNÍ ANESTETIKA

Lokální anestetika jsou farmaka, která přerušují vodivost nervového vlákna pro nervový vzruch tím, že brání depolarizaci vlákna blokadou sodíkových kanálů. Navozují tedy stav, jenž se nazývá lokální anestézie. Pod tímto pojmem rozumíme místně ohraničené reverzibilní vyřazení receptorů pro bolest, případně vyřazení příslušných aferentních nervových vláken. Lokální anestetika tedy přechodně tlumí vyvolání bolesti, neovlivňují percepci bolesti.

Podle místa podání, případně dle ovlivněné oblasti, se rozeznává lokální anestézie povrchová, infiltrační, svodná (blok nervového kmene, anestézie v místě zásobovaném určitým nervovým svazkem; sem patří i anestézie epidurální) a míšní (subarachnoidální - anestetikum podáno do mozkomíšního moku) [44], [51].

Lidokain

Obrázek 12 – strukturní vzorec lidokainu



Sumární vzorec: C₁₄H₂₂N₂O

Chemický název: 2-(diethylamino)-N-(2,6-dimethylfenyl)acetamid

CAS: 137-58-6

Molární hmotnost: 234,34 g/mol

pK_a: 7,86

log P: 2,1

[47]

Fyzikální a chemické vlastnosti:

Lidokain je bílý nebo téměř bílý krystalický prášek prakticky nerozpustný ve vodě, velmi snadno rozpustný v ethanolu 96% a dichlormethanu. Jeho teplota tání je 68,5°C [8].

Hodnota pK_a je 7,86, log P je 2,1 [47].

Farmakologické vlastnosti:

Farmakoterapeutická skupina: anestetika (lokální)

ATC skupina: N01BB02 [48]

Lidokain je lokální anestetikum amidového typu, látka stabilizující membránu a antiarytmikum třídy Ib podle klasifikace Vaughana Williama. Vyvolává anestezii dvěma způsoby: brání vzniku a vedení nervového vzruchu prostřednictvím snížení permeability membrány neuronu pro ionty sodíku. Nástup anestetického účinku je rychlý a blokáda může trvat 1 až 1,5 hodiny. Anestetická účinnost je ve srovnání s prokainem přibližně dvojnásobná [48].

Při použití lidokainu jako antiarytmika působí potlačením diastolické depolarizace a spontánní tvorby potenciálu v komorách. Látka neovlivňuje atrioventrikulární vedení a nemá vliv na síň [48].

Nástup účinku lidokainu je ve srovnání s prokainem rychlý, jeho dekompozice je naopak pomalejší. Lidokain je metabolizován mikrozomálními enzymy v játrech, zatímco prokain je hydrolyzován již v místě aplikace. Lidokain se rychle distribuuje do silně prokrvených tkání. Prostupuje i hematoencefalickou bariérou a placentou. Přibližně 90% je vylučováno ledvinami ve formě metabolitů a 10% v nezměněné podobě [44], [51].

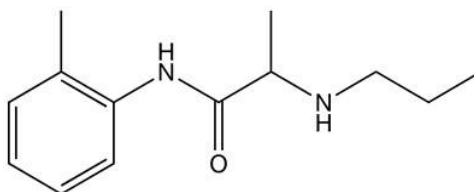
Terapeutické indikace:

V lokální anestezii je lidokain užíván k navození krátkodobé anestezie v chirurgii, gynekologii a stomatologii a rovněž k navození blokády nervů a navození kaudálního nebo jiného typu epidurálního bloku.

Kardiologickými indikacemi jsou pak prevence a terapie ventrikulárních extrasystol a ventrikulární tachykardie spojené s akutní fází infarktu myokardu a jinými projevy ICHS [48].

Prilokain

Obrázek 13 –strukturní vzorec prilokainu



Sumární vzorec: C₁₃H₂₀N₂O

Chemický název: N-(2-methylfenyl)-2-(propylamino)propanamid

CAS: 721-50-6

Molární hmotnost: 220,31 g/mol

pK_a: 7,89

log P: 2,1

[47]

Fyzikální a chemické vlastnosti:

Vzhledem je prilokain bílý nebo téměř bílý krystalický prášek. Těžce se rozpouští ve vodě, je ale velmi snadno rozpustný v ethanolu 96% a acetonu. Teplota tání se pohybuje v rozmezí 36°C až 39°C [8].

Hodnota pK_a prilokainu je 7,89, log P činí 2,1 [47].

Farmakologické vlastnosti:

Farmakoterapeutická skupina: lokální anestetikum amidového typu

ATC skupina: N01BB04 [48]

Mechanismus účinku prilokainu se od ostatních zástupců lokálních anestetik nijak neliší. Vyvolává lokální anestezii tedy tím, že stabilizuje membránu neuronu prostřednictvím inhibice iontové výměny nutné pro vznik a vedení vzruchu nervovým vláknem [48].

Účinek prilokainu nastupuje později a později také odeznívá. Silně se váže na plazmatické bílkoviny. Je metabolizován játry i ledvinami. Exkrece je zajištěna ledvinami [44], [47].

Terapeutické indikace:

Prilokain je indikován k lokální anestezii kůže či sliznic. Často je používán ve fixní kombinaci s lidokainem ve formě krému nebo náplasti [47], [48].

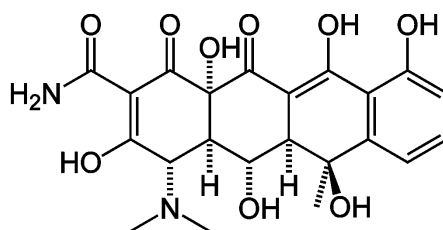
3.2.4 TETRACYKLINOVÁ ANTIBIOTIKA

Tetracyklinová antibiotika patří do skupiny antibiotik se širokým spektrem účinku, která působí především proti intracelulárním gramnegativním bakteriím a též proti mnoha druhům grampozitivních bakterií. Jsou získávány biosynteticky jako produkty bakterií rodu *Streptomyces*.

Jejich účinek, který je primárně bakteriostatický, spočívá v ovlivnění proteosyntézy, kdy tetracyklinová antibiotika znemožňují v bakteriích vazbu transferové-RNA na komplex messenger-RNA + ribozom [44].

Oxytetracyklin

Obrázek 14 – strukturní vzorec oxytetracyklinu



Sumární vzorec: C₂₂H₂₄N₂O₉

Chemický název: (4S,4aR,5S,5aR,6S,12aS)-4-(dimethylamino)-3,5,6,10,12,12a-hexahydroxy-6-methyl-1,11-dioxo-1,4,4a,5,5a,6,11,12a-oktahydrotetracen-2-karboxamid

CAS: 79-57-2

Molární hmotnost: 460,434 g/mol

pK_a: 9,1 (dimethylaminoskupina)

log P: -1,3

[47]

Fyzikální a chemické vlastnosti:

Oxytetracyklin je žlutý krystalický prášek, který je na vzduchu stabilní, ale na přímém slunečním světle se rozkládá. V roztocích pod pH 2 ztrácí svou biologickou aktivitu, v alkalických roztocích se rozkládá. Hydrochlorid je mírně hygroskopický. Oxytetracyklin se velmi těžce rozpouští ve vodě, dobře se rozpouští v kyselině dusičné a zředěných hydroxidech. Hydrochlorid je snadno rozpustný ve vodě, mírně rozpustný v ethanolu 96%. Teplota tání oxytetracyklinu je 183°C [8], [51].

Oxytetracyklin má hodnotu pK_a 9,1, log P -1,3 [47].

Farmakologické vlastnosti:

Farmakoterapeutická skupina: tetracykliny

ATC skupina: J01AA06 [48]

Oxytetracyklin je bakteriostatické antibiotikum ze skupiny tetracyklinů. Vniká do bakterií aktivním transportním systémem a jednoduchou difúzí. Oxytetracyklin má široké spektrum účinku zahrnující aerobní i anaerobní G⁺ a G⁻ bakterie, ale i mykoplazmata [48].

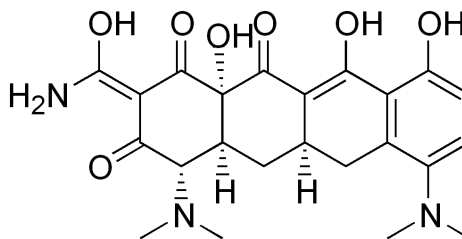
Enterální resorpce oxytetracyklinu se pohybuje okolo 60%. Snadno vytváří komplexy s dvoumocnými ionty a na základě těchto svých komplexotvorných vlastností se kumuluje ve tkáních s bohatým obsahem vápníku, např. v kostech. Tyto komplexy již postrádají antibakteriální aktivitu. Eliminační poločas oxytetracyklinu je přibližně 9 hodin a vylučuje se ledvinami i žlučí v bakteriostaticky účinných koncentracích. Prostupuje placentou a i do likvoru [44].

Terapeutické indikace:

Oxytetracyklin je určen k terapii infekčních onemocnění způsobených G⁺ a G⁻ mikroorganismy zahrnující *Mycoplasma pneumoniae*, *Pasteurella pestis*, *Escherichia coli*, *Haemophilus influenzae* a *Diplococcus pneumoniae*. Může být indikován i pro léčbu akné způsobené původcem *Propionibacterium acnes*. Oxytetracyklin je užíván v humánní i veterinární medicíně [47], [51].

Minocyklin

Obrázek 15 – strukturní vzorec minocyklinu



Sumární vzorec: C₂₃H₂₇N₃O₇

Chemický název: (2E,4S,4aS,5aR,12aS)-2-[amino(hydroxy)methyliden]-4,7-bis(dimethylamino)-10,11,12a-trihydroxy-1,2,3,4,4a,5,5a,6,12,12a-dekahydrotetracen-1,3,12-trion

CAS: 10118-90-8

Molární hmotnost: 457,477 g/mol

pK_a: 7,83

log P: 0,5

[47]

Fyzikální a chemické vlastnosti:

Minocyklin je žlutý krystalický prášek. Ve formě hydrochloridu dihydrátu se vyznačuje hygroskopickými vlastnostmi. V této formě je mírně rozpustný ve vodě, těžce rozpustný v ethanolu 96%. Rozpouští se v roztocích alkalických hydroxidů a uhličitánů [8].

Hodnota pK_a minocyklinu je 7,83, log P 0,5 [47].

Farmakologické vlastnosti:

Farmakoterapeutická skupina: tetracykliny

ATC skupina: J01AA08 [48]

Minocyklin je polosyntetické tetracyklinové antibiotikum, jež je hydrofobnější než původní tetracykliny a díky čemuž se vyznačuje i delší dobou účinku. Oproti ostatním zástupcům tetracyklinů má dále i širší spektrum účinku. Z důvodu nežádoucích účinků je však minocyklin určen jen ke krátkodobé profylaxi. Minocyklin se vyznačuje i protizánětlivým působením a pravděpodobně i

neuroprotektivním účinkem u neurodegenerativních onemocnění, jak ukazují výsledky posledních studií [47], [51], [54].

Biologická dostupnost minocyklinu po perorálním podání je kolem 100%. Na plazmatické bílkoviny se váže z 75%, dobře proniká do tkání a tělních dutin. Metabolizován je v játrech. Vylučován je žlučí i močí, kde dosahuje bakteriostaticky účinných koncentrací. Biologický poločas minocyklinu je 11-22 hodin [47].

Terapeutické indikace:

Minocyklin se užívá k léčení infekcí vyvolaných původci citlivými na minocyklin a způsobující zejména kožní infekce (akne vulgaris), infekce dýchacích cest, záněty vedlejších nosních dutin, záněty ucha, infekce močového ústrojí, akutní prostatitidu, infekce žlučníku a žlučových cest, oční infekce (chlamydiová konjunktivitida, trachom), Lymfskou nemoc [55].

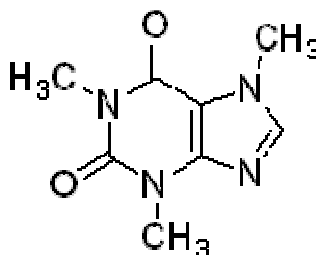
3.2.5 DERIVÁTY METHYLYXANTINU

Deriváty methylxantinu jsou methylované deriváty xantinu (2,6-dioxypurin), které se řadí do skupiny purinových alkaloidů zahrnující farmaceuticky významné látky, jako jsou kofein, theofylin, theobromin. Deriváty methylxantinu jsou dusíkaté sloučeniny převážně bazického charakteru.

Methylxantiny jsou nejdůležitější skupinou analeptik, látek s centrálně stimulačním účinkem působících na oběhové a dýchací ústrojí. Ovlivňují stimulaci CNS, uvolnění hladkého svalstva především plic a cév a stimulaci sekrece různých tkání. Na organismus působí pravděpodobně prostřednictvím neselektivní inhibice adenosinových receptorů. Další možností jejich působení je neselektivní inhibice fosfodiesterázy, která aktivuje dekompozici 3',5'-cAMP [56], [57].

Kofein

Obrázek 16 – strukturní vzorec kofeinu



Sumární vzorec: C₈H₁₀N₄O₂

Chemický název: 1,3,7-trimethyl-2,3,6,7-tetrahydro-1H-purin-2,6-dion

CAS: 58-08-2

Molární hmotnost: 194,19 g/mol

pK_a: 10,4

log P: -0,5

[47]

Fyzikální a chemické vlastnosti:

Kofein je bílý či téměř bílý krystalický prášek nebo je vzhledu hedvábných bílých nebo téměř bílých krystalů. Mírně se rozpouští ve vodě, snadno se rozpouští ve vroucí vodě. Je těžce rozpustný v ethanolu 96%. Rozpouští se v koncentrovaných

roztocích alkalických benzoanů a salicylanů. Snadno sublimuje. Teplota tání kofeinu činí 238°C [8], [47].

Hodnota pK_a kofeinu je 10,4, log P je -0,5 [47].

Farmakologické vlastnosti:

Farmakoterapeutická skupina: psychostimulans ze skupiny derivátů xantinu

ATC skupina: N06BC01 [48]

Kofein má z methylxantinů nejsilnější psychoanaleptický účinek. Působí přednostně na mozkovou kůru. Kofein navíc povzbuzuje srdeční činnost a má vasodilatační účinek. Ve vztahu k srdci zlepšuje schopnost kontrakcí srdečního svalstva a rozšiřuje srdeční věnčité tepny. Stimuluje funkci plic, a tak mírní projevy bronchiálního astmatu. Na druhou stranu zvyšuje dechovou frekvenci. Kofein také dočasně zvyšuje glykogenolýzu a lipolýzu organismu. Má tedy i dočasný anorektický účinek. Kofein je součástí analgetických směsí, kde podporuje účinek analgetik. Diuretický účinek je oproti theofylinu méně vyznačen [44], [51].

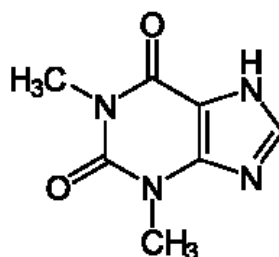
Biologická dostupnost je téměř 100%. Biotransformace probíhá v játrech a to prostřednictvím cytochromu P450. Vylučován je močí. Biologický poločas se pohybuje u dospělých jedinců od 3 do 7 hodin [47].

Terapeutické indikace:

Kofein se jako léčivo používá pro překonání stavů únavy. Dále je součástí kompozitních analgetických přípravků, kde doplňuje účinek ostatních účinných složek [44].

Theofylin

Obrázek 17 – strukturní vzorec theofylinu



Sumární vzorec: C₇H₈N₄O₂

Chemický název: 1,3-dimethyl-2,3,6,7-tetrahydro-1H-purin-2,6-dion

CAS: 58-55-9

Molární hmotnost: 180,164 g/mol

pK_a: 8,81

log P: -0,8

[47]

Fyzikální a chemické vlastnosti:

Theofylin je bílý nebo téměř bílý krystalický prášek, který je těžce rozpustný ve vodě a mírně rozpustný v bezvodém ethanolu. Rozpouští se v roztocích alkalických hydroxidů, v amoniaku a v minerálních kyselinách. Theofylin taje při teplotě 272°C [8], [47].

Theofylin má hodnotu pK_a 8,81 a log P -0,8 [47].

Farmakologické vlastnosti:

Farmakoterapeutická skupina: xantiny

ATC skupina: R03DA04 [48]

Theofylin se strukturálně i farmakologicky podobá kofeinu. Působí stimulačně na dechové centrum, dále se prezentuje účinkem vasodilatačním, bronchodilatačním a mírně diuretickým. Používá se při terapii respiračních onemocnění, jako jsou astma bronchiale a CHOPN, kde se prezentuje nejen svým aktivně bronchodilatačním efektem, ale i určitým protizánětlivým účinkem na bronchiální sliznici. Nevýhodou je však skutečnost, že ve vysokých dávkách může způsobovat signifikantní nežádoucí účinky na CNS a srdce, kterým se lze všeobecně

vyhnout přiměřeným dávkováním a monitorováním. Theofylin je látka s úzkým terapeutickým oknem, kdy účinná plazmatická koncentrace představuje 10-15 µg/ml [44], [49], [51].

Theofylin se po perorálním podání téměř kompletně vstřebává. 90% podané dávky se metabolizuje v játrech prostřednictvím cytochromu P450. Plazmatický poločas je 8 hodin. Vylučuje se převážně ledvinami, a to více jak z 10% v nezměněné podobě. Prostupuje placentou, do mateřského mléka a do CNS [47], [48].

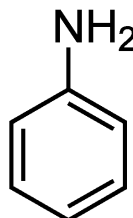
Terapeutické indikace:

Theofylin je používán jako bronchodilatans pro léčbu nebo prevenci bronchiálního astmatu s přetrvávající či paroxysmální dušností a u spastických forem chronických obstrukčních bronchopneumopathií [48].

3.2.6 ANILIN

Anilin

Obrázek 18 – strukturní vzorec anilinu



Sumární vzorec: C₆H₇N

Chemický název: anilin

CAS: 62-53-3

Molární hmotnost: 93,13 g/mol

pK_a: 4.63 (pK_b = 9,3)

log P: 0,9

[47]

Fyzikální a chemické vlastnosti:

Anilin, synonymum benzamin, je bezbarvá nebo slabě nažloutlá kapalina, dobře rozpustná ve vodě, mísitelná s ethanolem 96%. Relativní hustota při 20°C činí asi 1,02. Teplota tání je -6°C, teplota varu anilinu se pohybuje od 183°C do 186°C [8].

Hodnota pK_a anilinu je 4,63, log P je 0,9 [47].

Farmakologické vlastnosti:

Anilin je pro lidský organismus značně toxickou látkou. Tato látka byla vybrána k testovanému souboru látek jako příklad jednoduché aromatické bazické sloučeniny.

3.2.7 Shrnutí fyzikálních a chemických vlastností testovaných látek

Tabulka 1 – shrnutí vybraných fyzikálních a chemických vlastností testovaných látek

		pK _a	log P	M [g/mol]
β-sympatolytika	acebutolol	9,40	1,7	336,426
	bopindolol	-	4,7	380,480
Neuroleptika	thioridazin	9,50	5,9	370,577
	perphenazin	7,94	3,9	403,970
Lokální anestetika	lidokain	7,86	2,1	234,340
	prilokain	7,89	2,1	220,310
Tetracykliny	oxytetracyklin	9,10	-1,3	460,434
	minocyklin	7,83	0,5	457,477
Deriváty methylxantinu	kofein	10,40	-0,5	194,190
	theofylin	8,81	-0,8	180,164
Anilin	anilin	4,63	0,9	93,130

4 Experimentální část

4.1 Materiály a pomůcky

4.1.1 Standardy, vzorky a chemikálie

Acebutolol (Sigma Aldrich Chemie, Germany)

Bopindolol (Sigma Aldrich Chemie, Germany)

Thioridazin (Sigma Aldrich Chemie, Germany)

Perphenazin (Sigma Aldrich Chemie, Germany)

Lidokain (Sigma Aldrich Chemie, Germany)

Prilokain (Sigma Aldrich Chemie, Germany)

Oxytetracyklin (Sigma Aldrich Chemie, Germany)

Minocyklin (Sigma Aldrich Chemie, Germany)

Kofein (Sigma Aldrich Chemie, Germany)

Theofylin (Sigma Aldrich Chemie, Germany)

Anilin (Lachema Brno, ČR)

Methanol (Sigma Aldrich Chemie, Germany)

Destilovaná voda

Amoniak 25% (Sigma Aldrich Chemie, Germany)

Kyselina fosforečná 85% (Sigma Aldrich Chemie, Germany)

Kyselina octová (Sigma Aldrich Chemie, Germany)

4.1.2 Přístroje, podmínky separace

Chromatografický systém LC Shimadzu Prominence

<i>Chromatograf:</i>	3xpumpa LC-20AD
	Degasser DGU-20A5
	Autosampler SIL-20AC
	Termostat CTO-20AC
	Komunikační modul CBM-20A
<i>Detektor:</i>	DAD detektor SPD-M20A

<i>Kolona:</i>	Discovery HS F5, 100x4 mm, 3 µm částice (Sigma Aldrich)
<i>Dávkování:</i>	15 µl
<i>Detekce:</i>	zvolena podle absorpčního maxima testované látky
<i>Mobilní fáze:</i>	methanol - voda methanol - kyselina fosforečná 0,085% methanol - acetátový pufr pH 7
<i>Typ eluce:</i>	isokratická eluce v různých testovaných poměrech organické a vodné složky
<i>Průtoková rychlost:</i>	2,0 – 4,0 ml/min
<i>Teplota:</i>	60°C
<i>Vyhodnocení:</i>	chromatografický software Shimadzu LC Solution

Ultrazvuková lázeň: Bandelin SONOREX RK100, Berlín, SRN

Analytické váhy: Sartorius 2004 MP, SRN

pH metr: Hanna instruments

4.2 Příprava roztoků standardů testovaných skupin látek

Každá jednotlivá uvedená navážka byla rozpuštěna v acetonitrilu a doplněna acetonitrilem po rysku v 25 ml odměrné baňce. Odměrné baňky s roztoky byly umístěny na 1 minutu do ultrazvuku. Tyto roztoky byly dávkovány autosamplerm přímo na kolonu.

Navážky látek:

Acebutolol	Bopindolol
m = 0,0093 g	m = 0,0092 g

Thioridazin	Perphenazin
m = 0,0104 g	m = 0,0103 g

Lidokain

m = 0,0098 g

Prilokain

m = 0,0097 g

Oxytetracyklin

m = 0,0095 g

Minocyklin

m = 0,0093 g

Kofein

m = 0,0095 g

Theofylin

m = 0,0097 g

Anilin

m = 0,0092 g

4.3 Příprava mobilní fáze

4.3.1 Mobilní fáze pro sérii analýz č. 1: Methanol – voda

Jako vodná fáze mobilní fáze byla použita destilovaná voda H₂O, která byla přefiltrována za pomoci vakuové filtrace z důvodu odstranění možných nečistot.

4.3.2 Mobilní fáze pro sérii analýz č. 2: Methanol –

kyselina fosforečná H₃PO₄ 0,085%

Vodná fáze mobilní fáze obsahující kyselinu fosforečnou 0,085% byla připravena smísením 1 ml kyseliny fosforečné 85% s 1000 ml čištěné vody v kádince a následným přefiltrováním za pomoci vakuové filtrace z důvodu odstranění možných nečistot.

4.3.3 Mobilní fáze pro sérii analýz č. 3: Methanol –

acetátový pufr pH 7

Vodná fáze mobilní fáze obsahující acetátový pufr byla připravena smísením 570,00 µl kyseliny octové a 1000 ml destilované vody v kádince, upravením pH

vodné fáze na pH metru pomocí amoniaku 25% na pH 7 za stálého míchání magnetickým míchadlem a následným přefiltrováním za pomoci vakuové filtrace z důvodu odstranění možných nečistot.

4.4 Popis práce

Na koloně Discovery HS F5 byly sledovány retenční časy testovaných skupin látek v závislosti na změnách složení mobilní fáze při teplotě 60 °C.

Při sledování „U“– profilů na Discovery HS F5 koloně byly použity tři různé mobilní fáze. Ve všech byl obsažen methanol, rozdíl byl ve složení vodné fáze, která udávala pH mobilní fáze. Všechny retenční časy látek byly přepočítány na jednotný průtok 2,0 ml/min. Při jednotlivých měřeních bylo za pomoci chromatografického softwaru LC Solution a směšovacího zařízení HPLC měněno procentuální zastoupení methanolu a vodné fáze v mobilní fázi.

Nebyla-li testovaná látka z kolony HS F5 při 50% koncentraci methanolu v mobilní fázi eluována do 60 minut, byla analýza zastavena a v sérii měření s danou mobilní fází se již nepokračovalo.

4.5 Výsledky analýz a diskuse

4.5.1 Testovaná skupina látek č. 1: β -SYMPATOLYTIKA

Série analýz č. 1: Mobilní fáze: Methanol – H₂O

Z důvodu příliš vysoké retence látek nebyly získány žádné výsledky, které by odpovídaly retenčním profilům ve tvaru „U“.

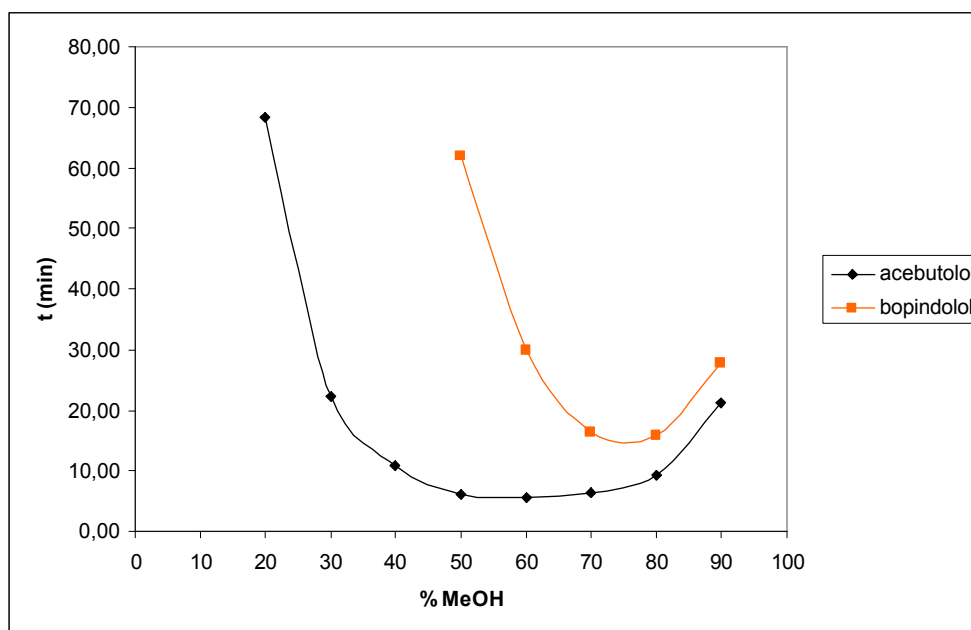
Série analýz č. 2: Mobilní fáze: Methanol – H₃PO₄ 0,085%

Tabulka 2, 3 – závislost retenčního času acebutololu a bopindololu na složení MF

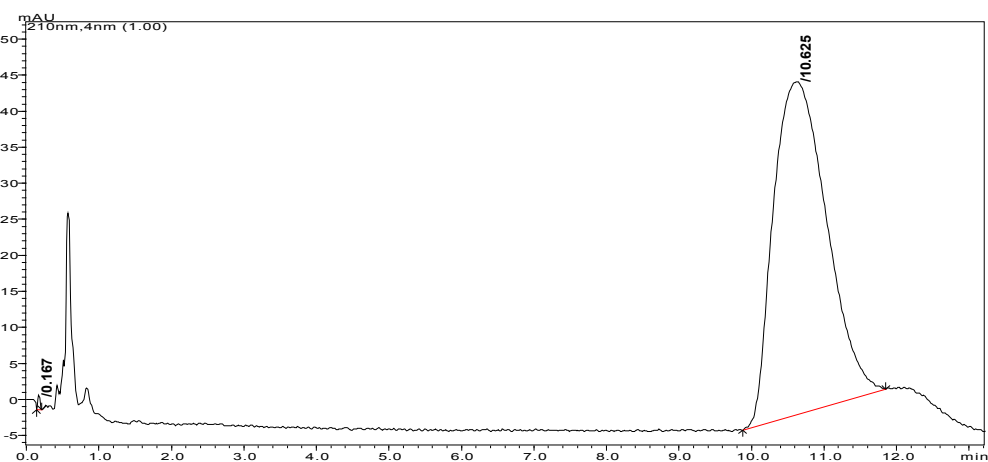
acebutolol	
MeOH(%)	t _r (min)
10	-
20	68,34
30	22,24
40	10,76
50	6,22
60	5,60
70	6,30
80	9,30
90	21,24

bopindolol	
MeOH(%)	t _r (min)
10	-
20	-
30	-
40	-
50	62,00
60	29,84
70	16,34
80	15,92
90	27,72

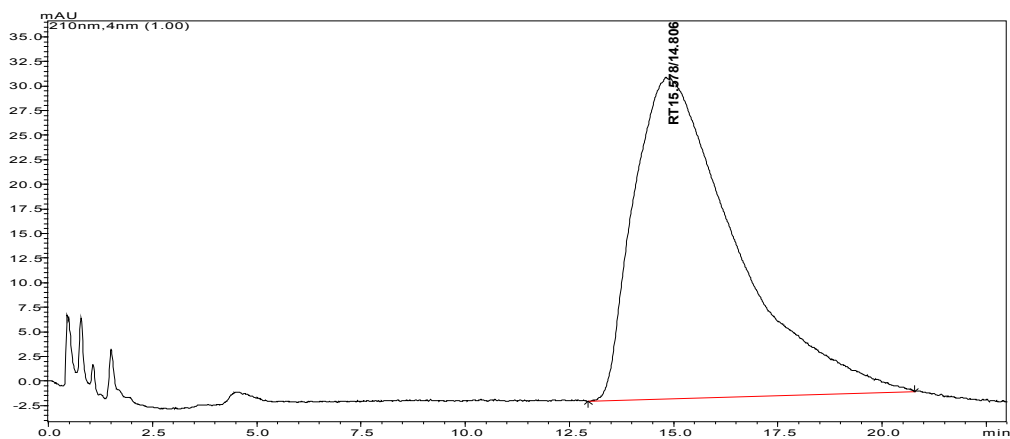
Obrázek 19 - retence acebutololu a bopindololu v závislosti na procentuálním zastoupení MeOH v MF



Obrázek 20 – chromatogram acebutololu při 90% zastoupení MeOH v MF, průtok 4 ml/min



Obrázek 21 – chromatogram bopindololu při 60% zastoupení MeOH v MF, průtok 4 ml/min



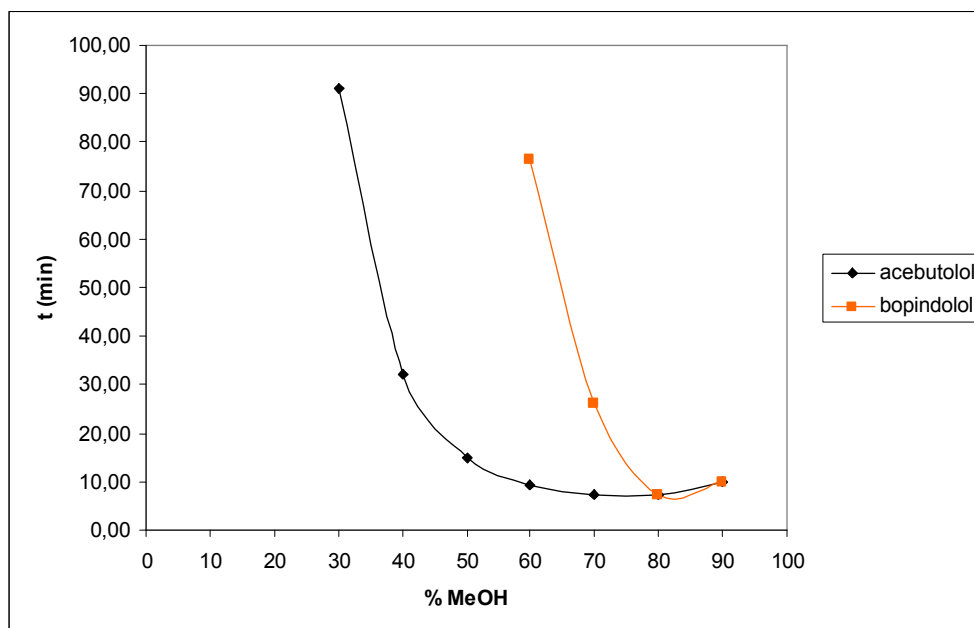
Série analýz č. 3: Mobilní fáze: Methanol – Acetátový pufr pH 7

Tabulka 4, 5 – závislost retenčního času acebutololu a bopindololu na složení MF

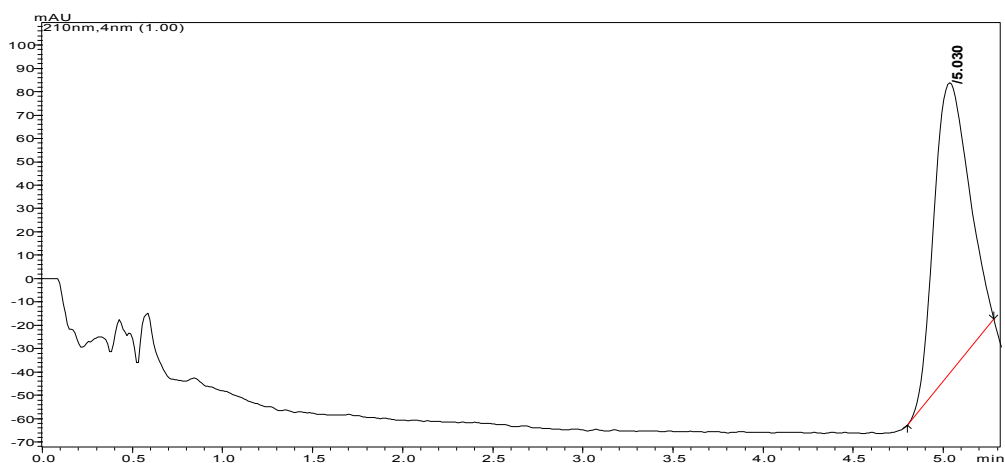
acebutolol	
MeOH(%)	t_r (min)
10	-
20	-
30	90,90
40	31,96
50	14,80
60	9,14
70	7,20
80	7,24
90	10,06

bopindolol	
MeOH(%)	t_r (min)
10	-
20	-
30	-
40	-
50	-
60	76,50
70	26,18
80	7,14
90	9,94

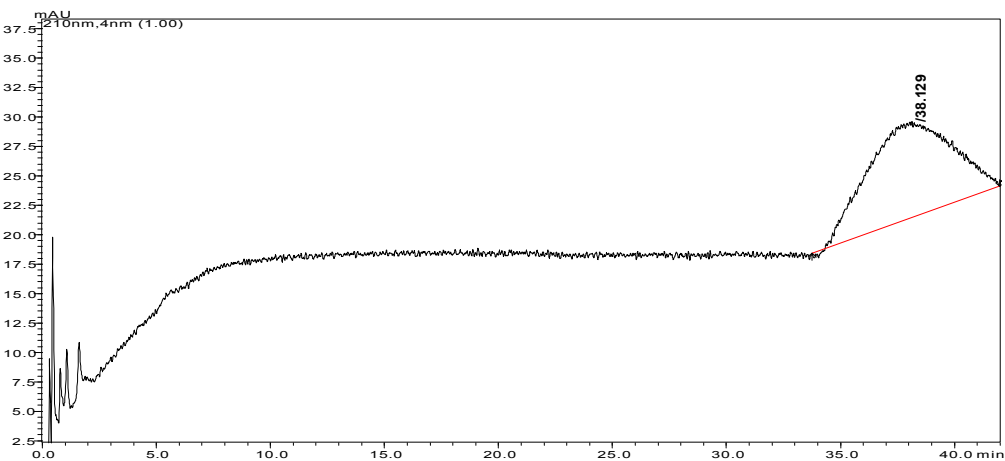
Obrázek 22 - retence acebutololu a bopindololu v závislosti na procentuálním zastoupení MeOH v MF



Obrázek 23 – chromatogram acebutololu při 90% zastoupení MeOH v MF, průtok 4 ml/min



Obrázek 24 – chromatogram bopindololu při 60% zastoupení MeOH v MF, průtok 4 ml/min



4.5.2 Testovaná skupina látek č. 2: NEUROLEPTIKA

Série analýz č. 1: Mobilní fáze: Methanol – H₂O

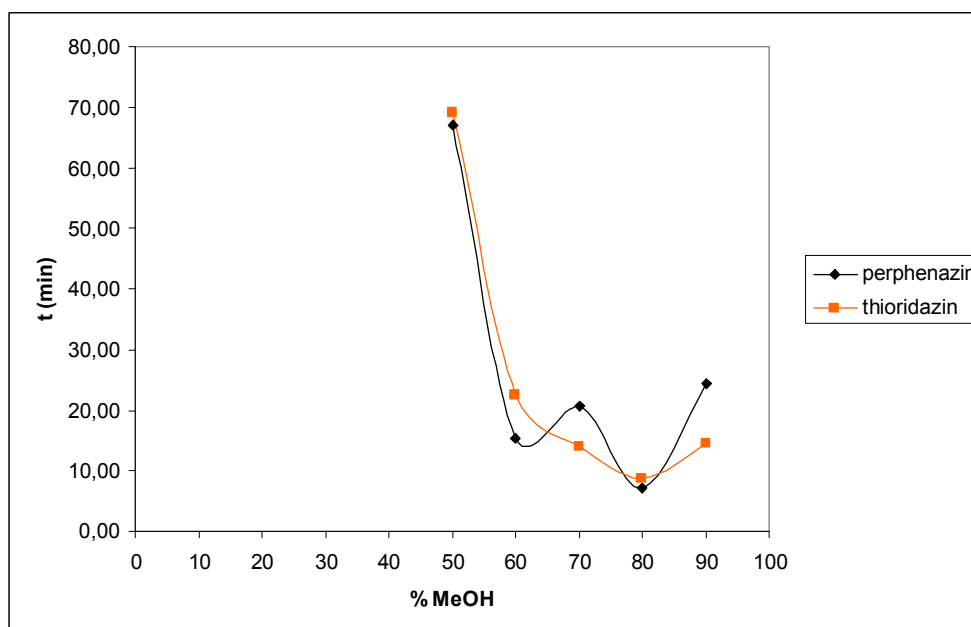
Z důvodu příliš vysoké retence látek nebyly získány žádné výsledky, které by odpovídaly retenčním profilům ve tvaru „U“.

Série analýz č. 2: Mobilní fáze: Methanol – H₃PO₄ 0,085%

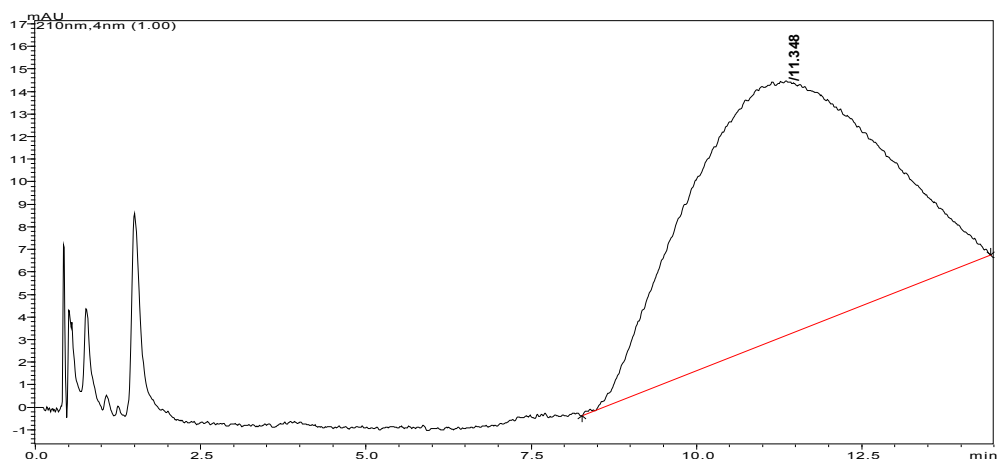
Tabulka 6, 7 - závislost retenčního času thioridazinu a perphenazinu na složení MF

thioridazin		perphenazin	
MeOH(%)	t _r (min)	MeOH(%)	t _r (min)
10	-	10	-
20	-	20	-
30	-	30	-
40	-	40	-
50	69,16	50	67,08
60	22,54	60	15,46
70	14,12	70	20,58
80	8,76	80	7,04
90	14,68	90	24,28

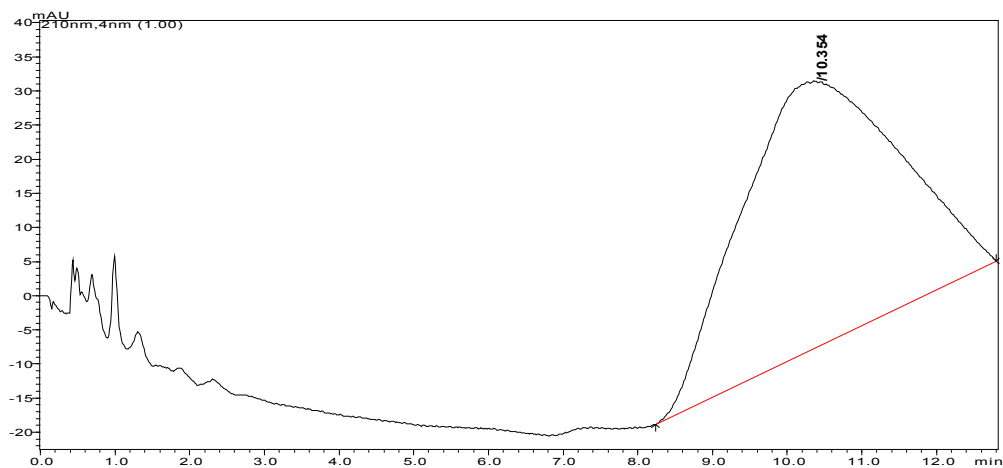
Obrázek 25 – retence thioridazinu a perphenazinu v závislosti na procentuálním zastoupení MeOH v MF



Obrázek 26 – chromatogram thioridazinu při 60% zastoupení MeOH v MF, průtok 4 ml/min



Obrázek 27 – chromatogram perphenazinu při 70% zastoupení MeOH v MF, průtok 4 ml/min



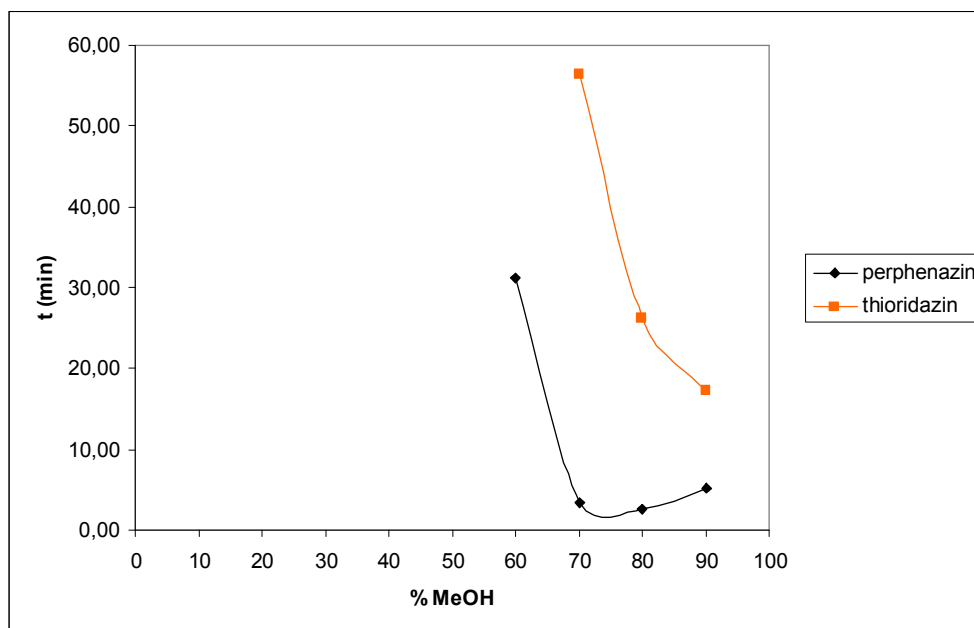
Série analýz č. 3: Mobilní fáze: Methanol – Acetátový pufr pH 7

Tabulka 8, 9 – závislost retenčního času thioridazinu a perphenazinu na složení MF

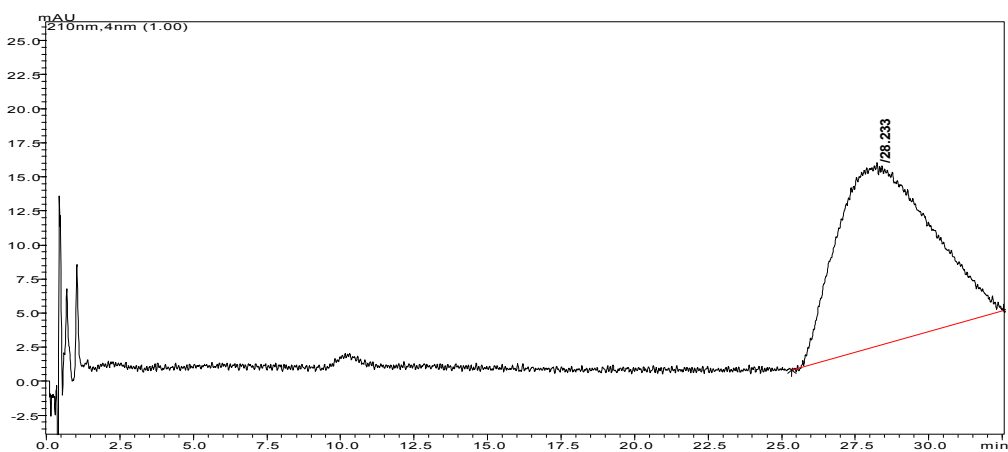
thioridazin	
MeOH(%)	t_r (min)
10	-
20	-
30	-
40	-
50	-
60	-
70	56,46
80	26,14
90	17,26

perphenazin	
MeOH(%)	t_r (min)
10	-
20	-
30	-
40	-
50	-
60	31,14
70	3,46
80	2,54
90	5,12

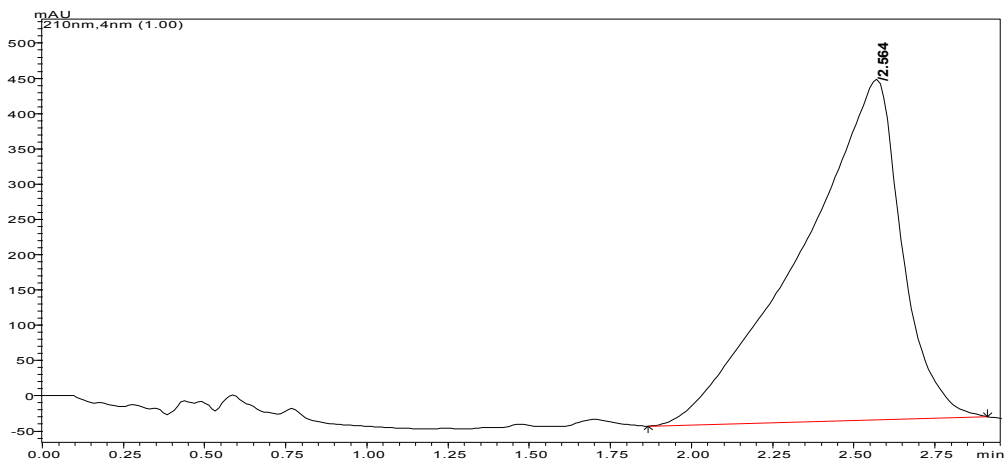
Obrázek 28 – retence thioridazinu a perphenazinu v závislosti na procentuálním zastoupení MeOH v MF



Obrázek 29 – chromatogram thioridazinu při 70% zastoupení MeOH v MF, průtok 4 ml/min



Obrázek 30 – chromatogram perphenazinu při 90% zastoupení MeOH v MF, průtok 4 ml/min



4.5.3 Testovaná skupina látek č. 3: LOKÁLNÍ ANESTETIKA

Série analýz č. 1: Mobilní fáze: Methanol – H₂O

Z důvodu příliš vysoké retence látek nebyly získány žádné výsledky, které by odpovídaly retenčním profilům ve tvaru „U“.

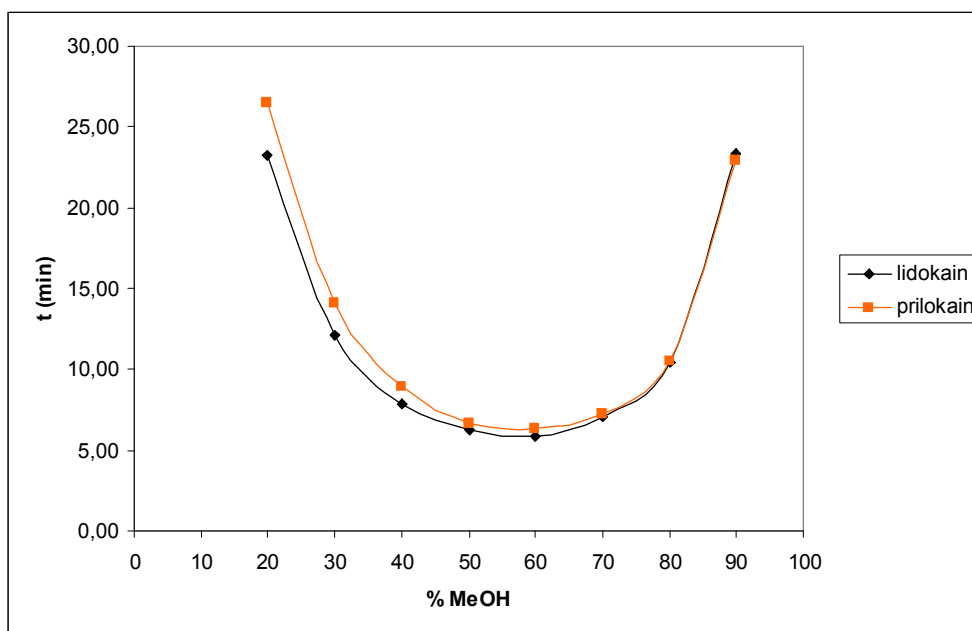
Série analýz č. 2: Mobilní fáze: Methanol – H₃PO₄ 0,085%

Tabulka 10, 11 – závislost retenčního času lidokainu a prilokainu na složení MF

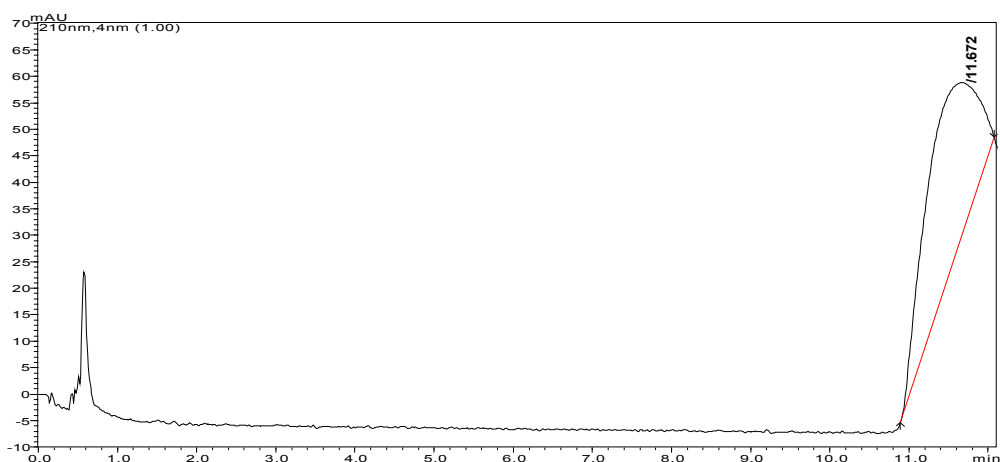
lidokain	
MeOH(%)	t _r (min)
10	-
20	23,20
30	12,12
40	7,86
50	6,22
60	5,88
70	7,04
80	10,44
90	23,34

prilokain	
MeOH(%)	t _r (min)
10	-
20	26,48
30	14,12
40	8,98
50	6,67
60	6,36
70	7,24
80	10,50
90	22,98

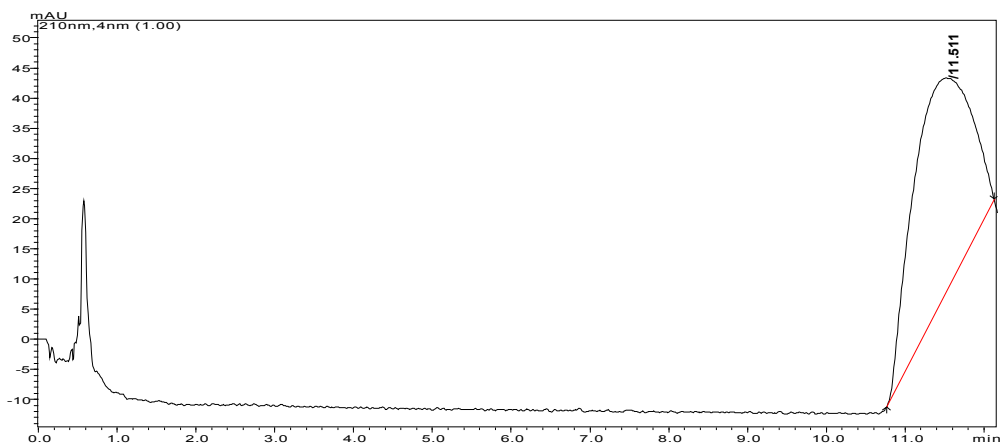
Obrázek 31 – retence lidokainu a prilokainu v závislosti na procentuálním zastoupení MeOH v MF



Obrázek 32 – chromatogram lidokainu při 90% zastoupení MeOH v MF, průtok 4 ml/min



Obrázek 33 – chromatogram prilokainu při 90% zastoupení MeOH v MF, průtok 4 ml/min



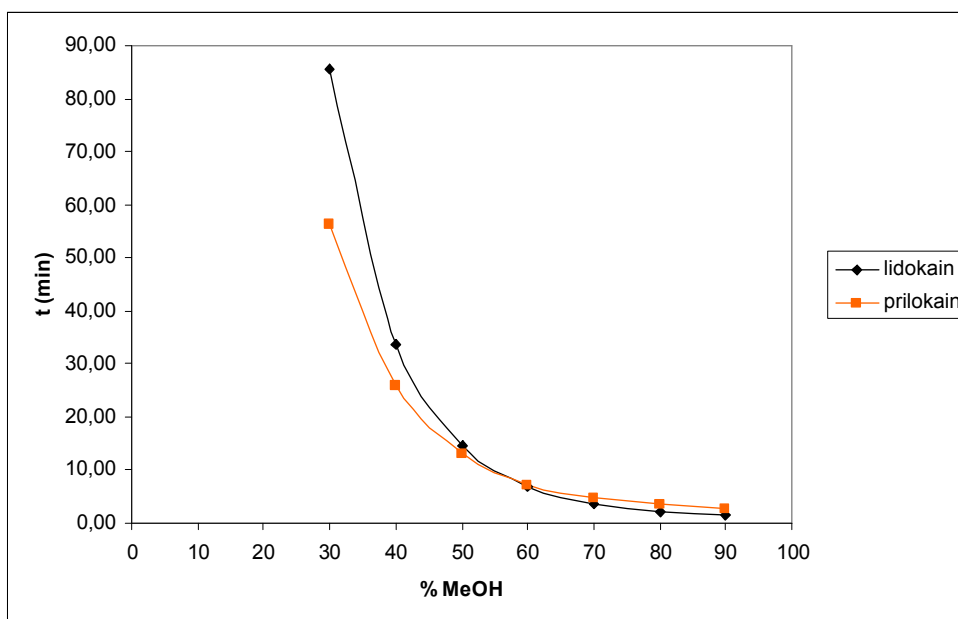
Série analýz č. 3: Mobilní fáze: Methanol – Acetátový pufr pH 7

Tabulka 12, 13 – závislost retenčního času lidokainu a prilokainu na složení MF

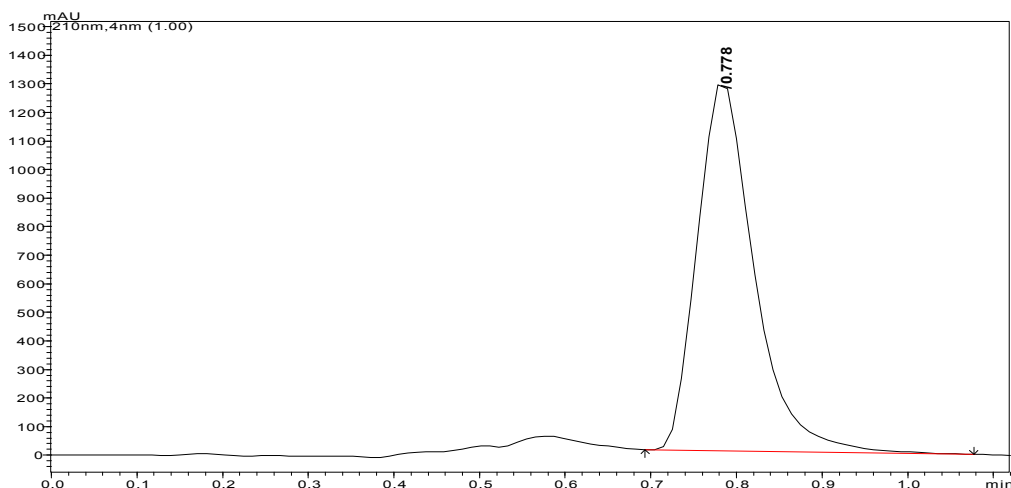
lidokain	
MeOH(%)	t_r (min)
10	-
20	-
30	85,50
40	33,58
50	14,48
60	6,88
70	3,70
80	2,18
90	1,54

prilokain	
MeOH(%)	t_r (min)
10	-
20	-
30	56,40
40	25,94
50	13,14
60	7,24
70	4,68
80	3,64
90	2,60

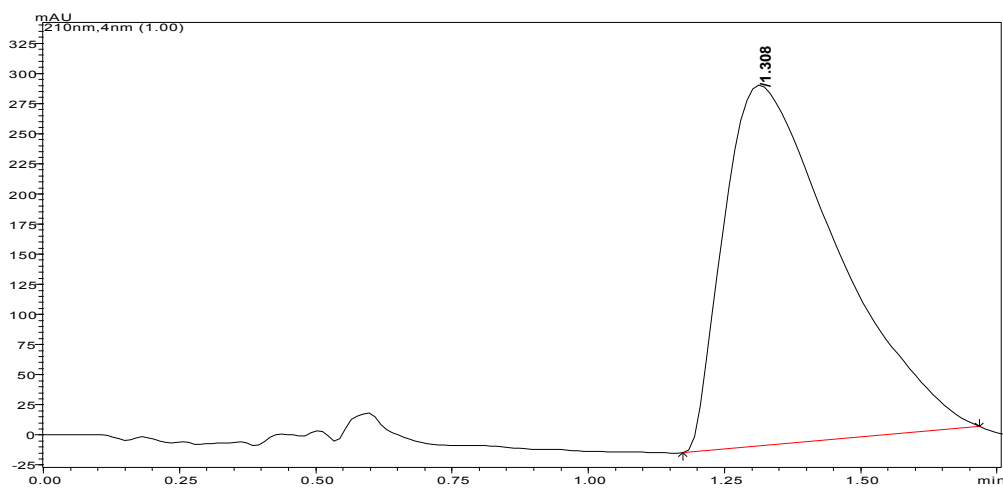
Obrázek 34 – retence lidokainu a prilokainu v závislosti na procentuálním zastoupení MeOH v MF



Obrázek 35 – chromatogram lidokainu při 90% zastoupení MeOH v MF, průtok 4 ml/min



Obrázek 36 – chromatogram prilokainu při 90% zastoupení MeOH v MF, průtok 4 ml/min



4.5.4 Testovaná skupina látek č. 4: TETRACYKLINOVÁ ANTIBIOTIKA

Série analýz č. 1: Mobilní fáze: Methanol – H₂O

Z důvodu příliš vysoké retence látek nebyly získány žádné výsledky, které by odpovídaly retenčním profilům ve tvaru „U“.

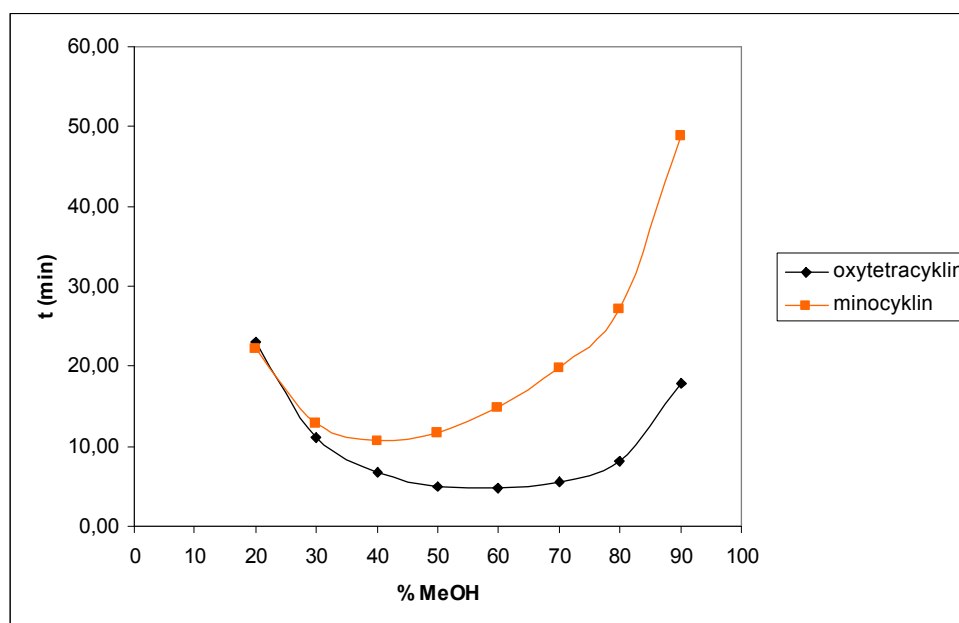
Série analýz č. 2: Mobilní fáze: Methanol – H₃PO₄ 0,085%

Tabulka 14, 15 – závislost retenčního času oxytetracyklinu a minocyklinu na složení MF

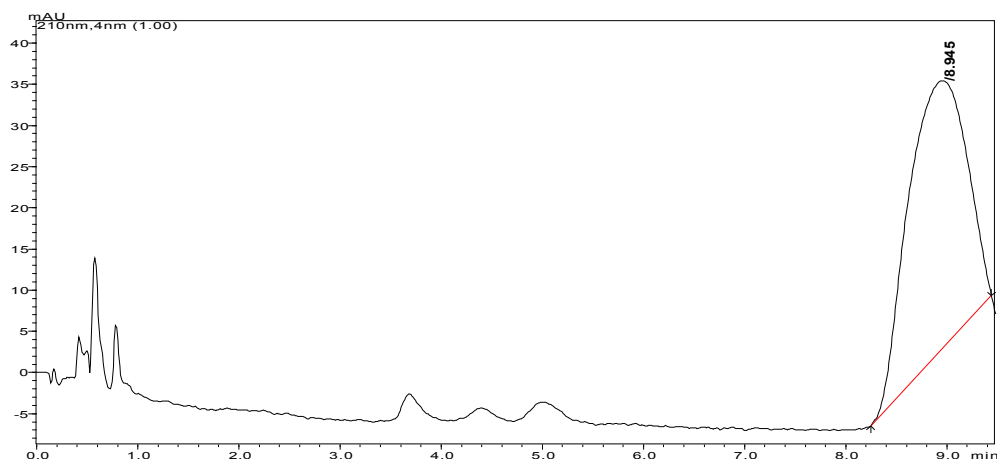
oxytetracyklin	
MeOH(%)	t _r (min)
10	-
20	23,00
30	11,06
40	6,68
50	4,88
60	4,74
70	5,50
80	8,18
90	17,90

minocyklin	
MeOH(%)	t _r (min)
10	-
20	22,26
30	12,92
40	10,78
50	11,64
60	14,98
70	19,94
80	27,14
90	48,88

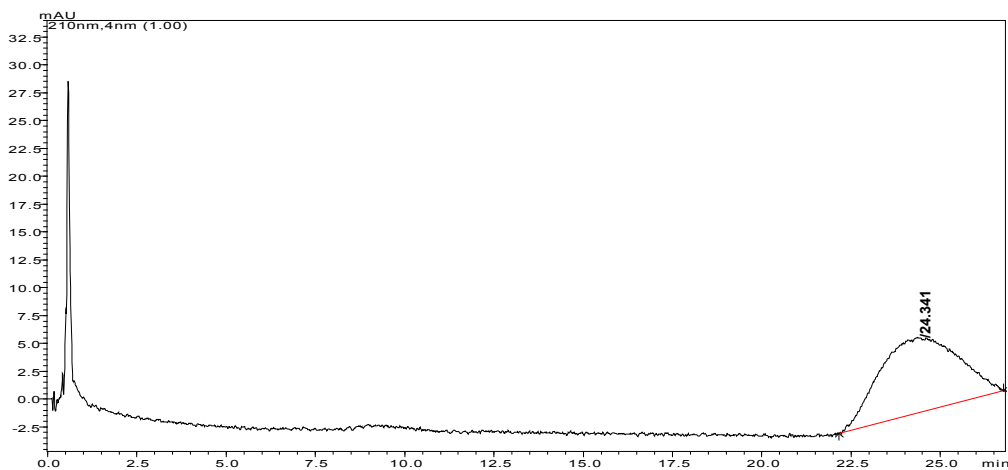
Obrázek 37 – retence oxytetracyklinu a minocyklinu v závislosti na procentuálním zastoupení MeOH v MF



Obrázek 38 – chromatogram oxytetracyklinu při 90% zastoupení MeOH v MF, průtok 4 ml/min



Obrázek 39 – chromatogram minocyklinu při 90% zastoupení MeOH v MF, průtok 4 ml/min



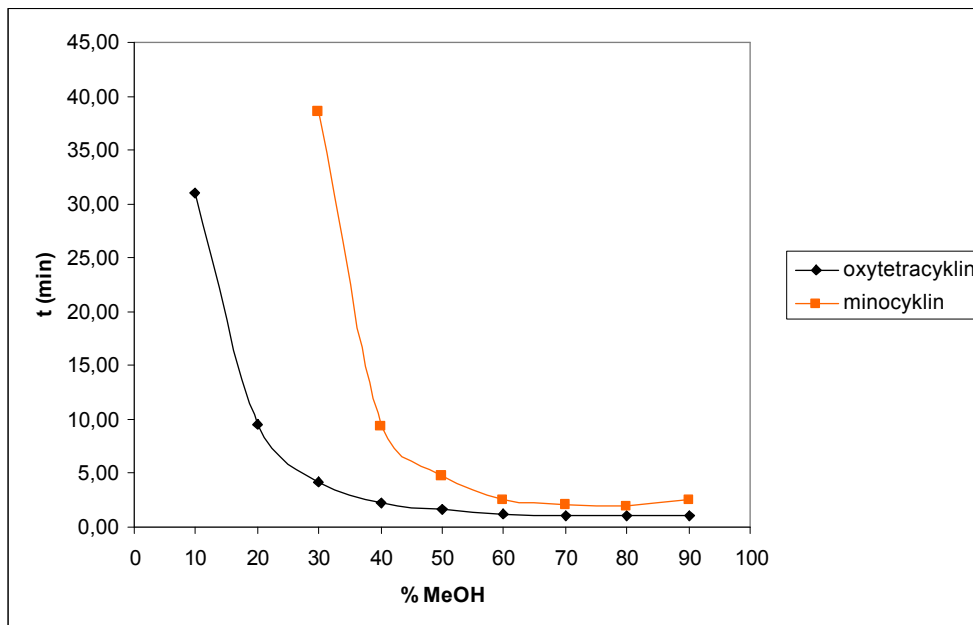
Série analýz č. 3: Mobilní fáze: Methanol – Acetátový pufr pH 7

Tabulka 16, 17– závislost retenčního času oxytetracyklinu a minocyklinu na složení MF

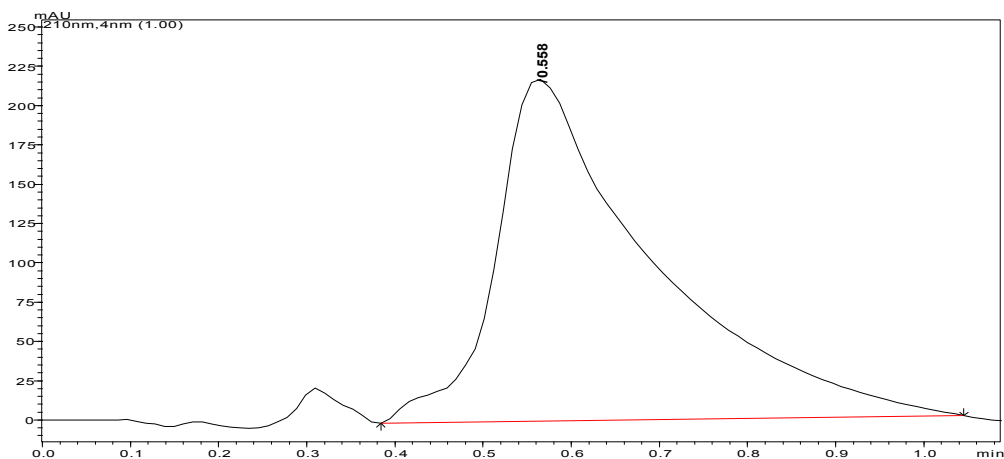
oxytetracyklin	
MeOH(%)	t_r (min)
10	30,98
20	9,54
30	4,20
40	2,28
50	1,58
60	1,24
70	1,10
80	1,08
90	1,10

minocyklin	
MeOH(%)	t_r (min)
10	-
20	-
30	38,52
40	9,40
50	4,76
60	2,60
70	2,02
80	2,00
90	2,58

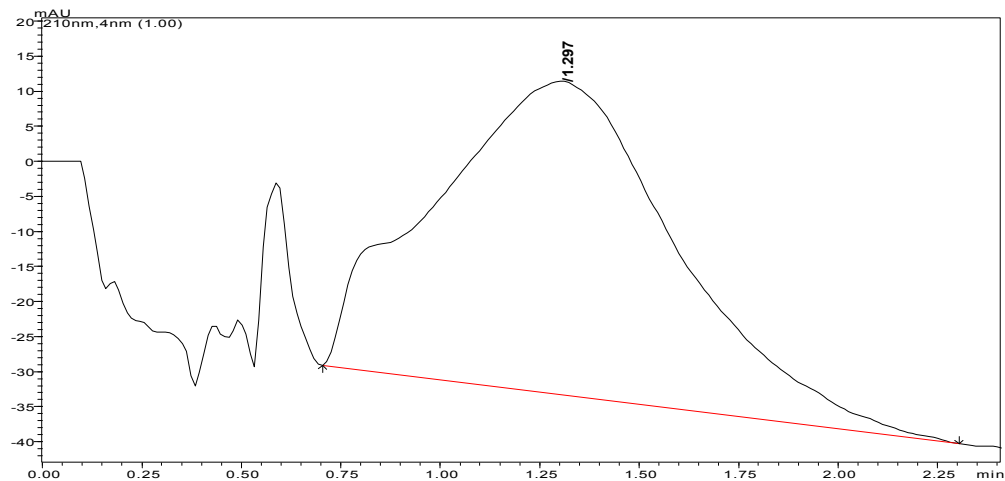
Obrázek 40 – retence oxytetracyklinu a minocyklinu v závislosti na procentuálním zastoupení MeOH v MF



Obrázek 41 - chromatogram oxytetracyklinu při 90% zastoupení MeOH v MF, průtok 4 ml/min



Obrázek 42 – chromatogram minocyklinu při 90% zastoupení MeOH v MF, průtok 4 ml/min



4.5.5 Testovaná skupina látek č. 5: DERIVÁTY METHYLYXANTINU

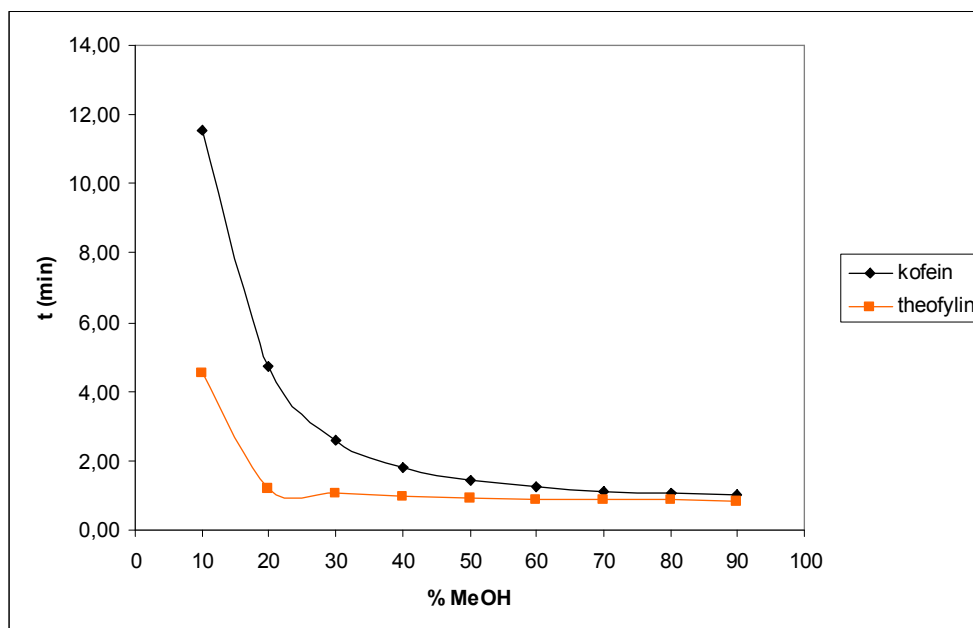
Série analýz č. 1: Mobilní fáze: Methanol – H₂O

Tabulka 18, 19 – závislost retenčního času kofeinu a theofylinu na složení MF

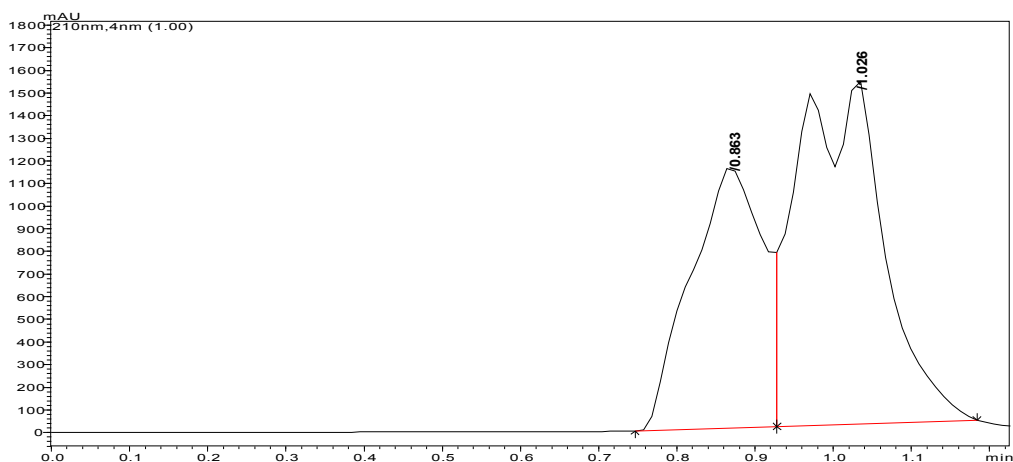
kofein	
MeOH(%)	t _r (min)
10	11,56
20	4,74
30	2,61
40	1,79
50	1,42
60	1,23
70	1,13
80	1,06
90	1,02

theofylin	
MeOH(%)	t _r (min)
10	4,56
20	1,21
30	1,08
40	0,98
50	0,93
60	0,90
70	0,88
80	0,86
90	0,84

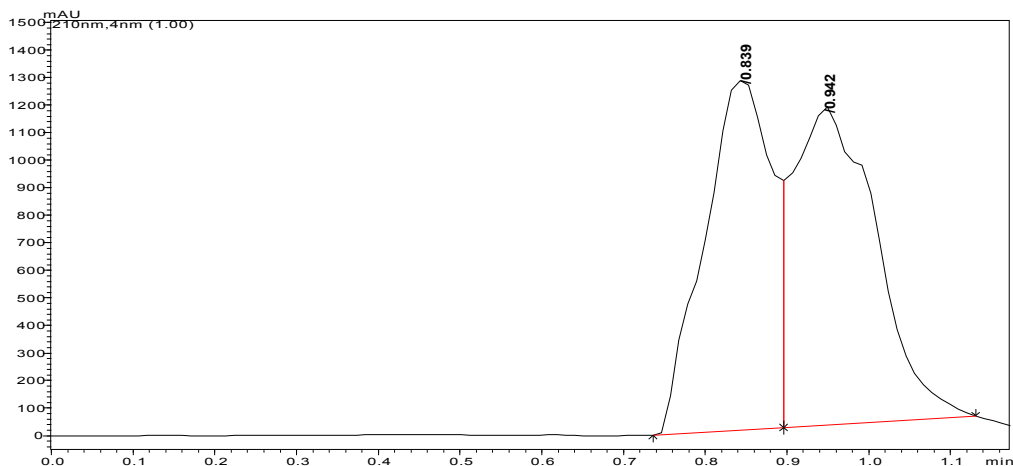
Obrázek 43 – retence kofeinu a theofylinu v závislosti na procentuálním zastoupení MeOH v MF



Obrázek 44 – chromatogram kofeinu při 90% zastoupení MeOH v MF, průtok 2 ml/min



Obrázek 45 – chromatogram theofylinu při 90% zastoupení MeOH v MF, průtok 2 ml/min



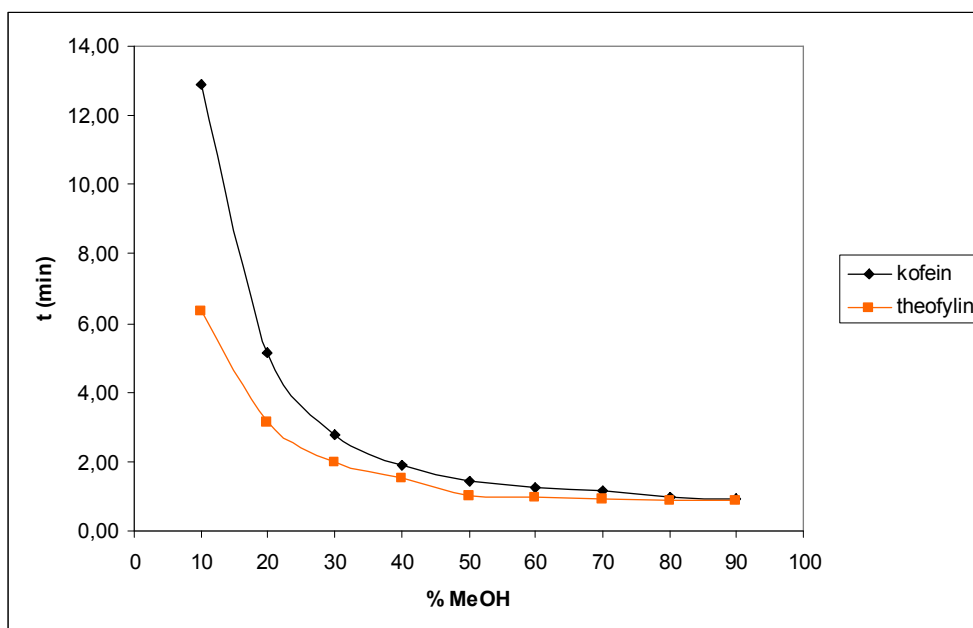
Série analýz č. 2: Mobilní fáze: Methanol – H₃PO₄ 0,085%

Tabulka 20, 21 – závislost retenčního času kofeinu a theofylinu na složení MF

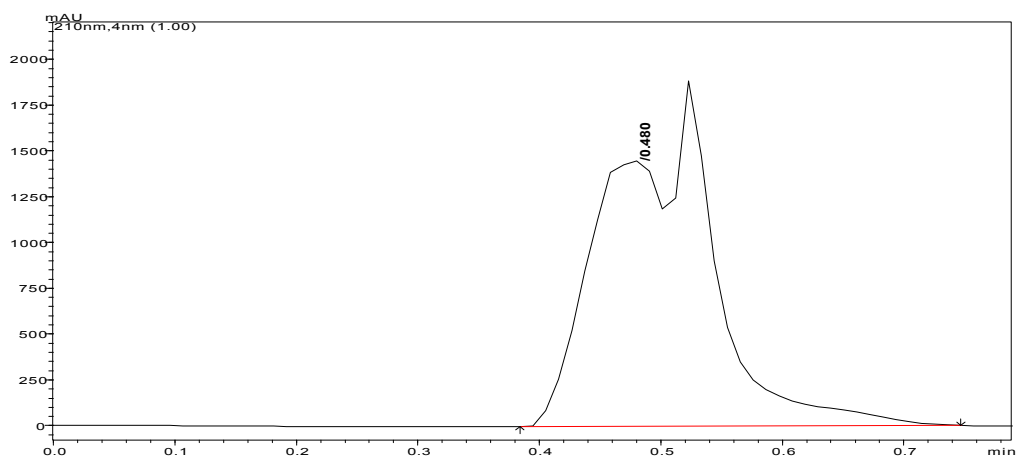
kofein	
MeOH(%)	t _r (min)
10	12,90
20	5,16
30	2,80
40	1,88
50	1,46
60	1,26
70	1,14
80	0,98
90	0,94

theofylin	
MeOH(%)	t _r (min)
10	6,36
20	3,14
30	2,00
40	1,52
50	1,00
60	0,96
70	0,94
80	0,88
90	0,86

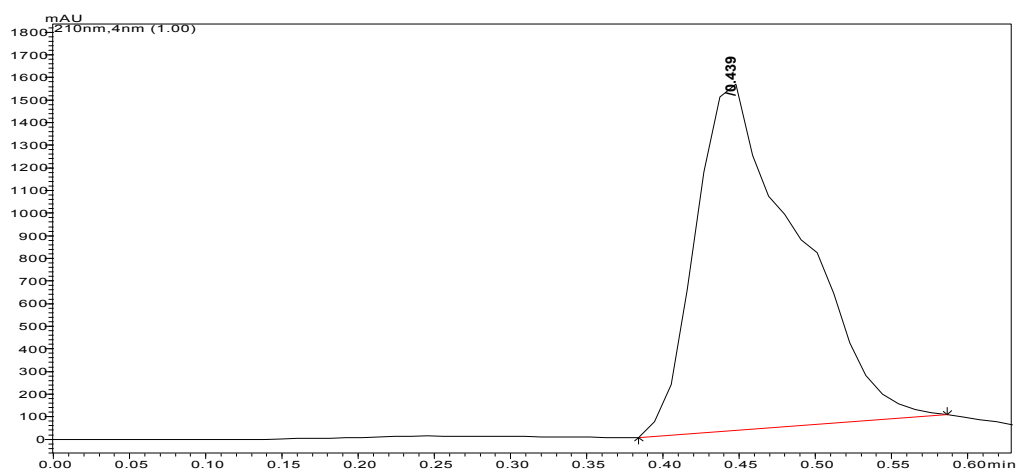
Obrázek 46 – závislost retence kofeinu a theofylinu na procentuálním zastoupení MeOH v MF



Obrázek 47 – chromatogram kofeinu při 90% zastoupení MeOH v MF, průtok 4 ml/min



Obrázek 48 – chromatogram theofylinu při 90% zastoupení MeOH v MF, průtok 4 ml/min



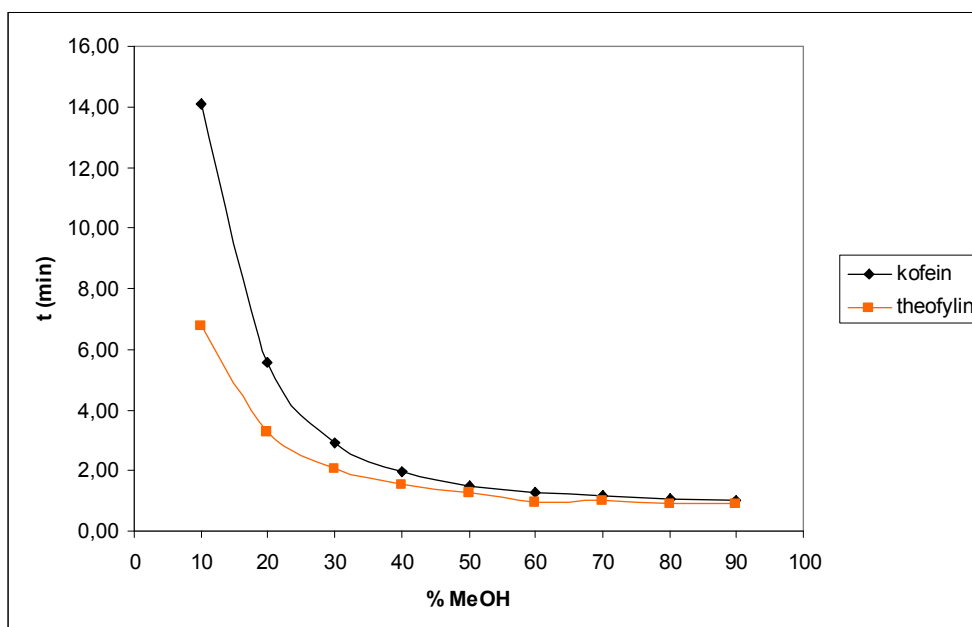
Série analýz č. 3: Mobilní fáze: Methanol – Acetátový pufr pH 7

Tabulka 22, 23 – závislost retenčního času kofeinu a theofylinu na složení MF

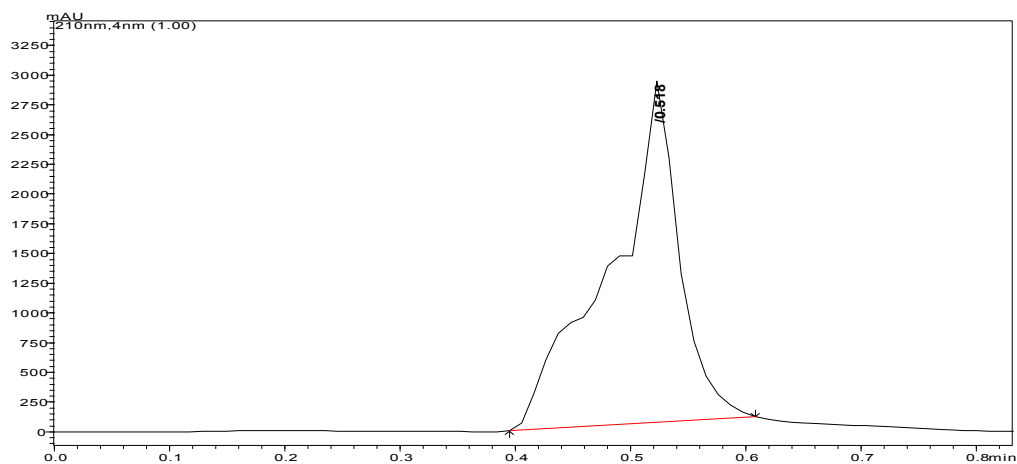
kofein	
MeOH(%)	t _r (min)
10	14,08
20	5,56
30	2,94
40	1,94
50	1,50
60	1,26
70	1,14
80	1,08
90	1,02

theofylin	
MeOH(%)	t _r (min)
10	6,76
20	3,28
30	2,06
40	1,54
50	1,28
60	0,94
70	1,00
80	0,90
90	0,92

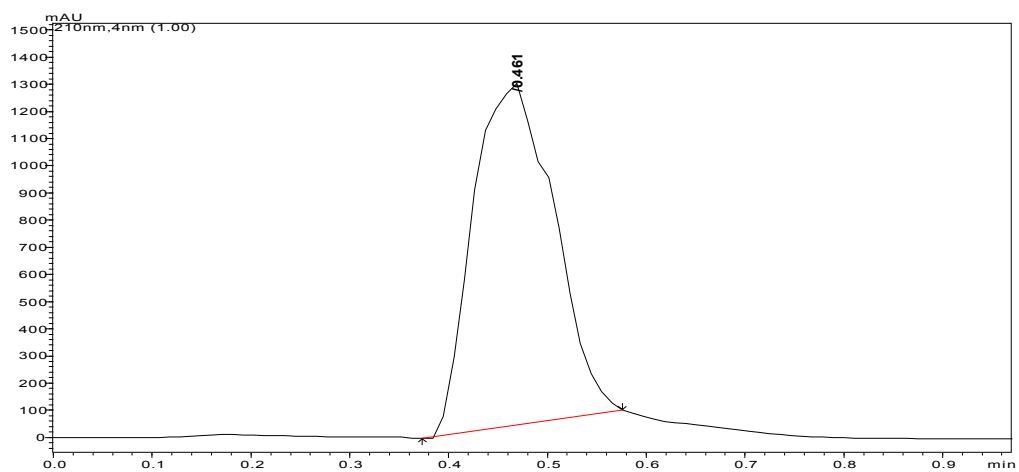
Obrázek 49 – retence kofeinu a theofylinu v závislosti na procentuálním zastoupení MeOH v MF



Obrázek 50 – chromatogram kofeinu při 90% zastoupení MeOH v MF, průtok 4 ml/min



Obrázek 51 – chromatogram theofylinu při 90% zastoupení MeOH v MF, průtok 4 ml/min



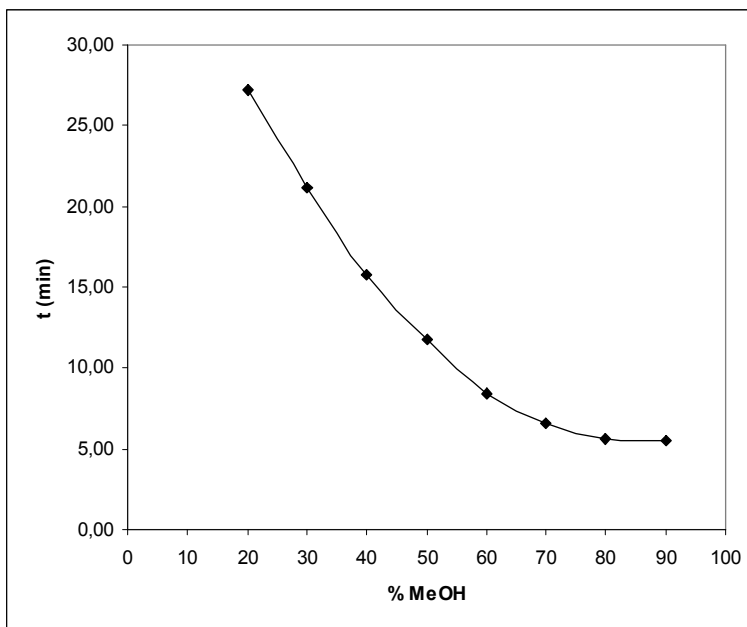
4.5.6 Testovaná skupina látek č. 6: ANILIN

Série analýz č. 1: Mobilní fáze: Methanol – H₂O

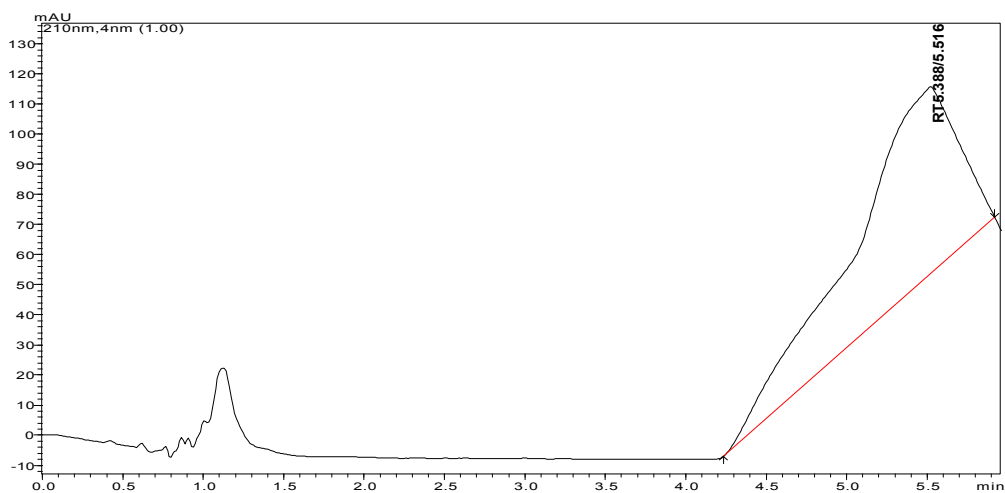
Tabulka 24 – závislost retenčního času anilinu na složení MF

Obrázek 52 – retence anilinu v závislosti na procentuálním zastoupení MeOH v MF

MeOH(%)	t _r (min)
10	-
20	27,18
30	21,11
40	15,77
50	11,80
60	8,46
70	6,62
80	5,59
90	5,51



Obrázek 53 – chromatogram anilinu při 90% zastoupení MeOH v MF, průtok 2 ml/min

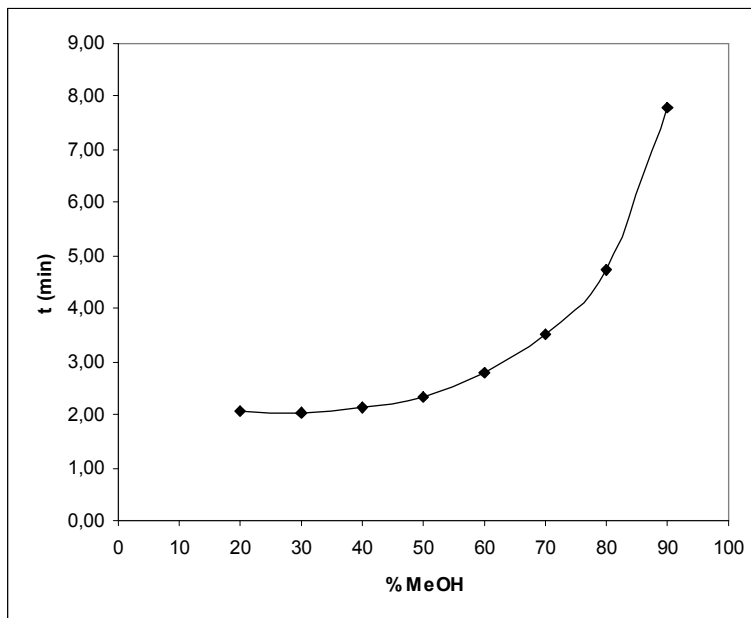


Série analýz č. 2: Mobilní fáze: Methanol – H₃PO₄ 0,085%

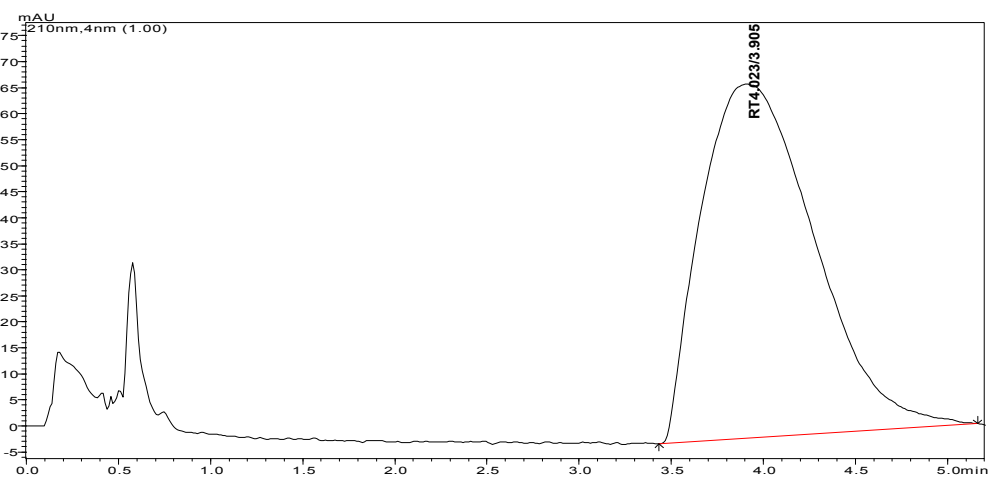
Tabulka 25 – závislost retenčního času anilinu na složení MF

Obrázek 54 – retence anilinu v závislosti na procentuálním zastoupení MeOH v MF

MeOH(%)	t _r (min)
10	-
20	2,06
30	2,04
40	2,12
50	2,34
60	2,80
70	3,52
80	4,72
90	7,80



Obrázek 55 – chromatogram anilinu při 90% zastoupení MeOH v MF, průtok 4 ml/min

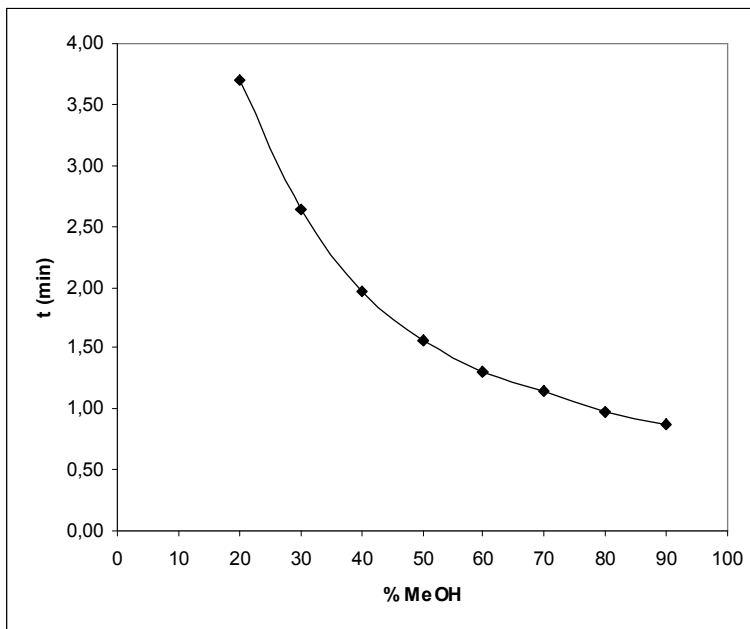


Série analýz č. 3: Mobilní fáze: Methanol – Acetátový pufr pH 7

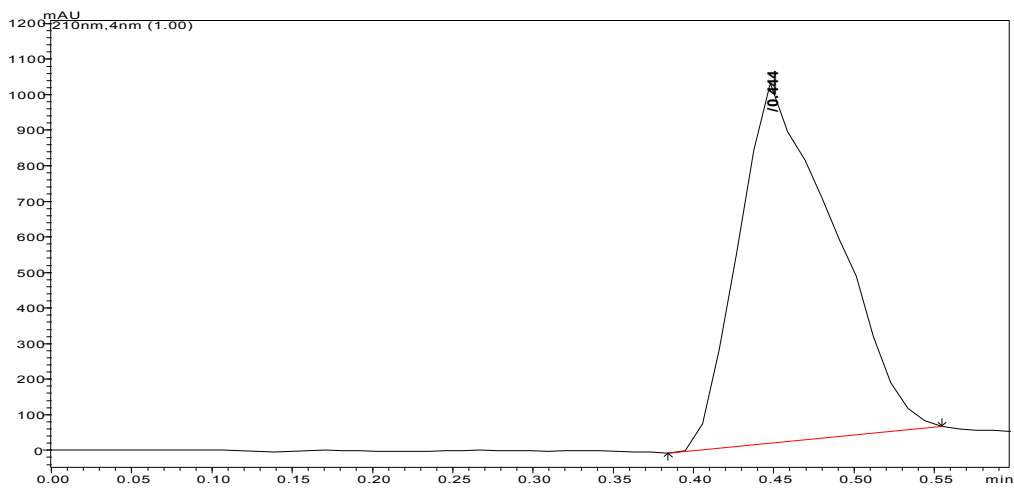
Tabulka 26 – závislost retenčního času anilinu na složení MF

Obrázek 56 – retence anilinu v závislosti na procentuálním zastoupení MeOH v MF

MeOH(%)	t _r (min)
10	-
20	3,70
30	2,64
40	1,96
50	1,56
60	1,30
70	1,14
80	0,98
90	0,88



Obrázek 57 – chromatogram anilinu při 90% zastoupení MeOH v MF, průtok 4 ml/min



4.5.7 Přehled látek vykazujících tzv. retenci ve tvaru „U“

Tabulka 27 – přehled látek vykazujících tzv. retenci ve tvaru „U“

		Typ použité mobilní fáze			
		MeOH/ H ₂ O	MeOH/ H ₃ PO ₄ 0,085%	MeOH/ Acetátový pufr pH 7	
Testované skupiny látek	β - sympatolytika	acebutolol	X	ANO	ANO
		bopindolol	X	ANO	ANO
	Neuroleptika	thioridazin	X	ANO	NE
		perphenazin	X	ANO	ANO
	Lokální anestetika	lidokain	X	ANO	NE
		prilokain	X	ANO	NE
	Tetracyklinová antibiotika	oxytetracyklin	X	ANO	NE
		minocyklin	X	ANO	ANO
	Deriváty methylxantinu	kofein	NE	NE	NE
		theofylin	NE	NE	NE
	Anilin	anilin	NE	NE	NE

legenda

ANO.....látky vykazovaly retenci ve tvaru „U“

NElátky nevykazovaly retenci ve tvaru „U“

X.....nebyly získány žádné výsledky odpovídající retenci ve tvaru „U“
z důvodu příliš vysoké retence látek

5 Shrnutí a diskuse

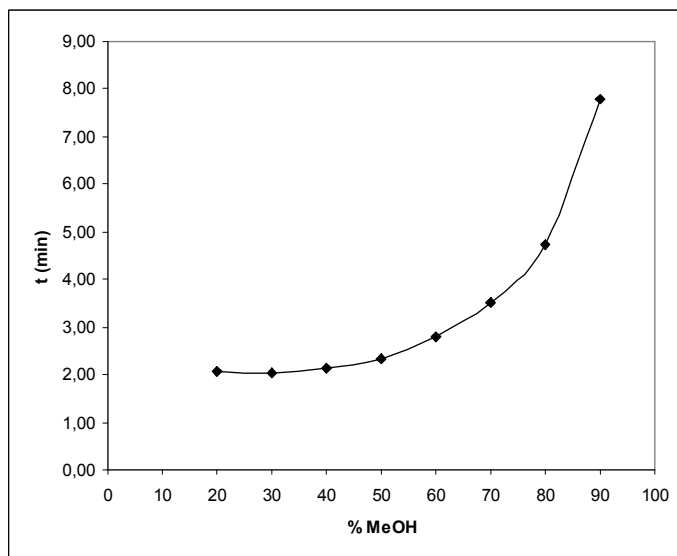
Zadaným cílem rigorózní práce bylo sledovat retenční „U“ profily vybraných látek na pentafluorofenylové stacionární fázi. Jako testované látky byly vybrány látky ze skupiny tetracyklinových antibiotik (oxytetracyklin, minocyklin), neuroleptik (thioridazin, perphenazin), lokálních anestetik (lidokain, prilokain), derivátů methylxantinu (kofein, theofylin), β -sympatolytik (acebutolol, bopindolol) a anilin. Při analýze byla sledována retenční testovaných skupin látek v závislosti na charakteru mobilní fáze. Cílem bylo zjistit, které látky z vybraných skupin vykazují retenci ve tvaru „U“.

U všech látek z vybraných skupin byly provedeny tři série analýz, kdy pro sérii analýz č. 1 byla použita mobilní fáze methanol – voda, pro sérii analýz č. 2 mobilní fáze methanol – kyselina fosforečná 0,085% a pro sérii analýz č. 3 mobilní fáze methanol – acetátový pufr pH 7. Při každé jednotlivé analýze bylo současně měněno procentuální zastoupení methanolu v mobilní fázi.

Z testovaných látek vybraných skupin vykazovaly retenční profil ve tvaru „U“ tetracyklinová antibiotika oxytetracyklin, minocyklin v sérii analýz č. 2 a minocyklin i v sérii analýz č. 3, neuroleptika thioridazin a perphenazin v sérii analýz č. 2 a perphenazin i v sérii analýz č. 3, lokální anestetika lidokain, prilokain v sérii analýz č. 2, β – sympatolytika acebutolol, bopindolol v sérii analýz č. 2 a č. 3. Aromatická bazická látka anilin, retenční profil ve tvaru „U“ nevykazoval, ale byla zjištěna jeho vyšší retenční s rostoucím obsahem methanolu v mobilní fázi v kyselém pH. Tento jev je velice podobný chování látky při separaci na normálních fázích, nebo chromatografie v módu HILIC. Je pravděpodobně způsoben π - π interakcemi mezi ionizovanou molekulou anilinu a atomy fluoru na stacionární fázi, které jsou silnější mezi molekulou a stacionární fází v případě přítomnosti methanolu v mobilní fázi. Methanol π - π interakce nevykazuje, zatímco acetonitril ano. V případě acetonitrilu v mobilní fázi pak dochází ke vzájemným π - π interakcím mezi molekulou anilinu, stacionární fází a zároveň i acetonitrem a tím je anilin i při stoupajícím obsahu organické složky vymýván později z kolony, avšak v kratších retenčních časech pro acetonitril než v případě methanolu. Tuto tezi podporují i výsledky z předchozí diplomové práce, kde byly testovány mobilní fáze s obsahem

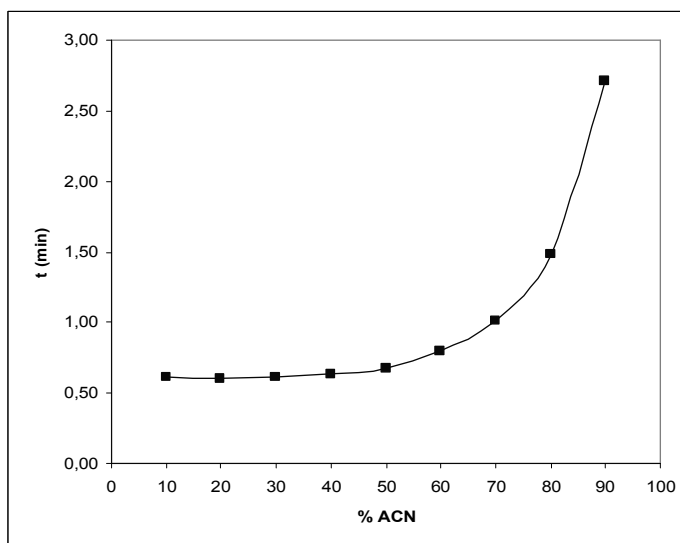
acetonitrilu, a tento jev byl u anilinu pozorován se stejným průběhem, avšak s kratšími retenčními časy (viz. Srovnání obrázku 54 a 58).

Obrázek 54 – retence anilinu v závislosti na procentuálním zastoupení methanolu v MF



Obrázek 58 – retence anilinu v závislosti na procentuálním zastoupení acetonitrilu v MF

(převzato z diplomové práce [27])



Ze sledovaných závislostí je částečně možné určit, které strukturní typy látek mohou „U“ profily na koloně HS F5 vykazovat, a tak využít tyto poznatky k zajištění větší retence během chromatografické separace. Jednotný závěr či pravidlo však pro získání „U“ profilu pro každou látku není možné vyvodit a je nutné sledovat cíleně chování látek v jednotlivých skupinách, kde se také mohou částečně lišit v závislosti na struktuře (viz. neuroleptika).

V porovnání s předchozím výzkumem provedeným na stejných látkách za identických podmínek, kde organickou složkou mobilní fáze byl použit acetonitril místo methanolu [27] (viz. příložená tabulka 28, str. 77) byly získány velice podobné výsledky stanovených retenčních „U“ profilů. Ve skupině sympatolytik (acebutolol, bopindolol) nebyly zjištěny rozdíly v retenčních profilech v závislosti na organické složce mobilní fáze. Podobně tomu bylo i v případě lokálních anestetik, kde byly pozorovány stejné typy „U“ profilů. U derivátů methylxantinů a u anilinu byla zjištěna stejná absence „U“ profilů ve všech kombinacích mobilních fází.

Drobné rozdíly byly po srovnání nalezeny v případě neuroleptik, kde „U“ profily v kyselé mobilní fázi byly totožné pro obě látky a pouze v případě pufované mobilní fáze byl zjištěn rozdíl v retenci thioridazinu a perphenazinu (tvorba „U“ profilu v methanolu vs. acetonitrilu byla reverzní). Větší rozdíl byl zjištěn u tetracyklinových antibiotik, kde pro kyselou mobilní fázi byly retenční profily shodné v obou organických fázích (methanol i acetonitril), avšak v methanolicke fázi byl zjištěn „U“ profil pro minocyklin v pufované mobilní fázi a v přítomnosti acetonitrilu naopak vykazoval „U“ profil oxytetracyklin v mobilní fázi bez úpravy pH.

Překvapením u obou organických složek mobilní fáze bylo retenční chování anilinu jako zástupce jednoduché bazické aromatické látky, kde byla pro tento typ jednoduché sloučeniny retence ve tvaru „U“ očekávána a nebyla dosažena. Byl však potvrzen jiný typ interakce, než ten který je charakteristický pro klasickou chromatografii na reverzních fázích a to díky vzrůstající retenci anilinu při zvyšujícím se množství organické složky v mobilní fázi. Tento jev je vysvětlen pravděpodobně π - π interakcemi mezi analytem, mobilní fází a stacionární fází a byl komentován výše.

Tabulka 28 – přehled látek s výskytem „U“ profilů za použití mobilní fáze s obsahem acetonitrilu [27]

			Typ použité mobilní fáze		
			ACN/ H ₂ O	ACN/ H ₃ PO ₄ 0,085%	ACN/ Acetátový pufr pH 7
Testované skupiny látek	β - sympatolytika	acebutolol	X	ANO	ANO
		bopindolol	X	ANO	ANO
	Neuroleptika	thioridazin	X	ANO	ANO
		perphenazin	X	ANO	NE
	Lokální anestetika	lidokain	X	ANO	NE
		prilokain	X	ANO	NE
	Tetracyklinová antibiotika	oxytetracyklin	ANO	ANO	NE
		minocyklin	X	ANO	NE
	Deriváty methylxantinu	kofein	NE	NE	NE
		theofylin	NE	NE	NE
	Anilin	anilin	NE	NE	NE

legenda

ANO.....látky vykazovaly retenci ve tvaru „U“

NElátky nevykazovaly retenci ve tvaru „U“

X.....nebyly získány žádné výsledky odpovídající retenci ve tvaru „U“
z důvodu příliš vysoké retence látek

6 Závěr

Závěrem je možné konstatovat, že zadaný cíl rigorózní práce – sledování retenčních „U“ profilů vybraných látek na pentafluorofenylové stacionární fázi byl v zadaném rozsahu splněn. Získané výsledky jsou dokumentovány v průběžných tabulkách a chromatogramech, a retenční profily jsou shrnuty v závěrečné souhrnné tabulce. Získané výsledky byly v rámci možností a dostupných informací o řešené problematice stručně komentovány.

7 Seznam použité literatury

- [1] Karlíček R., Polášek M., Pospíšilová M.: Analytická chemie pro farmaceuty, Karolinum, Praha 2005
- [2] Klimeš J., Sochor J., Mokry M.: Kontrola léčiv I., II., Karolinum, Praha 2002
- [3] Klouda P.: Moderní analytické metody, Ostrava 2003
- [4] [http://en.wikipedia.org/wiki/High-performance liquid chromatography](http://en.wikipedia.org/wiki/High-performance_liquid_chromatography) (8/2011)
- [5] <http://web.natur.cuni.cz/~pcoufal/ac.pdf> (8/2011)
- [6] Kazakevich Y., LoBrutto R.: HPLC for pharmaceutical scientists, John Wiley & Sons, Inc., publication, New Jersey 2007
- [7] www.hplc.cz (8/2011)
- [8] Český lékopis 2009, Grada Publishing a.s., Praha 2009
- [9] <http://www.sweb.cz/HPLC/> (8/2011)
- [10] Dohnal J., Jampílek J., Král V., Řezačová A.: Moderní přístupy k farmaceutické analýze, Farmaceutická fakulta Veterinární a farmaceutické univerzity Brno, Praha 2010
- [11] Švec F.: Monolitické stacionární fáze pro HPLC, Chemické Listy 98 (2004) 232-238
- [12] Discovery Zr: High pH and High Temperature HPLC, Supelco Publication Number T102931
- [13] <http://www.zirchrom.com/newsletter.asp> (8/2011)
- [14] Santasania C. T., Henderson T. J., Snyder E. M., Sarker M., Ascah T. L.: HPLC Separation at pH Extremes Using Zirconia Solid Supports, Supelco Publication Number T403057
- [15] Heftman E.: Chromatography 6th edition, Journal of chromatography (2004)
- [16] <http://www.phenomenex.com/Products/Search/HPLC#url> (8/2011)
- [17] <http://www.hamiltoncompany.com/products/hplc-columns-and-accessories/c/329/> (8/2011)
- [18] <http://sigmaaldrich.com/analytical-chromatography/hplc/columns/aphera-high-ph.html> (8/2011)
- [19] <http://www.sequant.com/default.asp> (8/2011)

- [20] <http://www.chromatech.ch/PolyLC/MainFram.html> (8/2011)
- [21] <http://www.merck-chemicals.cz/sequant-zic-hilic-hplc-columns> (8/2011)
- [22] www.westernanalytical.com/pdf/cat_227.pdf (8/2011)
- [23] Sýkora D., Tesařová E., Vosmanská M., Zvolánková M.: Moderní stacionární fáze pro RP-HPLC, Chem. Listy 101 (2007) 190-199
- [24] <http://www.waters.com> (8/2011)
- [25] <http://www.selectscience.net/products/xbridge> (8/2011)
- [26] <http://www.shimadzu.eu/sitemap/search.aspx?search=columns> (8/2011)
- [27] Havlátová M.: Testování chromatografických vlastností alternativních stacionárních fází, Hradec Králové 2011
- [28] <http://www.mn-net.com/chroma/ChromatographyServices/Service/ChromaNews/tabid/11049/language/en-US/Default.aspx> (8/2011)
- [29] <http://www.sigmaaldrich.com/analytical-chromatography/hplc/columns/discovery-hplc/hs-f5.html#scalable> (8/2011)
- [30] Bell D. S.: "Unique Retention and Selectivity of Pentafluorophenylpropyl Phases for High-Throughput LC/MS Analysis." ASMS Annual Meeting, Orlando, Florida. (2002), Supelco Publication Number T402119
- [31] Kindena W., Dekay C., Koziol W.W., Ali Z., Ahmed H., Poole C.F.: Insights into the retention mechanism on a pentafluorophenylpropylsiloxane-bonded silica stationary phase (Discovery HSF5) in RP-LC, Chromatographia 63 (9-10) (2006) 407-417
- [32] Bell D. S.: "Advantages of Polar Reversed-Phase Chemistries for LC/MS Analyses". Supelco, Bellefonte, PA.(2003), Supelco Publication Number T403121
- [33] Havlíková L., Matysová L., Hájková R., Šatínský D., Solich P.: Advantages of pentafluorophenylpropyl stationary phase over conventional C18 stationary phase - Application to analysis of triamcinolone acetonide, Talanta 76 (3) (2008) 597-601
- [34] Bell D. S., Jones A. D.: Solute Attributes and Molecular Interactions Contributing to U-Shape Retention on Fluorinated HPLC Stationary Phase. Lecture presented at Montreux (2003), Supelco Publication Number T403154

- [35] Pellati F., Benvenuti S.: Fast high-performance liquid chromatography analysis of phenethylamine alkaloids in Citrus natural products on a pentafluorophenylpropyl stationary phase, *Journal of Chromatography A*, 1165 (1-2) (2007) 58-66
- [36] Pellati F., Benvenuti S.: Determination of ephedrine alkaloids in Ephedra natural products using HPLC on a pentafluorophenylpropyl stationary phase, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 48 (2) (2008) 254-263
- [37] Vybíralová Z., Nobilis M., Zoulová J., Květina J., Petr P.: High-performance liquid chromatographic determination of ciprofloxacin in plasma samples, *Journal of Pharmaceutical and biomedical Analysis*, 37 (5) (2005) 851-858
- [38] Stariat J., Kovaříková P., Klimeš J., Lovejoy D. B., Kalinowski D. S., Richardson D. R.: HPLC methods for determination of two novel thiosemicarbazone anti-cancer drugs, *Journal of Chromatography B*, 877 (3) (2009) 316-322
- [39] <http://www.chromatographyonline.com/lcgc/data/articlestandard//lcgeurope/392002/32973/article.pdf> (8/2011)
- [40] Rustamov I., Farcas T., Ahmed F., Chan F., LoBruto R., McNair H. M., Kazakevich Y. V., *Journal of Chromatography A* 913 (2001) 49-63
- [41] Majors R. E., Przybyciel M., LCGC Europe 2002
- [42] Dong M. W.: *Modern HPLC for practicing scientists*, Wiley interscience, Hoboken, New Jersey 2006
- [43] Claessens H. A., van Straten M. A.: Review on the chemical and thermal stability of stationary phases for reversed-phase liquid chromatography, *Journal of Chromatography A* 1060 (2004) 23-41
- [44] Lullmann H., Mohr K., Wehling M.: *Farmakologie a toxikologie*, Grada Publishing, a.s., Praha 2004
- [45] Geršl V., Štěrba M.: *Farmakologie pro farmaceuty II.*, Karolinum, Praha 2007
- [46] <http://slovník-cizích-slov.abz.cz/web.php/slovo/betablokatory> (8/2011)
- [47] <http://drugbank.ca/drugs> (8/2011)
- [48] Mikro-verze AISLP – ČR, verze 2010.2
- [49] Marek J. a kolektiv: *Farmakoterapie vnitřních nemocí*, Grada Publishing, Praha 2010

- [50] <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8968966> (8/2011)
- [51] <http://en.wikipedia.org/wiki> (8/2011)
- [52] <http://www.adcc.sk/web/humanne-lieky/spc/thioridazin-25-leciva-spc-32993.html> (8/2011)
- [53] Amaral L., Boeree M. J., Gillespie S. H., Udwadia Z. F., van Soolingen D.: Thioridazine cures extensively drug-resistant tuberculosis (XDR-TB) and the need for global trials is now!. *Int. J. Antimicrob. Agents* 35 (6): 524–6. doi:10.1016/j.ijantimicag.2009.12.019. PMID 20188526.
- [54] <http://www.nih.gov/news/pr/feb2006/ninds-23.htm> (9/2011)
- [55] http://www.sukl.cz/file/5102_1_1/download/ (9/2011)
- [56] lekarske.slovníky.cz/lexikon-pojem/purinove-alkaloidy (9/2011)
- [57] <http://www.britannica.com/EBchecked/topic/378687/methylxanthine> (9/2011)