

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ
KATEDRA ANALYTICKÉ CHEMIE



DIPLOMOVÁ PRÁCE

Vývoj HPLC metody a optimalizace separačních podmínek pro stanovení potenciálních léčiv ze skupiny azaftalocyaninů.

Hradec Králové, 2006

Antonín Svoboda

*Děkuji Mgr. Daliborovi Šatínskému Ph.D.
Za odbornou pomoc a za vstřícný
a obětavý přístup.*

1.	SEZNAM ZKRATEK.....	4
2.	CÍL PRÁCE	5
3.	LÁTKY S POTENCIÁLNÍM VYUŽITÍM VE FOTODYNAMICKÉ LÉČBĚ .	6
3.1.	Fotodynamická terapie	6
3.1.1.	Úvod	6
3.1.2.	Historie PDT.....	7
3.1.3.	Fotochemický mechanismus PDT	9
3.1.4.	Fotosensitizerý	12
3.2.	Zhášeče fluorescence	19
3.2.1.	Princip metody	19
3.2.2.	Současní zástupci	21
3.2.3.	Nové látky s potenciálním využitím.....	23
3.2.3.1.	Sloučeniny odvozené od azaftalocyaninů.....	23
3.2.3.2.	Zástupci	25
3.2.3.2.1.	Látka „A“	25
3.2.3.2.2.	Látka „B“	26
3.2.3.2.3.	Látka „C“	27
3.2.3.2.4.	Látka „D“	28
3.2.3.2.5.	Látka „E“	29
4.	Kapalinová Chromatografie	30
4.1.	HPLC	30
4.1.1.	Přístroj pro měření HPLC	30
4.1.2.	Princip HPLC	30
4.1.3.	Vyhodnocování separace látek pomocí HPLC.	31
4.2.	Použité chromatografické kolony.....	33
4.2.1.	Kolony C-18	33
4.2.2.	Kolona C-8.....	33
4.2.3.	Kolona Zorbax® Eclipse SB-CN.....	33
4.2.4.	Kolona Zorbax® SB-Phe.....	33
4.2.5.	Kolona Phenomenex Synergi RP-80 FUSION®	33
4.3.	Použité mobilní fáze	34
5.	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	35
5.1.	Chemikálie a roztoky	35
5.1.1.	Chemikálie	35
5.1.2.	Roztoky	35
5.2.	Přístroje.....	35
5.3.	Pracovní a výpočetní postupy.....	36

5.3.1.	Pracovní postup	36
5.3.2.	Měření kalibrační závislosti	36
5.3.3.	Opakovatelnost metody.....	36
6.	VÝSLEDKY a diskuze	38
6.1.	Vývoj a optimalizace separace pomocí HPLC	38
6.1.1.	Výsledky na kolonách C18	39
6.1.2.	Výsledky na koloně C8.....	40
6.1.3.	Výsledky na kolonách se skupinami -CN, -Phe a -TMS chemicky vázanými na stacionární fázi	42
6.1.4.	Výsledky na koloně Phenomenex Synergi Fusion	43
6.2.	Kalibrační závislost.....	48
6.3.	Opakovatelnost metody.....	52
7.	ZÁVĚR.....	54
8.	literatura.....	55

1. SEZNAM ZKRATEK

ACN	acetonitril
ALA	kyselina 5-aminolevulinová
AMD	age-related macular degeneration, senilní makulární degenerace
AzaPc	azaftalocyanin
BHQ	Black Hole Quencher
FDA	Food and Drug Administration
FRET	Fluorescence Resonance Energy Transfer
HpD	derivát hematoporphyrinu
HPLC	vysokoučinná kapalinová chromatografie
ISC	intersystem crossing
MF	mobilní fáze
PDT	fotodynamická terapie
PS	fotosenzitizér
RP	reverzní fáze
$s, s(r)$	směrodatná odchylka, relativní směrodatná odchylka
SB	stable bonded
SF	stacionární fáze
$t(r)$	retenční čas

2. CÍL PRÁCE

Cílem předložené diplomové práce bylo najít vhodné separační podmínky pro 5 výše uvedených sloučenin – potenciálních léčiv ze skupiny azaftalocyaninů pomocí kapalinové chromatografie. Úkolem bylo najít vhodnou stacionární fázi (kolonu) a mobilní fázi, u níž bylo potřeba optimalizovat její složení. Důraz byl kladen zejména na nalezení optimálních separačních podmínek, které by splňovaly následující podmínky:

- dostatečnou separaci všech cílových látek (rozlišení minimálně 1,5),
- separace látek v izokratickém módu i přes jejich velice rozdílnou lipofilitu
- relativně krátký čas analýzy (do 15 až 20 minut)

3. LÁTKY S POTENCIÁLNÍM VYUŽITÍM VE FOTODYNAMICKÉ LÉČBĚ

3.1. Fotodynamická terapie

3.1.1. Úvod

Zhoubné nádorové bujení neboli rakovina je zákeřné onemocnění, které je spolu s kardiovaskulárními chorobami jednou z nejčastějších příčin úmrtí ve světě.

Léčba zhoubných nádorů je v současné době prováděna ve většině případů třemi základními postupy:

- 1) operativní odstranění nádoru – závisející na lokalizaci, typu a velikosti nádoru
- 2) radioterapie – buďto ozáření nádoru, který je neoperovatelný, nebo ozáření po operaci k odstranění možných zbytků nádorových buněk v okolí nádoru.
- 3) chemoterapie – neboli léčba cytostatiky – má za cíl zničit nádorové buňky, které jsou citlivější na podávané léky než ostatní buňky postiženého organismu (somatické buňky).

Každý z těchto postupů má své indikační spektrum a omezené použití.

Léčba cytostatiky má množství vedlejších účinků, neboť tyto léky jsou obecně toxické, a navíc musí být tyto léky podávány v příliš vysokých dávkách, aby léčba mohla být účinná. Vhodné cytostatikum má co největší toxicitu pro nádorové buňky a co nejmenší pro ostatní somatické buňky. Bohužel většina současných cytostatik výrazně poškozuje vlastní zdravé buňky organismu. Značným problémem je touto léčbou způsobený útlum imunitního systému, který je odpovědný za obranu organismu proti infekci, ale má dohled i nad vyhledáváním a ničením nádorových buněk. Jeho likvidace má mnohdy za následek nebezpečné infekční komplikace.

V posledních letech se z těchto důvodů dokonce na mnoha pracovištích ve světě zvažuje zda je chemoterapie v současné době tou nejlepší z možných variant při likvidaci zhoubných nádorů, protože její nežádoucí účinky mnohdy převažují nad celkovou úspěšností léčby.

Fotodynamická terapie („photodynamic therapy“ - PDT) je nová, rozvíjející se terapeutická metoda určená k léčbě mnoha druhů tumorů¹. Navíc má potenciál pomáhat při léčbě dalších nezhoubných onemocnění. Účinnost PDT závisí na selektivním vychytávání fotodynamicky aktivní sloučeniny nemocnou tkání, kterou chceme vyléčit, následované ozářením světlem vhodné vlnové délky. Vlnová délka

tohoto světla musí odpovídat absorpčnímu spektru fotoaktivní sloučeniny. Předpokládá se, že při PDT se vytváří reaktivní kyslík, díky kterému pak dochází k oxidativnímu poškození buněčných organel. Tento typ poškození podporuje kombinaci biochemických, genetických a molekulárních změn, které mají na normální buňku destrukční účinek a vedou k její nekróze a apoptóze².

Hlavním cílem antikancerózní terapie je selektivita zaměřená na likvidaci poškozených buněk, zatímco zdravá tkáň zůstává nedotčena. PDT zahrnuje kombinaci fotodynamicky aktivní látky a světla. Každá z těchto složek je sama o sobě neúčinná, ale v kombinaci vedou k inaktivaci tumorózní buňky³.

Na podobném principu jako PDT, ale bez efektu destrukce nádorových buněk, funguje i **photodiagnostika**. Bylo zjištěno, že některé PS se kumulují v tumorózní tkáni ve zvýšeném množství a po ozáření světlem vhodné vlnové délky poskytují silnou fluorescenci, což výrazně usnadňuje detekci i drobných metastáz⁴.

3.1.2. Historie PDT

Zatímco vlastní pojem „fotodynamická terapie“ je relativně nové označení pro binární součinnost světla a fotosensitizeru (PS), použití světla k léčbě různých onemocnění můžeme vystopovat hluboko v lidské historii. Již 4000 let př.n.l. používali staří Egypťané perorálně podávané rostliny (obsahující světlem aktivovatelné psoraleny) v kombinaci se slunečním zářením k úspěšné léčbě vitiliga⁵. Využití ultrafialového světla a psoralenů k léčbě psoriasis bylo později ve 20.století přijmuto na celém světě⁶.

Novodobá historie PDT odstartovala v roce 1900, kdy Oscar Raab popsal experiment, ve kterém nechal působit akridinové barvy a světlo na prvoky rodu *Paramecium*. Ukázalo se, že jednobuněčný organismus může být touto kombinací efektivně zahuben⁷. Von Tappeiner se v roce 1903 úspěšně pokusil vyléčit kožní novotvar topickou aplikací eosinu a světla⁸. Ve stejném roce francouzský neurolog J. Prime zjistil, že tuberkulotičtí pacienti, kteří byli léčeni eosinem prodělali dermatitidu v částech těla exponovaných slunci⁹. Spolu s Jodlbauerem později von Tappeiner demonstroval význam kyslíku ve fotosensitizačních reakcích a poprvé použil výraz fotodynamická aktivita¹⁰.

Do současné doby nejstudovanější PS jsou porfyriny, které byly identifikovány už v polovině 19.století. První pozorování fotodynamické aktivity látek tohoto typu byly provedeny v roce 1911, kdy Hausmann zjistil kožní reakce u myší, kterým podal hematoporfyrin a následně exponoval světlu. Zjistil také, že kombinace hematoporfyrinu a světla zabíjí prvoky rodu *Paramecium* a červené krvinky¹¹. První

pokus u lidí provedl v roce 1913 sám na sobě Němec Meyer-Betz, který si injekčně aplikoval hematoporfyrin a následně zaznamenal silné svědění a bolest v místech, jež byla vystavena světlu¹². V roce 1924 francouz Policard pozoroval fluorescenci porfyrinů v experimentálních tumorech a došel k názoru, že se porfyriny ve zvýšené míře lokalizují v tumorech¹³.

V šedesátých letech Richard Lipson a kolektiv začali moderní éru PDT^{14,15}. Zabývali se sloučeninou zvanou „hematoporphyrin derivative“ (HpD), získanou úpravou hematoporfyrinu, k fotodetekci nádorových ložisek, kde po zvýšené kumulaci vyvolával fluorescenci. V roce 1972, I. Diamond a spolupracovníci využili schopnosti porfyrinů kumulovat se v nádoru a jejich fototoxických vlastností k terapii nádorového onemocnění¹⁶. Studie in vivo ukázaly, že PDT zpomalila růst gliomů u myší.

Důležitým momentem byl rok 1975, kdy Thomas Dougherty a spolupracovníci kombinací HpD a červeného světla úplně eradikovali nádor prsu u myší¹⁷. V tom samém roce J. F. Kelly pozoroval eliminaci karcinomu močového měchýře u myší po světelné aktivaci HpD¹⁸. Pak následovaly pokusy na lidech s různými nádory, hlavně na kůži a močovém měchýři. Výsledky byly slibné. Úspěchu bylo dosaženo hlavně u povrchových nádorů v počátečním stádiu. Při dalších studiích byly objeveny nové indikace. Začaly také studie k vysvětlení mechanismu účinku a byly nalezeny další fotosensitizéry. Na konci 80.let probíhaly extensivní klinické studie, které vedly v roce 1993 v Kanadě k zavedení Photofrinu® (což je čištěná forma HpD¹⁹) jako prvního PS do klinické praxe. Později se Photofrin® začal používat i v USA, Japonsku a některých evropských zemích²⁰. Studie probíhají i v současnosti a jsou zaměřeny na vývoj lepších PS, zlepšení aplikace světla, a kombinaci PDT s hypertermií a s konvenčními metodami léčení nádorů²¹.

Takřka všechny zkoušené fotosensitizéry jsou založeny na tetrapyrolech (porfyriny, chloriny, bakteriochloriny a ftalocyaniny). PDT vyžaduje nové účinné fotosensitizéry s absorpcí ve vzdálené červené oblasti viditelného světla s minimálními nežádoucími účinky. Je nutno si uvědomit, že výsledný efekt je nezanedbatelně závislý na farmakologických parametrech daného PS (farmakokinetika, biodistribuce, eliminace), a proto je vývoj nových PS úzce spojen s různými technologickými mechanismy, které jsou schopny zlepšovat zejména farmakokinetické parametry – např. cílená distribuce („targeting“). Díky charakteru PDT (vysoká účinnost, selektivita k tumorózní tkáni, šetrnost k pacientovi) má tato metoda potenciál stát se v budoucnu velmi významnou a účinnou léčebnou metodou.

3.1.3. Fotochemický mechanismus PDT

Základním principem PDT je interakce fotosenzitizéru a světla vhodné vlnové délky. Vlnová délka patří mezi limitující faktory pro použití PDT. Světlo o nižších vlnových délkách proniká živými tkáněmi do hloubky zhruba několika milimetrů (Obr.1) a léčená oblast je tak velice malá²².

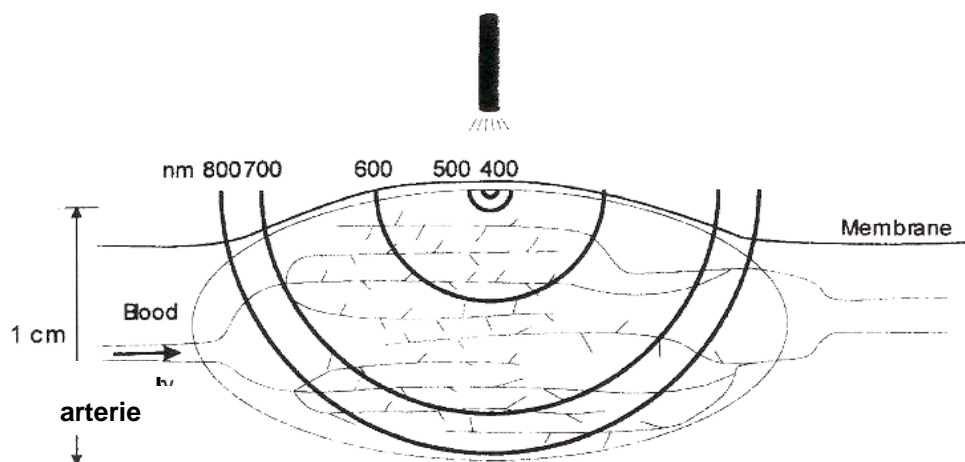


Figure 1 The wavelength dependence of depth of penetration of light into a tumor

Obrázek 1 Závislost prostupu světla do tkáně na jeho vlnové délce.

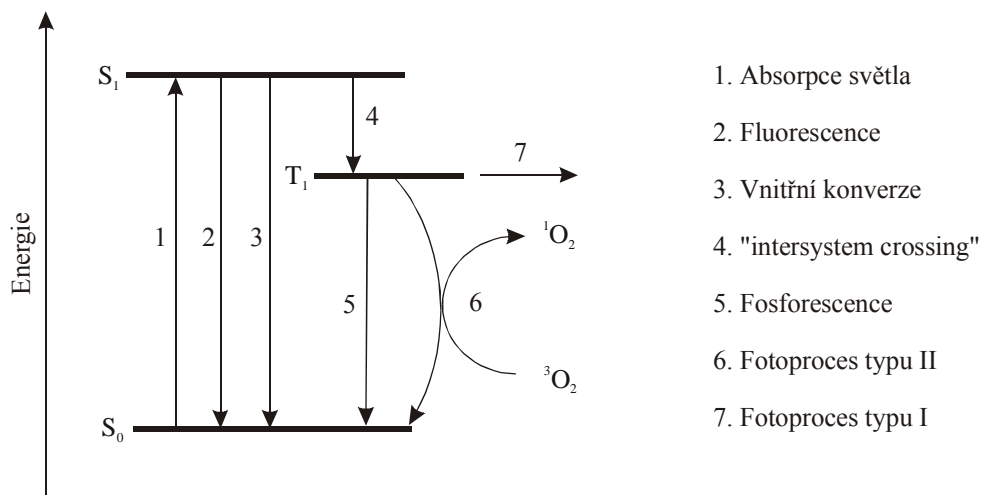
Další nevýhoda používání světla s krátkými vlnovými délkami je ta, že takové světlo je intenzivně pohlcováno i jinými biologickými strukturami, jako je např. hemoglobin. Optimální rozpětí vlnových délek se pohybuje v oblasti 680 - 800 nm. Další zvyšování nad 800 nm již není vhodné z důvodu nízké energie záření.

Po absorpci světelného kvanta se PS excituje ze základního singletového stavu (S_0) do velmi krátce trvajících (řádově nanosekundy) singletového stavu (S_1) (viz obr.2). Z této energetické hladiny se může PS uvolnit několika způsoby zahrnující procesy radiační (**fluorescence**) a procesy neradiační (vnitřní konverze a tzv. „intersystem crossing“)²³.

Při **vnitřní konverzi** ztrácí excitovaný PS energii po interakci s okolními molekulami ve formě tepla.

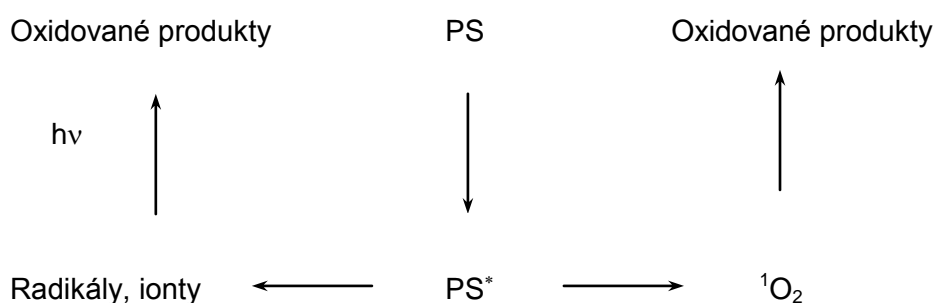
Procesem „**intersystem crossing**“ (ISC) se PS dostává do tripletového stavu (T_1). Při ISC dochází k inverzi jednoho elektronu (tzv. proces „spinem-zakázaný“), a proto je mnohem méně preferovaný než energeticky výhodnější tzv. „povolený“ proces. Avšak dobrý PS prochází tímto procesem s vysokou pravděpodobností, což je podmínkou pro vlastní fotodynamickou aktivitu. Energie PS se může uvolnit z tripletového stavu dvěma způsoby: vyzařováním formou **fosforescence** nebo **spinovou výměnou** s jinou molekulou v tripletovém stavu .

Princip probíhajícího fotofyzikálního procesu, který je podstatou PDT, vysvětluje modifikovaný Jablonského diagram (Obr.2). Popisuje chování typického fotosensitizeru.



Obrázek 2 Modifikovaný Jablonského diagram

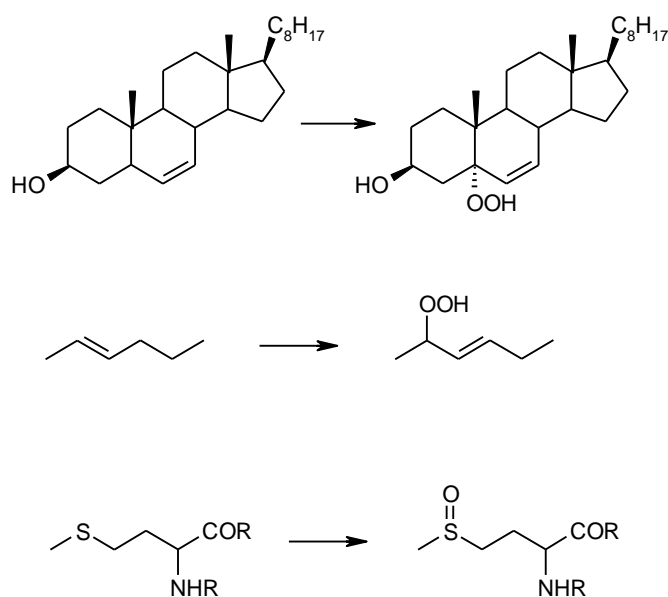
Pro PDT má největší význam tzv. „zhášení“ excitovaného tripletového stavu právě spinovou výměnou. Zhášecí mechanismus T_1 stavu fotosensitizeru probíhá dvěma možnými cestami a může být rozlišen dle převažující cesty na fotoprocес typu I a typu II.



Typ I – K tomuto procesu dochází nejčastěji za podmínek snížené koncentrace kyslíku. Při úplné anoxii reaguje excitovaný fotosensitizer (PS*) s okolním biologickým substrátem za vzniku redukovaného PS. Ten může dále reagovat s kyslíkem za produkce superoxidového aniontu, který se výrazně účastní na oxidaci biomolekul¹⁹.

Typ II – Při vyšších koncentracích kyslíku převažuje přenos energie na základní (tripletový) stav molekulárního kyslíku ($^3\text{O}_2$). Vlivem inverze spinu z něj vzniká silně reaktivní singletový kyslík ($^1\text{O}_2$), který se považuje za hlavní cytotoxické agens v PDT. Ačkoliv se životnost $^1\text{O}_2$ liší v závislosti na prostředí, mnoho autorů se shoduje, že toto agens není schopno penetrovat hlouběji než je přibližně šířka lipidové buněčné membrány. Tím je *de facto* zaručeno, že výsledný efekt zasáhne pouze buňky obsahující PS.

V biologickém substrátu napadá singletový kyslík okolní biomolekuly²⁴ (zejména molekuly obsažené v membránách, cholesterol, nenasycené mastné kyseliny a některé aminokyseliny - tryptofan, methionin, histidin – a také DNA). Tyto chemicky modifikované sloučeniny pak přestávají plnit své biologické funkce a dochází tak k poškození buňky. Z chemického pohledu dochází po interakci se singletovým kyslíkem buď k cykloadici nebo oxidaci napadených biomolekul (Obr.3).



Obrázek 3 Oxidace biomolekul singletovým kyslíkem

Tabulka 1 uplatnění fotodynamické terapie v praxi

Cílový orgán	Onemocnění, oblast aplikace
Oko	AMD
Kůže	psoriasis, akné, Kaposiho sarkom, bazaliom
Krev	antivirotika, antiparazitika
Imunomodulace	arthritis, arteriální restenóza, endometriální ablace
Ostatní	karcinom jícnu, plic, močového měchýře, prostaty, tlustého střeva

3.1.4. Fotosensitizéry

PS jsou látky schopné absorbovat světlo o určité vlnové délce a přeměnit ho na využitelnou energii. Jejich využití v PDT spočívá v generaci letálních cytotoxických produktů. Existují stovky přírodních a syntetických barviv, které se mohou uplatňovat jako PS v PDT. Klíčovou vlastností je schopnost lokalizovat se v nemocné tkáni ve zvýšené míře a produkovat cytotoxické produkty k indukci požadovaného biologického efektu²⁵.

Naprostá většina v současnosti testovaných a používaných PS je založena na porfyrinovém cyklu (látky podobné chlorofylu nebo barevné části hemoglobinu). Díky tomu, že zatím nejpoužívanější PS - sodná sůl porfimeru – má značný počet vedlejších účinků, byl výzkum zaměřen na nové typy PS. Vytvořil se optimální profil PS, kterému se výzkum v současnosti snaží co nejvíce přiblížit.

Vlastnosti ideálního fotosensitizéru

Ideální PS pro PDT by měl splňovat tyto požadavky:

- chemická čistota se známým a stabilním složením
- minimální toxicita v nepřítomnosti světla a toxicita jen po ozáření světlem
- preferenční lokalizace v cílové tkáni (výrazně zvýšená kumulace v nádorové tkáni oproti jiným tkáním)
- rychlá eliminace z organismu a tím nízká systémová toxicita
- vysoká fotochemická reaktivita s vysokým výtěžkem tripletového PS, a schopnost efektivně produkovat singletový kyslík a reaktivní formy kyslíku

- silná absorpce při delší vlnové délce (650 – 800 nm), kde hloubka průniku světla do tkáně je maximální a energie světla stačí k produkci singletového kyslíku
- cena, dostupnost, modifikovatelnost – Nezanedbatelnými vlastnostmi PS je také jejich cena, snadná dostupnost a případně jednoduchá možnost modifikace pro zlepšení farmakokinetických parametrů
- jednoduchá příprava
- fotoaktivní látka by měla fluoreskovat kvůli vizuální kontrole

Vhodné látky by za použití fluorescenční mikroskopie mohly být využity ke značení subcelulárních struktur²⁶.

Jednou z obecných vlastností PS je tzv. „**photobleaching**“ neboli vyblednutí. Je definován jako ztráta intenzity absorpce nebo emise způsobená světlem. V molekule barviva dochází působením světla k chemickým změnám (fotoadice, fotocyklizace, ireverzibilní fotoredukce nebo nejčastější oxidace²⁰), jejichž důsledkem je narušení chromoforu. Jsou známy dva typy ireverzibilních chemických změn, fotomodifikace a tzv. „pravý photobleaching“.

Při *fotomodifikaci* dochází ke ztrátě absorpce nebo fluorescence při určité vlnové délce, chromofor zůstává zachován v modifikované formě.

Při *pravém photobleachingu* je chemická struktura PS tak narušena, že se rozpadá na malé fragmenty bez výraznější absorpce ve viditelné oblasti. Photobleaching se tak může podílet na rychlejší exkreci PS z těla díky jeho rozkladu²⁷.

Typy fotosensitizerů

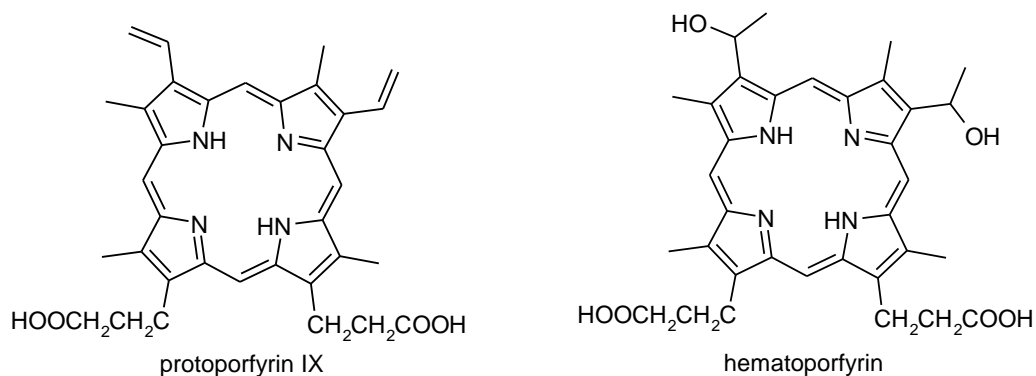
V současné době lze PS rozdělit do tří generací. První generaci tvoří pouze HpD a jeho deriváty a vyznačuje se některými nevhodnými vlastnostmi. Proto byly připraveny látky druhé generace odvozené nejen od pofyrinů. Spojení PS s různými biomolekulami tvoří generaci třetí.

1.generace

Jedinými zástupci této generace jsou deriváty hematoporphyrinu (HpD), popř. protoporphyrinu IX (PpIX, obr. 4). Připravují se působením kyseliny sírové na hematoporphyrin (Hp, obr. 5) v prostředí kyseliny octové. Jedním z nich je např. Photofrin II[®] připravený Doughertym²⁸, který se po dalších úpravách dostal do klinické praxe jako Photofrin^{®29}. Je to oligomer Hp, ale délku oligomerního řetězce je těžké

přesně určit. Photofrin[®] byl ale přesto přijat zdravotníky USA, Kanady, Japonska a Evropy. Touto látkou se PDT etablovala na poli léčby zhoubných nádorů hned vedle chirurgie, chemo- a radioterapie.

První generace fotosensitivních látek má ale několik závažných nedostatků, které dále vedly k hledání látek jiných typů. Jedním z nedostatků je jejich farmakokinetický profil. Intradermální akumulace Photofrinu[®] může přetrvávat až šest týdnů³⁰. To znamená, že pacient zůstává fotosensitivní, zejména na přímém slunečním svitu. Tento problém, ačkoli v porovnání s vedlejšími účinky chemoterapie zanedbatelný, omezuje terapeutické využití látek 1. generace. Navíc je u HpD omezena maximální vlnová délka (630 nm), při které mohou být fotoaktivovány.

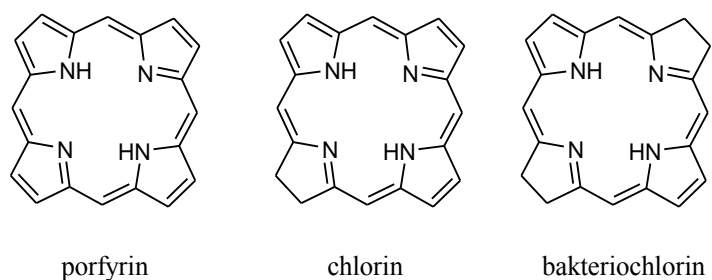


Obrázek 4

Zástupci I. generace fotosenzitizérů.

2. generace

Látky druhé generace jsou již chemicky jednotné a snadno charakterizovatelné. Také velice nízká vlnová délka posledního maxima HpD je zde již často zvýšena a tudíž lze tyto PS aktivovat světlem pronikajícím hlouběji do tkání. Používané látky patří jak do skupiny porfyrinů tak např. ftalocyaninů, texafyrinů, porfycenů a dalších. Porfyrinům jsou velice příbuzné chloriny a bakteriochloriny, které mají o jednu (chloriny) případně dvě (bakteriochloriny) konjugované vazby v makrocyclickém systému méně.



Obrázek 5

Základní struktury, od nichž byly odvozováni první yástupci fotosenzitizérů II. generace

Jedním ze zástupců skupiny chlorinů je **temoporfin** neboli tetra(*m*-hydroxyfenyl)chlorin (**mTHPC, Foscan®**, obr. 7). Temoporfin byl jako přípravek Foscan® od firmy Biolitec zaveden v říjnu 2001 v EU k léčbě rakoviny hlavy a krku³¹.

Další zástupcem syntetických chlorinů je **talaporfin** neboli mono-L-aspartyl chlorin e6 (**Npe6, MACE**, obr. 7). Za výhodné vlastnosti lze považovat jeho silnou absorpci při vyšších vlnových délkách (664 nm) a také to, že se z tkání rychle vylučuje, a proto se může již 4 hod po intravenózní aplikaci ozařovat postižená tkáň³².

Benzoporphyrinový monokarboxyderivát **verteporfin (BPD-MA**, obr. 7) je velmi rychle absorbován nádorovou tkání, ale je také intenzivně vylučován z těchto tkání (kožní fotosensitivita přetrvává pouze pár dní). Jeho absorpční maximum je posunuto až k vlnové délce 690 nm. Největších úspěchů však dosáhla tato látka v oftalmologii pod komerčním názvem **Visudyne™** od firmy Novartis. Dnes je tato látka registrována již v 71 zemích, včetně ČR. Používá se k léčbě senilní makulární degenerace (angl. age - related macular degeneration, AMD)³³. AMD má primární postavení v příčinách ztráty zraku u lidí starších 50 - ti let.

AMD je způsobena růstem abnormálních krevních cév (CNV- choroidal neovascularisation) pod střední částí sítnice nebo makulou. Tyto cévy propouštějí tekutinu a krev a mohou vést k rozvoji zjizvené tkáně, která poškozuje střední sítnici. Výsledkem toho je rapidní zhoršení zraku během dvou měsíců až tří let³⁴.

Etiopurpurin s centrálním atomem cínu (**SnET2, rostaporfin, Photrex, tinetiopurpurin**) patří do skupiny metalochlorinů (uprostřed je chelatovaný atom cínu). Přestože má silné absorpční maximum (660 nm), jsou pro efektivní terapii nutné vysoké dávky světla. Další nevýhodou je dlouhodobá kožní fotosensitivita (10 - 14 dní po podání). Rostaporfin významně snižuje riziko ztráty zraku u pacientů s AMD³⁵.

Motexafin lutecium (Lutex, Antrin®) patří již do jiné chemické skupiny než předchozí látky příbuzné porfyrinům. Jedná se o derivát texafyrinu (charakteristické pětiusíkaté makrocyclické jádro) s centrálně chelatovaným atomem lutecia. Mezi jeho

velké výhody patří silná absorpce při dlouhé vlnové délce 732 nm a dobrá selektivita pro maligní tkáň. Vzhledem k dlouhé vlnové délce lze motexafin lutecium používat i u silně pigmentovaných nádorů (maligní melanom)³⁶.

PDT umožňuje využití endogenních látek jako prekurzorů k vytvoření fotosensitizerů. Jednou z nich je **kyselina 5-aminolevulinová (ALA)**. Po jejím injekčním podání získá tělo více prekurzorů k syntéze fotosensitizerů. V nádorových buňkách, které se velmi rychle dělí, se přemění na protoporphyrin IX, který po ozáření slouží jako účinný PS.

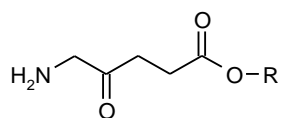
Pod obchodním názvem Levulan[®] byl v roce 2000 schválen americkou FDA k léčbě keratózy ze záření na obličeji a kůži pokrývající lebeční kosti³⁷.

Vzhledem k nízké lipofilitě ALA se do terapie dostávají také její estery, které lépe pronikají do tkání (dermální aplikace) a po hydrolyze uvolňují volnou ALA.

Methyl ester kyseliny 5-aminolevulinové byl jako Metvix[®] zaveden v roce 2001 k léčbě aktinoidní keratózy a později také k léčbě karcinomu bazálních buněk kůže³⁸.

Hexylester kyseliny 5-aminolevulinové byl jako Hexvix[®] vyvinut pro fotodetekci rakoviny močového měchýře.


Používá se též benzyl ester kyseliny 5-aminolevulinové (Benzvix[®]) pro fotodetekci a léčbu rakoviny jícnu.



R= **Produkt**

-CH₃ Metvix[®]

-(CH₂)₅CH₃ Hexvix[®]

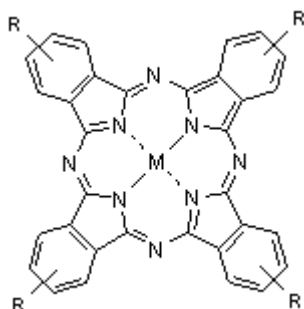
-CH₂- Benvix[®]

Obrázek 6

Příklady látek odvozených od 5-aminolevulinové kyseliny

Ftalocyaniny jsou další nadějnou skupinou PS. Stejně jako porfyriny jsou založeny na čtyřech pyrrolových jádrech, ovšem s tím rozdílem, že pyrrolové jednotky jsou spojeny přes dusík místo methinových můstků. Navíc jsou ke všem pyrrolovým jádrům přikondenzovány benzenové kruhy, což posunuje maximální vlnovou délku

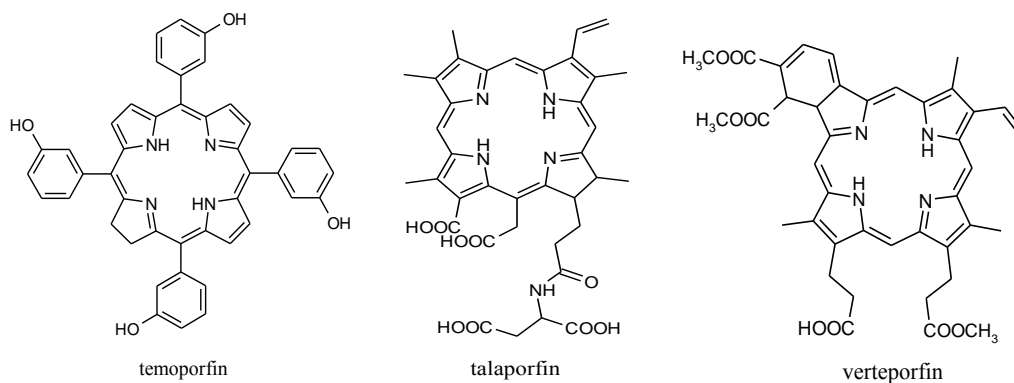
absorpce směrem k červené části spektra (670–700 nm). To je spolu s nepřilíživou obtížnou syntézou činí perspektivními PS do budoucna. Důležitou modifikací pro vlastní PDT účinek je přítomnost chelátovaných centrálních kovů a polokovů, z nichž některé prodlužují trvání tripletového stavu PS (viz obr. 2) a tím zvyšují jeho účinnost v PDT (např. Zn, Al, Si).



Obrázek 7
Obecná struktura ftalocyaninů

Nevýhodou některých ftalocyaninů je jejich velmi špatná rozpustnost nejen ve vodě, ale i v organických rozpouštědlech. Nicméně je možno se těmto problémům vyhnout pomocí různých substituentů na periférii, nebo konjugací s různými biomolekulami, popř. je možno použít vhodných lékových mikroforem (např. lipozómů). Vyšší rozpustnosti ve vodě se daří dosáhnout například sulfonací, vzniká ovšem špatně separovatelná směs sulfonovaných produktů.

Přidání dalšího benzenového jádra na periférii ftalocyaninů vede k látkám typu naftalocyaninů. Tyto látky absorbují při velmi dlouhých vlnových délkách (až 770 nm), čímž je zvýšena terapeutická hloubka, které může být dosaženo a lze tyto látky používat i pro vysoce pigmentované nádory jako např. melanom.



Obrázek 8
Příklady některých klinicky používaných fotosenzitizérů 2. generace

3. generace

Jako látky třetí generace se označují konjugáty fotosensitizerů s různými biomolekulami. Jak již bylo naznačeno výše, PS jsou schopné se do určité míry selektivně hromadit v nádorové tkáni. Avšak tato selektivita je často velmi nízká, a proto poměr mezi koncentrací PS v nádorových a zdravých tkáních je nízký. Zvýšením tohoto poměru lze dosáhnout jak snížení toxicity, tak i zlepšení odpovědi na terapii.

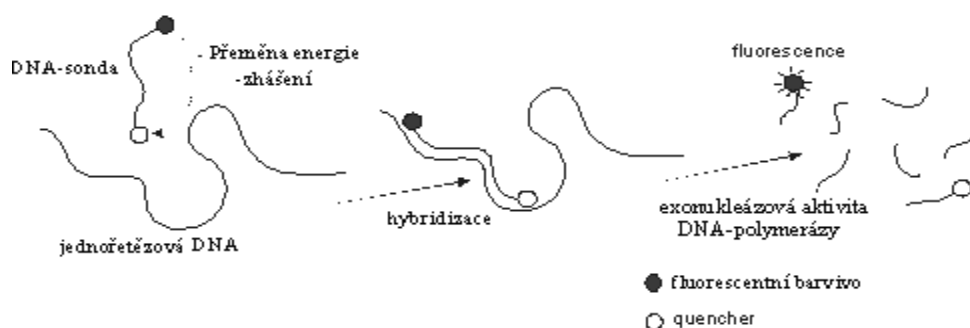
Jedním z přístupů k řešení tohoto problému je syntéza nových PS, u nichž by zvýšená selektivita byla již vlastností samotné molekuly. Takové látky se však hledají poměrně špatně, jelikož nejsou stanovena žádná kritéria, podle kterých by bylo možné jednoznačně předpovědět budoucí selektivitu dané látky. Podstatně jednodušší je použít již vyzkoušené a osvědčené PS a změnit různými způsoby jejich farmakokinetické vlastnosti. Proto se některé PS aplikují v různých aplikačních formách zlepšujících jejich farmakokinetiku (lipozómy, olejové disperze, a další) nebo se připravují tzv. „fotosensitizery třetí generace“. V tomto případě se nejedná o nové struktury PS, ale látky generace druhé vázané k biologicky aktivním molekulám.

Mezi látkami tvořícími fotosensitivní část konjugátů dominují porfyriny, zřejmě z důvodu jejich snadné přípravy. Porfyriny se konjugují zejména s protilátkami, steroidy (cholesterol), dále se sacharidy a polynukleotidy²³.

3.2. Zhášeče fluorescence

3.2.1. Princip metody

Princip metody je založen na použití dvou barviv kovalentně vázaných k DNA-sondě (dvojitě označená sonda). Jedno má silně fluorescenční vlastnosti (fluorofor), zatímco druhé (quencher) absorbuje světlo v oblasti emise fluoroforu. Dokud jsou obě barviva vázaná ke krátké DNA-sondě se specifickou (cílenou) sekvencí, neprodukují fluorescenci, protože energie je přenášena z fluoroforu na quencher bez emise fotonů. Tento proces se nazývá “fluorescence resonance energy transfer“ (FRET, viz níže).



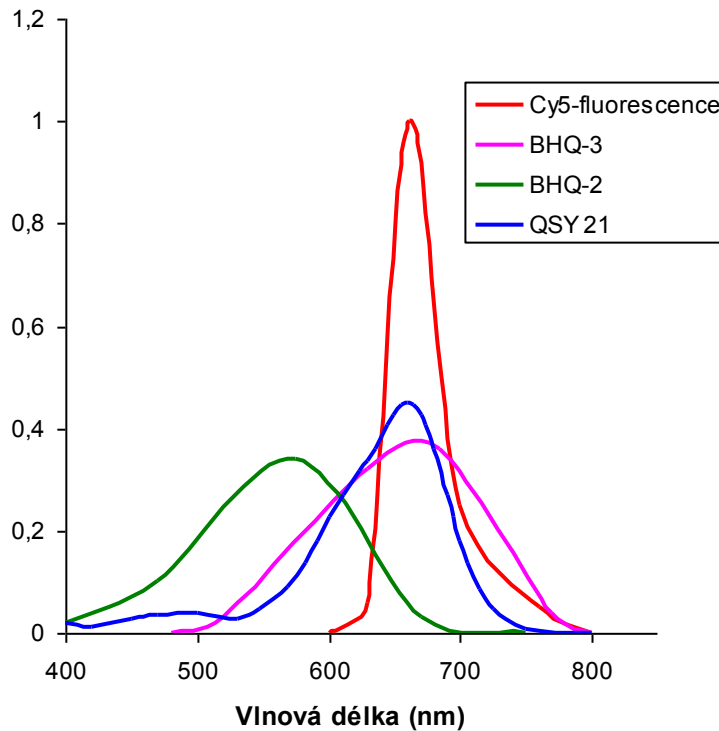
Obrázek 9

Princip kvantifikace DNA pomocí dvojitě značené sondy.

Po hybridizaci sondy s cílovou DNA se ke vzorku přidá DNA-polymeráza, která svou exonukleázovou aktivitou následně sondu rozštěpí. Barviva jsou po tomto procesu separovaná v roztoku a vzdálenost mezi nimi neumožňuje účinný FRET. Při měření intenzity fluorescence můžeme kvantifikovat množství cílových DNA sekvencí ve vzorku.

Fluorescenční barviva, která se nejčastěji používají jsou např. 5-karboxyfluorescein (FAM), 6-karboxy-2',4,7,7'-tetrachlorfluorescein (TET), 5-karboxytetramethylrhodamin (TAMRA), ale nejsilnějšími flurofory (umožňující nejlepší citlivost testů) jsou indocyaninová barviva Cy3 a Cy5. Momentálně není k dispozici mnoho quencherů s optimálními vlastnostmi vyhovujícími Cy5, hlavně s hodnotou absorpčního maxima v rozmezí zhruba mezi 650 a 700 nm (oblast fluorescenční emise Cy5). Patří sem například quencherů skupiny QSY, avšak z ní má výhodné vlastnosti pouze QSY 21. V současnosti nejlepší quencher pro indocyaninová barviva patří do skupiny “Black Hole Quenchers (BHQ). Překrývání Cy5 emisního spektra (**Obrázek 10**) spektrem BHQ-3 je slibným krokem pro Cy5 zhášení. Použití spojení Cy5+BHQ-2

neumožňuje kompletní zhášení fluorescence (nedochází k dostatečnému překryvu spekter), což snižuje citlivost stanovení.



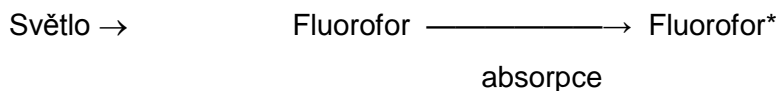
Obrázek 10

Fluorescenční emisní spektrum Cy5 a UV-VIS
absorpční spektra quencherů BHQ-2, BHQ-3 a QSY 21

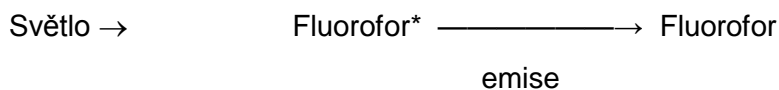
Nejvýznamnějším procesem při zhášení fluorescence je FRET proces.

FRET proces

1.krok : molekula fluoroforu absorbuje světlo a dostane se do excitovaného stádia

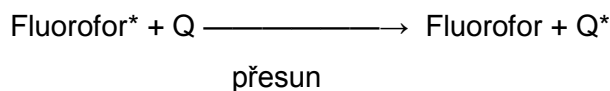


2.krok když nenastane FRET (při absenci quencheru): při absenci zhášení dochází k fluorescence

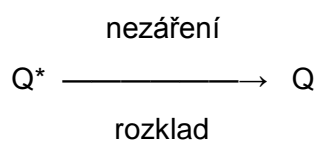


2.krok když nastane FRET (za přítomnosti quencheru): fluorofor v excitovaném stádiu předává energii quencheru (Q) v základním stavu, tím se quencher dostává do excitovaného stavu

energie



3.krok : quencher se vrátí do základního stavu



FRET je interakce mezi fluoroforem v excitovaném stavu a quencherem v základním stavu. Energie je předána z jedné molekuly (fluorofor) na jinou (quencher) bez emise fotonu.

Aby probíhal FRET účinně, musí být molekuly fluoroforu a quencheru blízko sebe (přibližně 10-100 Å) a absorpční spektrum quencheru se musí krýt s emisním spektrem fluoroforu.

3.2.2. Současní zástupci

BHQ barviva jsou nová třída quencherů, které zabraňují fluorescenci, dokud nedojde k hybridizaci. Tyto výkonná a vysoce specifická barviva umožňují identifikaci a kvantifikaci mnoha biomolekul.

Tabulka 2

Absorpční maxima a vlnové délky zhášení BHQ-barviv³⁹

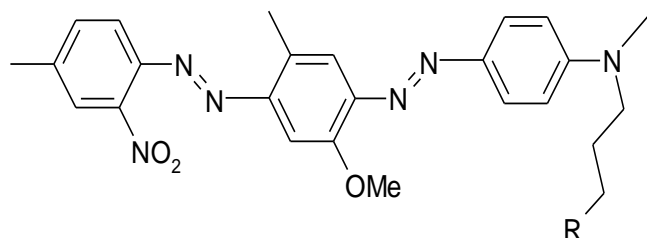
Quencher	Abs _{max}	Vlnová zhášení	délka
BHQ-1	534	480-580	
BHQ-2	579	550-650	
BHQ-3	672	620-730	

Tabulka 3BHQ-barviva / podporované fluorofoxy⁴⁰

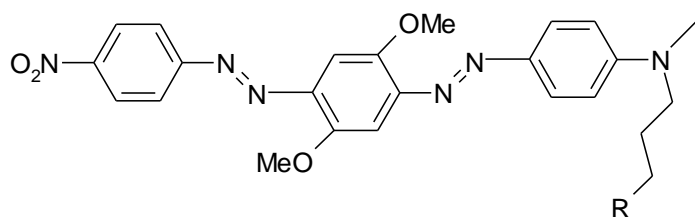
Quencher	Podporované fluorofoxy
BHQ-1	FAM,TET,JOE,HEX,Oregon Green
BHQ-2	TAMRA,ROX,Cy3,Cy3.5,Texas red,Red 640
BHQ-3	Cy5,Cy5.5

BHQ 1

Vyrábí se ve formě (R=) aminu, karboxylové kyseliny, sukcinimidyl esteru a peptidu.

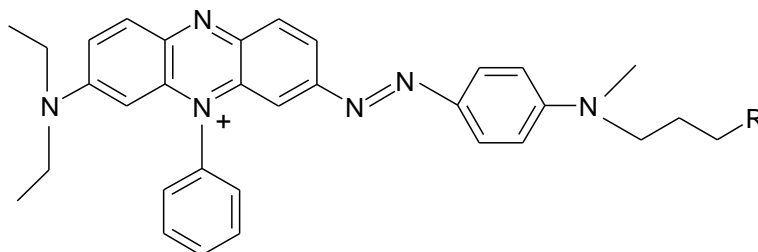
**BHQ 2**

Vyrábí se ve formě (R=) aminu, karboxylové kyseliny, sukcinimidyl esteru a peptidu.



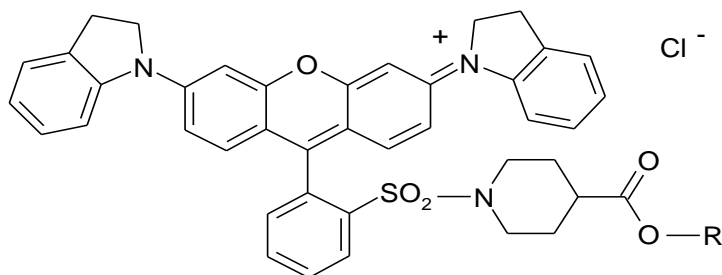
BHQ 3

Vyrábí se ve formě (R=) aminu, karboxylové kyseliny a sukcinimidyl esteru.



QSY 21

Vyrábí se ve formě (R=) karboxylové kyseliny a sukcinimidyl esteru.



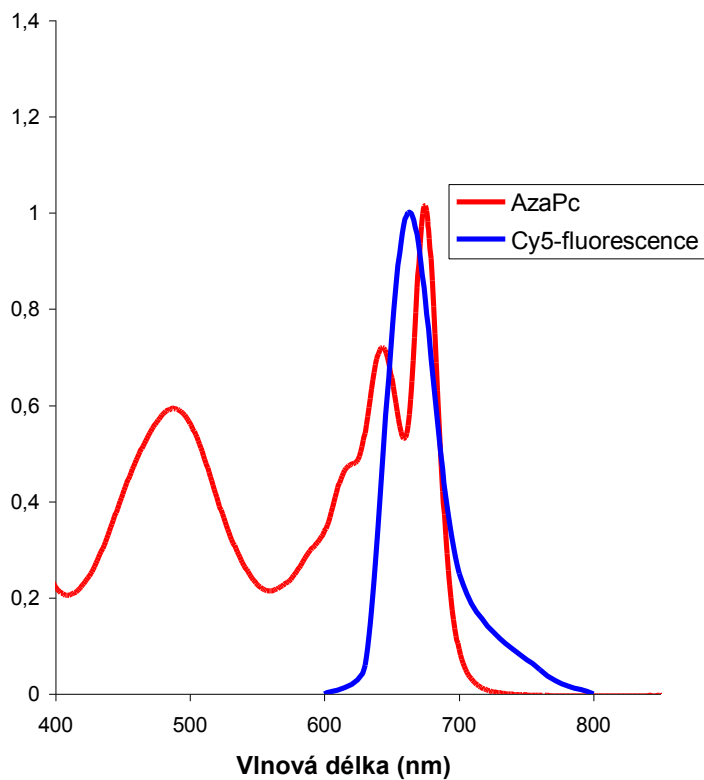
3.2.3. Nové látky s potenciálním využitím

3.2.3.1. Sloučeniny odvozené od azaftalocyaninů

Na katedře farmaceutické chemie a kontroly léčiv Farmaceutické fakulty Univerzity Karlovy v Hradci Králové jsou syntetizovány látky s potenciálním využitím jako zhášecí fluorescence.

Tyto sloučeniny jsou založeny na azaftalocyaninovém jádře. V případě zhášení fluorescence je produkce singletového kyslíku (¹O₂) nevýhodná, protože může způsobit rozštěpení testované DNA a narušit, případně zcela znemožnit testování. Na jádro jsou navázány substituenty pomocí heteroatomu, který určuje, zda látka bude produkovat singletový kyslík nebo nikoli. Řetězce vázané přes síru či kyslík mají výrazný potenciál v tvorbě radikálu. Alkylaminové AzaPc neprodukují žádnou nebo nepatrnou fluorescenci a mají velmi nízkou produkci singletového kyslíku. Jelikož mají silnou absorpci

ve vlnové délce mezi 580 a 710 nm (excitační koeficient okolo 80000-120000), pokrývají perfektně plochu Cy5 fluorescence (Obr. 12 ???), mohly by tedy být potenciálně využitelnými quencherými pro Cy5⁴¹.



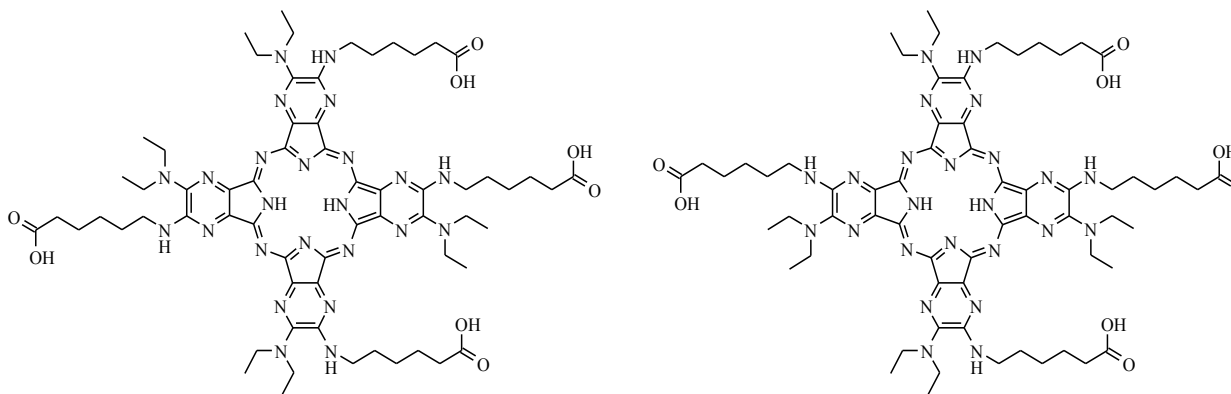
Obrázek 11

Fluorescenční emisní spektrum Cy5 a UV-VIS absorpční spektrum AzaPc

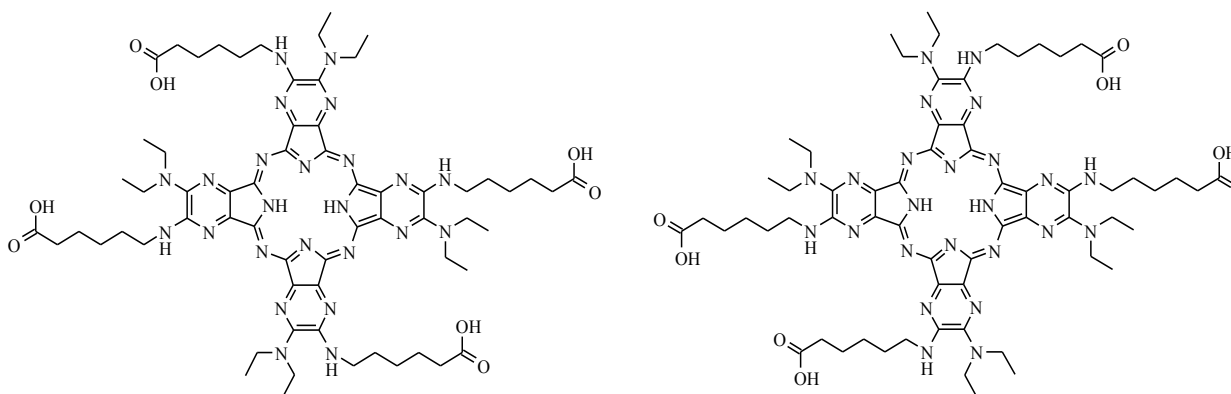
3.2.3.2. Zástupci

3.2.3.2.1. Látka „A“

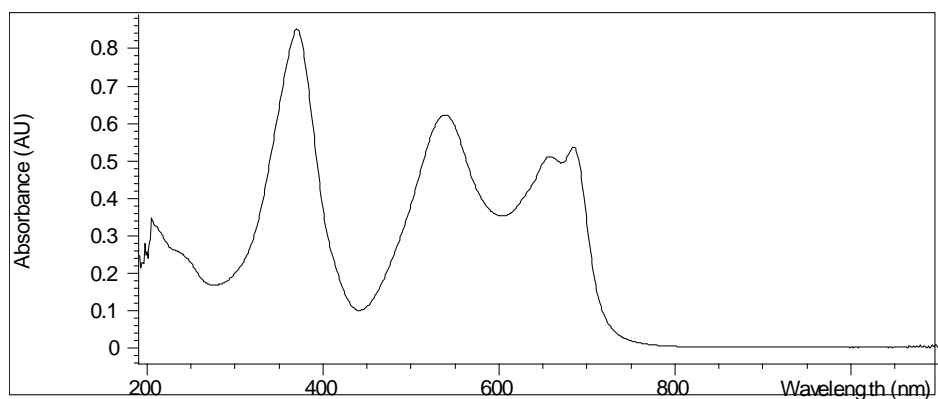
Vzorec (4 izomery):



A



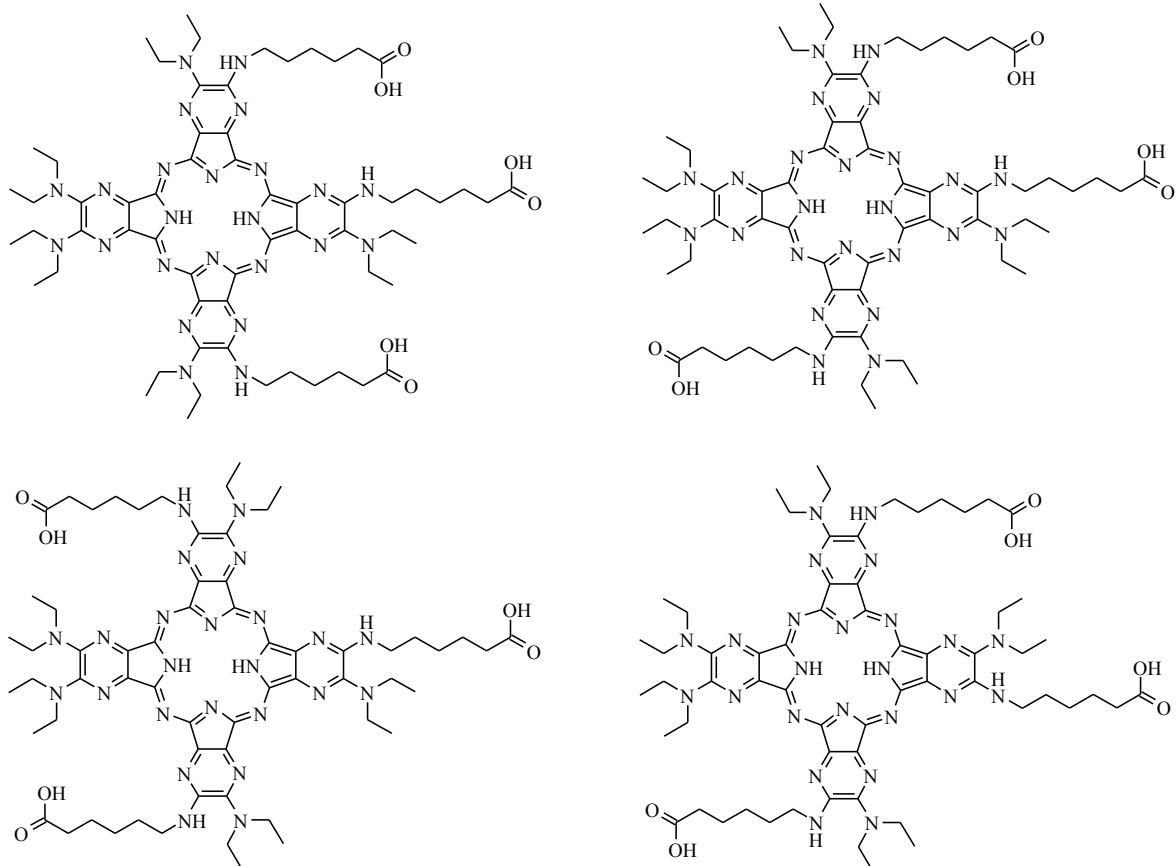
Rozpustnost: Pyridin, methanol, NaHCO₃



Obrázek 12 Absorpční spektrum látky A ve finální optimální mobilní fázi (MF).

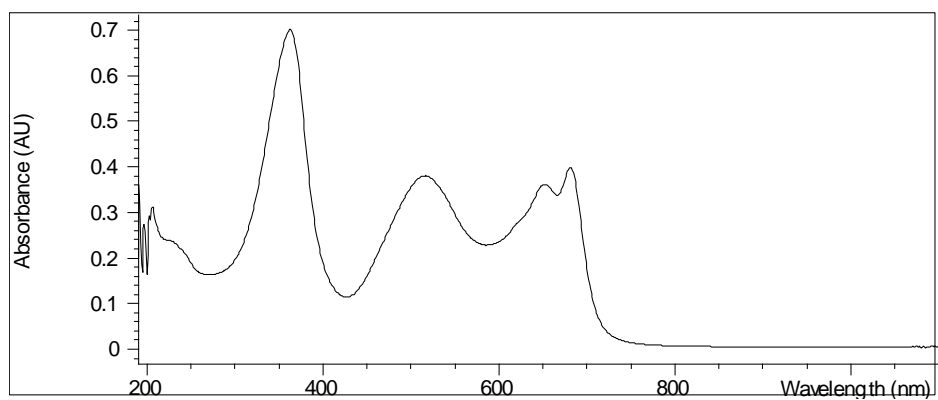
3.2.3.2.2. Látka „B“

Vzorec (4 izomery):



B

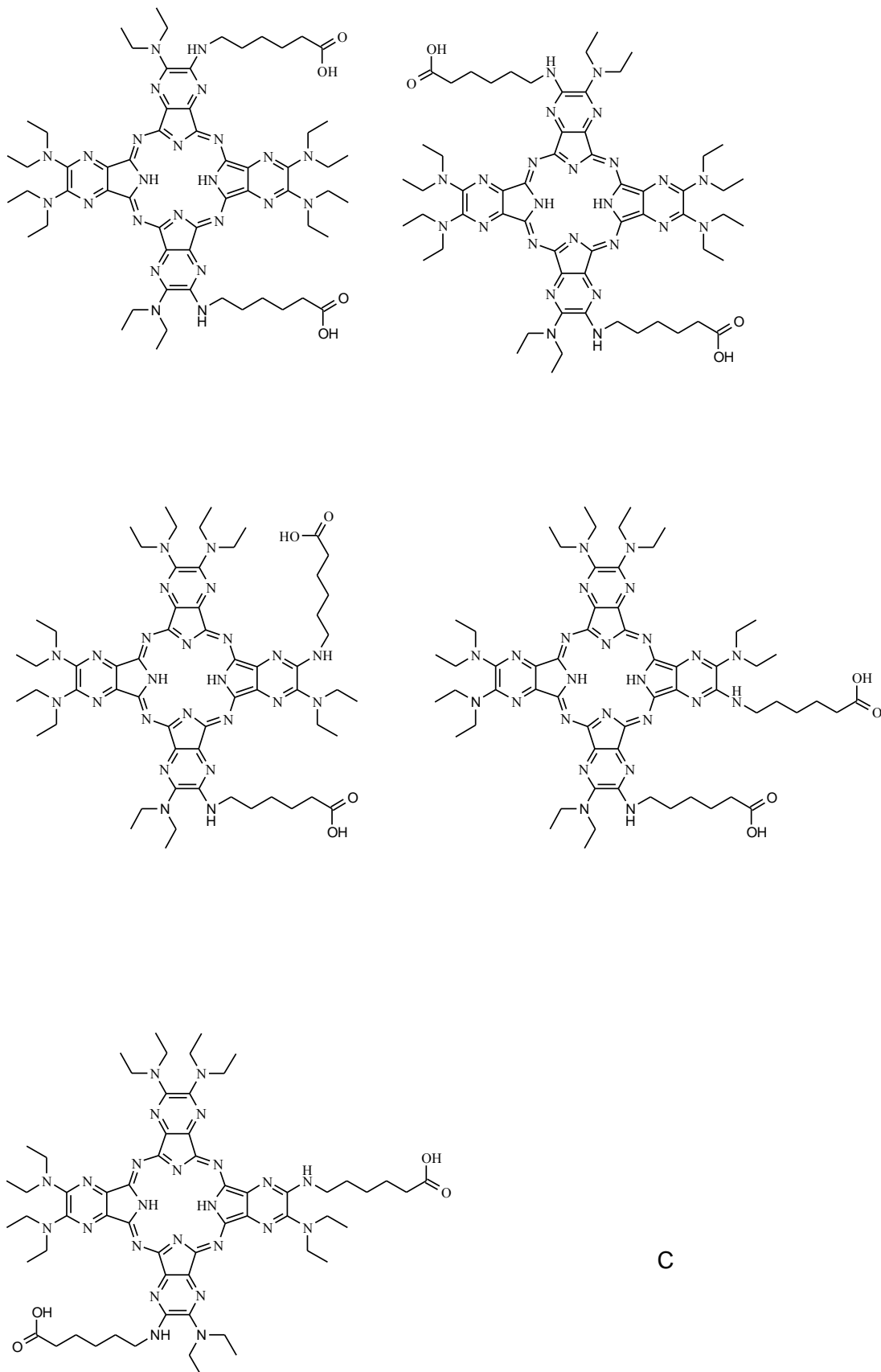
Rozpustnost: pyridin, methanol, NaHCO_3



Obrázek 13 Absorpční spektrum látky B ve finální MF.

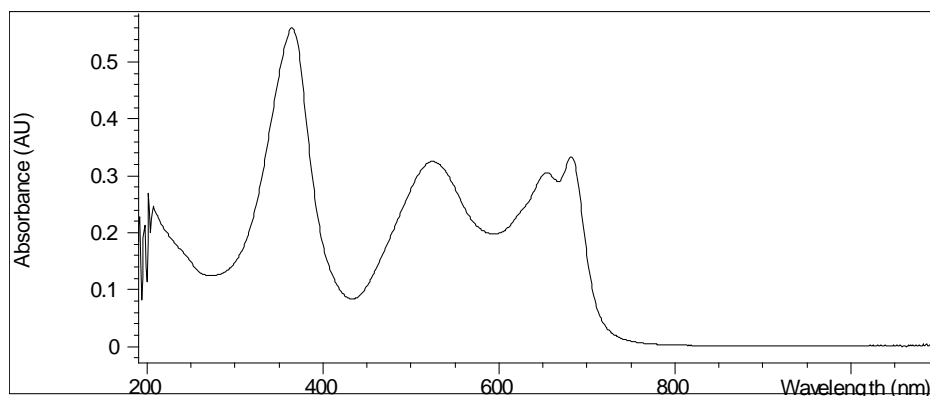
3.2.3.2.3. Látka „C“

Vzorec (5 izomerů):



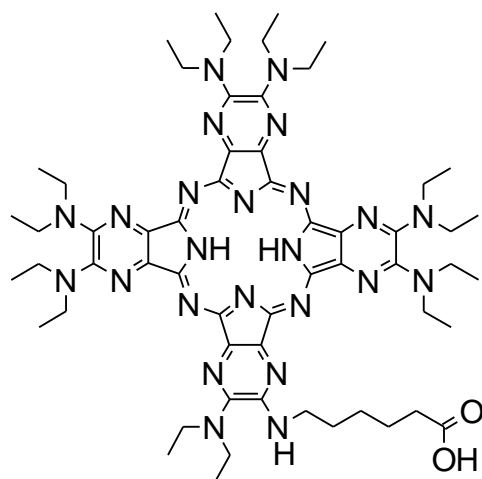
C

Rozpuštnost: pyridin, methanol, aceton, THF, dichlormethan



Obrázek 14 Absorpční spektrum látky C ve finální MF.

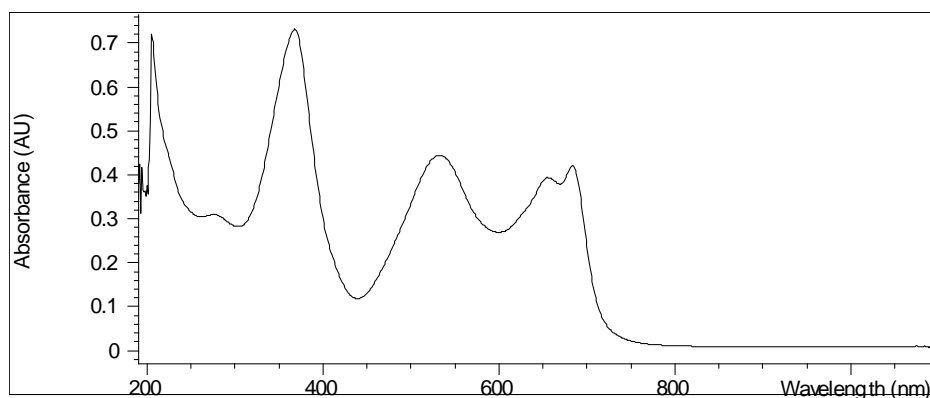
3.2.3.2.4. Látka „D“



D

Vzorec:

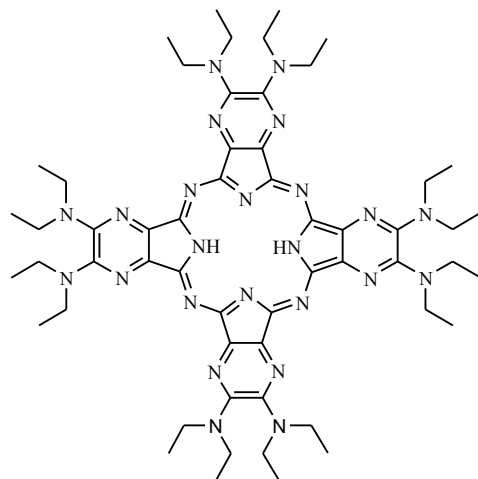
Rozpuštnost: pyridin, methanol, aceton, THF, dichlormethan



Obrázek 15 Absorpční spektrum látky D ve finální MF.

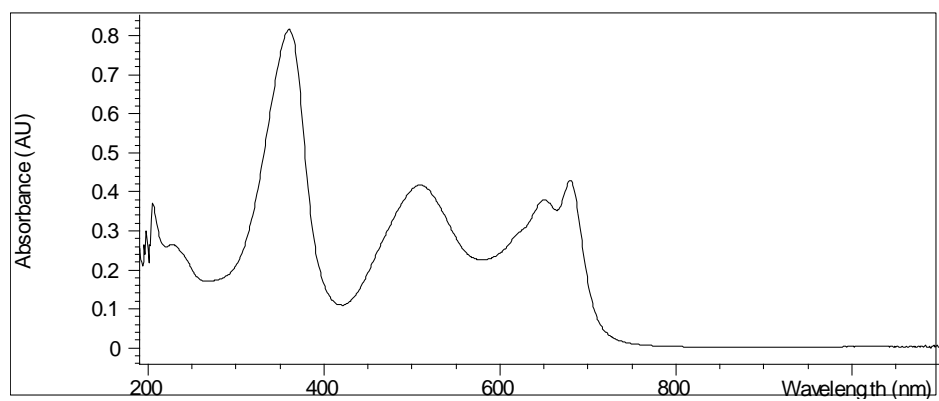
3.2.3.2.5. Látka „E“

Vzorec:



E

Rozpustnost: pyridin, THF, aceton, hexan, dichlormethan



Obrázek 16 Absorpční spektrum látky E ve finální MF.

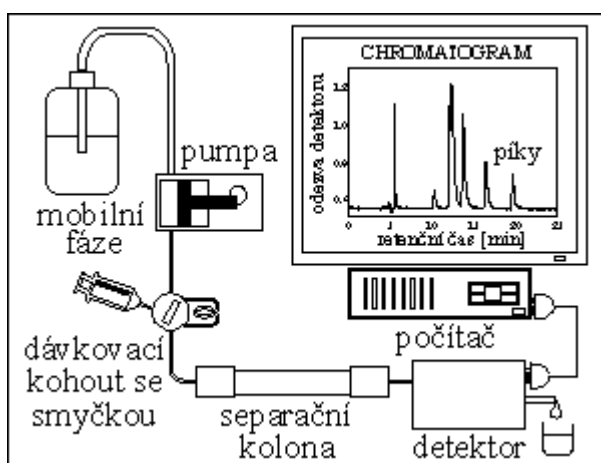
4. KAPALINOVÁ CHROMATOGRAFIE

Chromatografie je separační analytická metoda, tj. poskytuje kvalitativní i kvantitativní informace o vzorku. Využívá distribuce látek mezi dvě fáze – mobilní (pohyblivou) a stacionární (nepohyblivou). V kapalinové chromatografii dělíme od sebe látky kapalné povahy - kapaliny nebo roztoky pevných látek, především látky netěkavé a látky s vyšší molekulovou hmotností.

4.1. HPLC

4.1.1. Přístroj pro měření HPLC

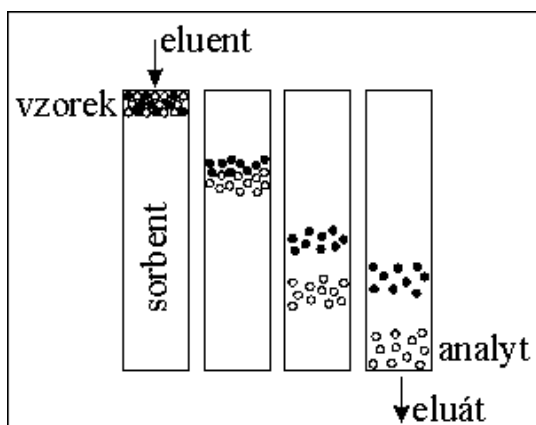
Vysokoúčinnou kapalinovou chromatografii tvoří systém, který se skládá z pumpy (která do systému pumpuje mobilní fázi), dávkovače vzorku, kolony (stacionární fáze), detektoru a počítače, který vyhodnocuje výstupy z detektoru:



Obrázek 17 schéma HPLC systému⁴².

4.1.2. Princip HPLC

Dělení cílových látek probíhá v separační koloně, která obsahuje stacionární fázi (SF) – sorbent a je kontinuálně promývána mobilní fází (MF). Rozdílné analyty mají různou afinitu k sorbentu, tzn., že jsou jím různě zadržovány. Analyty mají rozdílnou afinitu k MF. MF má jiný charakter polarity než stacionární fáze a jednotlivé látky mají afinitu k jedné nebo ke druhé fázi. Dělení pak probíhá na základě opakovaného a mnohonásobného ustalování rovnovážných stavů dělených látek mezi stacionární a mobilní fází. Míra polarity, případně lipofility stacionární a mobilní fáze, se volí podle chování analyzovaných látek.

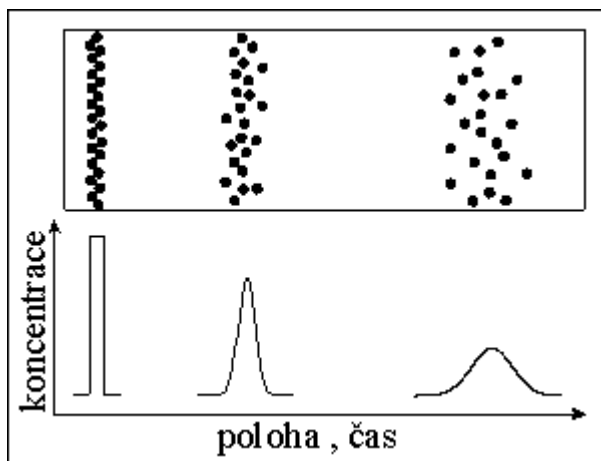


Obrázek 18 Princip separace v kapalinové chromatografii⁴²:

4.1.3. Vyhodnocování separace látek pomocí HPLC.

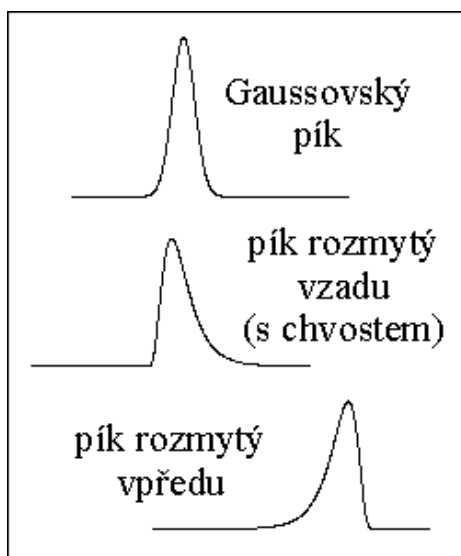
V této kapitole jsou zmíněny základní principy vyhodnocování separace látek pomocí HPLC a základní potíže, které se při vyhodnocování mohou vyskytnout.

Na distribuci látky mezi MF a SF závisí **retenční čas**, tj. čas, který látka stráví v separační koloně. Při hledání MF volíme takové složení, aby látky kolonu neopouštěly ani příliš brzy a nedaly se jednotlivé odezvy látek od sebe odlišit, ani příliš pozdě, neboť potom dochází ve značné míře k difúzi látky, jejíž odezva je pak nepřesná. Látky s nízkou retencí by měly kolonu opustit s určitým časovým odstupem od tzv. mrtvého objemu, tedy objemu, který projde od nástřiku kolonou k detektoru, aniž by byl na koloně zadržován. Jeho množství přibližně odpovídá poloze prvního píku na chromatogramu, který přísluší píku rozpouštědla vzorků. Píky málo zadržovaných látek jsou ostré, ale problémem může být tzv. rozlišení od ostatních píků. Naopak pokud jsou látky na koloně zadržovány příliš dlouho, dojde k většímu rozptylu látky na koloně a detektorem prochází delší dobu v nižší koncentraci, což vede k neostrému píku na chromatogramu. Míru účinnosti separace kvantitativně popisuje počet teoretických pater.



Obrázek 19 Závislost ostrosti píku na retenčním čase. Čím dříve analyt kolonou projde, tím ostřejší je pík odezvy⁴².

Jiným problémem může být tzv. chvostování píku. Dochází k tomu, že se látka buď předbíhá na koloně a určitá část vstupuje do detektoru o něco dříve, anebo se látka na koloně zadržuje více, než by odpovídalo chemickým přitažlivým silám ke stacionární fázi, a odezva látky se natahuje. K popisu charakteru píku z tohoto hlediska se využívá tzv. symetrie píku.



Obrázek 20 Chvostování píku může být na závadu při jeho vyhodnocování⁴².

4.2. Použité chromatografické kolony

4.2.1. Kolony C-18

Tyto kolony mají chemicky vázané uhlovodíkové řetězce s 18 uhlíky, stacionární fáze je tedy značně nepolární. Novinkou jsou monolitní kolony, které jsou složeny z polymerů s dostatečně velkými póry a umožňují průchod i dosti velkých molekul, zejména různých proteinů. Také umožňují pracovat s vyšším průtokem mobilní fáze⁴³.

Pracoval jsem s následujícími kolonami C18:

Chromolith C-18: 100 x 4.6mm

Chromolith C-18: 50 x 4.6mm

Chromolith C-18: 25 x 4.6mm

4.2.2. Kolona C-8

Kolona je tvořena kovalentně vázaným oktysilanem a je méně nepolární. Použil jsem kolonu Supelco Discovery C8 125x3 mm s velikostí částic 5 μm .

4.2.3. Kolona Zorbax[®] Eclipse SB-CN

Může sloužit při separaci jako fáze normální nebo reverzní v závislosti na mobilní fázi. Při reverzní fázi se vyznačuje významným snížením retenčních časů oproti jiným kolonám⁴⁴. Velikost kolony 150x4,6 mm, velikost částic 5 μm .

4.2.4. Kolona Zorbax[®] SB-Phe

Reverzní fáze. Použitá kolona: 75x4,6 mm, velikost částic 3,5 μm .

4.2.5. Kolona Phenomenex Synergi RP-80 FUSION[®]

Kolona obsahuje kombinaci delších nepolárních řetězců C18 a krátkých řetězců s navázanou polární skupinou. Takto upravená kolona zvyšuje retenci polárních skupin v prostředí organické mobilní fáze a snižuje retenci hydrofobních látek⁴⁵. Použitá kolona měla následující parametry: délka/šířka 75/3 mm, velikost částic 4 μm .

4.3. Použité mobilní fáze

Při výběru mobilní fáze jsem hledal takové složení, které by umožnilo dobrou separaci jednotlivých látek a vhodné retenční časy látek, pokud možno v izokratickém módu. Retenční čas látky A by měl být dostatečně vzdálen od mrtvého objemu a zároveň by se retenční čas látky E měl dostat pod 20 minut, aby byl její pík dostatečně ostrý, nechvostoval a zbytečně se neprodlužovala doba analýzy. Všechny mobilní fáze měly převažující organickou složku. Použil jsem následující mobilní fáze:

- ACN/H₂O (různé poměry)
- MeOH/ H₂O (70:30)
- MeOH/THF/ H₂O (60:20:20)
- ACN/THF/ H₂O (různé poměry)

5. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

5.1. *Chemikálie a roztoky*

5.1.1. Chemikálie

Methanol CHROMASOLV, pro HPLC, SIGMA-ALDRICH

Acetonitril CHROMASOLV, pro HPLC, SIGMA-ALDRICH

Tetrahydrofuran CHROMASOLV, pro HPLC, SIGMA-ALDRICH

Ultračistá voda pro HPLC, čištěná systémem Milli-Q (Millipore, Bedford, MA, USA)

Kyselina octová zředěná, Lachema Brno

Hydroxid sodný zředěný, Lachema Brno

Technické pufrы WTW pH 7.0 a pH 4.0

5.1.2. Roztoky

Zásobní roztoky vzorků o koncentraci 500 $\mu\text{g/l}$. 1 μg látky jsem rozpustil v 2 ml methanolu, pouze látku E v THF.

Pro přípravu roztoku směsi jsem smíchal 200 μl ze zásobního roztoku každé látky a 1 ml methanolu. Roztok směsi měl koncentraci 50 $\mu\text{g/l}$.

Pro stanovení kalibrace jsem používal roztoky o koncentraci 100 $\mu\text{g/l}$, 75 $\mu\text{g/l}$, 25 $\mu\text{g/l}$, 12.5 $\mu\text{g/l}$ a 6.25 $\mu\text{g/l}$. Roztok o koncentraci 100 $\mu\text{g/l}$ jsem připravil smícháním 400 μl ze zásobního roztoku každé látky. Nižší koncentrace příslušným ředěním methanolem.

Pro měření opakovatelnosti jsem použil roztok o koncentraci 50 $\mu\text{g/l}$, která leží přibližně uprostřed koncentrací kalibračních roztoků.

Roztoky pro měření spektra jsem připravil rozpuštěním 200 μl zásobního roztoku v mobilní fázi.

5.2. *Přístroje*

- HPLC systém byl složen z následujících komponent:

Pumpa LCP 4100 (Ecom, Praha)

Waters autosampler 717 plus (Waters, Milford, USA)

UV detektor Waters 486 (Waters, Milford, USA)

Řídicí chromatografický software CSW v.1.7 pro Windows (Data Apex s r.o., Praha)

- pH metr HANNA
- ultrazvuková lázeň Tescon 1, Tesla ČR
- analytické váhy Sartorius 2004 MP, SRN

5.3. Pracovní a výpočetní postupy

5.3.1. Pracovní postup

Po zapnutí přístrojů jsem 10-15 minut nechal promývat kolonu acetonitrem a připravil jsem si mobilní fázi, kterou jsem odzdušnil 5 minutovým probubláváním heliem. Poté jsem kolonu nechal přibližně 10 minut promývat mobilní fází. Poté jsem nadávkovoval vzorek a sledoval retenční časy píků látek. Při změně kolony jsem původní kolonu vždy aspoň 20 minut promýval acetonitrem, abych ji zbavil případných nečistot, ulpělých na koloně. Nástřik vzorku jsem nastavil zpočátku na 10, později na 5 μl a průtok jsem nastavoval různě v závislosti na použité koloně, u částicových kolon zpravidla na 1 ml/min a monolitních i 5 ml/min. Podle odezvy jsem upravoval mobilní fázi, případně zkoušel novou kolonu.

5.3.2. Měření kalibrační závislosti

Pro měření kalibrační závislosti jsem použil pět roztoků o koncentraci 100 $\mu\text{g/l}$, 75 $\mu\text{g/l}$, 25 $\mu\text{g/l}$, 12.5 $\mu\text{g/l}$ a 6.25 $\mu\text{g/l}$. Roztok o koncentraci 100 $\mu\text{g/l}$ jsem připravil smícháním 400 μl ze zásobního roztoku každé látky. Další roztoky příslušným naředěním methanolem. S každým roztokem pro kalibraci jsem provedl dvě měření. Kalibrační závislost jsem hodnotil pomocí lineární regrese jako závislost plochy píku látky na její koncentraci v roztoku.

5.3.3. Opakovatelnost metody

Pro zjištění opakovatelnosti metody jsem použil roztok o koncentraci 50 $\mu\text{g/l}$, která leží přibližně uprostřed koncentrací kalibračních roztoků. Provedl jsem šest měření. Vypočítal jsem průměr, směrodatnou odchylku a relativní směrodatnou odchylku podle následujících vztahů:

$$\bar{x} = \frac{\sum x_i}{n}$$

$$s = \sqrt{\frac{1}{n-1} \sum (x_i - \bar{x})^2}$$

$$s_r = \frac{s}{\bar{x}} \cdot 100\%$$

Kde \bar{x} je průměr, x_i - dílčí hodnota, n - počet měření, s - směrodatná odchylka, s_r - relativní směrodatná odchylka (v %).

6. VÝSLEDKY A DISKUZE

6.1. Vývoj a optimalizace separace pomocí HPLC

Hlavní náplní mé diplomové práce bylo navrhnout separační podmínky pro pět látek ze skupiny azaftalocyaninů pomocí kapalinové chromatografie. Látky jsem si označil A – E a jejich vzorce, rozpustnosti a absorbance jsou popsány v kapitole 3.2.3.2. Látka E je nejlipofilnější a nemá funkční skupinu ve své molekule. Látka D má řetězec s jednou karboxylovou skupinou. Řetězec s karboxylovou skupinou je vázán na jádro prostřednictvím sekundárního dusíku. Látky A - D mají charakter ϵ - aminokyselin, což mj. předurčuje jejich závislost na pH. Látky C až A mají vždy o další řetězec s karboxylovou skupinou více. Vybral jsem chromatografii na reverzní fázi, tj. s lipofilní stacionární a relativně hydrofilní mobilní fází. Vzhledem k lipofilitě látek bude přesto v mobilní fázi převažovat organická složka.

Jako první mobilní fázi jsem vyzkoušel směs ACN/H₂O a hledal poměr zastoupených rozpouštědel, který by byl pro separaci optimální. Zkusil jsem i směs methanolu a vody. Při této MF však separace nebyla dostačující. S MF ACN/H₂O se na koloně příliš zdržovala látka E, která narozdíl od všech ostatních není rozpustná v methanolu, ale zato se dobře rozpouští v THF. Zavedením THF do mobilní fáze jsem využil ke snížení separačního času látky E, aniž by došlo k překrývání píků méně zdržovaných látek, ke kterému docházelo u mobilní fáze ACN/H₂O s vysokým podílem organické složky. THF je rozpouštědlo s vyšší eluční silou než ACN.

Z kolon jsem vyzkoušel C-18, C-8, částicové kolony Zorbax s navázanými skupinami –CN, -Phe (fenyl) a –TMS (trimethylsilyl) a konečně kolonu Phenomenex Synergi RP Fusion.

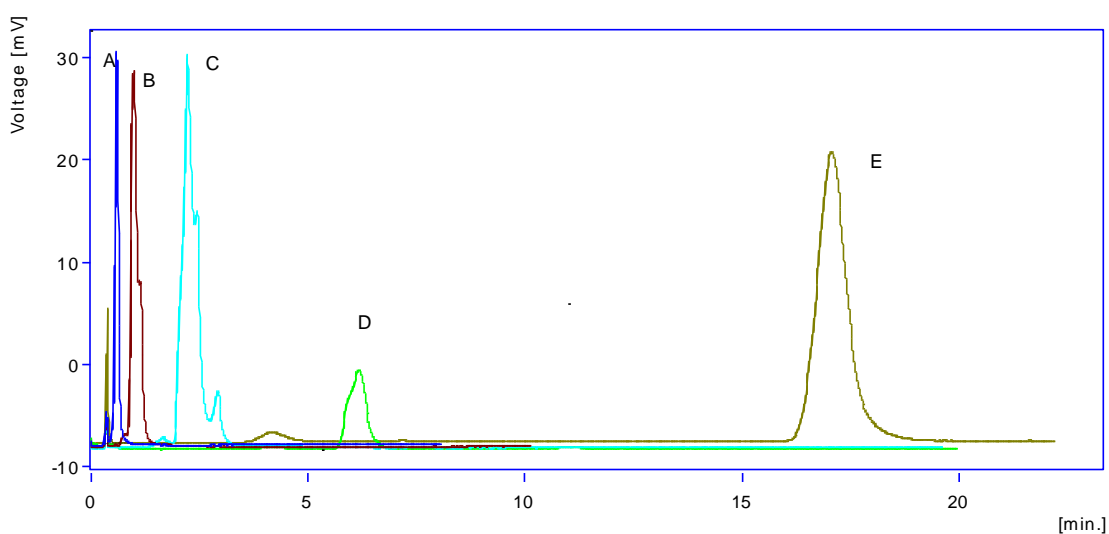
Během experimentální práce jsem hledal vhodnou kolonu i složení MF. Nejprve jsem otestoval kolony při použití dvousložkové MF ACN/H₂O. Po zavedení THF do MF jsem se k nadějným kolonám opět vrátil. Pro přehlednost uvádím výsledky v závislosti na použitých kolonách. Použitelné výsledky jsou shrnuty v tabulce. Pro názornost doplňuji zajímavější výsledky obrázkem chromatogramu.

6.1.1. Výsledky na kolonách C18

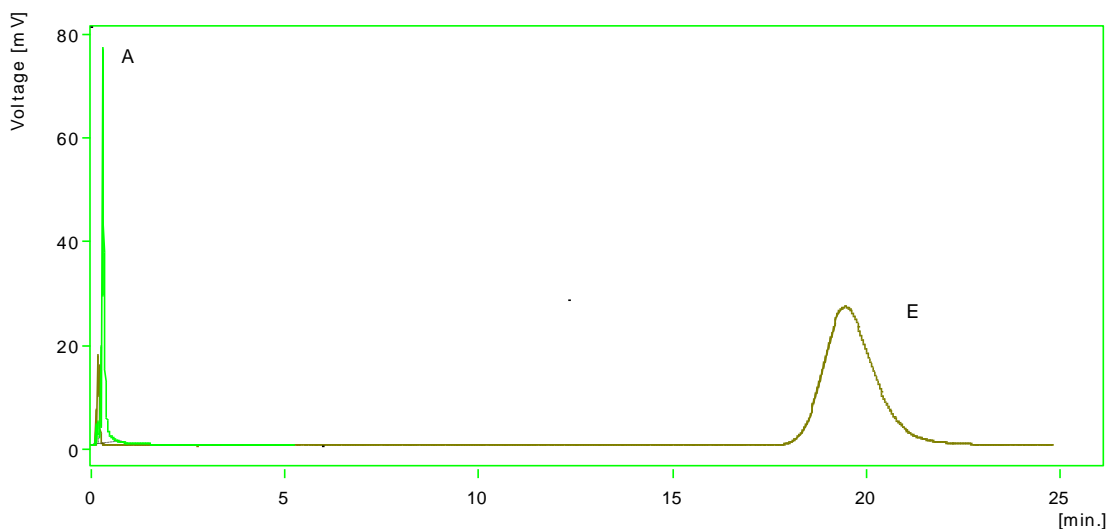
Při použití mobilní fáze ACN/H₂O jsem musel navolit poměr s výrazně převažující organickou složkou, aby látka E měla retenční čas do 20. minuty. Při použití kolony dlouhé 100 mm měla optimální dvousložková mobilní fáze poměr 90:10. Problémem byl retenční čas látky A, který byl příliš blízko retenčnímu času rozpouštědel. Při použití kratších kolon jsem mohl poměr organiky snížit, přesto látka A odcházela jen těsně za mrtvým objemem. Zařazení THF do mobilní fáze vedlo k mírnému posunu retenčního času látky A a ke snížení retenčního času látky E a k zaostření jeho píku.

Tabulka 4 Retenční časy látek A a E na kolonách C18.

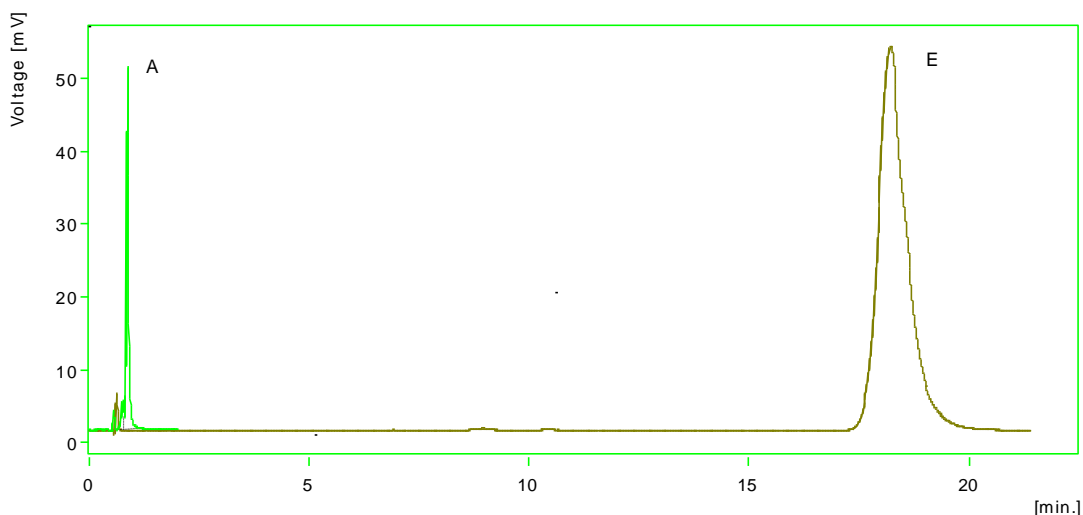
typ kolony	délka kolony(mm)	mobilní fáze	průtok k	ret.čas MeOH	ret.čas THF	ret. čas A	ret. čas E
C18	25	ACN/H ₂ O 80:20	3.0	0.16	0.19	0.31	19.53
	100	ACN/H ₂ O 90:10	5.0	0.35	0.38	0.59	17.13
	100	ACN/THF/H ₂ O 50:20:30	3.0	0.57	0.64	0.87	18.28



Obrázek 21 Chromatogram za podmínek: kolona Chromolith Performance C-18: 100 x 4.6mm, mobilní fáze: ACN/H₂O 90:10



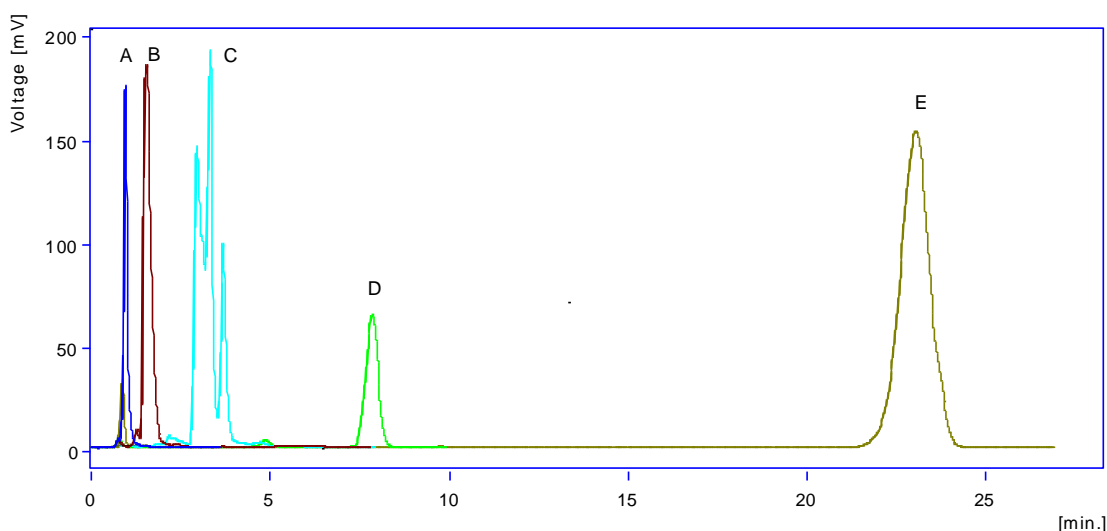
Obrázek 22 : Chromatogram za podmínek: kolona Chromolith Flash C-18: 25 x 4.6mm, mobilní fáze: ACN/H₂O 80:20



Obrázek 23 Chromatogram za podmínek: kolona Chromolith Flash C-18: 25 x 4.6mm, mobilní fáze: ACN/THF/H₂O 50:20:30

6.1.2. Výsledky na koloně C8

Na této koloně byla odezva píků mnohem ostřejší než na kolonách C18. Hledal jsem optimální mobilní fázi změnami poměru organické a vodné složky ve dvousložkové mobilní fázi. Mobilní fáze s poměrem ACN/H₂O 80:20 nerozdělil látku A od mrtvého objemu, při poměru 65:35 byly již píky lipofilních látek značně rozmyté. Nejlepší výsledky byly dosaženy při složení mobilní fáze ACN/H₂O 75:25, ovšem pik látky A se kryje s píky rozpouštědel, jak je možné vidět na obrázku:

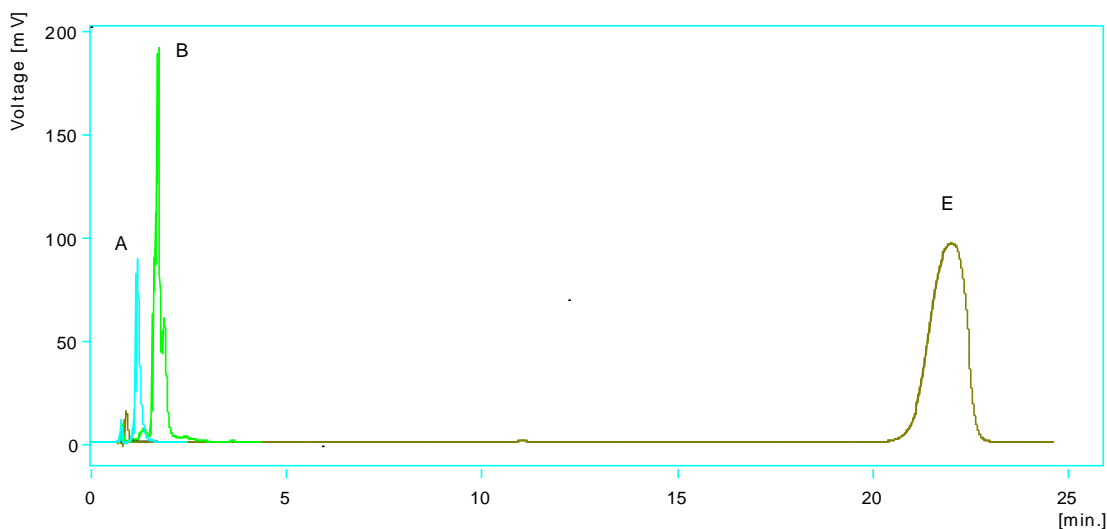


Obrázek 24 Chromatogram za podmínek: kolona C-8 Discovery 125 x 3 mm, mobilní fáze: ACN/H₂O 75:25

V tomto stádiu jsme uvažovali o gradientové eluci, ale stále ještě hledali možnost nalezení nové kolony vhodné pro isokratickou eluci. Pozdější zavedení THF do mobilní fáze přineslo nové možnosti. Látky hnané mobilní fází ACN/THF/H₂O byly na koloně zadržovány méně. Při mobilní fázi ACN/THF/H₂O 50:15:35 se látky separovaly dobře.

Tabulka 5 Závislost t(r) látek A a E na složení mobilní fáze na koloně C8 Discovery. Průtok mobilní fáze kolonou 1,0 ml/min.

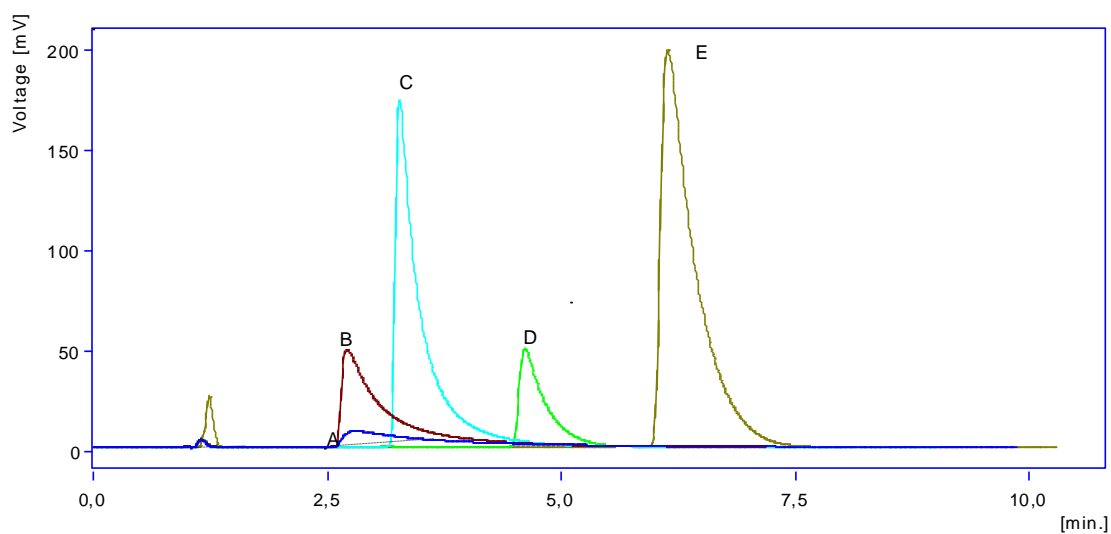
Mobilní fáze	t(r) THF	t(r) A	t(r) E	poznámka
ACN/H ₂ O 75:25	0.89	0.96	23.12	
ACN/THF/H ₂ O 60:20:20	0.88	0.87	3.61	Příliš velká eluční síla mobilní fáze
ACN/THF/H ₂ O 50:20:30	0.87	0.94	4.28	-II-
ACN/THF/H ₂ O 50:15:35	0.90	1.21	22.11	Pík látky E roztažený (obrázek 20)



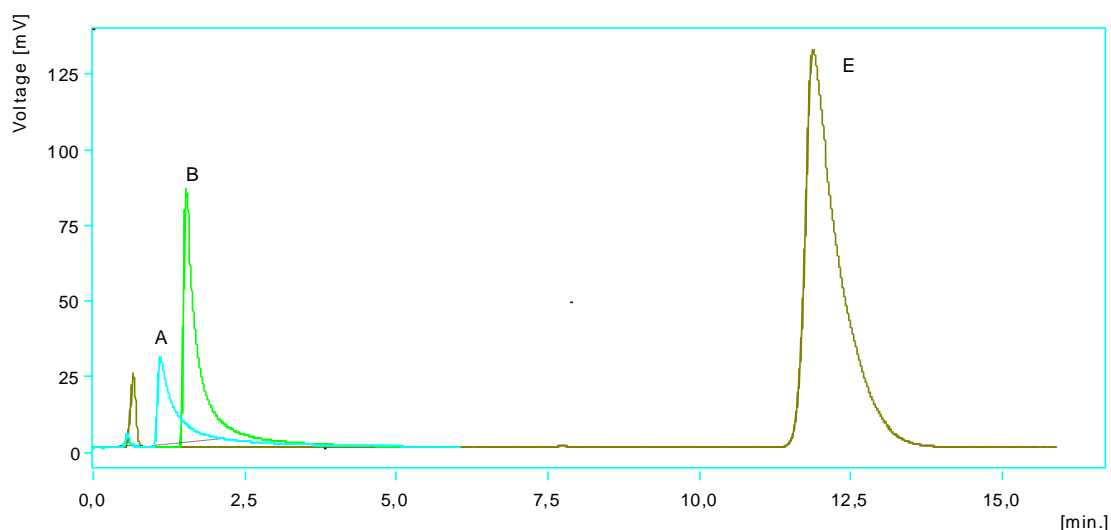
Obrázek 25 Chromatogram za podmínek kolona C-8 Discovery 125 x 3 mm, mobilní fáze: ACN/THF/H₂O 50:15:35

6.1.3. Výsledky na kolonách se skupinami -CN, -Phe a -TMS chemicky vázanými na stacionární fázi

Kolony značky Zorbax, připravené technologií, která chrání navázané substituenty – tzv. stable bond (SB) kolony⁵⁷. Vyzkoušel jsem na nich pouze mobilní fázi ACN/H₂O. Usoudil jsem, že pro separaci nebudou optimální a dále jsem se věnoval kolonám s lepším potenciálem. Kolonu s nitrilovou skupinou (Zorbax SB-CN150 x 4,6mm) jsem použil v naději, že se pík látky E bude méně zdržovat, což byl hlavní problém u kolon C18. Látky s polárními skupinami se na koloně zdržovaly déle a u látky E se retence snížila. Zásadním problémem však bylo chvostování pík. Pro ilustraci uvádím obrázky 21 a 22. Kolony s navázanými fenylovými, eventuálně trimethylsilylovými skupinami dobré výsledky nepřinesly. U posledně zmiňované se látky separovaly hodně špatně.



Obrázek 26 Chromatogram za podmínek: kolona Zorbax SB-CN150 x 4,6mm, mobilní fáze: ACN/H₂O 80:20.



Obrázek 27 Chromatogram za podmínek: kolona Zorbax SB-Phenyl: 75 x 4,6mm, mobilní fáze: ACN/H₂O 80:20.

6.1.4. Výsledky na koloně Phenomenex Synergi Fusion

Po zkušenostech z používání předchozích kolon jsem se snažil najít takovou kolonu, která by snížila retenci látky E a zároveň dostatečně zadržovala látky A, příp. B, aby byly dostatečně vzdálené od mrtvého objemu. Kolona Phenomenex Synergi Fusion by tuto vlastnost mohla splňovat, protože kromě nepolárních řetězců má i řetězce s polární skupinou, které budou zvyšovat retenci látky A a naopak snižovat

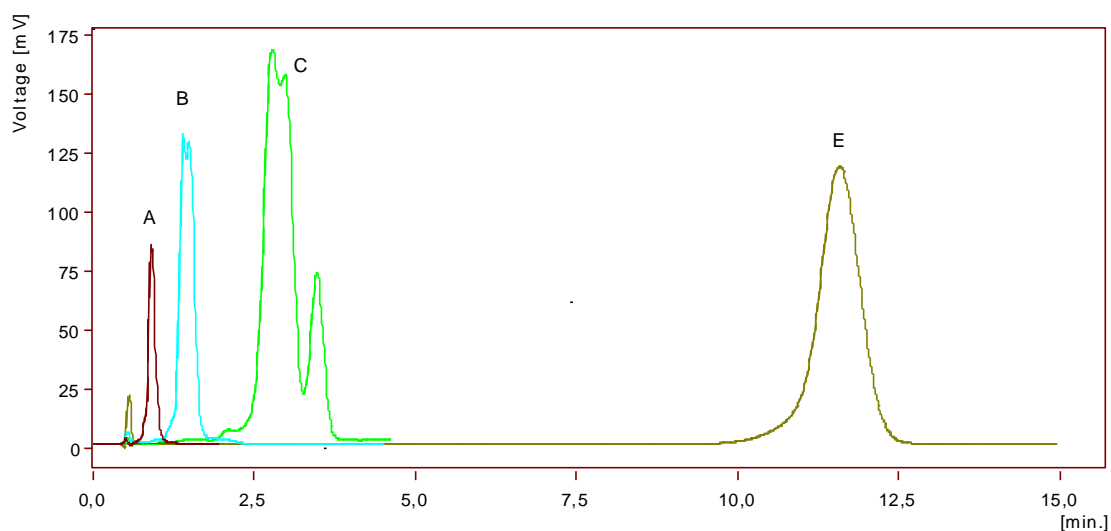
retenci látky E. S mobilní fází ACN/H₂O se látky na koloně příliš zdržovaly, zejména hodně lipofilní látka E.

Tabulka 6 Srovnání retence látek A a E na kolonách C18 a Phenomenex Synergi Fusion s mobilní fází ACN/H₂O 90:10.

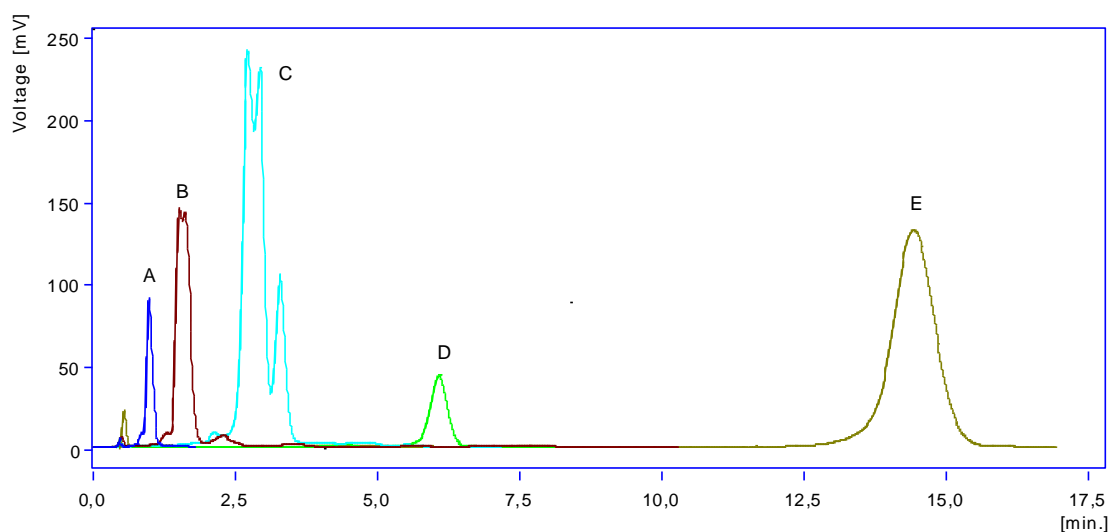
kolona	Průtok MF (ml/min)	t(r) THF	t(r) A	t(r) E
C18 100 x 4,6 mm	5,0	0.38	0.59	17.13
Phenomenox 75 x 3 mm	1,0	0.31	1.05	14.29

Tabulka 7 Závislost t(r) látek A, B a E na složení mobilní fáze na koloně Phenomenex Synergi Fusion. Průtok mobilní fáze kolonou 1,0 ml/min.

Mobilní fáze	t(r) THF	t(r) A	t(r) B	t(r) E	Poznámka
ACN/THF/H ₂ O 60:25:15	0.55	0.64	0.83	3.80	Vysoké množství THF v MF
ACN/THF/H ₂ O 75:15:15	0.56	0.91	1.41	11.63	Obrázek 28 Chromatogram za podmínek: kolona Phenomenex Synergi RP 80: 75 x 3mm, mobilní fáze: ACN/THF/H ₂ O 75:15:15, průtok 1,0 ml/min. .Obrázek 28
ACN/THF/H ₂ O 60:20:20	0.56	0.93	1.43	11.81	MF má velmi podobné vlastnosti
ACN/THF/H ₂ O 50:20:30	0.56	0.99	1.53	14.29	Vhodné složení MF. Obrázek 29



Obrázek 28 Chromatogram za podmínek: kolona Phenomenex Synergi RP 80: 75 x 3mm, mobilní fáze: ACN/THF/H₂O 75:15:15, průtok 1,0 ml/min.



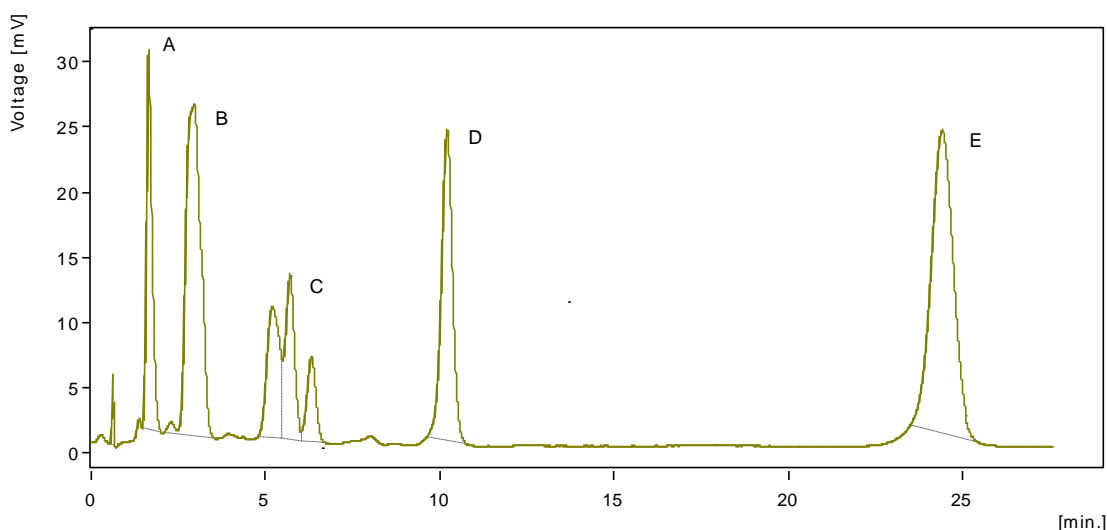
Obrázek 29 Chromatogram za podmínek: kolona Phenomenex Synergi Fusion RP 80: 75 x 3mm, mobilní fáze: ACN/THF/H₂O 50:20:30, průtok 1,0 ml/min..

S touto MF jsem se rozhodl dále pracovat, neboť umožnila na této koloně dobrou separaci látek při isokratické eluci. Ještě jsem se pokusil zařadit předkolonu C18, aby se píky od sebe více vzdálily, ovšem bez většího efektu.

Tabulka 8 Srovnání retenčních časů při použití kolony Phenomenex Synergi Fusion samotné a při použití předkolony C18.

Předkolona	MF	t(r) THF	t(r) A	t(r) B	t(r) E
ne	ACN/THF/H ₂ O 50:20:30	0.56	0.99	1.53	14.29
ano	ACN/THF/H ₂ O 50:20:30	0.76	1.19	2.18	24.20

Připravil jsem si roztok směsi všech 5 látek o koncentraci 50 µg/l. Příprava je popsána v kapitole Roztoky. Směsný roztok jsem nastříkl na kolonu Phenomenex Synergi Fusion s předkolonou C18. Látky byly dostatečně separované (splněna podmínka rozlišení nejméně 1,5). Retenční časy (zejména látky E) se poněkud zvýšily.



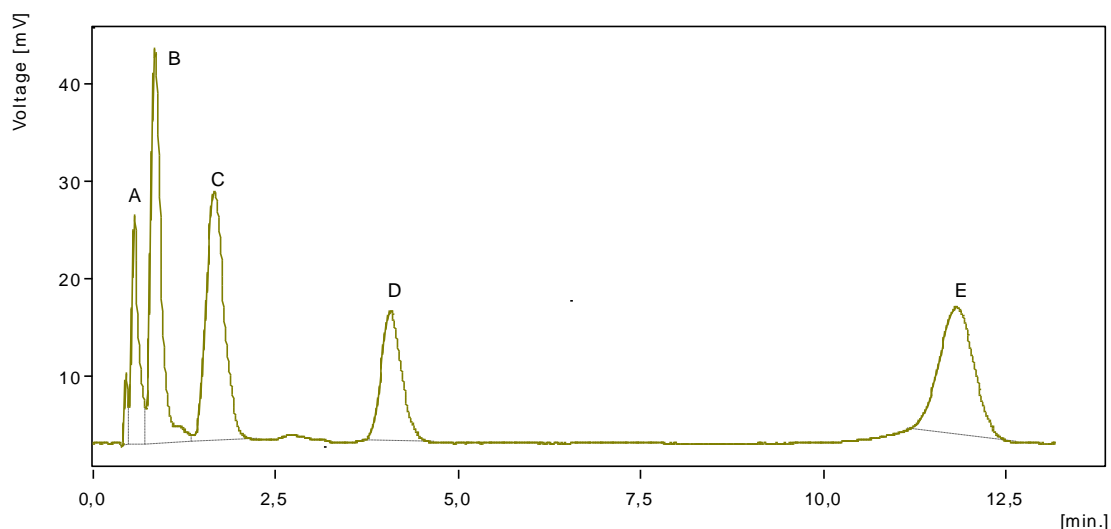
Obrázek 30 Nástřik směsi. Phenomenex Synergi Fusion RP 80: 75 x 3mm s předkolonou C18, mobilní fáze: ACN/THF/H₂O 50:20:30, průtok 1,0 ml/min.

Při dalších měřeních jsem již používal kolonu Phenomenex Synergi Fusion RP 80: 75 x 3mm bez předkolony. Výsledky shrnuje **Tabulka 9**, chromatograf je zobrazen na **Obrázek 32**.

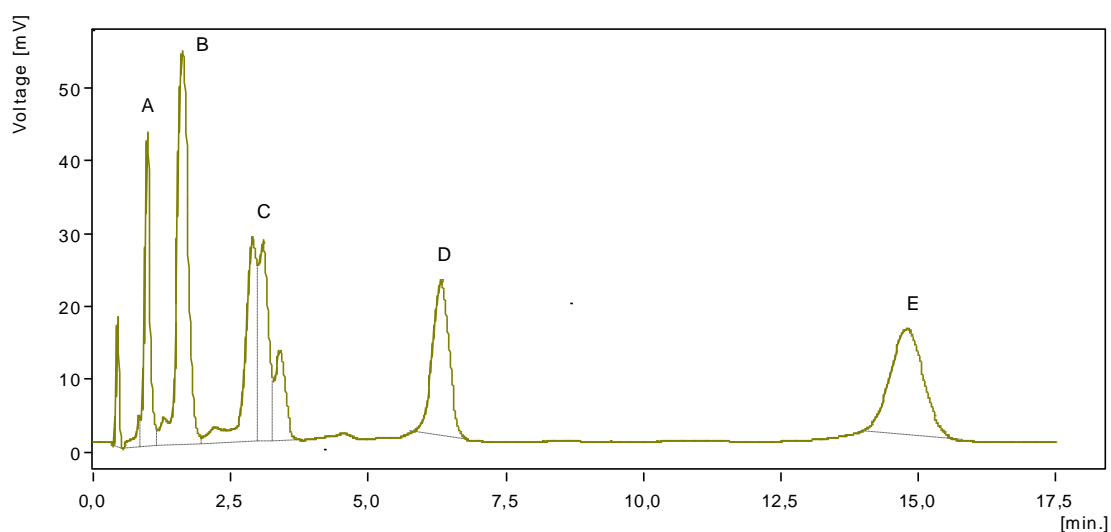
Tabulka 9 retenční časy látek po nástřiku roztoku směsi na koloně Phenomenex Synergi Fusion RP 80: 75 x 3mm, mobilní fáze ACN/THF/H₂O 50:20:30, průtok 1,0 ml/min.

t(r) THF	t(r) A	t(r) B	t(r) C	t(r) D	t(r) E
0.56	1.05	1.72	3.03	6.49	14.9

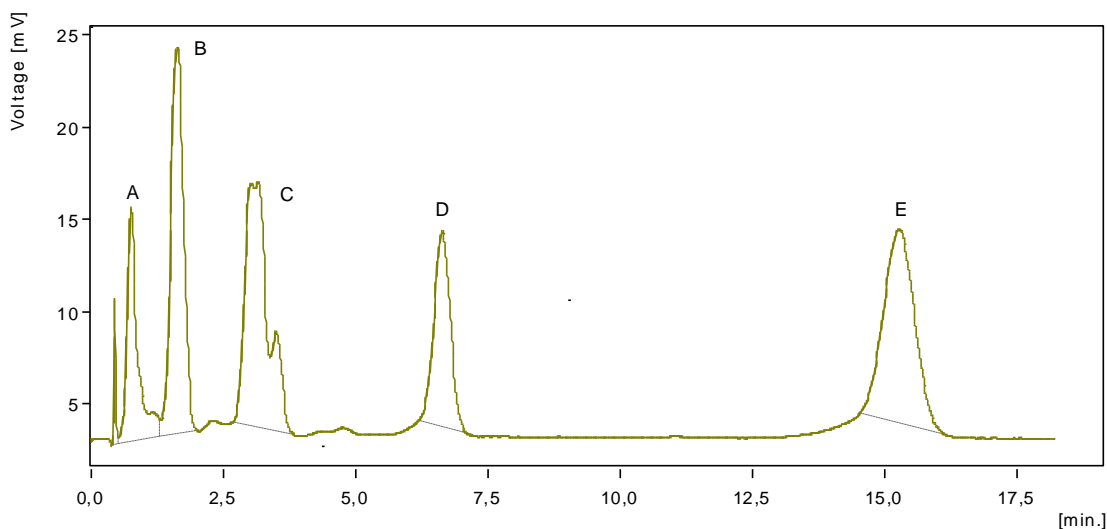
Látky A – D mají charakter ϵ -aminokyselin, a proto je jejich chování na koloně významně ovlivněno pH MF. Neměl jsem sice za cíl vystopovat závislost retenčních časů látek na pH, ale musím zde zmínit význam tohoto faktoru a důsledek změny pH na separaci. Dokladuji to následujícími chromatografy pořízenými při různých hodnotách pH MF ACN/THF/H₂O 50:20:30. Mimo určité optimální rozmezí pH se látky s více polárními skupinami dostatečně neseparují. Toto rozmezí leží přibližně mezi hodnotami pH 4,0 a 5,5.



Obrázek 31 Nástřik směsi. Phenomenex Synergi RP 80: 75 x 3mm, mobilní fáze: ACN/THF/H₂O 50:20:30, pH = 3.2.



Obrázek 32 Nástřik směsi. Phenomenox Synergi RP 80: 75 x 3mm, mobilní fáze: ACN/THF/H₂O 50:20:30, pH = 5.5.



Obrázek 33 Nástřik směsi. Phenomenox Synergi RP 80: 75 x 3mm, mobilní fáze: ACN/THF/H₂O 50:20:30, pH = 6.0.

Z výše uvedených 3 chromatogramů vyplývá, že nejlepší podmínky pro separaci látek jsou dosaženy při pH 5,5. Tato hodnota je pouze experimentálně zjištěná, protože hodnoty pK_a dodaných látek nejsou zatím známe. Nicméně v dalších experimentech bylo pH mobilní fáze vždy upraveno pomocí zředěné kyseliny octové, respektive zředěného hydroxidu sodného, na hodnotu pH 5,5.

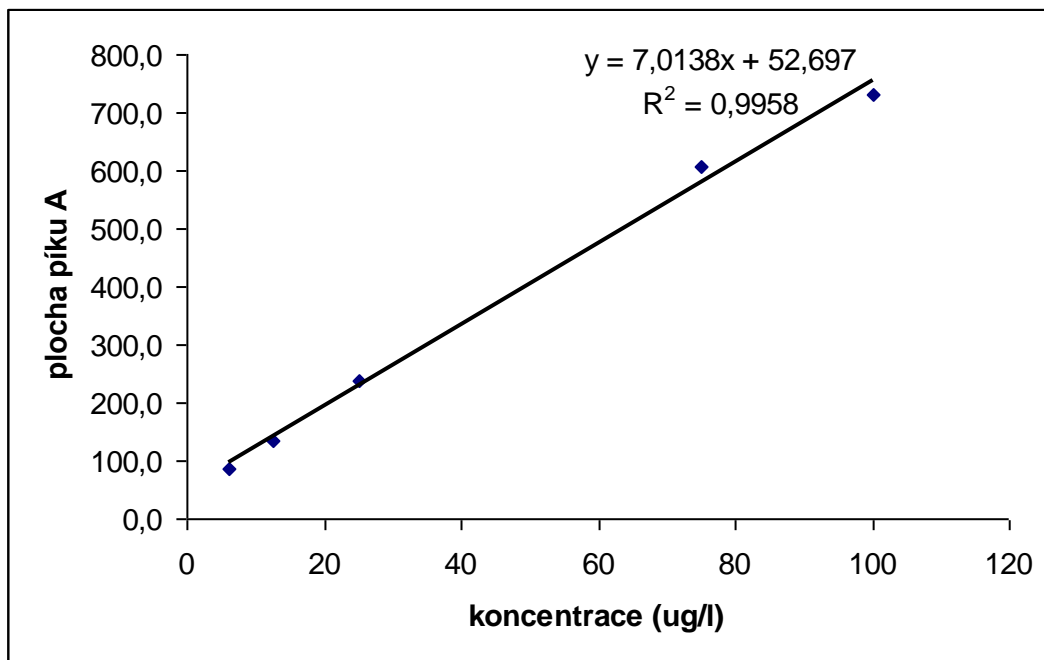
6.2. Kalibrační závislost

Závislost velikosti odezvy na koncentraci jsem měřil pro roztoky o koncentraci 100 µg/l, 75 µg/l, 25 µg/l, 12.5 µg/l a 6.25 µg/l. Linearitu závislosti jsem určoval pomocí lineární regrese.

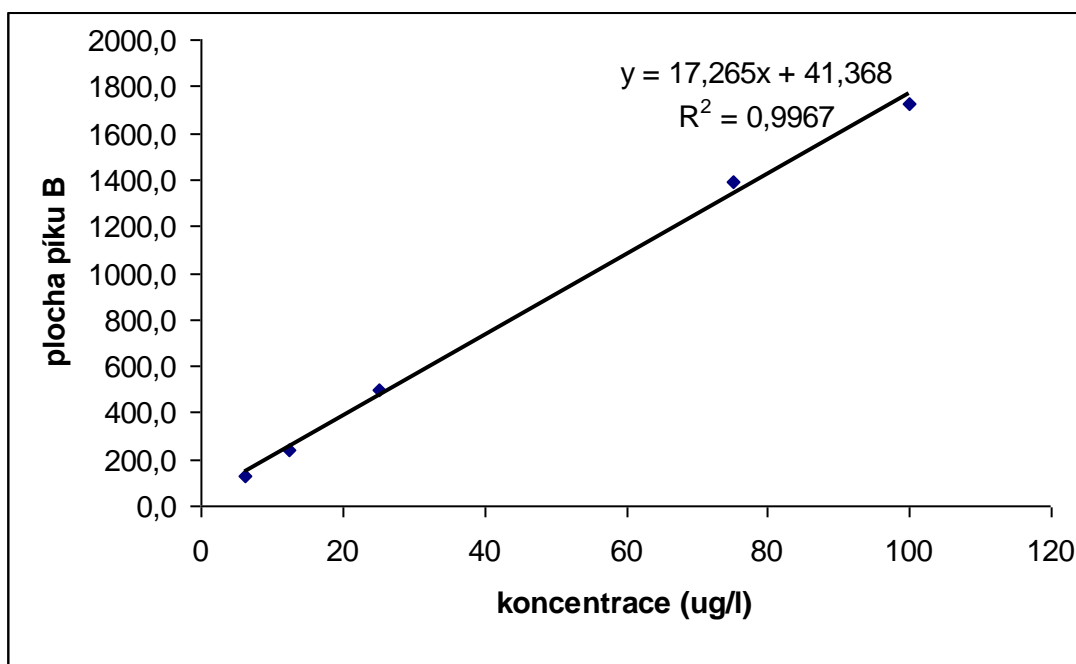
Tabulka 10 Průměrná plocha píků jednotlivých látek ve směsi v závislosti na jejich koncentraci.

Koncentrace v µg/l	plocha piku A	plocha piku B	plocha piku C	plocha piku D	plocha piku E
6,25	87,3	132,2	125,3	68,4	128,0
12,5	133,5	237,6	247,6	138,8	285,8
25	238,6	497,6	597,3	324,5	664,1
75	605,7	1394,8	1691,6	946,7	2107,0
100	732,7	1721,3	2020,5	1196,4	2659,7

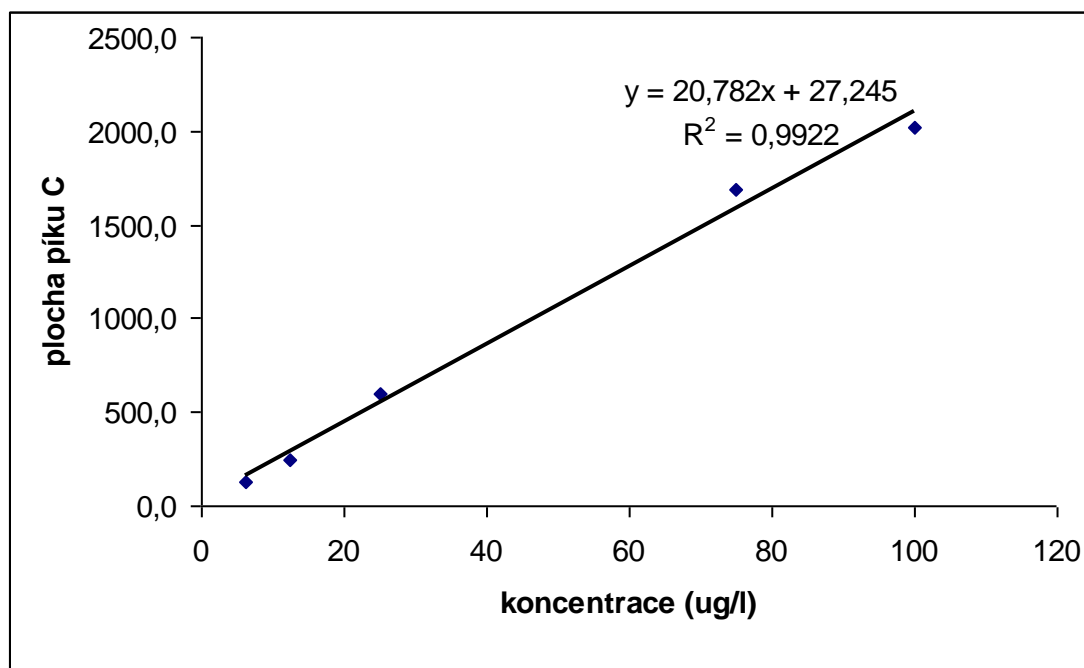
Dále uvádím závislost plochy píků na koncentraci na následujících grafech s lineární regresí, rovnicí vzniklé přímky a hodnotou spolehlivosti R^2 .



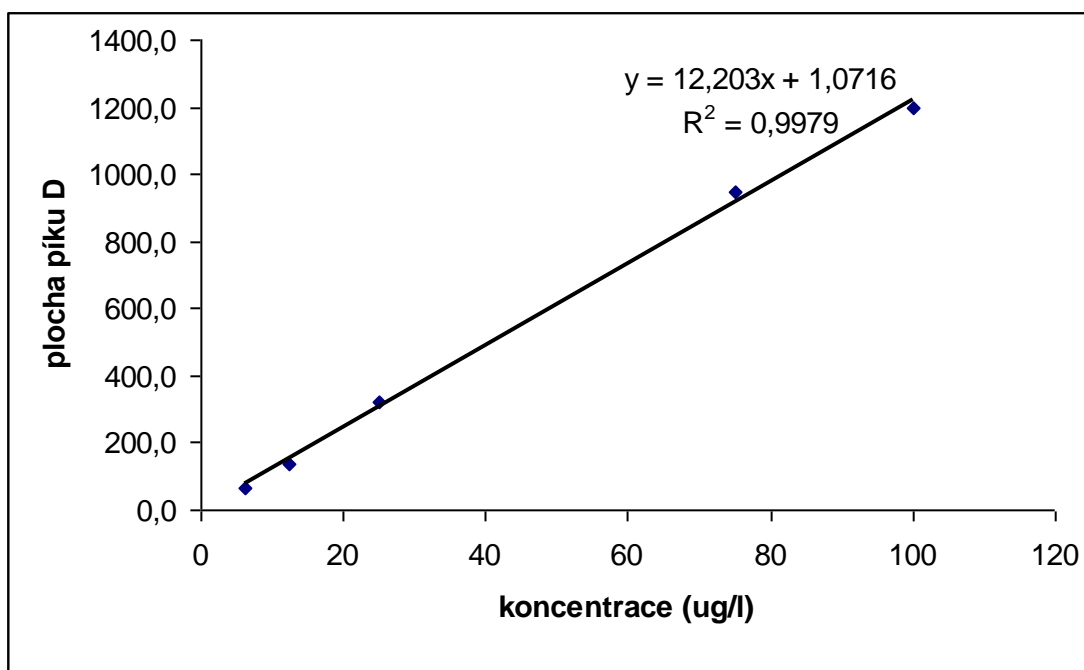
Obrázek 34 Kalibrační závislost látky A.



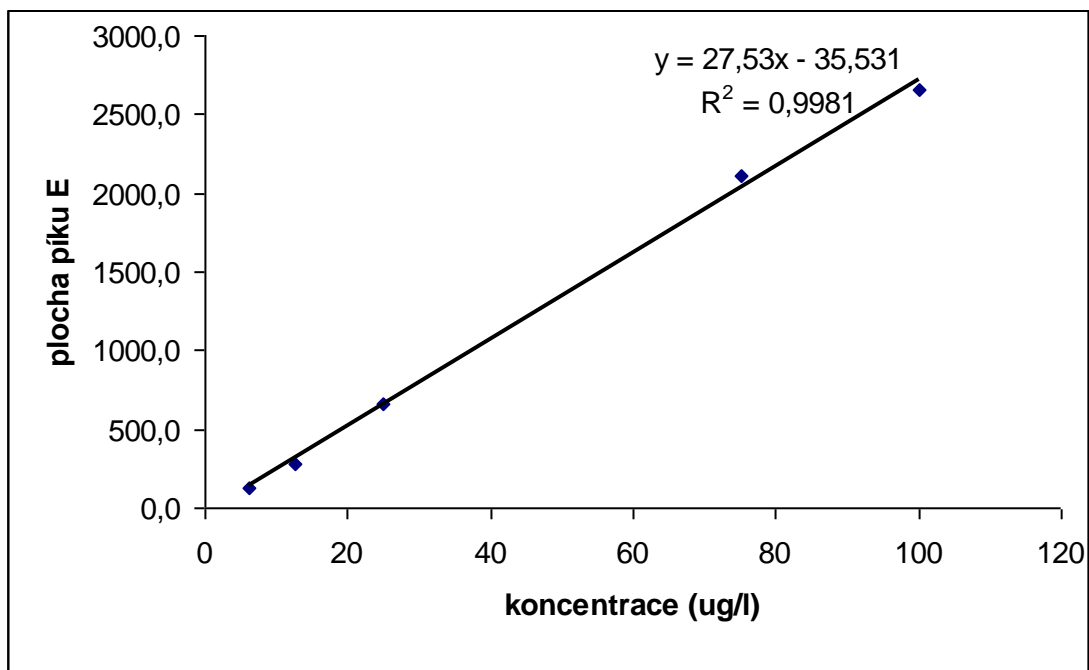
Obrázek 35 Kalibrační závislost látky B.



Obrázek 36 Kalibrační závislost látky C.



Obrázek 37 Kalibrační závislost látky D.



Obrázek 38 Kalibrační závislost látky E.

Tabulka 11 Hodnota linearity kalibrační závislosti látek.

látka	Hodnota spolehlivosti R^2
A	0.9958
B	0.9967
C	0.9922
D	0.9979
E	0.9981

Byla prokázána lineární závislost odezvy píku na koncentraci látky v uvedeném rozmezí koncentrací. Metoda měření byla vyhodnocena jako spolehlivá. Hodnota spolehlivosti R^2 se pohybovala od 0,9922 k 0,9981, tedy vysoko nad hranicí 0,95.

6.3. Opakovatelnost metody

Provedl jsem sérii osmi měření se vzorky o koncentraci 50 $\mu\text{g/l}$ a s MF ACN/THF/ H_2O 50:20:30, pH 5,5.

Tabulka 12 Měření opakovatelnosti metody na vzorku o koncentraci 50 $\mu\text{g/l}$.

Měření	Plocha píku A	Plocha píku B	Plocha píku C	Plocha píku D	Plocha píku E
1	596,09	1351,70	1628,86	893,38	2000,54
2	592,24	1348,49	1674,10	897,65	1956,17
3	580,52	1309,79	1636,34	914,22	1890,85
4	569,06	1286,19	1606,95	916,03	1850,03
5	561,20	1260,12	1518,70	824,17	1839,92
6	553,86	1237,66	1489,57	808,00	1797,23
7	546,52	1213,61	1460,60	789,95	1763,93
8	537,92	1188,55	1432,63	776,90	1734,39
průměr	567,18	1274,51	1555,97	899,41	1854,13

Tabulka 13 Směrodatné odchylky a relativní směrodatné odchylky k průměrné ploše píků látek.

Látka	Prům.plocha píku	s	s(r) (%)
A	567,18	21,184	3,74
B	1274,51	60,326	4,73
C	1555,97	91,366	5,87
D	899,41	58,512	6,86
E	1854,13	91,905	4,96

Relativní směrodatné odchylky hodnot plochy píků jsou relativně vysoké a pohybují se mezi 3,74 a 6,86%. Pro potvrzení opakovatelnosti metody by neměly přesahovat hodnotu 5%.

Tabulka 14 Směrodatné odchyly a relativní směrodatné odchyly vztažené k průměrné hodnotě retenčních časů látek.

Látka	Prům. $t(r)$	s	$s(r)$ (%)
A	1,046	0,018	1,68
B	1,713	0,035	2,04
C	3,070	0,018	0,58
D	6,465	0,142	2,20
E	14,927	0,299	2,00

Relativní směrodatné odchyly hodnot retenčních časů látek při osmi měření jsou relativně nízké a pohybují se od 0,58 do 2,20%. Potvrzují opakovatelnost metody.

7. ZÁVĚR

Validace vyvinuté separační metody nebyla hlavním cílem práce, a proto byla změřena pouze lineární závislost a opakovatelnost metody. Hlavním cílem práce bylo najít optimální separační podmínky pro dostatečnou a časově nenáročnou separaci všech 5 látek.

Při výběru kolony se nejlépe osvědčila kolona Phenomenex Synergi Fusion, která kombinuje řetězce C-18 s řetězcem s polárním koncem. To optimalizuje retenční časy látek, které se zadržovaly na C-18 příliš a nebo naopak málo.

Mobilní fázi jsem vybral třísložkovou, relativně nepolární, o složení ACN/THF/H₂O 50:20:30, pH upraveno na hodnotu 5,5, průtok 1,0 ml/min. Její eluční síla byla pro analyzovanou směs výše uvedených pěti látek ze zkoušených MF optimální.

Nejdůležitější bylo účinně separovat látku D, látku s jednou funkční skupinou. Ta má totiž z těchto pěti látek opravdový potenciál být úspěšně využita ve farmakodynamické terapii. Přes její funkční skupinu se může navázat na tzv. targetingovou látku, která by ji dovedla na místo použití. Jak je patrné z grafu na **Obrázek 32** je látka D na koloně Phenomenex Synergi Fusion RP 80: 75 x 3mm při MF: ACN/THF/H₂O 50:20:30, pH 5,5 a průtoku 1,0 ml/min velmi účinně separována od ostatních látek z dodaného souboru.

8. LITERATURA

1. Mittra, R. A. and Singerman, L. J. (2002) *Optom. Vis. Sci.*, **79**, 218.
2. Ahmad, N.; Mukhtar, H. (2000) *Methods Enzymol.*, **319**, 342.
3. Allen, C. M.; Sharman, W. M.; La Madeleine, C., et al. (1999) *Photochem. Photobiol.*, **70**, 512.
4. Lipson, R. L.; Baldes, E. J. and Olsen A. M. (1961) *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.*, **42**, 623.
5. Edelson, M. F. (1988) *Sci. Am*, **68**, 259.
6. Schmitt, I. M.; Chimenti, S.; Gasparro, F. P. (1995) *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.*, **27**, 101.
7. Raab, O. (1900) *Infusoria Z. Biol.*, **39**, 524.
8. Von Tappeiner, H. (1903) *Muench. Med. Wochenschr.*, **47**, 2024.
9. Prime, J. (1900) Les accidents toxiques par l'eosinate de sodium (Jouve and Boyer, Paris).
10. Von Tappeiner, H. and Jodlbauer, A. (1907) Die sensibilisierende Wirkung fluoreszierender Substanzen Gessamte Untersuchungen uber die photodynamische Erscheinung (Voger, F. C., Leipzig).
11. Hausmann, W. (1911) *Biochem. Z.*, **30**, 276.
12. Meyer-Betz, F. (1913) *Deutsches Arch. Klin. Med.*, **112**, 476.
13. Pollicard, A. (1924) *Comp. Rend. Soc. Biol.*, **91**, 1423.
14. Lipson, R. L. and Baldes, E. J. (1960) *Arch. Dermatol.*, **82**, 508.
15. Lipson, R. L.; Baldes, E. J. and Olsen, A. M. (1961) *J. Natl. Cancer Inst.*, **26**, 1.
16. Diamond, I.; Granelli, S. G.; McDonagh, A. F., et al. (1972) *Lancet*, **2**, 1175.
17. Dougherty, T. J.; Grindey, G. B.; Fiel, R., et al. (1975) *J. Natl. Cancer Inst.*, **55**, 115.
18. Kelly, J. F.; Snell, M. E. and Berenbaum, M. C. (1975) *Br. J. Cancer*, **31**, 237.
19. MacDonald, I. J. and Dougherty, T. J. (2001) *J. Porphyr. Phthalocyanines*, **5**, 105.
20. Bonnet, R. and Martínez G. (2001) *Tetrahedron*, **57**, 9513.
21. van Hillegersberg, R.; Kort, W. J. and Wilson, J. H. P. (1994) *Drugs*, **48**, 510.
22. Sternberg, E.D.; Dolphin, D. and Bruckner, Ch. (1998) *Tetrahedron*, **54**, 4151

23. Sharman, W. M.; Allen, C. M. and van Lier, J. E. (2000) *Methods Enzymol.*, **319**, 376.
24. Vrouenraets, M. B.; Visser, G. W. M.; Snow, G. B., et al. (2003) *Anticancer Res.*, **23**, 505.
25. Sharman, W. M.; Allen, C. M. and van Lier, J. E. (1999) *Drug Discov. Today*, **4**, 507.
26. Bonnett, R. (1995) *Chem. Soc. Rev.*, **19**.
27. Boyle, D. G. and Potter, W. R. (1987) *Photochem. Photobiol.*, **46**, 997.
28. Dougherty, T. J.; Mang, T.S. (1987) *Photochem. Photobiol.*, **46**, 67.
29. Hueger, B. D.; Lawter, J. R.; Waringrekar, V. H. et al. (1991) *United States patent No. 5059619*.
30. Henderson, B. W.; Dougherty, T. (1995) *Photochem. Photobiol.*, **30**, 145.
31. biolitec pharma ltd. [online] (2003) [cit. 2004-04-28]. Dostupné z WWW.BIOLITECPHARMA.COM
32. Light Sciences Corporation [online] (2003), posl. revize 15.10.2003 [cit. 2004-04-29]. Dostupné z WWW.LIGHTSCIENCES.COM
33. American Academy of Ophthalmology (2000) *Ophthalmology*, **107**, 2314.
34. QLT Inc. [online] (2002), posl. revize 15.5.2002 [cit. 2004-04-28]. Dostupné z WWW.QLT-PDT.COM
35. Miravant Medical Technologies [online] (2002), posl. revize 3.2.2003 [cit. 2004-04-28]. Dostupné z WWW.MIRAVANT.COM
36. Woodburn, K.W.; Fan, Q.; Kessel, D. (1998) *J. Invest. Dermatol.*, **110**, 746.
37. DUSA Pharmaceuticals, Inc. [online] (2003) [cit. 2004-04-26]. Dostupné z WWW.DUSAPHARMA.COM
38. PhotoCure ASA [online] (2004) [cit. 2004-04-27]. Dostupné z WWW.PHOTOCURE.COM
39. Biosearch Technologies, Inc. [online] [cit. 2005-04-21]. Dostupné z WWW.BIOSEARCHTECH.COM
40. Kanakarajan, K.; Czarnik, A. W. (1986) *J. Org. Chem.*, **51**, 5241.
41. Zimčík P., Miletín M., et al. (2004) *J. Photochem. and Photobiol. A:Chem.*, **163**, 21.
42. P. Coufal, Přírodovědecká fakulta UK Praha (2004), www.natur.cuni.cz/~pcoufal

43. A. Štancar, BIA separations, Ljubljana, www.biaseparations.com (2003)
44. <http://www.chromspec.com/Catalogue/HPLC%20Products/PDF/102.pdf>
45. www.phenomenex.com/Phen/Doc/zhsyng.pdf