

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

**Stanovení lipofilyty potencionálních léčiv metodou
HPLC**

Diplomová práce

Hradec Králové, 2006

Šárka Šotkovská

Na tomto místě bych ráda poděkovala všem, kteří mi byli jakkoliv nápomocni při vypracování této diplomové práce. Zejména však vedoucímu mé diplomové práce Prof. RNDr. Rolfu Karlíčkovi, DrSc. a RNDr. Daliboru Šatinskému, Ph.D. za odborné vedení, ochotu, obětavost a čas, který mi věnovali.

OBSAH:

1. Cíl práce.....	4
2. Teoretická část	5
2.1. Antileukotrienika	5
2.2. Lipofilita a způsoby jejího stanovení.....	6
2.3. Chromatografické metody	9
2.3.1. Základní principy chromatografického procesu	9
2.3.2. Klasifikace chromatografických metod	10
2.4. Vysokoúčinná kapalinová chromatografie	16
2.4.1. Teorie chromatografického procesu	17
2.4.2. Kvalitativní a kvantitativní analýza v HPLC.....	22
2.4.3. Instrumentace v HPLC.....	23
3. Experimentální část.....	34
3.1. Údaje o testovaných látkách	34
3.2. Použité přístroje a chemikálie.....	36
3.2.1. Použité přístroje	36
3.2.2. Použité chemikálie.....	36
3.3. Příprava vzorků, optimalizace podmínek, výběr standardu, detekce a zpracování dat	37
3.3.1. Příprava vzorků.....	37
3.3.2. Optimalizace chromatografických podmínek pro stanovení log k souboru látek.....	38
3.3.3. Výběr vnitřního standardu	45
3.3.4. Detekce	46
3.3.5. Zpracování dat	47
4. Výsledky a diskuze	48
4.1. RP – HPLC retenční charakteristiky.....	48
4.1.1. Naměřené hodnoty všech sérií při pH 5,5.....	49
4.1.2. Chromatogramy vybraných vzorků při pH 5,5.....	51
4.1.3. Naměřené hodnoty všech sérií při pH 2,5.....	53
4.1.4. Chromatogramy vybraných vzorků při pH 2,5.....	56

4.1.5. Naměřené hodnoty pro skupinu látek III pro srovnání retence při vyšším obsahu methanolu v mobilní fázi.....	58
4.1.6. Naměřené hodnoty pro skupinu látek III pro srovnání retence na kolonách C-8 a C-18 za stejných podmínek.....	60
4.1.7. Naměřené hodnoty pro skupinu látek III pro srovnání retence při různé průtokové rychlosti	62
4.2. Vzájemná korelace lipofilitních parametrů.....	64
Za těchto podmínek bylo dosaženo korelace $R^2=0,8687$	73
4.3. Srovnání retence vzorku při užití různých kolon za stejných podmínek.....	74
4.4. Srovnání retence vzorku při užití mobilních fází s různým obsahem methanolu.....	75
4.5. Srovnání retence vzorku při různé rychlosti průtoku.....	76
5. Závěr	77
6. Literatura.....	78

1. CÍL PRÁCE

Lipofilita je jednou z nejvýznamnějších fyzikálně – chemických vlastností léčiv. Její znalost nám umožňuje představit si působení léčiva v organismu, protože ovlivňuje jeho osud a účinek. K nejčastějším metodám určování lipofility patří chromatografické metody. Nejvíce se využívá chromatografie kapalinová (hlavně HPLC).

Tato práce se zabývá studii lipofility série nově syntetizovaných potencionálních antileukotrienik a dále porovnáva naměřené výsledky s výsledky vypočtenými pomocí počítačového programu.

2. TEORETICKÁ ČÁST

2.1. Antileukotrienika

Leukotrieny mají významný účinek spasmogenní a vasoaktivní (bronchokonstrikce, zvýšení cévní permeability, otok, tvorba hlenu), ale také prozánětlivý (přívod eosinofilů). Antileukotrieny všechny výše uvedené účinky blokují. Biologický účinek leukotrienů lze léčebně ovlivnit buď inhibicí jejich tvorby zásahem na úrovni 5 – lipooxygenázy nebo pomocí antagonistů cysteinylových leukotrienů na příslušných receptorech.

Zafirlukast

Zafirlukast je selektivní kompetitivní antagonist leucotrienů na jejich receptorech. Tlumí časnou i pozdní prozánětlivou fázi alergické reakce. Má bronchodilatační účinky a tlumí bronchokonstrikci, a to jak vyvolanou leukotrieny nebo alergeny, tak po tělesné zátěži či inhalaci studeného vzduchu. U těžkého perzistujícího astmatu vyžadujícího aplikaci vysokých dávek kortikosteroidů nebo jiných antiastmatik umožňuje postupné snížení jejich dávek. Pro všechny tyto účinky se zafirlukast používá při profylaxi a dlouhodobé terapii perzistujícího astmatu v případě nedostatečné účinnosti standardní terapie.

Mezi nejčastější nežádoucí účinky vyvolané tímto léčivem patří nauzea, bolesti břicha, bolesti hlavy. Zafirlukast zvyšuje účinek perorálních antikoagulancií. Jeho plazmatické hladiny zvyšuje kyselina acetylsalicylová, snižuje erythromycin, theophyllin a terfenadin.

Montelukast

Montelukast má stejné účinky jako předchozí zafirlukast, a proto se také používá při profylaxi dlouhodobé terapii perzistujícího astmatu v případě nedostatečné účinnosti standardní terapie. Nežádoucí účinky jsou obdobné. Jeho plazmatické hladiny snižují barbituráty.

Tenidap

Látka, která působí oběma mechanismy a pravděpodobně inhibuje také tvorbu a účinky interleukinu – 1.

Inhibitory 5 – lipooxygenázy

Sem patří docebenon, piriprost, zileuton a další. Ty ovšem zatím v běžné terapii nejsou dostupné. [14,15]

2.2. Lipofilita a způsoby jejího stanovení

Lipofilita patří k nejdůležitějším fyzikálně – chemickým vlastnostem léčiva. Je to jeden z parametrů, který má vliv na biologickou aktivitu léčiva. Ovlivňuje osud a účinek léčiva v organismu při dějích jako jsou resorpce, distribuce, biotransformace a eliminace. Většina léčiv je na místo svého působení transportována vodní cestou, takže je nutná alespoň částečná rozpustnost ve vodě. Rozpustnost v tucích je důležitá pro vstup léčiva biologickou membránou. Po podání se léčivo v organismu setkává s mnoha rozhraními mezi vodnou a tukovou fází a dochází k opakovanému ustanovování rovnováhy na těchto rozhráních.

Rozpustnost ve vodě a tucích se neuplatňuje izolovaně, nýbrž ve vzájemném vztahu. Podíl hydrofilních a hydrofobních faktorů v molekule daného léčiva můžeme vyjádřit pomocí **rozdělovacího koeficientu P**, což je poměr celkové koncentrace látky rozpuštěné v lipofilní fázi (c_L) k celkové koncentraci látky rozpuštěné ve vodní fázi (c_V):

$$P = \frac{c_L}{c_V}$$

Vlastnosti léčiva, které jsou tímto koeficientem vyjádřeny, hrají velmi důležitou roli při transportních dějích. Souvisí se schopností léčiv pronikat biologickými membránami a ovlivňuje i koncentraci léčivé látky v místě účinku. Uvádí se v logaritmované podobě **log P**.

Rozdělovací koeficient je používán i při posuzování bezpečnosti léčiv a látek s možnou biologickou aktivitou. Léčiva s nízkým rozdělovacím koeficientem, tj. látky dobře rozpustné ve vodě, jsou v organismu transportována i eliminována rychleji, vykazují tedy krátkodobý účinek. Naopak zvýšení lipofility u léčiv přináší riziko zpomaleného vylučování a případně i kumulace látky v organismu. Z tohoto hlediska jsou bezpečnější léčiva s dostatečným účinkem při co nejnižší hodnotě log P. [2,11]

Stanovení lipofility

Lipofilitní parametry se dají stanovit několika způsoby. Stanovují se metodami, které jsou založeny na sledování chování látek v systému vodné a organické fáze.

Základní metodou je **metoda třepací**, která je založena na určení rozdělovacího koeficientu P díky vytřepávání látek v systému *n*-oktanol – voda.

Rozdělovací koeficient je poměr koncentrací látky ve fázi *n*-oktanolu (c_o) a ve vodě (c_v).

$$P = \frac{c_o}{c_v}$$

Zjištěný rozdělovací koeficient se uvádí v logaritmované podobě log P.

Druhou a mnohem více využívanější možností stanovení jsou chromatografické metody. Využívají se tenkovrstvá (TLC) a vysokoúčinná kapalinová (HPLC) chromatografie na obrácených fázích.

Metoda TLC využívá ke zjištění lipofility látek měření hodnot R_F , které určují poměr vzdáleností středu skvrny od startu a vzdálenosti čela mobilní fáze od startu a hodnot R_M z nich vypočtených.

$$R_M = \log\left(\frac{1}{R_F} - 1\right)$$

Hodnota R_M je ovlivněna podmínkami chromatografického procesu jako např. stupněm impregnace, pH eluentu a hlavně druhem a procentuálním zastoupením organického rozpouštědla v mobilní fázi. Hodnota R_F s rostoucím podílem organické složky v mobilní fázi stoupá, naopak hodnota R_M klesá. K vyloučení případných

rušivých efektů organické složky se provádí extrapolace R_M hodnot do 0% organické fáze, tj. do 100% fáze vodné, pomocí lineární regrese. Takto získané hodnoty označujeme R_{MW} a slouží nám jako lipofilní charakteristiky látek získané metodou TLC.

Metodou HPLC získáváme hodnoty **log k**, které jsou vypočteny z retenčních časů látek. Podobně jako u metody TLC se zde také může použít lineární extrapolace do 0% organické fáze vycházející z grafu závislosti log k na koncentraci organické složky v mobilní fázi. Tato hodnota se označuje *log K_w*.

$$\log k = \log \frac{t_R - t_0}{t_0}$$

Hodnoty log P lze také vypočítat pomocí **počítačových programů** na základě aditivních vlastností lipofilních charakteristik. Vycházejí ze znalosti již určených rozdělovacích koeficientů známých látek a lipofilitních příspěvků jednotlivých strukturních částí a funkčních skupin, které jsou přičteny nebo odečteny. [2,11]

2.3. Chromatografické metody

2.3.1. Základní principy chromatografického procesu

Chromatografie je vysoce účinná separační metoda založená na postupném mnohonásobně opakovaném ustavování řady fázových rovnováh součástí analyzované směsi mezi dvě vzájemně nemísitelné fáze, které jsou relativně vůči sobě v pohybu. [10]

Separace je dosaženo buď pomocí rozdělovacích a/nebo adsorpčních, nebo jiných fyzikálně chemických dělicích metod. U všech chromatografických dějů jsou potřebné dvě nemísitelné látky, které nazýváme fáze. Jedna z fází má v rozdělovacím systému stacionární charakter (**stacionární fáze**). S pomocí druhé fáze (**mobilní fáze**) je směs, která má být rozdělena, transportována přes fázi stacionární. Stacionární fázi mohou tvořit malá tělíska nebo může být kapalinou. Pevné stacionární fáze se nazývají **sorbenty**, kapalně jako **rozdělovací kapaliny**. Mobilní fáze může být kapalná nebo plynná. Kapalná mobilní fáze je označována jako **eluent** nebo **eluční činidlo**, plynná jako **nosný plyn**. [9]

Hybnou silou v chromatografickém procesu je tok mobilní fáze, která unáší ionty nebo molekuly. Vlastní dělení látek v systému však závisí na brzdící síle (retenci), která působí selektivně: některá látka je bržděna více, některá méně. Při chromatografickém procesu se ustanovuje dynamická rovnováha mezi vratnou sorpcí na stacionární fázi a desorpcí mobilní fáze. Rychlost postupu látky závisí na sorpční rovnováze, tj. čím pevněji se látka sorbuje na stacionární fázi, tím pomaleji v chromatografickém systému postupuje. [4]

2.3.2. *Klasifikace chromatografických metod*

Chromatografických metod je velké množství. Proto je účelné jejich rozdělení do určitých skupin. Vzhledem k jejich různorodosti se dělí podle různých hledisek:

1. podle povahy děje, který převládá při separaci
2. podle uspořádání stacionární fáze
3. podle povahy mobilní a stacionární fáze
4. podle způsobu vyvíjení chromatogramu
5. podle způsobu využití [7,11]

1. podle povahy děje, který převládá při separaci

Obvykle se při separaci uplatňuje několik fyzikálně – chemických dějů současně, jeden z nich převládá.

Adsorpční chromatografie

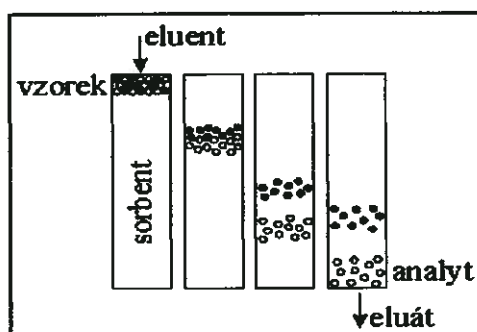
Adsorpcí se rozumí vazba látky na povrch látky druhé. Zakládá se na specifickém vzájemném působení mezi polárním povrchem sorbentu a polárními skupinami adsorbující látky. Síla, kterou sorbent látku váže, se nazývá **aktivita**. Množství látky, které může být navázáno, je závislé na teplotě. Při vyšších teplotách je adsorbováno méně substance než při nižších. Takto může být nějaká adsorbující substance pomocí úpravy teploty opět desorbována.

Množství adsorbované látky také závisí na velikosti plochy sorbentu. Čím je plocha větší, tím více látky může být adsorbováno.

Při adsorpční chromatografii je analyzovaný vzorek adsorbován na pevnou plochu. Pomocí směsi rozpouštědel (mobilní fáze, eluční činidlo) je neadsorbovaná látka z plochy opět vytlačena. Jednotlivé komponenty jsou rozděleny podle polaritě a rozpustnosti, díky kterým jsou různou silou adsorbovány. Většinou se ještě při separaci překrývají také dělicí procesy, iontová výměna a síťový efekt. Jak silně se tyto efekty vedle adsorpce zapojí, závisí mimo jiné na aktivitě použitého sorbentu a polaritě elučního činidla.

Adsorbentem (nepohyblivá fáze) bývá nejčastěji oxid hlinitý, oxid hořečnatý, silikagel, prášková celulóza nebo aktivní uhlí. Pohyblivou fází tvoří buďto čistá rozpouštědla sestavená podle eluční schopnosti do tzv. eluotropní řady (voda > methylalkohol > n-propylalkohol > aceton > octan ethylnatý > diethylether > benzen > tetrachlormethan > hexan) nebo směsi rozpouštědel.

Nejdůležitější způsob pro získání jednotlivých složek je eluční technika, při které se dělené složky vymývají přidávaným rozpouštědlem. Přitom vychází ze sloupce složka nejslaběji adsorbovaná a postupně složky silněji adsorbované.



Obr. 2.3.2.1. Separace [13]

Eluční způsob vyvíjení je možné realizovat v několika variantách. Při **jednoduché eluci** se kolona promývá stále stejnou mobilní fází tak dlouho, až dojde k oddělení jednotlivých složek a ty pak postupně opustí kolonu v roztoku mobilní fáze (eluátu). Při **vícetupňové eluci** se eluují dobře některé složky méně polárním rozpouštědlem, jiné jsou příliš sorbovány a pro jejich eluci se zvolí polárnější rozpouštědlo. Při **eluci gradientové** se postupně plynule mění pH mobilní fáze nebo koncentrace polárnější složky v mobilní fázi. Tento způsob vyvíjení se používá zejména při dělení komplikovanějších směsí a jeho cílem je zkrácení doby analýzy a získání ostřejšího rozdělení látek.

Mezi rozdělovací techniky, u nichž hrají roli adsorpční procesy, patří chromatografie plyn – pevná látka (GSC), vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC), tenkovrstvá chromatografie (TLC). [4,9]

Rozdělovací chromatografie

K dělení látek dochází na základě jejich různých rozdělovacích koeficientů. Chromatografický sloupec je naplněn inertním nosičem (silikagel, křemelina, silikáty, celulóza), na jehož povrchu je zakotvena účinná stacionární kapalná fáze (na celulóze nejčastěji voda). Po vnesení roztoku dělené směsi dochází při průchodu mobilní fáze k opakovanému rozdělování (extrakci) součástí směsi mezi obě kapalnou a plynnou fázi.

Platí zde Nernstův vztah:

$$K = \frac{c_1}{c_2}$$

kde K je rozdělovací koeficient

c_1 je koncentrace látky ve fázi 1

c_2 je koncentrace látky ve fázi 2

Rozdělovací koeficient je látková konstanta, která popisuje stupeň rozpustnosti a s tím spojené rozdělení látky mezi fáze. Tato konstanta je závislá na teplotě, a proto můžeme v mnoha případech separaci výhodně ovlivnit. [4,9]

Iontově výměnná chromatografie

Tuto metodu lze použít, jestliže dělené složky vytvářejí v roztoku ionty. Stacionární fázi tvoří **iontoměniče** (katexy, anexy).

Při iontově výměnné chromatografii se distribuují složky iontové povahy mezi dvě fáze působením elektrostatických sil mezi nabitými částicemi (ionty) v mobilní fázi a funkčními skupinami měniče iontů, které nesou náboj. [3]

Gelová chromatografie

K dělení složek dochází podle velikosti jejich molekul molekulárně síťovým efektem. Stacionární fází je **polymerní gel** s póry různých velikostí, do kterých difundují molekuly dělených složek. Menší molekuly mohou do gelu difundovat a jejich dráha v pórech gelu je tím delší, čím jsou menší. Molekuly, které mají velikost větší než je největší průměr pórů, nemohou do gelu proniknout a postupují tedy vpřed s mobilní fází a jsou eluovány nejdříve. [3,11]

Afinní chromatografie

Je určena k separaci biologických makromolekul, které lze jinak velmi obtížně separovat, neboť rozdíly ve fyzikálně chemických vlastnostech těchto látek jsou malé. Tato metoda je založena na selektivních interakcích. Na nosič je navázán kovalentní vazbou vhodný **ligand**, který je schopen vytvářet specifický komplex s určitou biologickou makromolekulou. Ta zůstává vázána v koloně, zatímco ostatní složky vzorku jsou vymyty. [3]

2. podle uspořádání stacionární fáze

Kolonová chromatografie

Stacionární fáze je umístěna v trubici – **koloně**. Příkladem je HPLC.

Plošné techniky

- **papírová chromatografie** (PC), kdy je stacionární fáze součástí chromatografického papíru
- **tenkovrstvá chromatografie**, kdy je stacionární fáze umístěna na skleněné desce, hliníkové fólii nebo plochem podkladu z jiného materiálu [7]

3. podle povahy mobilní a stacionární fáze

Plynová chromatografie

Vzorek se vnáší do proudu plynu, který jej dál unáší kolonou. Proto se mobilní fáze nazývá **nosný plyn**. Aby vzorek mohl být transportován, musí se ihned přeměnit na plyn. V koloně se složky separují na základě různé schopnosti poutat se na stacionární fázi.

Kapalinová chromatografie

Mobilní fází je kapalina. Na rozdíl od plynové chromatografie rozhodují o separaci složek nejen jejich interakce se stacionární fází, ale rovněž použitá mobilní fáze. [7]

Kapalinová chromatografie se pak dále ještě rozděluje dle skupenství fáze na:

- **chromatografie kapalina – pevná látka** – LSC (liquid-solid chromatography), kde sorbentem je pevná látka
- **chromatografii kapalina – kapalina** – LLC (liquid-liquid chromatography), kde stacionární fázi představuje kapalina nemísitelná nebo omezeně mísitelná s mobilní fází

Plynovou chromatografii také rozdělujeme na:

- **chromatografie plyn-pevná látka** – GSC (gas-solid chromatography)
- **chromatografie plyn- kapalina** – GLC (gas-liquid chromatography) [11]

4. podle způsobu vyvíjení chromatogramu

Frontální chromatografie

Při tomto způsobu se kontinuálně přivádí roztok dělené směsi na stacionární fázi během celého chromatografického procesu. Nejdříve je eluována složka s nejmenší afinitou ke stacionární fázi, později začne vycházet směs této látky se složkou, která má středně velkou afinitu a nakonec se objeví i složky s největší afinitou k sorbentu. Tato metoda byla vyvinuta k analytickým účelům. [8]

Vytěšňovací chromatografie

Princip této metody spočívá v tom, že se na chromatografickou kolonu jednorázově vnese analyzovaná směs a poté je kontinuálně přiváděn roztok látky, která má ke stacionární fázi největší afinitu. Tato látka v mobilní fázi tak vytěšňuje jednotlivé složky z vazby na sorbent. Složky vycházejí jednotlivě, v pořadí podle afinity k sorbentu a těsně na sebe navazují. Jako poslední vytéká látka vytěšňující. Tato metoda slouží k preparativním účelům. [8]

Eluční chromatografie

Analyzovaná směs se nanáší jednorázově v malém množství a kontinuálně se přivádí mobilní fáze, která má menší afinitu ke stacionární fázi než má kterákoliv ze složek analyzované směsi. Jednotlivé složky vycházejí samostatně, oddělené mobilní fází. Pokud se afinita jednotlivých složek ke stacionární fázi příliš neliší, používá se mobilní fáze o stejném složení během celého chromatografického procesu – **eluce**

izokratická, v opačném případě se složení mobilní fáze plynule mění – **eluce gradientová**. Používá se k účelům analytickým i preparativním. [8]

5. podle způsobu využití

Chromatografie analytická

Slouží ke kvalitativní i kvantitativní analýze.

Chromatografie preparativní

Slouží k čištění látek v laboratorním měřítku.

Chromatografie sloužící k výrobním účelům [3,8]

Tento přehled rozdělení uvádí jen některá z možných kritérií klasifikace chromatografických metod.

Dále se zaměřuji pouze na metodu použitou při studii lipofily látek v experimentální části této práce.

2.4. Vysokoučinná kapalinová chromatografie

Vysokoučinná kapalinová chromatografie (dále jen HPLC) je forma kolonové chromatografie, při které je eluční činidlo pomocí pumpy tlačeno do dělicí kolony. HPLC slouží stejně jako všechny chromatografické metody jak k rozdělení směsi látek, tak ke kvalitativní a kvantitativní analýze. Výsledkem je pak závislost intenzity signálu z detektoru na čase.

Při klasické sloupcové chromatografii teče eluční činidlo na základě hydrostatického tlaku přes kolonu naplněnou stacionární fází shora dolů. Předpokladem pro separaci je dostatečná průtoková rychlost mobilní fáze, která je uskutečněna gravitací. Výkonnost rozdělení hodně závisí na velikosti částic a rozdělení velikosti částic stacionární fáze. Menší a stejnoměrně tvarované částičky vedou k vysoké rozdělovací výkonnosti. Menší částičky mají vysokou hustotu a tvoří tak překážku pro eluční činidlo. K zajištění dostačující rychlosti toku je eluční činidlo tlačeno kolonou pomocí pumpy. Tlak, potřebný pro tok mobilní fáze, je závislý na průměru a délce kolony, stejně jako na viskozitě elučního činidla. Na základě podstatně vyšší účinnosti oproti běžné sloupcové chromatografii je tato chromatografie pod tlakem nazývána **vysokoučinná kapalinová chromatografie** (high performance liquid chromatography – HPLC). Starší název vysokotlaká kapalinová chromatografie (high pressure liquid chromatography) již není používán, poněvadž chromatografická separace není podmíněna pouze tlakem.

Vývoj přístrojů a metod pro tento typ chromatografie začal v sedmdesátých letech minulého století. Pomocí HPLC můžeme stanovovat téměř všechna rozpustná organická a anorganická léčiva a díky různým kombinačním možnostem mobilní a stacionární fáze dosáhnout požadované selektivity. Díky rozmanitým možnostem použití dnes patří HPLC k nejoblíbenějším a nejvyužívanějším dělicím metodám ve farmaceutické analytice. Výhodou oproti plynové chromatografii (GC) je, že analyzované substance nemusí být odpařovány, ale mohou být zkoumány v rozpuštěné formě. [9]

2.4.1. Teorie chromatografického procesu

V kapalinové chromatografii se v současné době uplatňuje hlavně eluční vyvíjení, které je možné realizovat dvěma způsoby.

První a jednodušší variantou je **eluce izokratická**, při které je složení mobilní fáze po celou dobu vyvíjení konstantní. V druhém případě se hovoříme o **eluci gradientové**, kdy se složení mobilní fáze programově mění směrem k vyšší eluční schopnosti v závislosti na čase, a to buď kontinuálně nebo diskontinuálně (**vícetupňová eluce**). Gradientovou elucí lze dosáhnout lepší separace látek, zkrácení analýzy. Využívá se zejména při dělení komplikovanějších směsí. Kromě koncentračního gradientu lze použít i gradient pH.

Při svém postupu kolonou vzorek interaguje se sorbentem a je na koloně různou měrou zadržován. Čas, který uplyne od nástřiku vzorku na kolonu po dosažení maxima píku nazýváme **retenční čas** t_R . Retenci lze také vyjádřit **retenčním objemem** V_R , což je objem mobilní fáze proteklé kolonou za tento čas. Vztah těchto veličin je definován takto:

$$V_R = t_R \times F_m$$

kde F_m je objemová rychlost mobilní fáze, tj. množství mobilní fáze proteklé kolonou za jednotku času. [3,11]

S retenčním časem souvisí **mrtvý retenční čas** t_M , což je retenční čas složky, která není v koloně zadržována, tj. retenční čas složky, která se pohybuje kolonou stejnou rychlostí jako mobilní fáze. Mrtvému retenčnímu času odpovídá příslušný retenční objem, který se nazývá **mrtvý retenční objem** V_M . I pro ně platí výše uvedený vztah.

Z rozdílu retenčního a mrtvého retenčního času lze vypočítat **skutečný (redukovaný) retenční čas** t_R' .

$$t_R' = t_R - t_M$$

kde t_R je retenční čas a t_M je mrtvý retenční čas.

Analogicky platí vztah pro **skutečný (redukovaný) objem V_R'** :

$$V_R' = V_R - V_M$$

kde V_R je retenční objem a V_M mrtvý retenční objem. [3,11]

Rychlost toku mobilní fáze lze také vyjádřit jako **střední lineární rychlost toku mobilní fáze u (cm s^{-1})**:

$$u = \frac{L}{t_M}$$

kde L je délka kolony (v cm), t_M mrtvý retenční čas

Vzájemný vztah mezi objemovou rychlostí a lineární rychlostí můžeme vyjádřit následovně:

$$u = \frac{F_m}{q}$$

kde q je volný průřez kolony, tj. ta část kolony, která je volná pro průtok mobilní fáze.

[3]

Libovolná složka A, která je v koloně retardovaná postupuje rychlostí u_A :

$$u_A = \frac{L}{t_R}$$

kde L je délka kolony a t_R je retenční čas látky A.

Poměr lineárních rychlostí u a u_A je označován jako **retardační faktor R_F** . Vyjadřuje pravděpodobnost, že molekula složky A se nachází ve stacionární fázi. Platí vztah:

$$R_F = \frac{u_A}{u} = \frac{(n_A)_M}{(n_A)_M + (n_A)_S} = \frac{1}{1 + K}$$

kde $(n_A)_M$ je množství látky A v mobilní fázi, $(n_A)_S$ množství látky A ve stacionární fázi, K je kapacitní poměr. [3]

Kapacitní poměr (faktor) K je bezrozměrná veličina, která slouží k charakterizaci retence:

$$K = \frac{V_R - V_M}{V_M} = \frac{V_R'}{V_M} = \frac{t_R - t_M}{t_M} = \frac{t_R'}{t_M}$$

Kapacitní poměr vyjadřuje poměr celkového množství separované látky ve stacionární fázi k celkovému množství této látky ve fázi mobilní a je přímo úměrný distribuční konstantě K_D , která vyjadřuje poměr koncentrací separované látky v obou fázích:

$$K = (n_A)_S / (n_A)_M = K_D \times S$$

kde S je označení fázového poměru v koloně, který je roven: $S = \frac{V_S}{V_M}$ [3]

Aby bylo možno chromatografické metody široce používat, je nutné zajistit dostatečnou účinnost separačního procesu.

Účinnost separační schopnosti kolony se popisuje počtem teoretických pater, případně výškovým ekvivalentem teoretického patra.

Model teoretického patra si lze představit tak, že kolona je složena z řady stejně velkých příčných segmentů a v každém z nich dochází k ustavení rovnováhy mezi mobilní a stacionární fází. Účinnost separačních schopností kolony je pak přímo úměrná počtu teoretických pater n . Počet teoretických pater je možno zjistit experimentálně dosazením naměřených hodnot do vztahu:

$$n = 16 \cdot \left(\frac{t_R}{W} \right)^2$$

kde t_R je retenční čas, W šířka daného píku při bázi.

A nebo ze vztahu:

$$n = 5,545 \cdot \left(\frac{t_R}{Y_{0,5}} \right)^2$$

kde $Y_{0,5}$ je šířka píku v polovině jeho výšky. [3,11]

Ke srovnávání účinnosti různých kolon byl zaveden výškový ekvivalent teoretického patra H :

$$H = \frac{L}{n}$$

kde L je délka kolony, n počet teoretických pater.

Další důležitou veličinou je rozlišení R . Rozlišení je mírou chromatografické separace a udává se jako rozdíl dvou píků separovaných látek vztažený na šířky píků v základně. Rozlišení získáme dosazením do vztahu:

$$R = \frac{2(V_{R_2} - V_{R_1})}{W_1 + W_2} \quad \text{resp.} \quad R = \frac{2(t_{R_2} - t_{R_1})}{W_2 + W_1}$$

Pokud dosadíme šířku píku v polovině jeho výšky, bude rozlišení vyjádřeno vztahem:

$$R = \frac{1,18(t_{R_2} - t_{R_1})}{Y_{0,5,1} + Y_{0,5,2}}$$

Rozlišení souvisí také se selektivitou.

Selektivita je míra separace dvou složek směsi a je možné ji vyjádřit pomocí relativní retence:

$$\alpha = \frac{t_{R_2} - t_M}{t_{R_1} - t_M} = \frac{K_2}{K_1}$$

kde t_{R_1} , t_{R_2} a t_M odpovídají hodnotám retenčních časů látek 1 a 2 a mrtvému retenčnímu času, K_1 a K_2 jsou hodnoty kapacitních poměrů látek.

Dosažením výše uvedených rovnic do vztahu pro parametr rozlišení dvou píků je možné odvodit a popsat tři faktory, na kterých je rozlišení závislé:

$$R = \frac{\sqrt{n}}{4} \times \frac{\alpha-1}{\alpha} \times \frac{K}{K+1}$$

A B C

A.....účinnost

B.....selektivita

C.....kapacita

Všechny tyto vlastnosti lze ovlivnit změnou složení mobilní fáze, změnou pH mobilní fáze, náplní kolony a teplotou. Účinnost může být ovlivněna také viskozitou mobilní fáze, vlastnostmi chromatografované látky, jejím difúzním koeficientem a hlavně průtokovou rychlostí mobilní fáze kolonou.

Dosažení optimálních separačních hodnot představuje kompromis mezi kapacitou, rozlišením a rychlostí separace. [11]

2.4.2. Kvalitativní a kvantitativní analýza v HPLC

HPLC nám může sloužit jak k identifikaci látek, tak ke stanovení jejího obsahu.

Kvalitativní hodnocení

Při kvalitativním hodnocení látek nám slouží jejich retenční čas t_R , popř. retenční objem V_R . Nejčastěji se posuzuje shoda s retenčním časem standardu měřeného za stejných podmínek.

Kvantitativní hodnocení

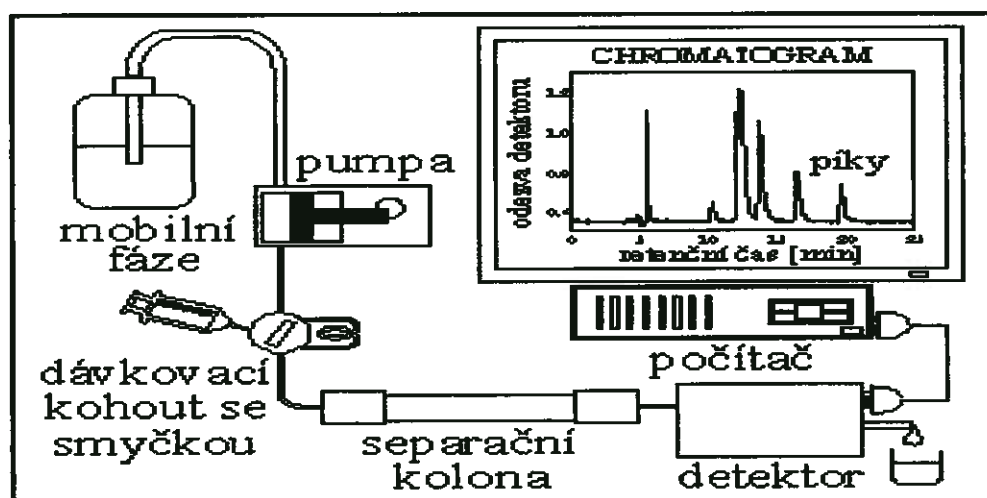
Pro vlastní kvantitativní hodnocení je základem plocha (event. výška) chromatografického píku. Pro stanovení jednotlivých složek ve směsi se používají nejčastěji dvě metody:

- **metoda vnějšího standardu** – spočívá ve dvou krocích (dvojím dávkování). V prvním kroku se na kolonu nastříkne roztok analyzovaného vzorku a po registraci záznamu se v druhém kroku nastříkne roztok vnějšího standardu (zpravidla se používá některá ze složek analyzované směsi) a opět se registruje jeho chromatogram. Koncentrace stanovovaných složek směsi se pak vypočítá z poměru ploch (výšek) píků jednotlivých stanovovaných látek a plochy píku vnějšího standardu.
 - **metoda vnitřního standardu** – ke známému objemu roztoku vzorku se přidá definovaný objem roztoku vhodného vnitřního standardu (musí být eluován v blízkosti píku analyzované látky a musí být chemicky inertní) a po promíchání se nastříkuje na kolonu. Koncentrace stanovovaných látek se opět vypočítá z poměru ploch (výšek) píků jednotlivých separovaných složek a plochy píku vnitřního standardu. Tato metoda je méně časově náročná a hlavně přesnější, protože není zatížena chybou dvojího nástřiku.
- [6,11]

2.4.3. Instrumentace v HPLC

Kapalinový chromatograf se skládá z těchto částí:

- zařízení pro uchovávání a transport mobilní fáze (vysokotlaké čerpadlo)
- zařízení pro dávkování vzorku
- zařízení pro separaci látek (chromatografická kolona, termostat kolony)
- zařízení pro detekci látek, popř. sběrač frakcí



Obr. 2.4.3.1. Kapalinový chromatograf [13]

Při izokratické eluci je mobilní fáze vedena ze zásobníku mobilní fáze do vysokotlakého čerpadla nebo při gradientové eluci se přiváděné proudy ze dvou nebo více zásobníků mísí podle programu ve směšovači, který je zařazen před nebo za vysokotlakým čerpadlem. Odplynění mobilní fáze se provádí v odplyňovači (degaser). Dále je mobilní fáze vedena přes zařízení pro dávkování vzorku do chromatografické kolony, která je přímo spojena s detektorem, za nějž může být na výstupu zařazen ještě sběrač jednotlivých frakcí. Z detektoru může být signál veden buď do integrátoru a zapisovače nebo dnes častěji do datové stanice s tiskárnou.

Kapalinový chromatograf je konstruován tak, aby byl omezen vliv mrtvých objemů na minimum, protože jinak dochází k přílišnému rozšiřování elučních křivek. Proto se spoje mezi nástřikovým zařízením a kolonou a mezi kolonou a detektorem konstruují tak, aby mrtvé objemy byly co nejmenší. [1]

Zařízení pro přípravu a transport mobilní fáze

Tomuto zařízení patří zásobník s mobilní fází, zařízení pro odplynění mobilní fáze, vysokotlaké čerpadlo, tlumič pulsů a mixery mobilní fáze.

Zásobník mobilní fáze

V zásobníku jsou umístěny speciální filtry pro odstranění suspendovaných pevných částic (kovový nebo teflonový filtr, 0,20 μm). Zásobníky musí být dobře uzavřeny tak, aby z nich kapalina mohla odtékat, ale přitom její páry neunikaly do okolní atmosféry. Spoje zásobníku s odplyňovačem, směšovačem a vysokotlakým čerpadlem jsou zhotoveny většinou z teflonu nebo z nerez oceli. [1]

Zařízení pro odplynění mobilní fáze

Mobilní fáze se odplyňuje především proto, aby po uvolnění tlaku na výstupu chromatografické kolony nebo i v koloně nedocházelo k uvolnění bublinek rozpuštěných plynů. Rozpuštěné plyny v mobilní fázi mají vliv na funkci vysokotlakého čerpadla, kdy dochází k uvolnění bublin v sacích ventilech a dochází k zavzdušnění hlavy pumpy a průtok mobilní fáze je pulzní a nereprodukovatelný, dochází ke kolísání tlaku v systému, a to zejména při gradientové eluci. Při gradientové eluci dochází k mísení dvou a více mobilních fází a tím dochází k uvolnění rozpuštěného plynu.

Principy odplynění jsou v podstatě čtyři:

- ultrazvuk
- probublávání heliem (on-line)
- vakuum – in-line vakuové odplynění a vakuová filtrace
- ohřev

a tyto metody mohou být použity samostatně nebo v kombinaci.

Využití ultrazvuku při odplynění se již příliš nepoužívá. Zvýšení teploty mobilní fáze se může projevit snížením rozpustnosti daného plynu v mobilní fázi a dochází ke zvýšení parciálního tlaku. Daleko častější je odplynění stripováním nebo vakuem. Probublávání se dnes již výhradně provádí přímo v zásobnících heliem z tlakové lahve přes redukční ventil. Rychlejší, daleko účinnější a levnější je použití **vakuového degaseru**.

Na zavzdušnění mobilní fáze má vliv i volba zásobníku a jeho umístění. Zásobník musí být umístěn tak, aby docházelo k vyrovnání tlaků – musí být umístěn výše než chromatografická pumpa a nesmí se použít uzávěr zásobníku, který by znemožňoval vyrovnání atmosférického tlaku a tlaku uvnitř zásobníku. [1]

Vysokotlaká čerpadla

Na vysokotlaká čerpadla jsou kladeny poměrně vysoké požadavky:

- výstupní tlaky na čerpadlech se musí pohybovat v širokém rozmezí 1 až 60 MPa
- změna průtoku mobilní fáze musí být v širokém rozmezí (0,1 až 10,0 ml)
- průtok mobilní fáze musí být reprodukovatelný (do 1%) a přesný (do 1 %)
- průtok mobilní fáze musí být bezpulzní a bez monotónních změn
- materiály použité ke konstrukci čerpadel musí být odolné vůči korozi i při použití agresivních mobilních fází (nerezová ocel, titan, keramika)
- vnitřní objem čerpadel má být co nejmenší, aby umožnil rychlou výměnu mobilní fáze

Obvyklým zařízením k protlačování mobilní fáze je **pístové čerpadlo**, pracující na principu injekční stříkačky. Důležité pro tento typ čerpadla je to, že díky vyvíjenému konstantnímu tlaku je průtok skrz kolonu plynulý, bez rázů a je také reprodukovatelně nastavitelný. To umožňuje použít i nejcitlivějších detektorů, aniž se projeví šum signálu způsobený nerovnoměrným průtokem.

Čerpadla rozlišujeme na **pulzní** a **bezpulzní**. Pulzní čerpadla mají objem pracovní komory relativně malý. K dosažení potřebného průtoku musí dojít k mnohonásobnému vypuzení mobilní fáze. Bezpulzní čerpadla pracují s poměrně velkým objemem pracovní komory (až 400cm³). Nejlepších výsledků, co se týče minimalizace pulzů, je dosahováno spojením dvou čerpadel. V momentě, kdy je první čerpadlo ve fázi sání, je druhé ve fázi výtlačku. Existují i pumpy tvořené propojením tří i více čerpadel. [3,11]

Tvorba gradientu mobilní fáze

Z hlediska tvorby gradientu rozeznáváme dva typy:

- *nízkotlaký gradient* – složky mobilní fáze se míchají za atmosférického tlaku před vstupem do čerpadla v malé směšovací komůrce, přičemž poměr směšovaných složek se řídí otevíráním a zavíráním ventilů na vstupu komůrky nebo pomocí podávacích nízkotlakých mikročerpadel nebo pomocí rychlého proporcionálního ventilu.
- *vysokotlaký gradient* – každá složka mobilní fáze má své vysokotlaké čerpadlo a je dávkována do směšovací komůrky před kolonou.

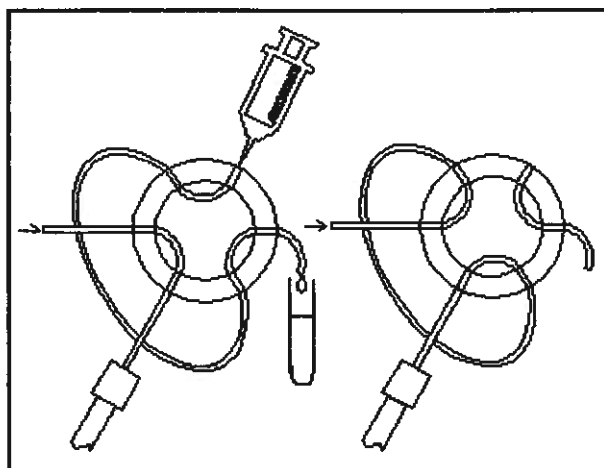
K programování gradientu se v současné době používá mikroprocesor, který ovládá otáčky elektromotoru nebo otevírání a zavírání ventilu. [1]

Zařízení pro dávkování vzorku

Dávkování vzorku injekčními stříkačkami přes vhodné septum nebo při zastaveném průtoku mobilní fáze se v současné době již nepoužívá zejména pro vysoké tlakové nároky na používané septum, které musí odolávat tlakům až 20 MPa, a hlava kolony musí být konstruována tak, aby jehla stříkačky dosahovala právě na konec vrstvy náplně chromatografické kolony. V současnosti se tedy používají manuální smyčkové dávkovače na principu přepínacích ventilů nebo automatické dávkovače různé konstrukce.

Dávkovací vysokotlaké ventily

Tyto ventily umožňují dávkovat i při tlaku 60 až 80 MPa a to pouze konstantní objem vnitřního prostoru ventilu nebo při zařazení dávkovací smyčky objem smyčky. Komerčně dostupné dávkovače (Rheodyne, Valco, Waters) mají různé objemy dávkovacích smyček od 0,2 μl do 2 000 μl . Dávkovací ventily mohou být elektricky nebo pneumaticky ovládané.



Obr. 2.4.3.2. Dávkovací kohout [13]

Automatické dávkovače – autosamplery

Automatické dávkovače jsou spojeny se zásobníkem vzorku, ve kterém jsou umístěny mikronádobky (vialky) uzavřené pryžovým septem nebo perforovanou zátkou z polypropylenu. Konstrukční spojení injekční stříkačky dávkovače a zásobníku je několik druhů:

- injekční stříkačka je fixní a pohybuje se pouze zásobník vzorku pod zvednutou jehlu stříkačky, jejíž píst je ovládán speciálním krokovým motorem. Pohyb zásobníku je buď osový nebo kruhový (tzv. karusel), záleží na typu konstrukce (Waters, Hewlett Packard)
- zásobník vzorků je fixní a pohybuje se raménko injekční stříkačky ve směru osy x-y-z (Hewlett Packard)
- zásobník i injekční stříkačka jsou fixní, vialka je roboticky dopravena pod zvednutou jehlu injekční stříkačky, kde může docházet k dalšímu zpracování vzorku (tzv. robotické autosamplery – TSP) [1]

Kolony

V současné době se kolony pro aplikace HPLC připravují výhradně komerčně a uživatel může ovlivnit konstrukci, rozměry a tvar chromatografické kolony minimálně, může si vybrat druh sorbentu a jeho zrnění.

Materiál, ze kterého se zhotovuje vnitřní povrch kolony, musí vykazovat určité vlastnosti. Musí odolávat vysokým tlakům a to až do 70 MPa (i když pracovní tlak

v koloně se pohybuje do 15 MPa), musí odolávat chemickému působení mobilní fáze a pokud možno vnitřní povrch musí být dokonale hladký.

Chromatografické kolony jsou nejčastěji vyrobeny z kovu (nerezavějící oceli, hliníku, mědi) pro použití za vysokých tlaků nebo jsou tlustostěnné skleněné, nejlépe z vysoce chemicky odolného borsilikátového skla (pro kyseliny a tlak do 10 MPa). Výhody obou spojují kolony z kovu, jejichž vnitřní povrch je potažen vrstvou skla.

Délka kolony závisí na použité stacionární fázi a nebývá větší než 50 cm. Pro analytické účely je obvyklá délka kolony 10 – 30 cm o vnitřním průměru 3 – 5 mm. Účinnost kolony podstatně závisí na kvalitě náplně. V dnešní době se používají nejčastěji komerčně vyráběné kolony plněné kulovitými částicemi o průměru 3 – 10 μm . Náplň kolony musí být dokonale homogenní a rovnoměrná. Účinnost dělení, ale i délka analýzy se zvyšují s klesající velikostí částic a rostoucí délkou kolony. [1,11]

Základní typy sorbentů:

- polární sorbenty – silikagel, oxid hlinitý
- chemicky vázané stacionární fáze – nejčastěji používané, na silikagel navázané různé radikály:
 - uhlovodíkové řetězce C8, C18, popř. jiných délek
 - perfluoralkyly
 - tříuhlíkatý řetězec zakončený skupinami $-\text{NH}_2$, $-\text{CN}$, $-\text{NO}_2$
- iontoměniče – katexy i anexy (sulfoskupina, tetraalkylamoniová skupina)
- sorbenty na bázi organických gelů (např. divinylbenzenové kopolymery) nebo porézní skelný uhlík – vhodné pro analýzu při pH vyšším než 8,5 [11]

Detekční systémy

Detektory jsou umístěny na konci kolony a analyzují eluát. Detektory zaznamenávají rozdíl mezi průchodem čisté mobilní fáze a mobilní fáze, obsahující eluovanou složku celou detektorem. Detektory se nejčastěji dělí na **koncentrační** a **hmotnostní**. Koncentrační detektory reagují na změnu hmotnostní koncentrace složky v eluentu dm/dV nezávisle na přívodu složky do detektoru. Hmotnostní detektory reagují na změnu hmotnostního toku složky v eluentu dm/dt do detektoru. Jiný způsob

dělení je na detektory **nedestrukční** a **destrukční**. V nedestrukčních detektorech nedochází k chemické změně detekované komponenty, v destrukčních detektorech se detekovaná komponenta ireverzibilně mění.

Na detektory jsou kladeny určité ideální požadavky:

- možnost detekce všech přítomných komponent
- odezva detektoru by měla být okamžitá a lineární v co nejširším koncentračním rozmezí
- vysoká citlivost a nízká úroveň šumu
- robustní vůči změnám tlaku, průtoku mobilní fáze a teploty
- mimokolonový příspěvek k rozšiřování elučních zón co nejmenší
- umožnění gradientové eluce [1]

Cela detektoru

Srdce účinnosti HPLC detektoru je cela detektoru. Konstrukce cely detektoru musí být taková, aby eliminovala mísení separovaných chromatografických zón a mimokolonový příspěvek k rozšíření chromatografické zóny objemu cely detektoru byl minimální. Optika cely soustřeďuje paprsek světla do středu cely, kde drift průtoku, teploty, resp. indexu lomu je nejmenší. Šířka cely zajišťuje, aby bylo přeměněno maximum energie a směřováno z cely detektoru do fotodetektoru. Geometrie cely detektoru by měla být optimalizována, aby nedocházelo k chvostování píku. [1]

Typy detektorů

Spektrofotometrické detektory

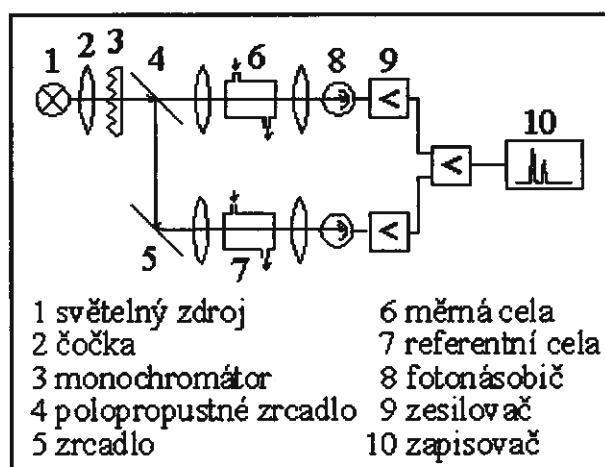
Proměřují absorpenci elektromagnetického záření určité vlnové délky složkami eluátu protékajícího celou detektoru. K detekci léčiv se využívá především UV oblast spektra, mnohem méně oblast viditelná a minimálně infračervená oblast spektra. V praxi se uplatňují především UV – detektory, event. UV – VIS detektory.

Nejužívanější UV detektory:

- s fixní vlnovou délkou – poměrně jednoduchá konstrukce a cenově nejdostupnější
- s proměnnou vlnovou délkou – libovolně měnitelná dle potřeb

- scanning UV detektor – snímá během několika sekund absorpční spektrum v maximu píku hodnoceného léčiva
- diode array detektor – řízený počítačem, trojrozměrná projekce, detektor snímá celé absorpční spektrum a umožňuje hodnotit léčivo současně při několika vlnových délkách

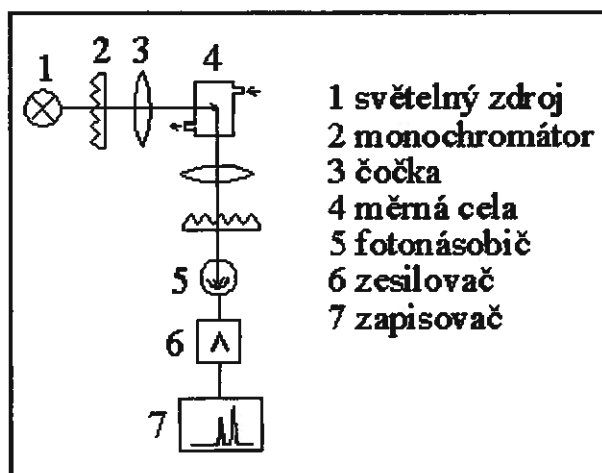
V HPLC jsou tyto detektory používány nejčastěji. Vyznačují se značnou citlivostí (10^{-9} až 10^{-10} g/ml) a lze je použít při gradientové eluci. [5]



Obr. 2.4.3.3. fotometrický detektor [13]

Fluorimetrické detektory

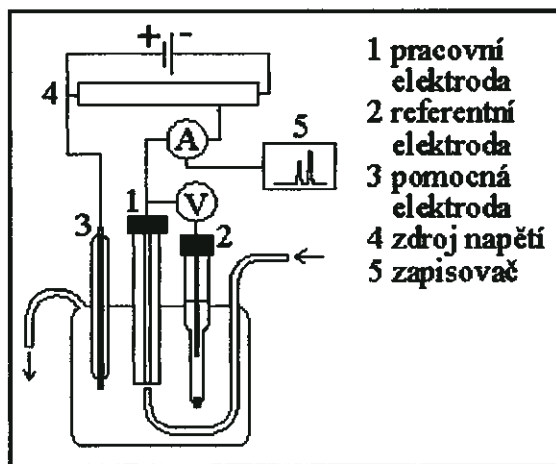
Použitelné v případech, kdy analyzovaná látka vykazuje fluorescenci. Látky, které ji nevykazují, lze mnohdy vhodnou derivatizací převést na fluoreskující deriváty. Tyto detektory jsou méně univerzální než předchozí, ale citlivější (10^{-9} až 10^{-12} g/ml), selektivnější a jsou rovněž použitelné při gradientové eluci. [5]



Obr. 2.4.3.4. Fluorimetrický detektor [13]

Elektrochemické detektory

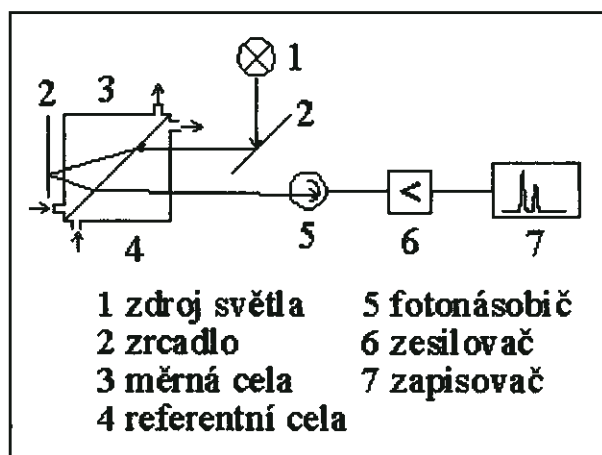
Lze jimi detekovat látky schopné elektrochemické reakce. Jsou založeny na měření proudu vyvolaného průchodem redukovatelné nebo oxidovatelné látky měrnou celou mezi elektrodami, na něž je vloženo určité pracovní napětí nutné k průběhu elektrochemické reakce (amperometrický a polarografický detektor), nebo měří náboj potřebný k oxidaci nebo redukcí látky (coulometrický). Jsou značně citlivé (10^{-9} amperometrický a polarografický, 10^{-7} g/ml coulometrický), ale většinou je nelze použít při gradientové eluci. [3,11]



Obr. 2.4.3.5. Amperometrický detektor [13]

Refraktometrické detektory

Měří rozdílný index lomu mezi čistou mobilní fází a eluátem vytékajícím z kolony, obsahujícím analyzovanou látku. Jsou prakticky univerzální, ale používají se ojedinele pro poměrně velké nevýhody – především výrazně menší citlivost (10^{-6} g/ml), nutnost termostatování (odezva detektoru je značně závislá na teplotě) a nelze je použít při gradientové eluci. [5]



Obr. 2.4.3.6. Refraktometrický detektor [13]

Hmotnostně – spektroskopické detektory

Po výstupu z kolony je z eluentu odstraněna mobilní fáze a detekovaná látka v plynném stavu je v hmotnostním spektrometru ionizována nárazy elektronů, termoionizací nebo elektroionizací. Vzniklé nabitě částice jsou vlivem magnetického nebo vysokofrekvenčního pole separovány podle hmotnosti a náboje. Výstupem je hmotnostní spektrum, tj. závislost četnosti iontů na poměru jejich hmotnosti a náboje (spojení HPLC-MS). [5]

Vodivostní detektory

Patří mezi univerzální detektory a měří elektrickou vodivost eluátu v průtokové cele mezi dvěma elektrodami, na něž je vkládáno střídavé napětí, aby se zabránilo polarizaci těchto elektrod. U tohoto typu detektoru jsou kladeny vysoké nároky na mobilní fázi, která by měla být pokud možno nevodivá, musí ovšem zkoumané látky dostatečně rozpouštět a mít dostatečně velkou permitivitu. Vodivostní detektory se uplatňují nejvíce v iontové chromatografii, kdy se používá kolon plněných ionexy s nízkou kapacitou, které umožňují použití mobilní fáze s nízkým obsahem elektrolytů. [1]

Další detektory:

Radiometrické detektory – detekce radioaktivních látek nebo látek značených radioizotopy

Permitivitní detektory – měří permitivitu eluátu vztahenou k permitivitě čisté mobilní fáze

Reakční detektory – využívají vhodné reakce analyzovaných látek s vhodnými činidly přímo v chromatografickém systému

Detektory založené na principu tepelné čočky – základem je částečná absorpce laserového paprsku a ohřívání eluátu při přechodu molekul z excitovaného do základního stavu

Detektory typu spray impact – měří elektrický potenciál, který se vytváří na uhlíkové nebo kovové elektrodě po dopadu aerosolu vzniklého rozprášením eluátu z kolony. [11]

Zařízení pro záznam a zpracování dat

Dnes se používají zařízení schopná automaticky zaznamenat a vyhodnotit veškerá získaná data. Poskytují i kvantitativní údaje, které lze sledovat na monitoru. Moderní typy kapalinových chromatografů jsou řízeny mikroprocesory a chod těchto přístrojů je zcela automatizován. Veškerá získaná data jsou uložena v paměti mikroprocesoru a lze je kdykoli vyvolat. [11]

3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

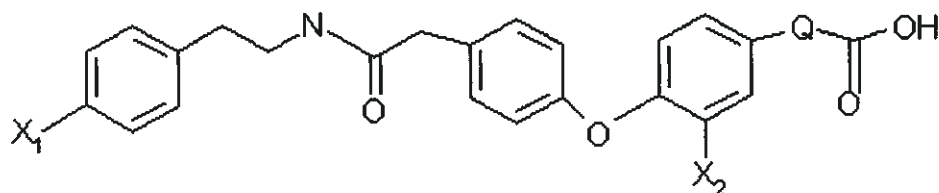
3.1. Údaje o testovaných látkách

V této diplomové práci byla analyzována skupina potenciálních antiflogistik (antileukotrienik) nasyntetizovaných ve VÚFB a.s. v Praze.

Jedná se o rozsáhlou sérii látek tří základních struktur, které označíme jako I, II, III. V následujícím seznamu jsou označeny jako deriváty fenylctové kyseliny (I), fenyalkanových kyselin (II) a deriváty bifenyly (III).

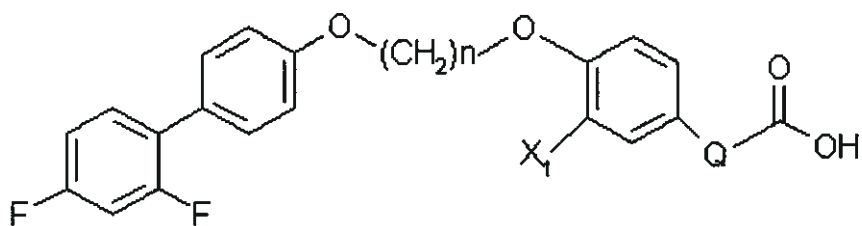
Vzorky jsou krystalické struktury, barvu mají bílou.

Obecné vzorce struktur:



I $Q = CH_2$

II $Q = CH(CH_3), CH_2CH_2, (CH_2)_3, CH=CH, COCH_2CH_2$



III $Q = CH_2CH_2CH(CH_3), C(CH_3)_2, C(CH_2)_3$

Na VÚFB a.s. v Praze předběžně určili lipofilitu těchto látek výpočtem log P a zjistili, že ve skupině I je nejméně lipofilní látka 20558 (log P 4,73) a nejlipofilnější 20563 (log P 6,54). Ve skupině II je nejméně lipofilní 20611 (log P 4,66) a nejvíce 20587 (log P 7,42). A konečně ve skupině III je nejméně lipofilní látka 20634 (log P 6,28) a nejlipofilnější je látka 20581 (log P 8,15). Pozdějším měřením pomocí HPLC jsme zjistili odchylky od předpokládaných hodnot.

Tab.3.1.1. Přehled testovaných vzorků

Der.fenyloctové kyseliny (skupina I)		Der.fenylalkanových kyselin (skupina II)				Der.bifenyly (skupina III)	
číslo	čistota	číslo	čistota	číslo	čistota	číslo	čistota
20553	94%	20583	>95%	20611	>95%	20581	>95%
20444	92%	20587	>95%	20612	>95%	20582	>95%
20556	94%	20588	>95%	20613	>95%	20621	>95%
20558	>95%	20589	86%	20614	>95%	20628	>95%
20559	>95%	20590	>95%	20616	>95%	20629	>95%
20563	82%	20591	>95%	20617*	>95%	20632	>95%
20566	95%	20592	94%	20618*	>95%	20633	>95%
20568	>95%	20596	>95%	20619	>95%	20634	>95%
20573	89%	20597	>95%	20620	>95%	20635	>95%
20575	75%	20598	>95%	20622*	>95%	20639	>95%
20576	78%	20599	>95%	20624	>95%	20640	>95%
20601	>95%	20600	>95%	20627	>95%	20641	>95%
20602	>95%	20603	>95%	20630	>95%	20642	>95%
		20604	>95%	20631	>95%	20643	>95%
		20605	>95%	20638*	>95%	20644	>95%
		20606	>95%			20645	>95%
		20607	>95%			20647	>95%

* cyklohexylamoniová sůl

3.2. Použité přístroje a chemikálie

3.2.1. Použité přístroje

HPLC systém:

- Pumpa LCP 4100 (Ecom, Praha)
- Waters autosampler 717 plus (Waters, Milford, USA)
- UV detektor Waters 486 (Waters, Milford, USA)
- kolona Discovery® C-18 125x4 mm 5µm
- kolona Discovery® C-18 250x3 mm 5µm
- kolona Thermoquest Hypersil® C-18 250x4,6 mm 5µm
- kolona Thermoquest Hypersil® C-18 250x4 mm 5µm
- kolona Zorbax Eclipse® XDB C-8 150x4,6 mm 5µm

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

UV spektrofotometr (Hewlett Packard)

Váhy Sartorius 2004 MP

Ultrazvuková lázeň Teson 1 (Tesla)

PHmetr Hanna

Automatické pipety

3.2.2. Použité chemikálie

Chloroform p.a. (Lachema Neratovice, ČR)

Methanol CHROMASOLV (Sigma – Aldrich, USA)

Acetonitril CHROMASOLV (Sigma – Aldrich, USA)

Triethylamin 0,1% p.a. (Sigma – Aldrich, USA)

Kyselina octová 99% p.a. (Lachema Neratovice)

Kyselina dusičná p.a. (Lachema Neratovice, ČR)

Hydroxid sodný p.a. (Lachema, Neratovice, ČR)

Destilovaná voda

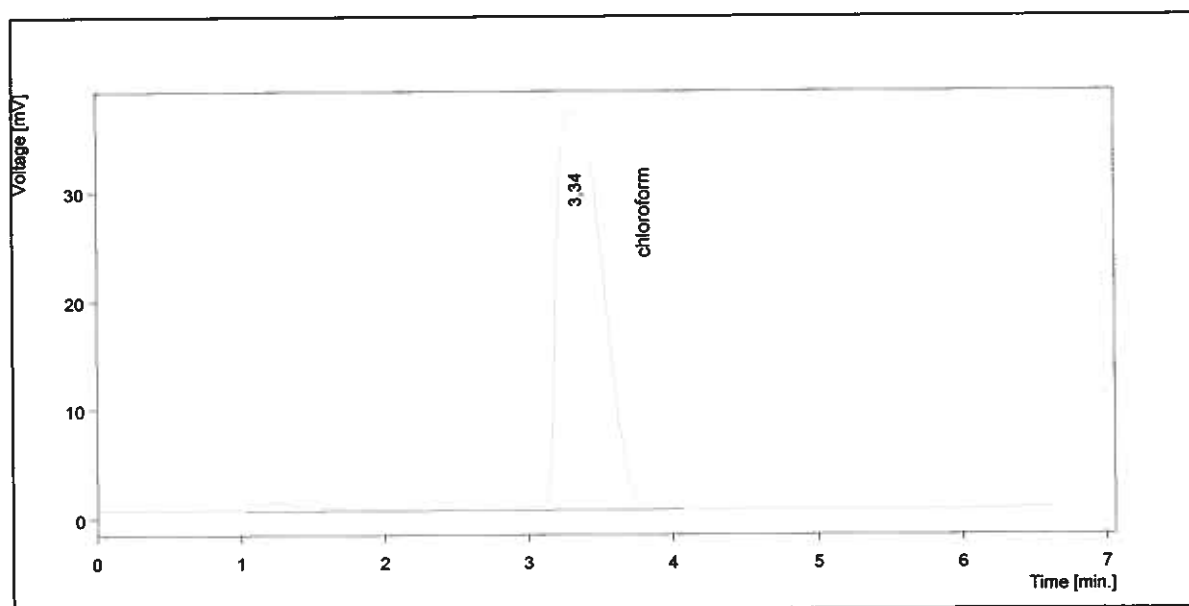
3.3. Příprava vzorků, optimalizace podmínek, výběr standardu, detekce a zpracování dat

3.3.1. Příprava vzorků

Standards byly zpočátku rozpuštěny v chloroformu (asi 1 mg vzorku ve 2 ml chloroformu). Ovšem z důvodu rušivého vlivu jeho píku (viz obr. 3.3.1.1.) bylo rozpouštění vzorků v chloroformu nevhodné a standardy byly rozpuštěny v acetonitrilu.

Konečná příprava vzorků: vzorek + 2ml acetonitrilu + 10 μ l vnitřního standardu

Na chromatografickou kolonu jsme nastříkovali vzorek v objemu 10 μ l.



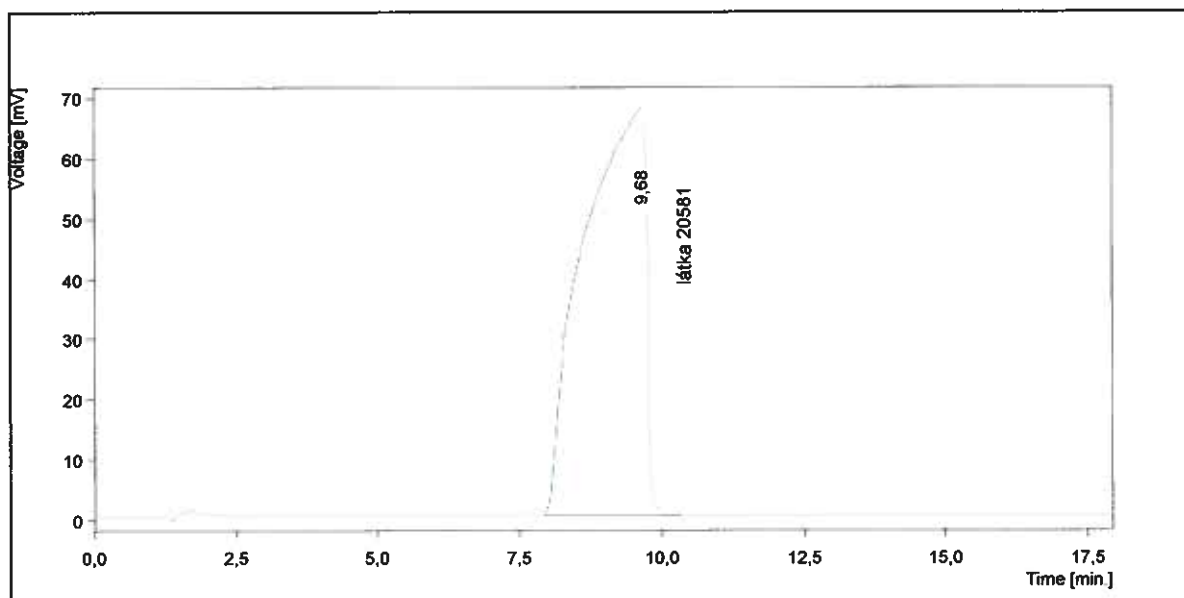
Obr. 3.3.1.1. Chromatogram chloroformu

Podmínky: Discovery® C-18 125x4mm 5 μ m, mobilní fáze acetonitril/voda 50/50, průtok 1,0 ml/min

3.3.2. Optimalizace chromatografických podmínek pro stanovení log k souboru látek

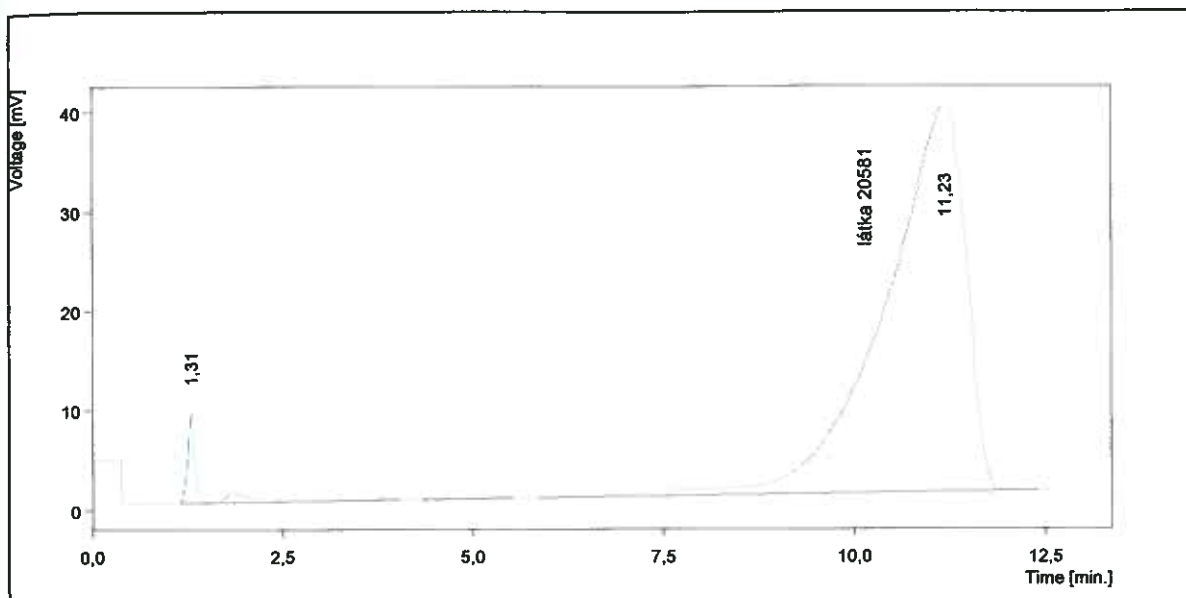
Optimalizace podmínek byla prováděna pro předpokládanou nejlipofilnější látku ze souboru, tj. 20581.

Jednotlivé testované podmínky a chromatografické systémy:



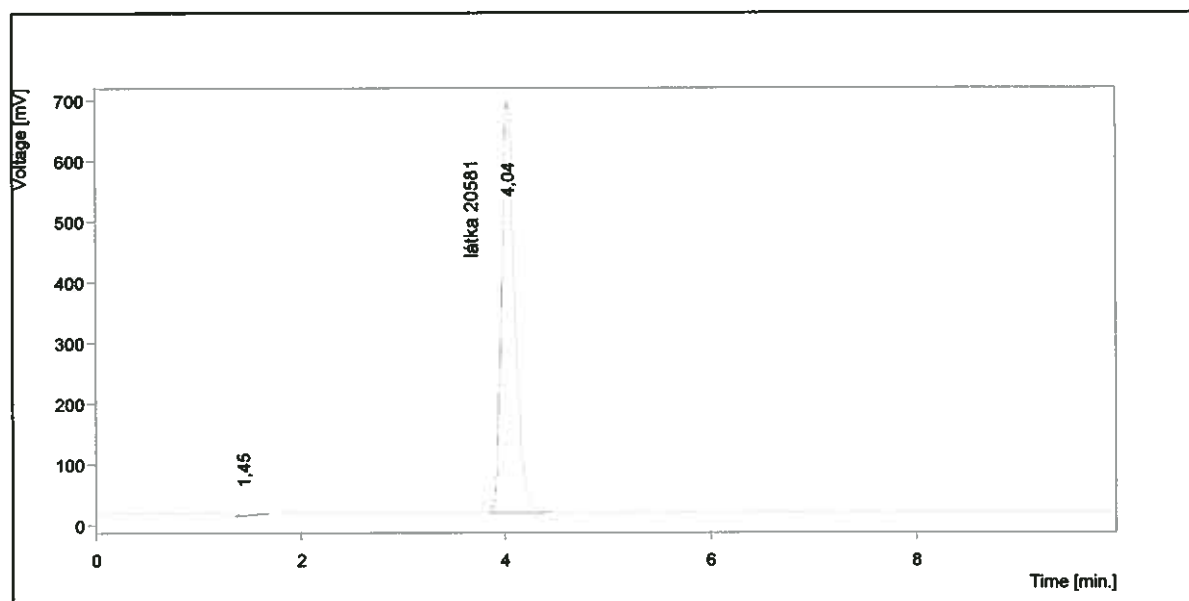
Obr. 3.3.2.1. Chromatogram látky č. 20581

Podmínky: Discovery® C-18 125x4mm 5 μ m, mobilní fáze acetonitril/voda 50/50, průtok 1,0 ml/min, pH 7



Obr. 3.3.2.2. Chromatogram látky č. 20581

Podmínky: Discovery® C-18 125x4mm 5µm, mobilní fáze methanol/voda 50/50, průtok 1,0 ml/min, pH 7

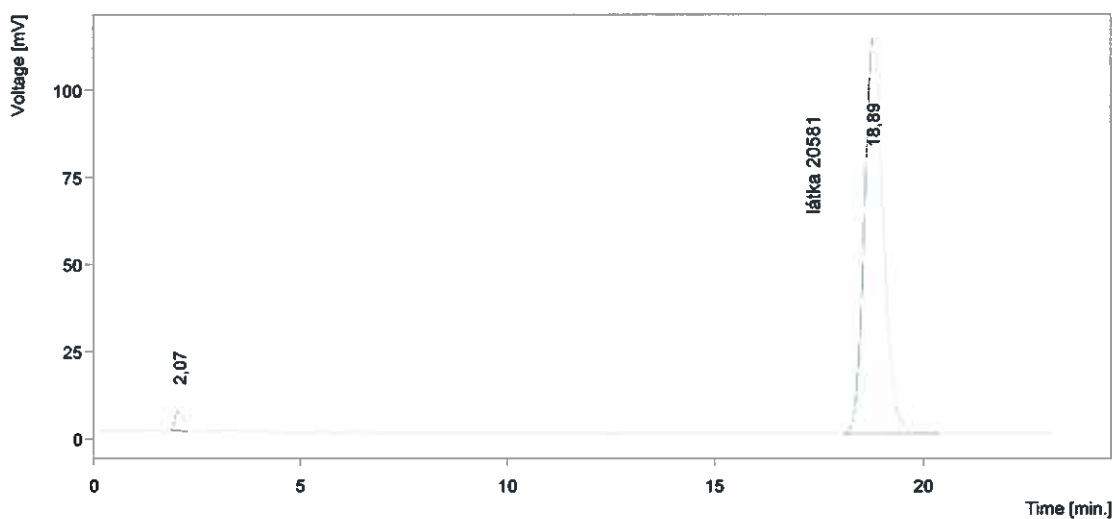


Obr. 3.3.2.3. Chromatogram látky č. 20581

Podmínky: Discovery® C-18 125x4mm 5µm, mobilní fáze methanol/voda 70/30, průtok 1,0 ml/min, pH 7

Závěr: Kolona Discovery® C-18 125x4mm 5µm vykazovala příliš slabou retenci analyzovaných látek. Rozpouštědlo v mobilní fázi vedlo k asymetrii píků a retenční časy se dostatečně nezvyšovaly. Z tohoto důvodu byla tato kolona o separační délce 125 mm pro další pokusy zavržena.

Další testovaná kolona:

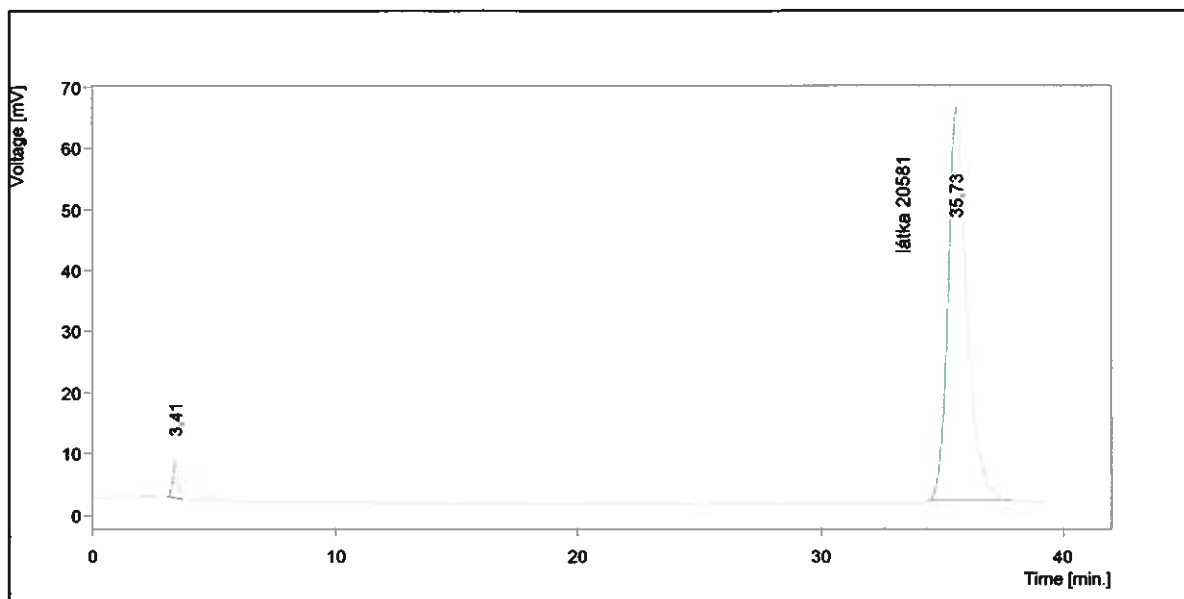


Obr. 3.3.2.4. Chromatogram látky č. 20581

Podmínky: Discovery® C-18 250x3mm 5µm, mobilní fáze methanol/voda 80/20, průtok 0,8 ml/min, pH 7

Závěr: Kolona Discovery® C-18 250x3 mm 5µm byla testována z důvodu větší separační délky. Retenční časy vybraných látek se zvyšovaly, ne však dostatečně pro naše účely. Snížení poměru organického rozpouštědla v mobilní fázi vedlo k opět k asymetrii píků s poměrně vysokou retencí.

Další testovaná kolona:

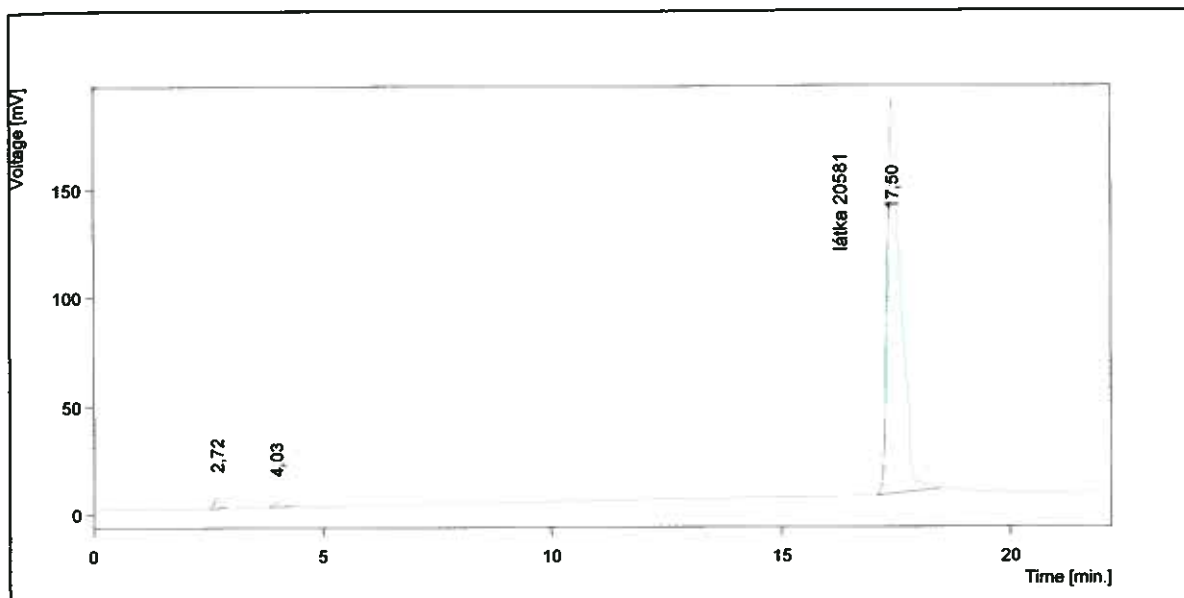


Obr. 3.3.2.5. Chromatogram látky č. 20581

Podmínky: Thermoquest Hypersil® C-18 250x4,6 mm 5 μ m, mobilní fáze methanol/voda 80/20, průtok 0,8 ml/min, pH 7

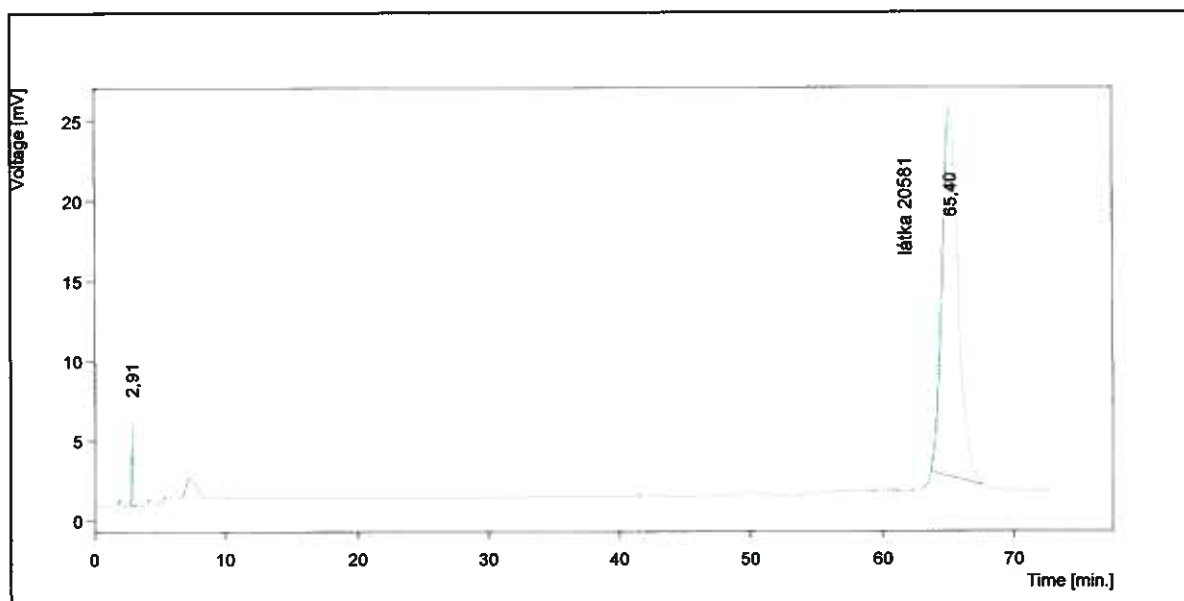
Závěr: Kolona Thermoquest Hypersil® C-18 250x4,6 mm 5 μ m by mohla být použita jako druhá možná kolona o celkové separační délce 250 mm.

Další testovaná kolona:



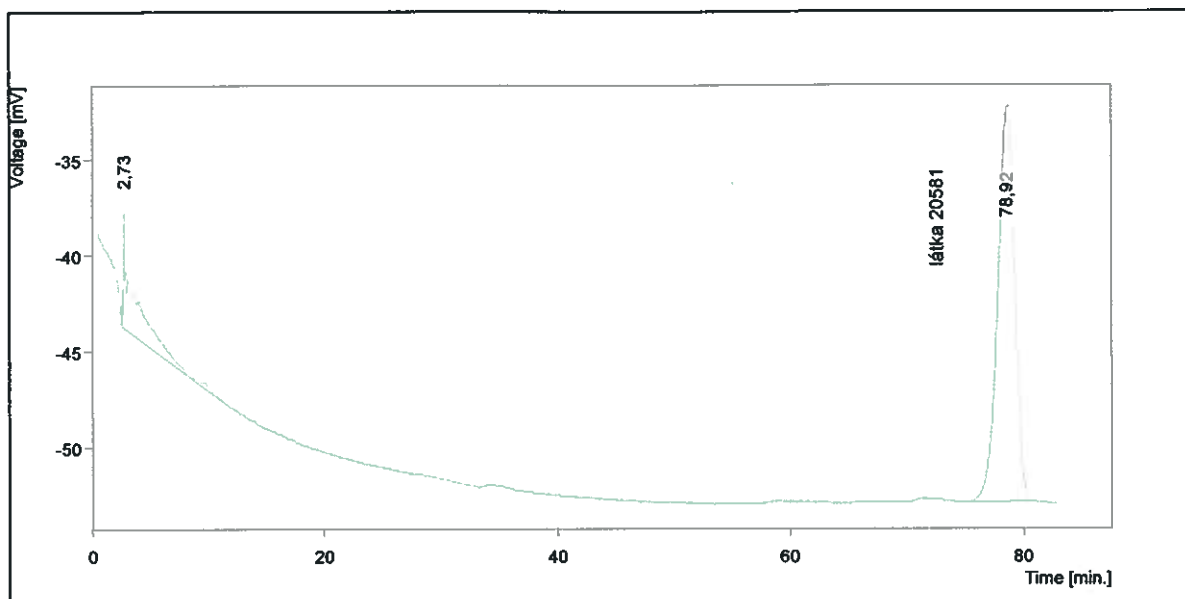
Obr. 3.3.2.6. Chromatogram látky č. 20581

Podmínky: Thermoquest Hypersil® C-18 250x4 mm 5 μ m, mobilní fáze methanol/voda 80/20, průtok 0,8 ml/min, pH 7



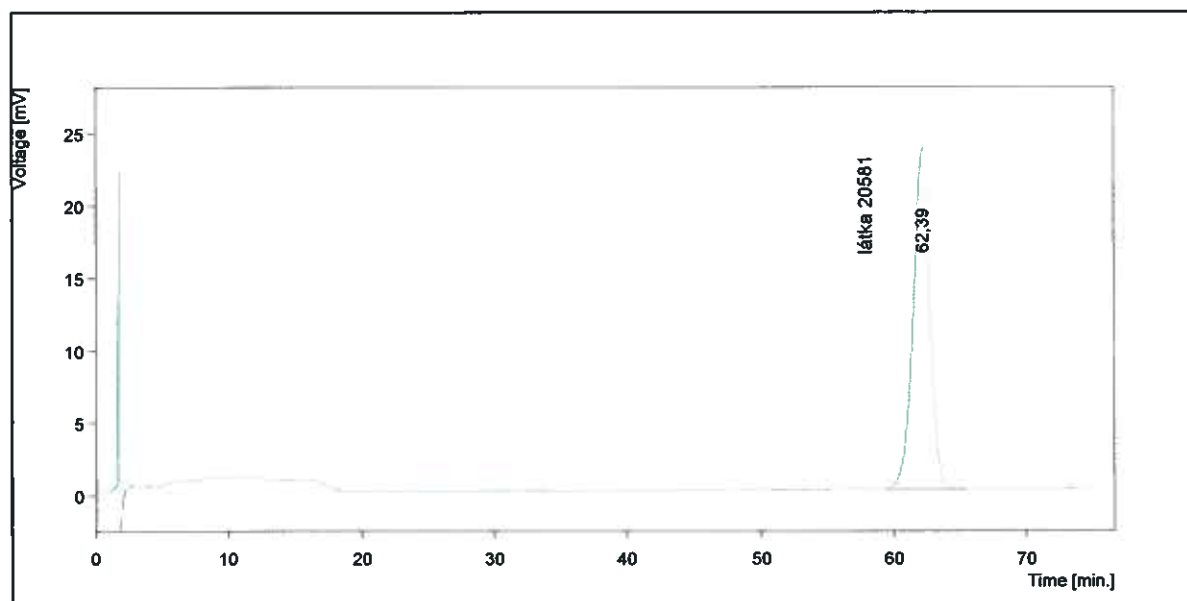
Obr. 3.3.2.7. Chromatogram látky č. 20581

Podmínky: Thermoquest Hypersil® C-18 250x4 mm 5 μ m, mobilní fáze methanol/voda 80/25, průtok 0,8 ml/min, pH 7



Obr. 3.3.2.8. Chromatogram látky č. 20581

Podmínky: Thermoquest Hypersil® C-18 250x4 mm 5 μ m, mobilní fáze methanol/voda 80/25, průtok 1 ml/min, pH 2,5



Obr. 3.3.2.9. Chromatogram látky č. 20581

Podmínky: Thermoquest Hypersil® C-18 250x4 mm 5 μ m, mobilní fáze methanol/voda 80/25, průtok 1 ml/min, pH 5,5

Závěr: Kolona Thermoquest Hypersil® C-18 250x4 mm 5µm se jevila pro naše měření jako nejvhodnější. V průběhu testování různých mobilních fází bylo zjištěno, že v oblasti pH 7 vykazují látky velice slabou retenci. Proto byly dále mobilní fáze pufovány pomocí triethylaminu a kyseliny octové. Jako optimální mobilní fáze pro analýzu byly vybrány tyto dvě:

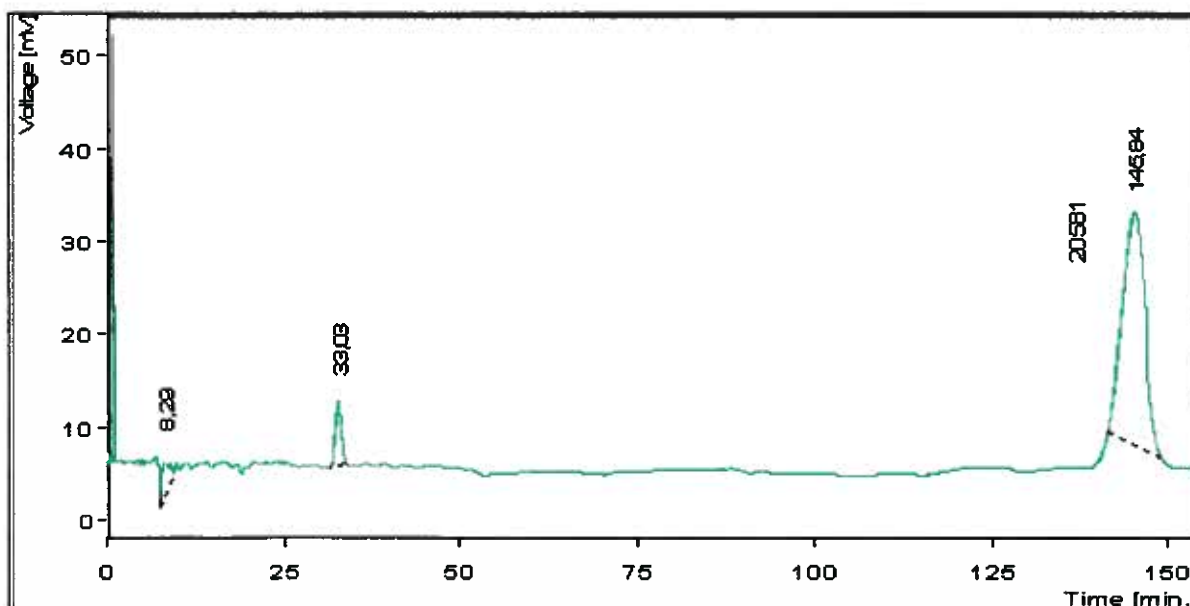
methanol/voda 80/25, pH 5,5 průtok 1,0 ml/min

methanol/voda 80/25, pH 2,5 průtok 1,0 ml/min

V mobilní fázi při pH 2,5 přitom látky vykazovaly vyšší retenci.

Naším cílem bylo najít vhodný chromatografický systém, kde retenční časy nejlipofilnější látky budou kolem hodnot 60 – 70min (z důvodu velice rozsáhlého souboru látek - 55).

Pro další měření s cílem srovnat retenci na koloně C-8 a C-18 za stejných podmínek byla využita kolona Zorbax Elipse® XDB C-8 150x4,6mm 5µm.



Obr. 3.3.2.10. Chromatogram látky č. 20581

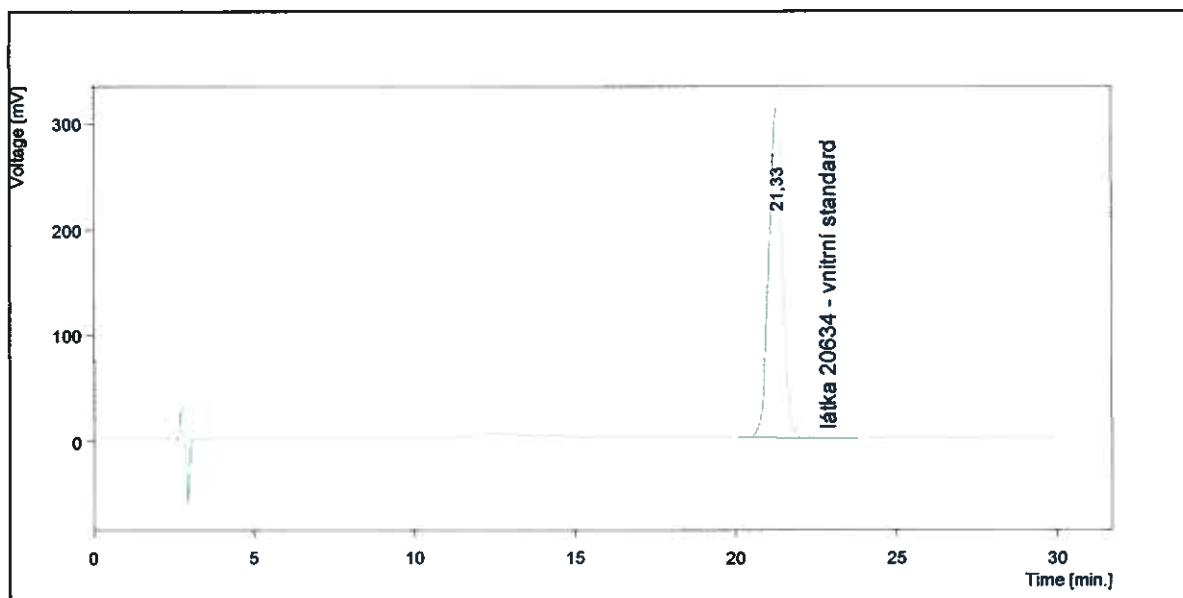
Podmínky: Zorbax Elipse® XDB C-8 150x4,6mm 5µm, mobilní fáze methanol/voda 70/40, průtok 1,7 ml/min, pH 2,5

Pro optimální podmínky byla hledána mobilní fáze, při které bude mít vnitřní standard retenci mezi 30 – 40 minutami. Tyto požadavky byly zvoleny na základě předchozích dvou studií, kdy zhruba 30 látek ze souboru vykazovaly příliš nízké retenční časy.

Jako optimální byla nalezena mobilní fáze methanol/voda 70/40, pH 2,5, průtok 1,7 ml/min. Při použití této mobilní fáze bylo umožněno lépe rozlišit retenční časy jednotlivých látek.

3.3.3 Výběr vnitřního standardu

Jako optimální se jevila látka z analyzovaného souboru č. 20634, která podle předběžných výpočtů vykazovala střední lipofilitu v rámci dodaných látek.



Obr. 3.3.3.1. Chromatogram látky č. 20634

Podmínky: Thermoquest Hypersil® C-18 250x4mm 5µm, mobilní fáze methanol/voda 80/25, průtok 1,0 ml/min

3.3.4. Detekce

Detekce byla prováděna pod UV detektorem při vlnové délce 228 nm. Vlnová délka byla zvolena na základě předchozího proměření absorpčního spektra.

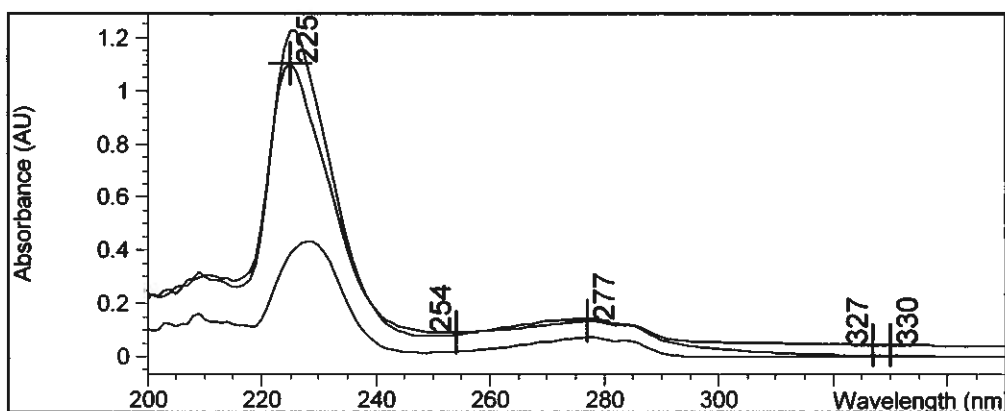
Spektra studovaných látek v acetonitrilu

Spektra byla měřena ve třech pH oblastech. Alkalický roztok acetonitrilu byl získán přidáním 100 μ l 0,5 M NaOH do měřeného roztoku, okyselení bylo provedeno pomocí 100 μ l 0,5 M HNO₃. Porovnávací roztok obsahoval 100 μ l chloroformu a 2 ml acetonitrilu.

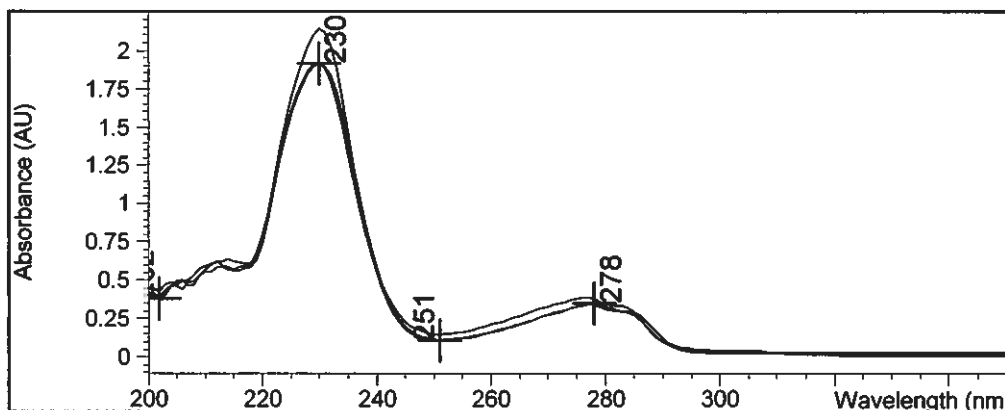
Vysvětlivky: plná křivka měření v neutrálním prostředí

dlouze čárkovaná křivka měření v zásaditém prostředí

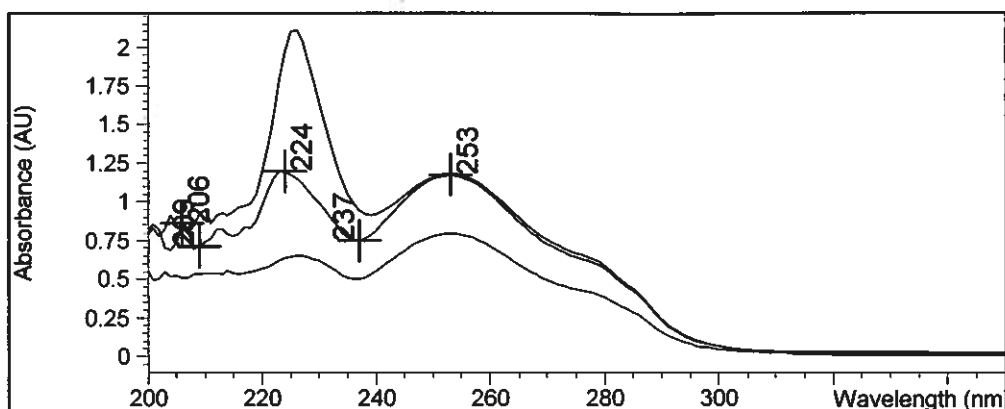
krátce čárkovaná křivka měření v kyselém prostředí



Obr. 3.3.4.1. Spektrum látky č. 20583



Obr. 3.3.4.2. Spektrum látky č. 20553



Obr. 3.3.4.3. Spektrum látky č. 20581

Jak je vidno z jednotlivých spekter, všechny měřené látky měly maximální absorbanci při vlnové délce 228 nm (zaokrouhлено). Proto byly všechny látky na HPLC detekovány při vlnové délce 228 nm.

3.3.5. Zpracování dat

Naměřené retenční časy jednotlivých vzorků t_R byly přepočítány na lipofilní parametry $\log k$ a jsou uvedeny v tabulce.

4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1. RP – HPLC retenční charakteristiky

V následujících tabulkách jsou umístěny změřené a vypočítané lipofilitní charakteristiky vzorků (retenční čas t_R , logaritmovaná hodnota kapacitního poměru $\log k$). Všechny tři série byly proměřeny při pH 5,5 a pH 2,5. Pak se prováděly studie s látkami ze skupiny III, kdy se porovnávaly časy na dvou různých kolonách (C-8 a C-18), při různém složení mobilní fáze a při rozdílné rychlosti průtoku mobilní fáze.

Výpočet relativního retenčního času:

$$\text{relat. } t_R = \frac{t_{R \text{ i.s.}(s)}}{t_{R \text{ i.s.}(vz)}} \cdot t_{R \text{ vz}}, \quad \text{kde } t_{R \text{ i.s.}(s)} \text{ je retenční čas standardu při měření}$$

samotného standardu a $t_{R \text{ i.s.}(vz)}$ je retenční čas standardu při měření vzorku.

Výpočet $\log k$:

$$\log k = \log \frac{(\text{relat. } t_R - t_0)}{t_0}, \quad \text{kde relat. } t_R \text{ je relativní retenční čas vzorku a } t_0 \text{ mrtvý čas}$$

t_0 je mrtvý čas kolony, tj. doba, za kterou projde kolonou mobilní fáze, aniž by byla kolonou zadržena, v našem případě je to pík při hodnotě 2,67 min (viz. obr. 4.1.2.1.)

4.1.1. Naměřené hodnoty všech sérií při pH 5,5

Tab. 4.1.1.1. Naměřené hodnoty látek skupiny I při pH 5,5

Podmínky: kolona Thermoquest Hypersil® C-18 250x4 mm 5µm, mobilní fáze methanol/voda 80/25, rychlost průtoku $f = 1,0$ ml/min, $t_0 = 2,67$

Vzorek č.	t_R i.s. (1)	t_R vz. (1)	t_R i.s. (2)	t_R vz. (2)	t_R i.s.	t_R vz.	relat. t_R	log k
20553	15,73	6,29	15,89	6,33	15,81	6,31	6,58	0,166
20554	15,79	7,5	15,63	7,44	15,71	7,47	7,84	0,287
20556	15,61	9,98	15,52	9,94	15,565	9,96	10,56	0,47
20558	15,87	5,22	15,85	5,21	15,86	5,215	5,42	0,013
20559	16,06	6,03	16,18	6,06	16,12	6,045	6,19	0,12
20563	15,65	9,96	15,5	9,89	15,575	9,925	10,51	0,468
20566	15,75	10,09	15,67	10,04	15,71	10,065	10,57	0,471
20568	16,19	4,8	16,13	4,79	16,16	4,795	4,89	-0,079
20573	15,78	5,68	15,67	5,66	15,725	5,67	5,95	0,089
20575	15,63	6,49	15,66	6,47	15,645	6,48	6,83	0,193
20576	15,53	8,21	15,38	8,14	15,455	8,175	8,73	0,356
20601	15,79	7,1	15,52	7,04	15,655	7,07	7,45	0,253
20602	16,01	8,59	16,09	8,63	16,05	8,61	8,85	0,364

Vysvětlivky: t_R i.s. (1); (2) ..retenční čas vnitřního standardu při prvním; druhém měření
 t_R vz. (1); (2) retenční čas daného vzorku při prvním; druhém měření
 t_R i.s.; t_R vz. průměrný retenční čas vnitřního standardu; daného vzorku
relat. t_R relativní retenční čas
log k logaritmovaná hodnota kapacitního poměru log k

Tab. 4.1.1.2. Naměřené hodnoty látek skupiny II při pH 5,5

Podmínky: kolona Thermoquest Hypersil® C-18 250x4 mm 5 µm, mobilní fáze methanol/voda 80/25, rychlost průtoku $f = 1,0$ ml/min, $t_0 = 2,67$

Vysvětlivky: viz. Tab. 4.1.1.1.

Vzorek č.	t_R i.s. (1)	t_R vz. (1)	t_R i.s. (2)	t_R vz. (2)	t_R i.s.	t_R vz.	relat. t_R	log k
20583	15,76	13,6	15,46	13,33	15,61	13,465	14,23	0,636
20587	15,53	16,74	15,41	16,57	15,47	16,655	17,76	0,752
20588	15,36	12,48	15,5	12,58	15,43	12,53	13,39	0,604
20589	15,1	10,21	15,21	10,27	15,155	10,24	11,15	0,502
20590	15,46	8,5	15,56	8,56	15,51	8,53	9,07	0,38
20591	16,01	12,97	15,45	12,41	15,73	12,69	13,31	0,6
20592	15,46	10,05	15,45	10,05	15,455	10,05	10,73	0,48
20596	16,85	10,85	16,84	10,84	16,845	10,845	10,62	0,474
20597	16,68	10,51	16,69	10,53	16,685	10,52	10,4	0,462
20598	15,76	8,08	15,86	8,14	15,81	8,11	8,46	0,336
20599	16,86	8,49	16,88	8,5	16,87	8,495	8,31	0,324
20600	15,48	9,59	15,56	9,63	15,52	9,61	10,21	0,451
20603	15,43	6,16	15,48	6,17	15,455	6,165	6,58	0,166
20604	16,79	7,83	16,68	7,77	16,735	7,8	7,69	0,274
20605	16,21	4,91	16,26	4,91	16,235	4,91	4,99	-0,061
20606	15,45	6,24	15,47	6,25	15,46	6,245	6,66	0,175
20607	16,73	7,72	16,75	7,73	16,74	7,725	7,61	0,267
20611	15,63	4,61	15,77	4,61	15,7	4,61	4,84	-0,089
20612	15,8	6,91	15,76	6,9	15,78	6,905	7,22	0,231
20613	16,08	17,42	16,07	17,39	16,075	17,405	17,86	0,755
20614	16,11	11,95	15,91	11,8	16,01	11,875	12,23	0,554
20616	16,86	14,02	16,74	13,95	16,8	13,985	13,73	0,617
20617	15,88	8,25	16	8,31	15,94	8,28	8,57	0,344
20618	16,34	9,81	16,45	9,86	16,395	9,835	9,89	0,432
20619	16,51	10,35	16,49	10,34	16,5	10,345	10,34	0,458
20620	15,53	5,53	15,53	5,55	15,53	5,54	5,88	0,081
20622	16,55	7,67	16,62	7,69	16,585	7,68	7,64	0,27
20624	15,46	4,61	15,47	4,61	15,465	4,61	4,92	0,075
20627	16,8	4,02	16,85	4,01	16,825	4,015	3,94	-0,324
20630	16,72	5,36	16,66	5,36	16,69	5,36	5,3	-0,007
20631	15,42	4,53	15,45	4,56	15,435	4,545	4,86	-0,087
20638	15,85	9,36	15,85	9,35	15,85	9,355	9,74	0,423

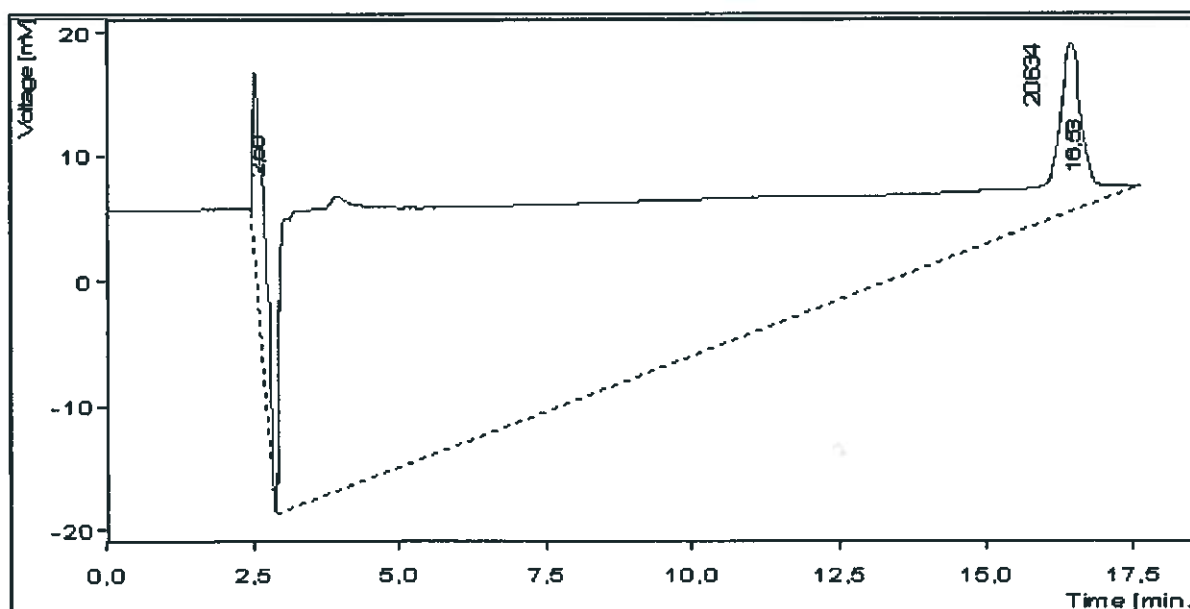
Tab. 4.1.1.3. Naměřené hodnoty látek skupiny III při pH 5,5

Podmínky: kolona Thermoquest Hypersil® C-18 250x4 mm 5 μm, mobilní fáze methanol/voda 80/25, rychlost průtoku $f = 1,0$ ml/min, $t_0 = 2,67$

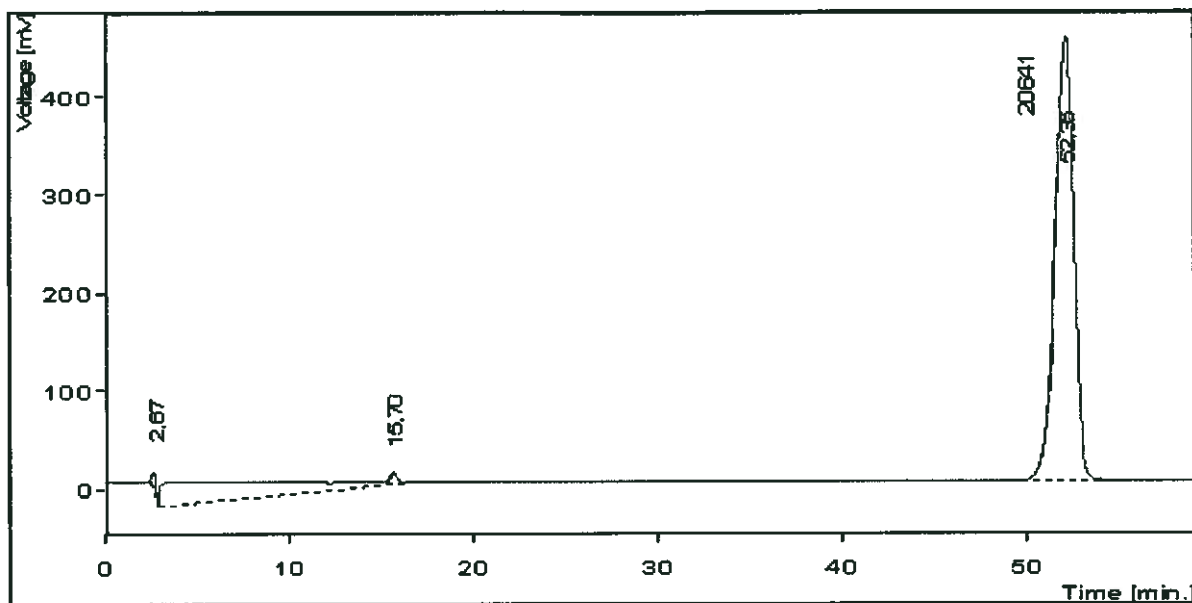
Vysvětlivky: viz. Tab. 4.1.1.1.

Vzorek č.	t_R i.s. (1)	t_R vz. (1)	t_R i.s. (2)	t_R vz. (2)	t_R i.s.	t_R vz.	relat. t_R	log k
i.s. 20634	16,46		16,53		16,495		16,495	0,714
20582	15,59	35,21	16,14	35,65	15,865	35,43	36,84	1,107
20621	15,07	31,95	15,14	32,15	15,105	32,05	35	1,083
20628	15,31	25,79	15,23	25,62	15,27	25,705	27,77	0,973
20629	15,59	34,32	15,6	34,33	15,595	34,325	36,31	1,1
20632	15,58	25,9	15,58	25,91	15,58	25,905	27,43	0,967
20633	15,69	41,69	15,39	40,98	15,54	41,335	43,88	1,188
20635	15,43	31,55	15,49	31,78	15,46	31,665	33,78	1,066
20639	16,01	14,03	15,83	13,86	15,92	13,945	14,45	0,645
20640	15,69	17,55	15,65	17,49	15,67	17,52	18,44	0,771
20641	15,7	52,35	15,61	51,99	15,655	52,17	54,97	1,292
20642	15,13	37,9	14,99	37,73	15,06	37,815	41,42	1,162
20643	15,73	23,37	15,47	22,95	15,6	23,16	24,49	0,912
20644	15,57	32,87	15,56	32,87	15,565	32,87	34,83	1,081
20645	15,16	41,53	15,96	44,31	15,56	42,92	45,5	1,205
20647	15,61	24,53	15,67	24,65	15,64	24,59	25,93	0,94

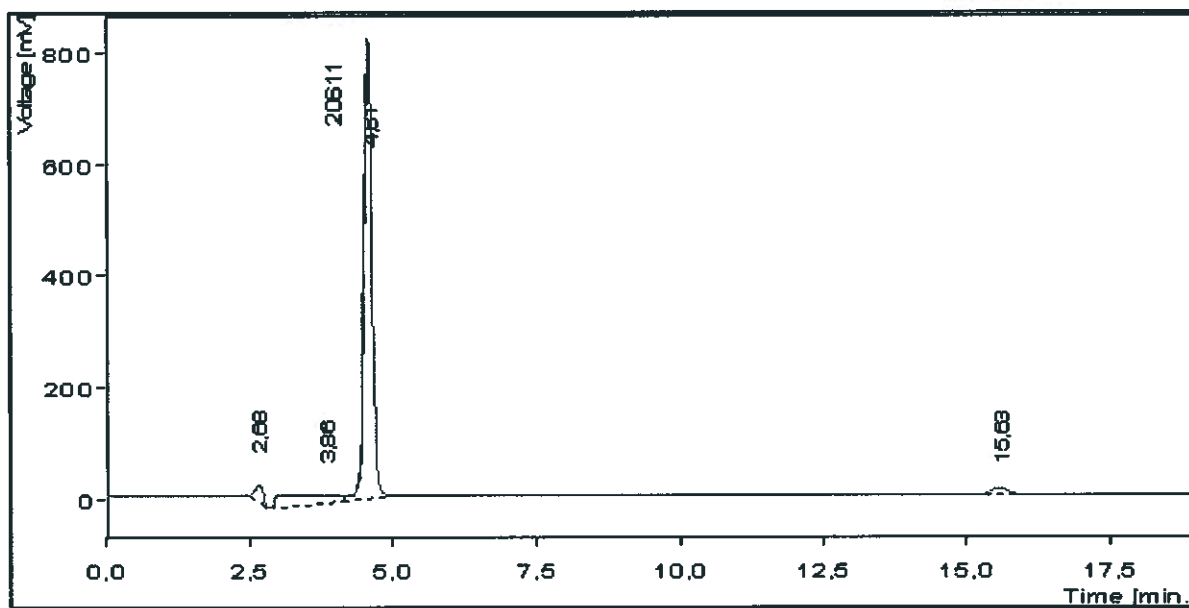
4.1.2. Chromatogramy vybraných vzorků při pH 5,5



Obr. 4.1.2.1. Chromatogram vnitřního standardu – látka č. 20634



Obr. 4.1.2.2. Chromatogram nejvíce lipofilní látky – látka č. 20641



Obr. 4.1.2.3. Chromatogram nejméně lipofilní látky – látka č. 20611

4.1.3. Naměřené hodnoty všech sérií při pH 2,5

Tab. 4.1.3.1. Naměřené hodnoty látek skupiny I při pH 2,5

Podmínky: kolona Thermoquest Hypersil® C-18 250x4 mm 5µm, mobilní fáze methanol/voda 80/25, rychlost průtoku $f = 1,0$ ml/min, $t_0 = 2,67$

Vysvětlivky: viz. Tab. 4.1.1.1.

Vzorek č.	t_R i.s. (1)	t_R vz. (1)	t_R i.s. (2)	t_R vz. (2)	t_R i.s.	t_R vz.	relat. t_R	log k
20553	17,86	7,38	17,81	7,36	17,835	7,37	7,34	0,243
20554	17,79	8,85	17,77	8,85	17,78	8,85	8,84	0,364
20556	17,79	12,19	17,79	12,2	17,79	12,195	12,17	0,551
20558	17,79	6,03	17,81	6,03	17,8	6,03	6,02	0,098
20559	17,87	7,06	17,85	7,05	17,86	7,055	7,02	0,212
20563	17,92	12,3	17,91	12,3	17,915	12,3	12,19	0,552
20566	17,88	12,28	17,89	12,28	17,885	12,28	12,19	0,552
20568	17,9	5,48	17,9	5,48	17,9	5,48	5,44	0,016
20573	17,9	6,65	17,91	6,65	17,905	6,65	6,6	0,167
20575	17,91	7,76	17,91	7,76	17,91	7,76	7,7	0,275
20576	17,71	6,22	17,65	6,21	17,68	6,215	6,24	0,126
20601	17,87	8,99	17,86	8,99	17,865	8,99	8,94	0,371
20602	17,84	10,92	17,78	10,89	17,81	10,905	10,87	0,488

Tab. 4.1.3.2. Naměřené hodnoty látek skupiny II při pH 2,5

Podmínky: kolona Thermoquest Hypersil® C-18 250x4 mm 5µm, mobilní fáze methanol/voda 80/25, rychlost průtoku $f = 1,0$ ml/min, $t_0 = 2,67$

Vysvětlivky: viz. Tab. 4.1.1.1.

Vzorek č.	t_R i.s. (1)	t_R vz. (1)	t_R i.s. (2)	t_R vz. (2)	t_R i.s.	t_R vz.	relat. t_R	log k
20583	18,19	15,65	18,13	15,59	18,16	15,62	15,28	0,674
20587	18,06	19,67	18,06	19,66	18,06	19,665	19,34	0,795
20588	17,79	14,51	17,78	14,5	17,785	14,505	14,48	0,646
20589	17,81	11,65	17,83	11,67	17,82	11,66	11,62	0,525
20590	17,7	9,47	17,75	9,49	17,725	9,48	9,5	0,408
20591	17,55	14,26	17,61	14,31	17,58	14,285	14,43	0,644
20592	17,8	11,51	17,75	11,49	17,775	11,5	11,49	0,519
20596	17,96	10,83	17,95	10,83	17,955	10,83	10,71	0,479
20597	17,96	11,87	17,97	11,87	17,965	11,87	11,73	0,531
20598	17,81	9,37	17,73	9,34	17,77	9,355	9,35	0,398
20599	17,92	9,21	17,93	9,21	17,925	9,21	9,13	0,383
20600	17,73	11,15	17,79	11,18	17,76	11,165	11,17	0,503
20603	17,73	7,15	17,7	7,15	17,715	7,15	7,17	0,227
20604	17,9	8,78	17,91	8,78	17,905	8,78	8,71	0,354
20605	17,91	5,45	17,87	5,45	17,89	5,45	5,41	0,011
20606	17,79	7,07	17,77	7,06	17,78	7,065	7,06	0,216
20607	17,95	8,47	18,01	8,48	17,98	8,475	8,37	0,329
20611	17,91	4,99	17,63	4,94	17,77	4,965	4,96	-0,066
20612	17,67	7,56	17,77	7,59	17,72	7,575	7,59	0,265
20613	17,65	20,35	17,87	20,65	17,76	20,5	20,5	0,825
20614	17,83	14,33	17,88	14,37	17,855	14,35	14,27	0,638
20616	17,15	16,02	17,1	15,98	17,125	16	16,59	0,717
20617	17,79	9,31	17,79	9,31	17,79	9,31	9,29	0,395
20618	17,91	11,56	17,91	11,57	17,91	11,565	11,47	0,518
20619	17,89	11,46	17,91	11,47	17,9	11,465	11,38	0,513
20620	17,71	6,22	17,65	6,21	17,68	6,215	6,24	0,127
20622	17,91	13,96	17,92	13,97	17,915	13,965	13,84	0,622
20624	17,77	8,3	17,75	8,32	17,76	8,31	8,31	0,325
20627	18,03	6,9	17,99	6,89	18,01	6,895	6,8	0,189
20630	17,88	7,95	17,87	7,94	17,875	7,945	7,89	0,291
20631	17,75	6,57	17,76	6,57	17,755	6,57	6,57	0,165
20638	17,6	17,6	17,62	17,62	17,61	17,61	17,76	0,752

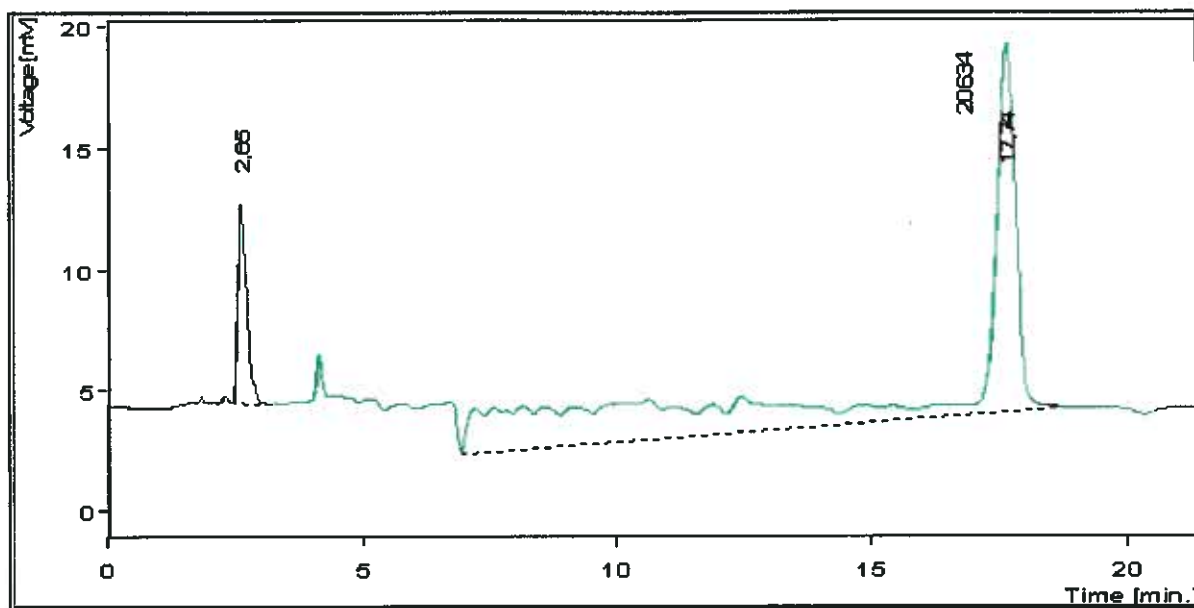
Tab. 4.1.3.3. Naměřené hodnoty látek skupiny III při pH 2,5

Podmínky: kolona Thermoquest Hypersil® C-18 250x4 mm 5 μ m, mobilní fáze methanol/voda 80/25, rychlost průtoku $f = 1,0$ ml/min, $t_0 = 2,67$

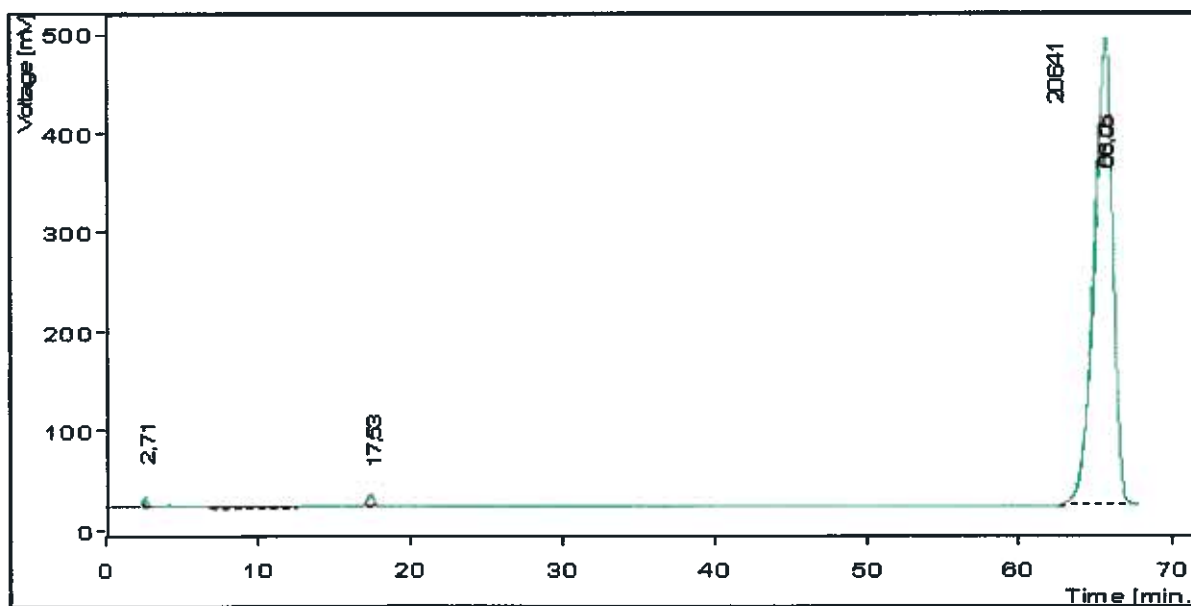
Vysvětlivky: viz. Tab. 4.1.1.1.

Vzorek č.	t_R i.s. (1)	t_R vz. (1)	t_R i.s. (2)	t_R vz. (2)	t_R i.s.	t_R vz.	relat. t_R	log k
i.s. 20634	17,74		17,78		17,76		17,76	0,752
20582	17,51	40,91	17,6	41,84	17,555	41,375	41,86	1,167
20621	17,56	38,99	17,93	39,44	17,745	39,215	39,25	1,137
20628	17,77	30,81	17,82	30,89	17,795	30,85	30,79	1,022
20629	17,89	40,49	17,77	40,21	17,83	40,35	40,19	1,148
20632	17,64	29,73	17,47	29,4	17,555	29,565	29,91	1,009
20633	17,33	52,04	17,64	49,97	17,485	51,005	51,81	1,265
20635	17,33	37,64	17,31	37,56	17,32	37,6	38,56	1,128
20639	17,27	17,27	17,24	17,24	17,255	17,255	17,76	0,752
20640	17,57	22,08	17,59	22,11	17,58	22,095	22,32	0,867
20641	17,53	66,05	17,52	66,02	17,525	66,035	66,92	1,381
20642	17,6	51,17	17,63	51,39	17,615	51,28	51,7	1,264
20643	17,83	29,81	17,75	29,69	17,79	29,75	29,7	1,005
20644	17,42	38,97	17,33	38,74	17,375	38,855	39,72	1,142
20645	17,74	51,73	17,61	51,46	17,675	51,595	51,84	1,265
20647	17,39	29,04	17,38	28,99	17,385	29,015	29,64	1,004

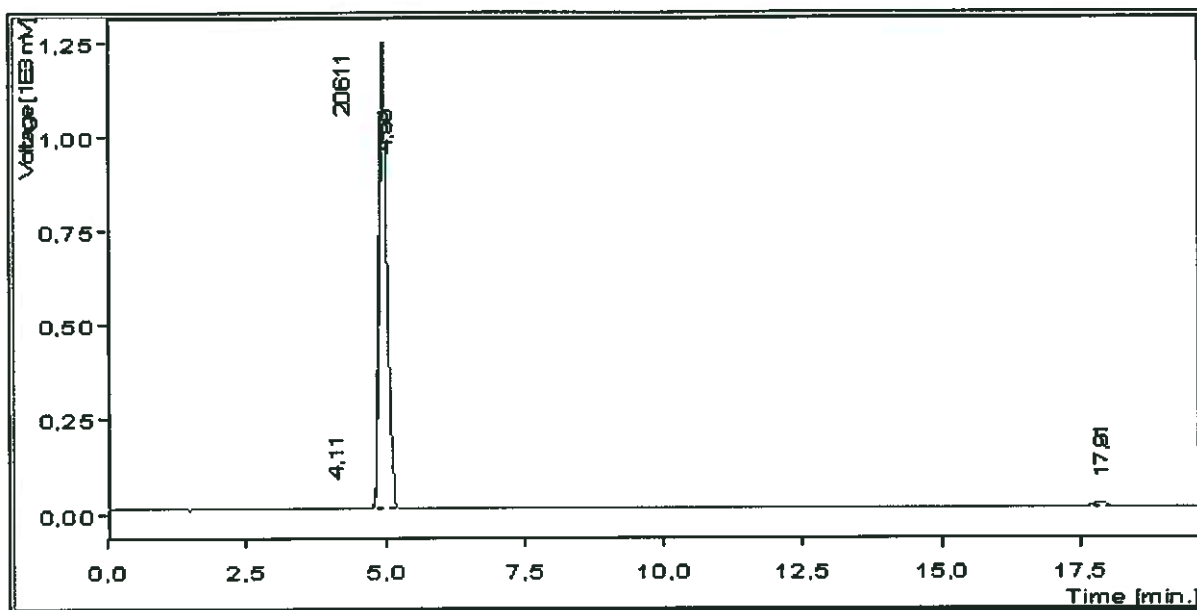
4.1.4. Chromatogramy vybraných vzorků při pH 2,5



Obr. 4.1.4.1. Chromatogram vnitřního standardu – látka č. 20634



Obr. 4.1.4.2. Chromatogram nejvíce lipofilní látky – látka č. 20641



Obr. 4.1.4.3. nejméně lipofilní látky – látka č. 20611

4.1.5. Naměřené hodnoty pro skupinu látek III pro srovnání retence při vyšším obsahu methanolu v mobilní fázi

Tab. 4.1.5.1. Naměřené hodnoty látek skupiny III

Podmínky: kolona Zorbax Elipse ® XDB C-8 150x4,6 mm 5µm, methanol/voda 80/25, rychlost průtoku $f = 1,7$ ml/min, pH 2,5

Vysvětlivky: viz. Tab. 4.1.1.1.

Vzorek č.	t_R i.s.	t_R vz.	relat. t_R	log k
i.s. 20634	4,31	4,31	4,31	0,585
20582	4,4	9,095	8,91	0,955
20621	4,32	7,755	7,74	0,886
20628	4,38	7,155	7,04	0,84
20629	4,345	8,67	8,6	0,938
20632	4,375	6,465	6,37	0,789
20633	4,335	10,6	10,54	1,035
20635	4,355	8,615	8,53	0,933
20639	4,4	4,13	4,05	0,56
20640	4,33	4,91	4,89	0,652
20641	4,33	14,175	14,11	1,172
20642	4,39	11,65	11,44	1,074
20643	4,355	6,98	6,91	0,83
20644	4,345	9,215	9,14	0,967
20645	4,34	11,355	11,28	1,067
20647	4,395	6,61	6,48	0,798

Tab. 4.1.5.2. Naměřené hodnoty látek skupiny III

Podmínky: kolona Zorbax Elipse ® XDB C-8 150x4,6 mm 5µm, methanol/voda 70/40,
f = 1,7 ml/min, pH 2,5

Vysvětlivky: viz. Tab. 4.1.1.1.

Vzorek č.	t _R i.s.	t _R vz.	relat. t _R	log k
i.s.				
20634	34,885	34,885	34,885	1,517
20582	34,91	112,49	109,28	2,022
20621	34,78	88,055	81,96	1,895
20628	36,765	78,56	74,54	1,854
20629	36,24	109,405	105,31	2,005
20632	36,085	60,995	58,97	1,75
20633	34,455	135,345	137,037	2,121
20635	36,52	104,9	100,29	1,984
20639	36,145	29,875	28,83	1,431
20640	35,79	41,83	40,77	1,586
20641	35,9	220,135	213,91	2,315
20642	34,91	155,625	155,51	2,176
20643	37,75	84,52	78,11	1,874
20644	35,425	114,47	112,73	2,035
20645	33,735	157,72	163,1	2,197
20647	36,745	69,505	65,99	1,8

4.1.6. Naměřené hodnoty pro skupinu látek III pro srovnání retence na kolonách C-8 a C-18 za stejných podmínek

Tab. 4.1.6.1. Naměřené hodnoty látek skupiny III

Podmínky: kolona Zorbax Elipse® XDB C-8 150x4,6 mm 5µm, methanol/voda 80/25, f = 1,0 ml/min, pH 2,5

Vysvětlivky: viz. Tab. 4.1.1.1.

Vzorek č.	t _R i.s.	t _R vz.	relat. t _R	log k
i.s.				
20634	7,135	7,135	7,135	0,582
20582	7,82	16,69	15,23	0,968
20621	7,31	13,22	12,9	0,888
20628	7,73	12,87	11,88	0,847
20629	7,58	15,45	14,54	0,946
20632	7,63	11,42	10,68	0,793
20633	7,42	18,49	17,78	1,042
20635	7,73	15,725	14,515	0,945
20639	7,815	7,405	6,76	0,552
20640	7,32	8,295	8,09	0,65
20641	7,27	24,12	23,67	1,176
20642	7,69	21,035	19,52	1,086
20643	7,515	12,135	11,52	0,832
20644	7,45	16,02	15,34	0,972
20645	7,39	19,505	18,83	1,069
20647	7,745	11,855	10,92	0,805

Tab. 4.1.6.2. Naměřené hodnoty látek skupiny III

Podmínky: Thermoquest Hypersil® C-18 250x4 mm 5µm, mobilní fáze methanol/voda 80/25, průtok 1 ml/min, pH 2,5

Vysvětlivky: viz. Tab. 4.1.1.1.

Vzorek č.	t_R i.s.	t_R vz.	relat. t_R	log k
i.s.				
20634	17,76	17,76	17,76	0,752
20582	17,555	41,375	41,86	1,167
20621	17,745	39,215	39,25	1,137
20628	17,795	30,85	30,79	1,022
20629	17,83	40,35	40,19	1,148
20632	17,555	29,565	29,91	1,009
20633	17,485	51,005	51,81	1,265
20635	17,32	37,6	38,56	1,128
20639	17,255	17,255	17,76	0,752
20640	17,58	22,095	22,32	0,867
20641	17,525	66,035	66,92	1,381
20642	17,615	51,28	51,7	1,264
20643	17,79	29,75	29,7	1,005
20644	17,375	38,855	39,72	1,142
20645	17,676	51,595	51,84	1,265
20647	17,385	29,015	29,64	1,004

4.1.7. Naměřené hodnoty pro skupinu látek III pro srovnání retence při různé průtokové rychlosti

Tab. 4.1.7.1. Naměřené hodnoty látek skupiny III

Podmínky: Zorbax Elipse ® XDB C-8 150x4,6 mm 5µm, methanol/voda 80/25,
f = 1,0 ml/min, pH 2,5

Vysvětlivky: viz. Tab. 4.1.1.1.

Vzorek č.	t _R i.s.	t _R vz.	relat. t _R	log k
i.s.				
20634	7,135	7,135	7,135	0,582
20582	7,82	16,69	15,23	0,968
20621	7,31	13,22	12,9	0,888
20628	7,73	12,87	11,88	0,847
20629	7,58	15,45	14,54	0,946
20632	7,63	11,42	10,68	0,793
20633	7,42	18,49	17,78	1,042
20635	7,73	15,725	14,515	0,945
20639	7,815	7,405	6,76	0,552
20640	7,32	8,295	8,09	0,65
20641	7,27	24,12	23,67	1,176
20642	7,69	21,035	19,52	1,086
20643	7,515	12,135	11,52	0,832
20644	7,45	16,02	15,34	0,972
20645	7,39	19,505	18,83	1,069
20647	7,745	11,855	10,92	0,805

Tab. 4.1.7.2. Naměřené hodnoty látek skupiny III

Podmínky: Zorbax Elipse ® XDB C-8 150x4,6 mm 5µm, methanol/voda 80/25,
f = 1,7 ml/min, pH 2,5

Vysvětlivky: viz. Tab. 4.1.1.1.

Vzorek č.	T _R i.s.	T _R vz.	relat. t _R	log k
i.s.				
20634	4,31	4,31	4,31	0,585
20582	4,4	9,095	8,91	0,955
20621	4,32	7,755	7,74	0,886
20628	4,38	7,155	7,04	0,84
20629	4,345	8,67	8,6	0,938
20632	4,375	6,465	6,37	0,789
20633	4,335	10,6	10,54	1,035
20635	4,355	8,615	8,53	0,933
20639	4,4	4,13	4,05	0,56
20640	4,33	4,91	4,89	0,652
20641	4,33	14,175	14,11	1,172
20642	4,39	11,65	11,44	1,074
20643	4,355	6,98	6,91	0,83
20644	4,345	9,215	9,14	0,967
20645	4,34	11,355	11,28	1,067
20647	4,395	6,61	6,48	0,798

4.2. Vzájemná korelace lipofilitních parametrů

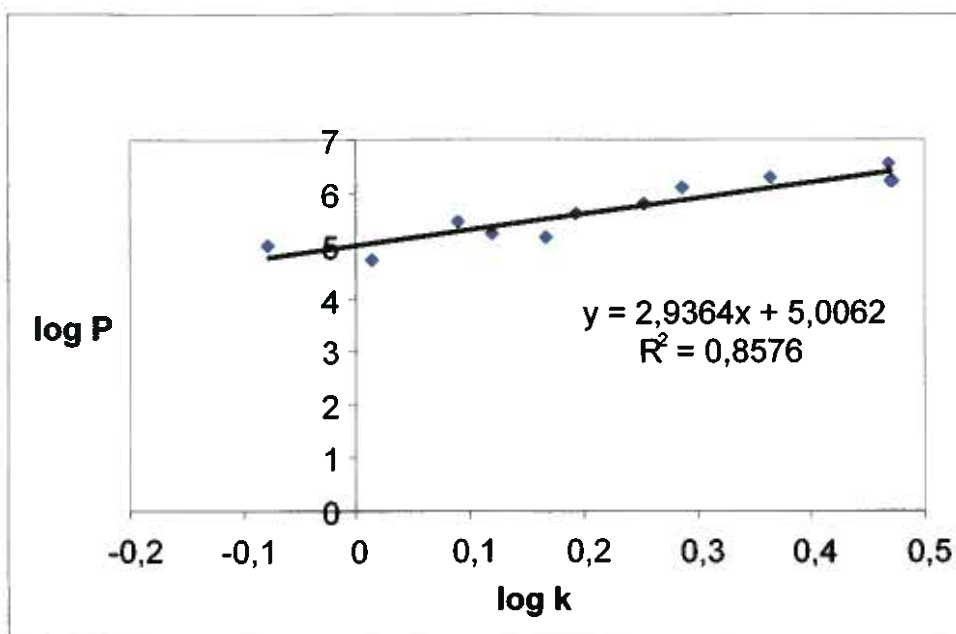
Hlavním cílem této diplomové práce bylo zjistit vzájemnou korelaci lipofilitních parametrů získaných pomocí RP-HPLC a počítačového programu. V následujících tabulkách jsou uvedeny hodnoty $\log k$ vypočítané z výsledků metody RP-HPLC a $\log P$ vypočítané pomocí počítačového programu. [Kuchař M.: osobní sdělení]

K potvrzení nebo vyvrácení lineární závislosti byla použita metoda lineární regrese.

Tab. 4.2.1. Výsledné hodnoty látek skupiny I při pH 5,5

Podmínky: Thermoquest Hypersil® C-18 250x4 mm 5 μ m, mobilní fáze methanol/voda 80/25, rychlost průtoku $f = 1,0$ ml/min

Vzorek č.	$\log k$	$\log P$
20553	0,166	5,16
20554	0,287	6,11
20556	0,47	6,2
20558	0,013	4,73
20559	0,12	5,22
20563	0,468	6,54
20566	0,471	6,2
20568	-0,079	5,01
20573	0,089	5,44
20575	0,193	5,62
20601	0,253	5,81
20602	0,364	6,3



Obr. 4.2.1. Graf korelace pro skupinu I při pH 5,5

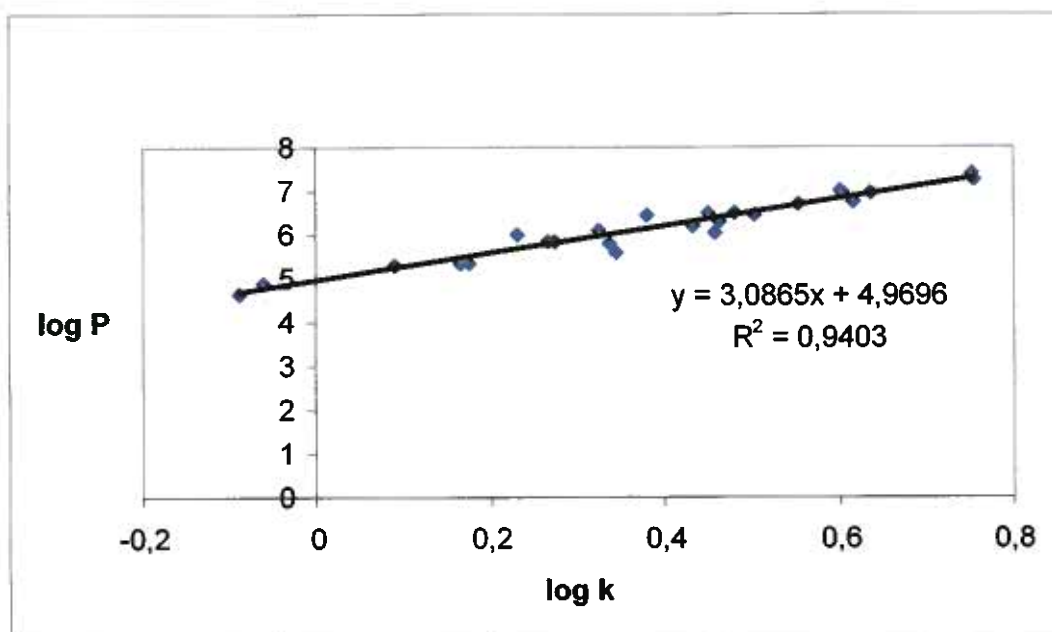
Podmínky: kolona Thermoquest Hypersil® C-18 250x4 mm 5 μ m, mobilní fáze methanol/voda 80/25, rychlost průtoku $f = 1,0$ ml/min

Za těchto podmínek byla dosažena korelace $R^2=0,8576$.

Tab. 4.2.2. Výsledné hodnoty látek skupiny II při pH 5,5

Podmínky: kolona Thermoquest Hypersil® C-18 250x4 mm 5 μ m, mobilní fáze methanol/voda 80/25, rychlost průtoku $f = 1,0$ ml/min

Vzorek č.	log k	log P
20583	0,636	6,93
20587	0,752	7,42
20588	0,604	6,93
20589	0,502	6,44
20590	0,38	6,44
20591	0,6	7
20592	0,48	6,51
20597	0,462	6,3
20598	0,336	5,81
20599	0,324	6,09
20600	0,451	6,51
20603	0,166	5,37
20604	0,274	5,86
20605	-0,061	4,88
20606	0,175	5,37
20607	0,267	5,86
20611	-0,089	4,66
20612	0,231	6,02
20613	0,755	7,25
20614	0,554	6,71
20616	0,617	6,76
20617	0,344	5,58
20618	0,432	6,22
20619	0,458	6,07
20620	0,089	5,31



Obr. 4.2.2. Graf korelace pro skupinu II při pH 5,5

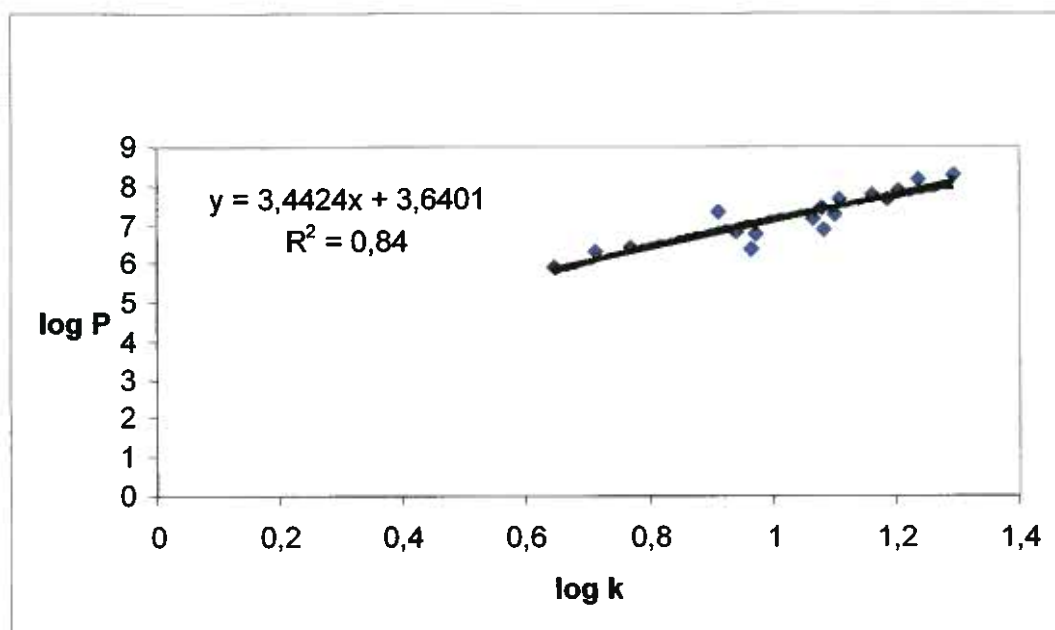
Podmínky: Thermoquest Hypersil® C-18 250x4 mm 5 μ m, mobilní fáze methanol/voda 80/25, rychlost průtoku $f = 1,0$ ml/min

Za těchto podmínek byla dosažena korelace $R^2=0,9403$.

Tab. 4.2.3. Výsledné hodnoty látek skupiny III při pH 5,5

Podmínky: Thermoquest Hypersil® C-18 250x4 mm 5 μ m, mobilní fáze methanol/voda 80/25, rychlost průtoku $f = 1,0$ ml/min

Vzorek č.	log k	log P
20581	1,235	8,15
20582	1,107	7,66
20621	1,083	6,86
20628	0,973	6,77
20629	1,1	7,26
20632	0,967	6,37
20633	1,188	7,64
i.s.		
20634	0,714	6,28
20635	1,066	7,15
20639	0,645	5,9
20640	0,771	6,39
20641	1,292	8,28
20642	1,162	7,79
20643	0,912	7,3
20644	1,081	7,41
20645	1,205	7,9
20647	0,94	6,81



Obr. 4.2.3. Graf korelace pro skupinu III při pH 5,5

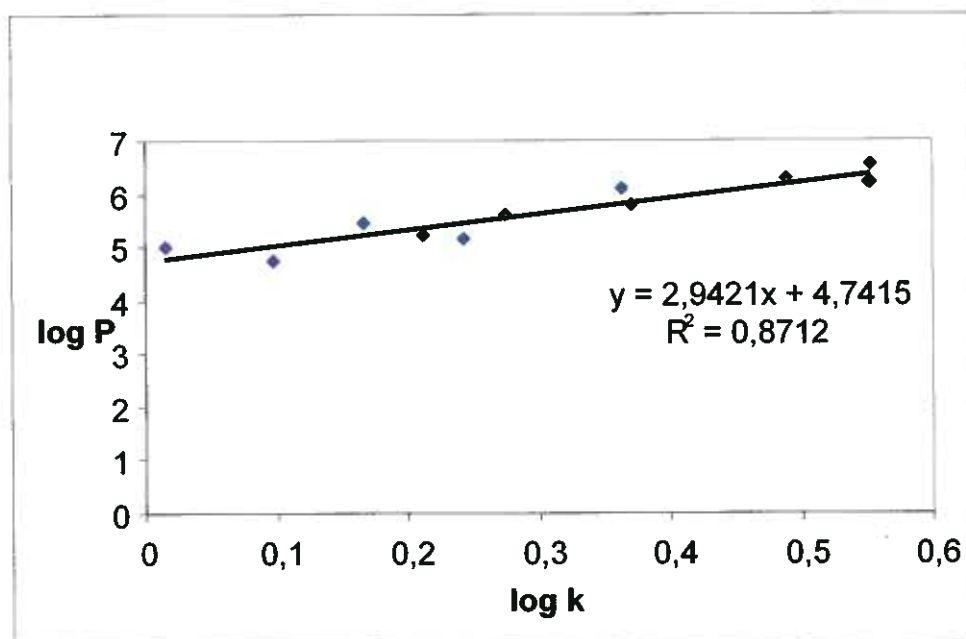
Podmínky: kolona Thermoquest Hypersil® C-18 250x4 mm 5 μ m, mobilní fáze methanol/voda 80/25, rychlost průtoku $f = 1,0$ ml/min

Za těchto podmínek bylo dosaženo korelace $R^2=0,84$.

Tab. 4.2.4. Výsledné hodnoty látek skupiny I při pH 2,5

Podmínky: kolona Thermoquest Hypersil® C-18 250x4 mm 5µm, mobilní fáze methanol/voda 80/25, rychlost průtoku $f = 1,0$ ml/min

Vzorek č.	log k	log P
20553	0,243	5,16
20554	0,364	6,11
20556	0,551	6,2
20558	0,098	4,73
20559	0,212	5,22
20563	0,552	6,54
20566	0,552	6,2
20568	0,016	5,01
20573	0,167	5,44
20575	0,275	5,62
20601	0,371	5,81
20602	0,488	6,3



Obr. 4.2.4. Graf korelace pro skupinu I při pH 2,5

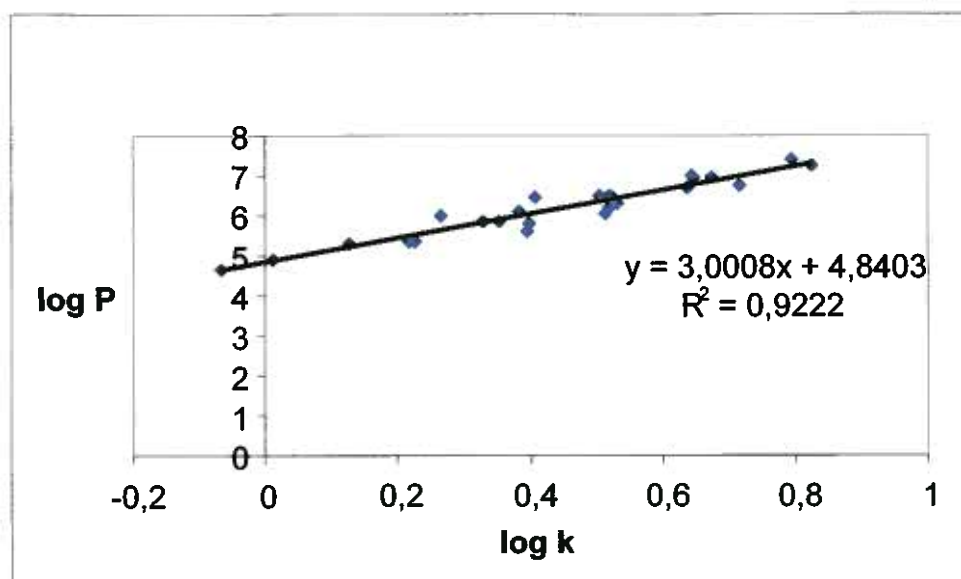
Podmínky: kolona Thermoquest Hypersil® C-18 250x4 mm 5µm, mobilní fáze methanol/voda 80/25, rychlost průtoku $f = 1,0$ ml/min

Za těchto podmínek bylo dosaženo korelace $R^2=0,8712$.

Tab. 4.2.5. Výsledné hodnoty látek skupiny II při pH 2,5

Podmínky: kolona Thermoquest Hypersil® C-18 250x4 mm 5 μ m, mobilní fáze methanol/voda 80/25, rychlost průtoku $f = 1,0$ ml/min

Vzorek č.	log k	log P
20583	0,674	6,93
20587	0,795	7,42
20588	0,646	6,93
20589	0,525	6,44
20590	0,408	6,44
20591	0,644	7
20592	0,519	6,51
20597	0,531	6,3
20598	0,398	5,81
20599	0,383	6,09
20600	0,503	6,51
20603	0,227	5,37
20604	0,354	5,86
20605	0,011	4,88
20606	0,216	5,37
20607	0,329	5,86
20611	-0,066	4,66
20612	0,265	6,02
20613	0,825	7,25
20614	0,638	6,71
20616	0,717	6,76
20617	0,395	5,58
20618	0,518	6,22
20619	0,513	6,07
20620	0,127	5,31



Obr. 4.2.5. Graf korelace pro skupinu II při pH 2,5

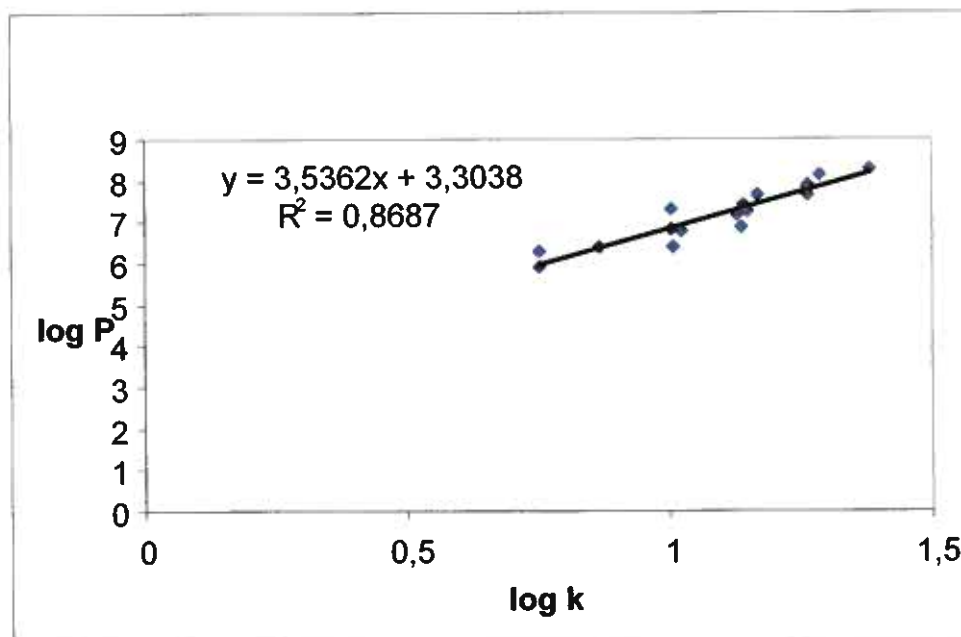
Podmínky: kolona Thermoquest Hypersil® C-18 250x4 mm 5 μ m, mobilní fáze methanol/voda 80/25, rychlost průtoku $f = 1,0$ ml/min

Za těchto podmínek bylo dosaženo korelace $R^2 = 0,9222$.

Tab. 4.2.6. Výsledné hodnoty látek skupiny III při pH 2,5

Podmínky: kolona Thermoquest Hypersil® C-18 250x4 mm 5µm, mobilní fáze methanol/voda 80/25, rychlost průtoku $f = 1,0$ ml/min

Vzorek č.	log k	log P
20581	1,287	8,15
20582	1,167	7,66
20621	1,137	6,86
20628	1,022	6,77
20629	1,148	7,26
20632	1,009	6,37
20633	1,265	7,64
i.s. 20634	0,752	6,28
20635	1,128	7,15
20639	0,752	5,9
20640	0,867	6,39
20641	1,381	8,28
20642	1,264	7,79
20643	1,005	7,3
20644	1,142	7,41
20645	1,265	7,9
20647	1,004	6,81



Obr. 4.2.6. Graf korelace pro skupinu III při pH 2,5

Podmínky: kolona Thermoquest Hypersil® C-18 250x4 mm 5µm, mobilní fáze methanol/voda 80/25, rychlost průtoku $f = 1,0$ ml/min

Za těchto podmínek bylo dosaženo korelace $R^2=0,8687$.

4.3. Srovnání retence vzorku při užití různých kolon za stejných podmínek

Dalším cílem této diplomové práce bylo srovnávání retence za použití dvou rozdílných kolon. Šlo o kolonu Thermoquest Hypersil® C-18 250x4 mm 5µm a Zorbax Elipse® XDB C-8 150x4,6 mm 5µm. Měření probíhalo za shodných podmínek. Mobilní fázi byla směs methanolu a vody v poměru 80/25, průtok byl 1 ml/min a pH 2,5. Byla zkoumána skupina látek III.

V následující tabulce je srovnání retenčních časů u obou kolon.

Tab. 4.3.1. Srovnání retence kolon u série III

Zorbax	Vzorek č.	Thermoquest	T/Z
18,93	20581	54,36	2,87
15,23	20582	41,86	2,74
12,9	20621	39,25	3,04
11,88	20628	30,79	2,59
14,54	20629	40,19	2,76
10,68	20632	29,91	2,8
17,78	20633	51,81	2,91
7,135	<i>i.s. 20634</i>	17,76	2,49
14,515	20635	38,56	2,66
6,76	20639	17,76	2,63
8,09	20640	22,32	2,76
23,67	20641	66,92	2,83
19,52	20642	51,7	2,65
11,52	20643	29,7	2,58
15,34	20644	39,72	2,59
18,83	20645	51,84	2,75
10,92	20647	29,64	2,71
		průměr:	2,727059

Z tabulky je zřejmé, že kolona Thermoquest zadržuje vzorek asi třikrát déle než Zorbax.

4.4. Srovnání retence vzorku při užití mobilních fází s různým obsahem methanolu

Pro toto srovnání jsme užili stejnou kolonu, a to Zorbax Elipse ® XDB C-8 150x4,6 mm 5µm. Měření probíhalo při průtoku 1,7 ml/min a pH 2,5. Jediný rozdíl byl ve složení mobilní fáze. V prvním případě byla poměr methanolu a vody 80/25 (mf1) a ve druhém 70/40 (mf2). Byla prozkoumána opět skupina látek III.

V následující tabulce je znázorněno srovnání retenčních časů při použitých rozdílných mobilních fázích.

Tab. 4.4.1. Srovnání retence za použití různých mobilních fází

80/25 t_R	Vzorek č.	70/40 t_R	mf2/mf1
11,02	20581	154,33	14
8,91	20582	109,28	12,26
7,74	20621	81,96	10,58
7,04	20628	74,54	10,59
8,6	20629	105,31	12,25
6,37	20632	58,97	9,25
10,54	20633	137,037	13
4,31	<i>i.s.</i> 20634	34,885	8,09
8,53	20635	100,29	11,75
4,05	20639	28,83	7,12
4,89	20640	40,77	8,34
14,11	20641	213,91	15,16
11,44	20642	155,51	13,59
6,91	20643	78,11	11,3
9,14	20644	112,73	12,33
11,28	20645	163,1	14,46
6,48	20647	65,99	10,18
		průměr	11,42647

Z tabulky vyčteme, že při použití mobilní fáze s nižším obsahem methanolu, je retence asi jedenáctkrát větší.

4.5. Srovnání retence vzorku při různé rychlosti průtoku

Posledním úkolem bylo porovnat retenční časy na stejné koloně (opět Zorbax Elipse ® XDB C-8 150x4,6 mm 5µm), při stejném složení mobilní fáze (methanol/voda 80/25) a pH (2,5). Jediné, co se lišilo, byla průtoková rychlost. Prvním případě se jednalo o 1 ml/min (f1), ve druhém o 1,7 ml/min (f2).

Výsledky jsou zpracovány v následující tabulce.

Tab. 4.5.1. Srovnání retence při různé rychlosti průtoku

1,0 ml/min t_R	Vzorek č.	1,7 ml/min t_R	f1/f2
18,93	20581	11,02	1,71
15,23	20582	8,91	1,71
12,9	20621	7,74	1,56
11,88	20628	7,04	1,68
14,54	20629	8,6	1,69
10,68	20632	6,37	1,68
17,78	20633	10,54	1,69
7,135	<i>i.s. 20634</i>	4,31	1,66
14,515	20635	8,53	1,7
6,76	20639	4,05	1,67
8,09	20640	4,89	1,65
23,67	20641	14,11	1,68
19,52	20642	11,44	1,71
11,52	20643	6,91	1,68
15,34	20644	9,14	1,68
18,83	20645	11,28	1,67
10,92	20647	6,48	1,68
		průměr	1,676471

Podle předpokladů je retence při vyšší rychlosti průtoku nižší. Kolikrát je rychlost větší, tolikrát je retence slabší. V našem případě je druhá rychlost průtoku 1,7krát vyšší, tudíž retenční časy jsou 1,7krát nižší.

5. ZÁVĚR

V této diplomové práci byla provedena studie lipofility tří sérií látek metodou RP-HPLC. Po optimalizaci podmínek a nalezení vhodného složení mobilní fáze byly tyto série několikrát proměřeny a ze získaných retenčních časů byly vypočítány hodnoty $\log k$.

Poté bylo provedeno srovnání $\log k$ s teoretickými hodnotami $\log P$, které byly získány z počítačového programu. Mezi hodnotami byla prokázána lineární závislost.

Cílem této práce bylo také změřením lipofility. Na VÚFB v Praze předběžně určili lipofilitu pomocí $\log P$ a zjistili nejméně a nejvíce lipofilní látky v jednotlivých skupinách. Po proměření všech tří skupin bylo patrné, že tyto předpoklady byly mylné. Ve skupině I byla nejlipofilnější látkou látka č. 20566 (předpokladem byla látka č. 20563), nejméně lipofilní byla 20568 (předpoklad látka č. 20558). Ve skupině II byla nejvíce lipofilní látka č. 20613 (předpoklad byl látka č. 20587), nejméně lipofilní byla látka č. 20611 (předpoklad byl správný). Ve skupině III byla jako nejlipofilnější změřena látka č. 20641 (předpokladem byla látka č. 20581) a nejméně lipofilní látka č. 20639 (předpoklad látka č. 20634). Po proměření jsme výsledky předali opět VÚFB a ti pokračují v dalších studiích těchto potenciálních antileukotrienik.

Dalším cílem bylo porovnání retence vzorků na dvou různých kolonách za stejných podmínek, dále na stejných kolonách při použití stejné mobilní fáze v různém poměru a nakonec na stejných kolonách za stejných podmínek, ale při jiné rychlosti průtoku.

Z výsledků vyplývá, že kolona C-18 má větší retenci než C-8. Při použití mobilní fáze s nižším obsahem methanolu je retence nižší než při použití mobilní fáze s vyšším obsahem methanolu. A nakonec při použití různých rychlostí průtoku platí, že o kolik je rychlost průtoku vyšší, o tolik jsou nižší retenční časy.

6. LITERATURA

1. Douša M.: Základy separačních metod se zaměřením na HPLC, Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský, Brno, 2002
2. Hartl J., Palát K.: Farmaceutická chemie I., SPN, Praha, 1990
3. Churáček J. a kol.: Analytická separace látek, SNTL, Praha, 1990
4. Karlíček R. a kol.: Analytická chemie pro farmaceuty, Karolinum, Praha, 2005
5. Klimeš J. a kol.: Kontrola léčiv I., Karolinum, Praha, 2002
6. Klimeš J. a kol.: Kontrola léčiv II., Karolinum, Praha, 2004
7. Klouda P.: Analytická chemie: separační metody, Ostrava, 1994
8. Mikeš O. a kol.: Laboratorní chromatografické metody, SNTL, Praha, 1980
9. Rücker G., Neugebauer M., Willems G.G.: Instrumentelle pharmazeutische Analytik, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft Stuttgart, Stuttgart, 2001
10. Zýka J.: Analytická příručka, SNTL, Praha, 1973
11. Mrkvičková Z.: Diplomová práce, Hradec Králové, 2004
12. Český lékopis 2002, Grada, Praha, 2002
13. www.natur.cuni.cz/~pcoufal/hplc.html
14. Dagmar Lincová, Hassan Farghali et al.: Základní a aplikovaná farmakologie, Galén, Karolinum, 2002
15. Mikro – verze AISLP, verze 2006.2