

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ
Katedra biofyziky a fyzikální chemie



Použití kolon s pelikulárními částicemi pro analýzu benzimidazolů

Diplomová práce

Utilization of Columns Filled by Pellicular Particles for Analysis of
Benzimidazoles

Diploma thesis

Vedoucí diplomové práce: ing. Vladimír Kubíček, CSc.

Hradec Králové 2013

Tomáš Hrdý, DiS.

PROHLÁŠENÍ

„Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpal, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány. Obrázky jsou použity se svolením autorů. Práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.“

Tomáš Hrdý, DiS.

Poděkování

Děkuji za cenné rady a postřehy Ing.Vladimíru Kubíčkoví, CSc. při vedení mé diplomové práce.

Abstrakt

Univerzita Karlova v Praze

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra biofyziky a fyzikální chemie

Kandidát: Tomáš Hrdý, DiS.

Konzultant: Ing. Vladimír Kubíček, CSc.

Název diplomové práce: Použití kolon s pelikulárními částicemi pro analýzu benzimidazolů

Cílem této práce je nalézt optimální složení mobilní fáze (MF) ke chromatografickému stanovení albendazolu (ABZ), albendazolu sulfoxidu (ABZSO) a albendazolu sulfonu (ABZSO₂). Vnitřním standardem byl zvolen oxibendazol (OXI) a separace byly studovány na koloně Kinetex PFP 100 mm x 4,6 mm; 2,6 μm s náplní tvořenou pelikulárními částicemi. V práci byly studovány čtyři různé MF, každá z nich byla testována při čtyřech různých poměrech složek. Jako optimální MF byla vybrána MF sestávající z acetonitrilu a fosfátového pufru o pH = 7,0.

Klíčová slova: chromatografie, HPLC, benzimidazoly, albendazol, pelikulární částice, pentafluorfenyl.

Abstract

Charles University in Prague

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Biophysics and Physical Chemistry

Candidate: Tomáš Hrdý, DiS.

Consultant: Ing. Vladimír Kubíček, CSc.

Title of Thesis: Utilization of Columns Filled by Pellicular Particles for Analysis of Benzimidazoles

The goal of the diploma thesis was to determine the most suitable mobile phase composition for chromatographic determination of albendazole (ABZ), albendazole sulphoxide (ABZSO) and albendazole sulfone (ABZSO₂). Oxibendazole (OXI) was selected as internal standard and separations were studied on Kinetex PFP 100 mm x 4.6 mm, 2.6 micron column packed with pellicular particles. Four different mobile phases were studied. Each of them was tested at four different component ratios. The optimal mobile phase consisted of acetonitrile and phosphate buffer (pH = 7.0).

Key words: chromatography, benzimidazoles, pellicular particles, HPLC, pentafluorophenile (PFP)

OBSAH

Seznam zkratk.....	8
1. Úvod a zadání práce.....	9
2. Teoretická část	10
2.1 Benzimidazolová anthelmintika.....	10
2.1.1 Mechanismus účinku.....	10
2.1.2 Indikace.....	10
2.1.3 Nežádoucí účinky a kontraindikace.....	10
2.2 Benzimidazoly z chemického hlediska.....	10
2.3 Jednotliví zástupci benzimidazolů.....	10
2.3.1 Albendazol.....	11
2.3.2 Thiabendazol.....	12
2.3.3 Mebendazol.....	12
2.3.4 Fenbendazol.....	12
2.3.5 Oxibendazol.....	13
2.4 Metabolity albendazolu použité při studiu vlastností kolony.....	14
2.5 Chromatografie.....	14
2.5.1 Rozdělení chromatografie.....	14
2.5.2 Druhy chromatografie.....	14
2.5.3 High performance liquid chromatography (HPLC).....	15
2.5.4 Detekce používané v chromatografii.....	16
2.5.5 Typy detektorů.....	16
2.5.6 Fluorescenční detektor.....	17
2.5.7 Detektor UV-VIS.....	19
2.6 Kolony pro kapalinovou chromatografii.....	20
2.6.1 Typy kolon.....	20
2.6.2 Kolona Kinetex PFP 100 mm x 4.60 mm.....	21
2.6.3 Technologie fused-core.....	21
2.6.4 Kinetika přenosu sloučenin v chromatografické koloně s pelikulárními částicemi.....	21
3. Experimentální část.....	22
3.1 Použitý materiál.....	24
3.1.1 Chemikálie.....	24
3.1.2 Pomůcky a přístroje.....	24
3.2 Příprava zásobních roztoků.....	24

3.3	Přehled elučních činidel.....	26
3.4	Příprava vzorků.....	26
4.	Výsledky studie vlivu složení mobilní fáze na délku eluce jednotlivých benzimidazolů....	27
4.1	Výsledky studie ABZ.....	27
4.2	Výsledky studie OXI.....	31
4.3	Výsledky studie ABZSO.....	35
4.4	Výsledky studie ABZSO ₂	41
5.	Diskuse	45
5.1	Albendazol (ABZ).....	45
5.2	Oxibendazol (OXI).....	45
5.3	Albendazol sulfoxid (ABZSO).....	46
5.4	Albendazol sulfon (ABZSO ₂).....	46
5.5	Shrnutí.....	46
6.	Závěr.....	47
	Informační zdroje.....	48

Seznam zkratek:

ABZ	Albendazol
ABZSO	Albendazol sulfoxid
ABZSO2	Albendazol sulfon
AcAcet	Kyselina octová 0,01 M
ACN	Acetonitril for gradient elution (Aldrich)
DMSO	Dimethylsulfoxid
EČ	eluční činidlo
FL	fluorescenční světlo
MetOH	Methanol for gradient elution (Aldrich)
MF	Mobilní fáze
OXI	oxibendazol
Pufr	fosforečnanový pufr 0,025 M o pH 7,0
RT	retenční čas

1. Úvod a zadání práce

Benzimidazoly jsou látky s antinematodním, anticestodním, antitrepatodním a potenciálně antimykotickým účinkem. U červů, kteří parazitují na hospodářských zvířatech, se však vyvíjí rezistence vůči těmto látkám. Studium této rezistence se zabývá výzkum, na němž se v rámci Farmaceutické fakulty UK v Hradci Králové podílí několik kateder. Součástí výzkumu nutně jsou i analytické metody stanovení benzimidazolových anthelmintik a jejich metabolitů. Jak plyne z rešerší, není zatím vyvinuta uspokojivá HPLC metoda stanovení albendazolu a jeho dvou metabolitů, albendazol sulfoxidu a albendazol sulfonu, v biologickém materiálu, která by byla využitelná při výše zmíněném výzkumu. Proto jsem se ve své práci zabýval vlivem složení mobilní fáze na retenční časy čtyř benzimidazolů (albendazolu, albendazol sulfoxidu, albendazol sulfonu a oxibendazolu) na koloně s pentafluorofenylovou stacionární fází. Oxibendazol byl vybrán jako vnitřní standard. Cílem této práce je zjistit optimální složení mobilní fáze pro analýzu směsi uvedených benzimidazolů.

2. Teoretická část

2.1 Benzimidazolová anthelmintika

Skupina benzimidazolových anthelmintik je nejrozsáhlejší skupinou antinematod. Někteří zástupci mají antitrematodní a anticestodní aktivitu, výjimečně i antimykotickou účinnost.¹⁾

2.1.1 Mechanismus účinku

Mechanismus jejich účinku je založen na inhibici energetického metabolismu parazitujících červů, konkrétně inhibici beta-tubulinových subjednotek a zástavy tvorby mikrotubulů. Většina benzimidazolů působí proti vývojovým i dospělým stádiím helmintů, některé působí i ovocidně. Anthelmintická aktivita benzimidazolů je závislá na čase, po který v tkáních a tělních tekutinách přetrvává terapeutická koncentrace léčiva. U monogastričních zvířat jako pes, kočka nebo prase je většinou potřeba opakované podání benzimidazolů. Naopak u polygastričních zvířat a býložravců lze benzimidazoly podávat i jednorázově.²⁾

2.1.2 Indikace

K indikacím benzimidazolů patří nematodózy plic, gastrointestinálního traktu, případně dalších orgánů. Příkladem nematodóz jsou toxokarózy a trichuriózy koček a psů. Používají se rovněž jako antitrematodika a anticestodika pro léčbu tasemnice psí, kočičí a hráškové. Využívají se též v terapii prakticky všech hospodářských zvířat (skot, prase, ovce, kozy, drůbež), zvířat nehospodářských (pes, kočka, kůň) a spárkaté zvěře. Jednotlivé terapeutické dávky jsou závislé na konkrétních látkách a jejich způsobu podání.²⁾

2.1.3 Nežádoucí účinky a kontraindikace

U některých druhů zvířat vyvolávají nauzeu a zvracení, popř. průjem. Jejich podání je kontraindikováno u laktující zvěře a u zvěře s produkcí určenou pro lidský konzum. Kontraindikovány jsou také u zvířat s poruchami jater a ledvin.¹⁾

2.2 Benzimidazoly z chemického hlediska

Benzimidazoly jsou heterocyklické organické sloučeniny. Jejich strukturní základ tvoří benzen a imidazol. V přírodě se benzimidazoly původně nalézají v podobě N-ribosyl-dimethylbenzimidazolu, který slouží jako ligand pro kobalt ve vitaminu B12. Benzimidazoly mají imidazolový systém vycházející ze základu pro N-heterocyklické karbeny.³⁾⁴⁾

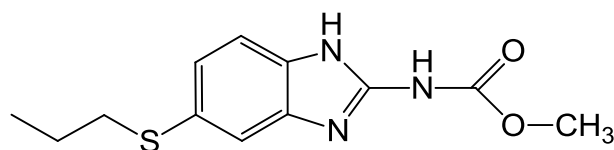
2.3 Jednotliví zástupci benzimidazolů

Ve farmacii se používají tyto zástupci:

- albendazol
- fenbendazol
- flubendazol
- mebendazol
- oxibendazol
- tiabendazol

2.3.1 Albendazol

Albendazol (Obr.1) je širokospektrální antiparazitikum ze skupiny benzimidazolů s účinkem proti střevním a tkáňovým červům a částečným působením proti některým parazitickým prvokům. Mechanismus účinku albendazolu spočívá v inhibici polymerace tubulinu v těle parazitů, což vede k rozvratu metabolismu a smrti parazita. V konečném důsledku dochází k zástavě tvorby ATP s následným úbytkem energie a úhynem vývojových stádií i dospělců.



Obr.1: Struktura albendazolu

Nejčastější použití albendazolu je při léčbě enterobiózy, trichuriózy, trichinelózy, strongyloidózy a askariózy.¹⁾

Přípravek s účinnou látkou albendazol: Zentel POR TBL FLM 2x200MG

I. Farmakokinetika

Albendazol se z trávicího traktu příliš nevstřebává, absorpce se zvýší při podání tučných jídel. Váže se ze 70 % na bílkoviny krevní plazmy a dobře se distribuuje v organismu. V játrech se metabolizuje na aktivní metabolit albendazol sulfoxid, který se vylučuje žlučí. Eliminační poločas je 8-12 hodin.

Albendazol je kontraindikován v těhotenství a u kojících žen. Mezi jeho nežádoucí účinky patří bolesti hlavy, závratě, horečka a meningeální příznaky. Může se také vyskytovat alopecie, nauzea a zvracení. Mezi velmi vzácné nežádoucí účinky patří hematologické poruchy jako leukopenie, pancytopenie a agranulocytóza.²⁾

II. Farmakodynamika

Albendazol je anthelmintikum s účinností proti nematodám, cestodám a trematodám (Tab.1).

Nematodes	Ascaris lumbricoides, Trichuris trichuira, Enterobius vermicularis, Ancylostoma duodenale, Necator americanus Strongyloides stercoralis, Cutaneus larva migrans
Cestodes	Hymenolepsis nana, Taenia spp.
Trematodes	Opisthorchis viverrini, Chlonorchis sinensis

Tab.1: Jednotlivé druhy parazitů

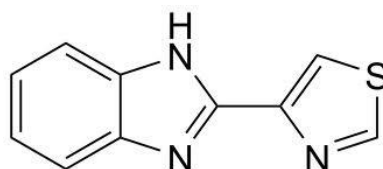
Je účinný též proti protozoím (Tab.2)

Protozoa	giardia lamblia intestinalis et duodenalis
----------	--

Tab.2: Příklady protozoí²⁾

2.3.2 Thiabendazol

Thiabendazol (Obr.2) má fungicidní a antiparazitické účinky. Je používán především ke zvládnání plísní, snětí a dalších houbami způsobených nemocí na ovoci (hlavně pomeranče) a zelenině. Je též používán k profylaxi choroby jilmu holandského. Používá se k léčbě keratitidy způsobené houbou *Aspergillus flavus*. Jako antiparazitikum je schopen likvidovat škrkavky (způsobující strongyloidózu), měchovce a další helminty napadající hospodářská zvířata a člověka.



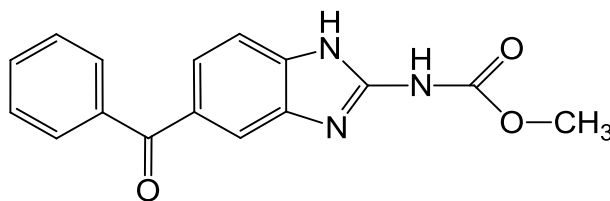
Obr.2 Struktura thiabendazolu

I. Farmakodynamika

Thiabendazol inhibuje mitochondriální enzym fumarát reduktázu, který je pro helminty specifický. Hlísti pak nemůžou přijímat glukózu. Látka se rychle absorbuje ze střeva a je vylučována močí.¹⁾

Thiabendazol je chelatační činidlo, proto se v medicíně používá jako antidotum při otravách těžkými kovy (olovo, rtuť, antimon). Ve veterinární farmacii se užívá k léčbě ušních infekcí u koček a psů. Není schválený pro použití v EU, Austrálii, Novém Zélandu nebo USA.

2.3.3 Mebendazol



Obr.3 Struktura mebendazolu

Mebendazol (Obr.3) se používá při onemocnění roupy, oblými a plochými červy a měchovci.

Má vysokou účinnost a široké anthelmintické spektrum účinku indikované pro léčbu napadení nematody, včetně škrkavky a měchovce. Špatně se vstřebává a nemá systémové účinky.

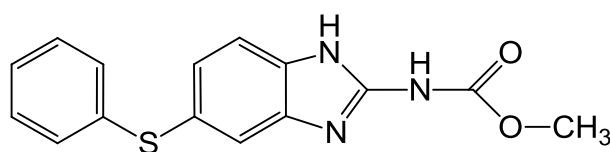
I. Mechanismus účinku:

Selektivní inhibice syntézy mikrotubulů v parazitech a zničení cytoplazmatického mikrotubulu v jeho zažívacím traktu. Je blokován příjem glukózy a jiných živin, což vede k imobilizaci a smrti helminta.¹⁾

2.3.4 Fenbendazol

Fenbendazol má široké spektrum účinků proti gastrointestinálním parazitům jako jsou škrkavky, měchovci, tasemnice, roupy a strongyloidy. Fenbendazol (Obr.4) se podává ovčím, skotu, koním, rybám, psům, kočkám, králíkům a tuleňům. Interakce fenbendazolu s bromsalanem mohou vést k potratům u skotu a ovcí.²⁾

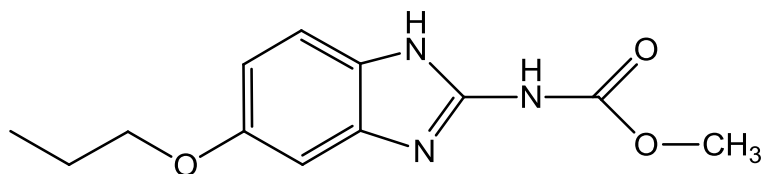
Navzdory širokému použití při likvidaci mnoha druhů červů byla zjištěna toxicita. U ptáků (čápi, pelikáni, supi, holubi) a plazů (zmije, želvy) se toxicita projevuje útlumem kostní dřeně, nekrózou buněk střevních krypt a opadáváním distálních klků. Fenbendazol se u většiny druhů zvířat špatně vstřebává z gastrointestinálního traktu. LD₅₀ u laboratorních zvířat přesahuje 10 g/kg při orálním podání.²⁾



Obr.4 Struktura fenbendazolu

2.3.5 Oxibendazol

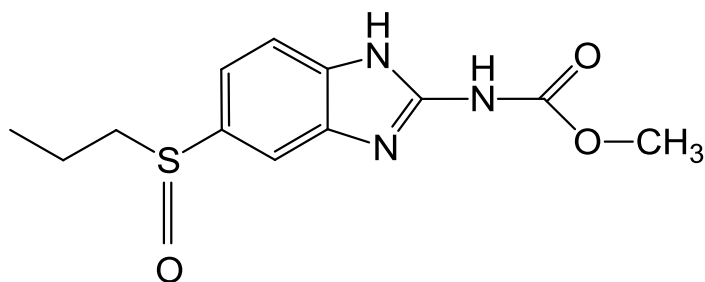
Derivát benzimidazolu, který byl použit jako vnitřní standard (Obr.5).



Obr.5 Struktura oxibendazolu

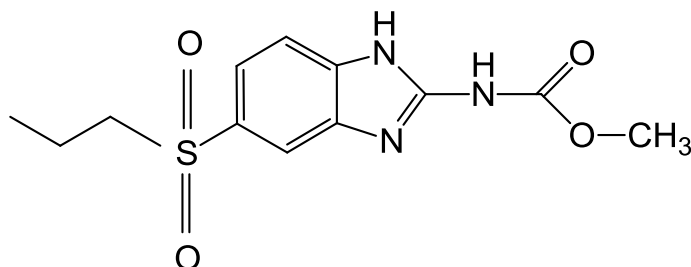
2.4 Metabolity albedazolu použité při studiu vlastností kolony

A) Albendazol sulfoxid (Obr.6)



Obr.6 Struktura albedazol sulfoxidu

B) Albendazol sulfon (Obr.7)



Obr.7 Struktura albedazol sulfonu

2.5 Chromatografie

Chromatografie je souhrnný termín označující laboratorní techniku rozdělování směsí. Směsi jsou rozdělovány mezi kapalnou nebo plynnou fází zvanou „mobilní fáze“, která unáší částice skrze strukturu z pevného materiálu zvanou „stacionární fáze“. Rozdělování směsí je způsobeno tím, že různé prvky směsí jsou unášeny různými rychlostmi. Rozdělování je založeno na různé afinitě částic k jednotlivým fázím. Jemné diference ve sloučeninách způsobí rozdílné zadržování na stacionární fázi a tudíž změnu retence.³⁾

2.5.1 Rozdělení chromatografie

Chromatografie může být preparativní nebo analytická. Cílem preparativní chromatografie je separovat složky směsi pro následné využití. Množství vzorku v tomto případě bývá podstatně větší, než u analytické chromatografie. Liší se i způsobem purifikace. Analytická chromatografie se obvykle praktikuje s menším množstvím vzorku a je určena pro měření relativních poměrů analytů ve směsi. Tyto dva způsoby se vzájemně nevylučují. ³⁾

2.5.2 Druhy chromatografie

- 1) *Podle uspořádání:*
 - a) Kolonová
 - b) Planární
 - papírová
 - tenkovrstevná
- 2) *Podle druhu mobilní fáze:*
 - a) plynová
 - b) kapalinová
- 3) *Podle afinity:*
 - a) Superkritická fluidní
 - b) Podle mechanismu separace:
 - c) Iontově výměnná
 - d) Separace podle velikosti částic
- 4) *Speciální techniky:*
 - a) Chromatografie s reverzní fází
 - b) Dvojrozměrná chromatografie
 - c) Kontinuální se simulovaným pohybem pevné fáze
 - d) Pyrolýzová plynová chromatografie
 - e) Kapalinová pro separaci proteinů
 - f) Protiproudová chromatografie
 - g) Chirální chromatografie

2.5.3 High-performance liquid chromatography

HPLC (high-performance liquid chromatography) vysoce účinná kapalinová chromatografie je chromatografickou technikou používanou k separaci sloučenin za účelem

identifikace, zjištění kvantity a čistoty jednotlivých složek směsi. Retenční čas je doba, za kterou každá jednotlivá sloučenina opustí kolonu. Retenční čas naměřený za standardních podmínek je považován za identifikační charakteristiku daného analytu.

Některé HPLC techniky pracují s bezvodou mobilní fází. Vodné složky mobilní fáze mohou obsahovat pufr, kyseliny (mravenčí, fosforečnou nebo trifluoroctovou) nebo pomocné soli k separaci složek vzorku. Složení mobilní fáze může zůstat po dobu analýzy konstantní (izokratická eluce) nebo se mění (gradientová eluce). Izokratická eluce je účinná u vzorků, jejichž afinita k pevné fázi není příliš rozdílná.

U gradientové eluce je složení mobilní fáze proměnné, tj. od nízké po vysokou eluční sílu. Krátký retenční čas analytu je způsoben vysokou eluční silou mobilní fáze. Gradientová eluce snižuje retenční čas později eluovaných sloučenin tak, že se eluují dříve a mají užší a vyšší píky. Zlepšuje se též tvar píků z hlediska chvostování.³⁾ Typický gradientní profil reverzní fáze může začínat na 5% acetonitrilu (ve vodě nebo pufru) a postupovat lineárně do 95% acetonitrilu během 5-25 minut. Například může být složení mobilní fáze konstantní (5% acetonitrilu) po 1-3 minuty, pak následuje lineární změna na více než 95% acetonitrilu. Složení mobilní fáze závisí na intenzitě interakcí mezi analytem a stacionární fází (například hydrofobní interakce u HPLC na reverzních fázích). Separační proces na koloně je umožněn rozdílnou afinitou jednotlivých sloučenin ke stacionární a k mobilní fázi. Tento rozdělovací proces je podobný extrakci kapalina-kapalina, je ale kontinuální, ne stupňovitý. Příkladem může být použití směsi voda/acetonitril na stacionární fázi C18, kde hydrofóbnější komponenty se budou eluovat (odejdou z kolony) později, neboť jsou více zadržovány stacionární fází.

Složení mobilní fáze volíme podle vlastností zkoumaných vzorků a přidaných solí nebo kyselin. Separace vzorků je závislá na přirozených vlastnostech kolony.

K nalezení optimální metody HPLC separace se často analyzují celé série vzorků.

2.5.4 Detekce používané v chromatografii:

Rozdělení detektorů:

Nedestrukční x destrukční

Koncentrační x hmotnostní

Destrukční detektor mění charakter procházející látky, na rozdíl od nedestrukčního detektoru, který zachovává původní strukturu analytu.

Koncentrační detektory reagují na změny hmotnostní koncentrace složky v efluentu nezávisle na přívodu složky do efluentu. Hmotnostní detektory zaznamenávají změnu hmotnostního toku v efluentu.

2.5.5 Typy detektorů

Detektor UV/VIS

Fluorescenční detektor

Elektrochemický detektor

Vodivostní detektor

Detektor ELSD

Detektor CORONA

Na detektor jsou kladeny určité ideální požadavky:

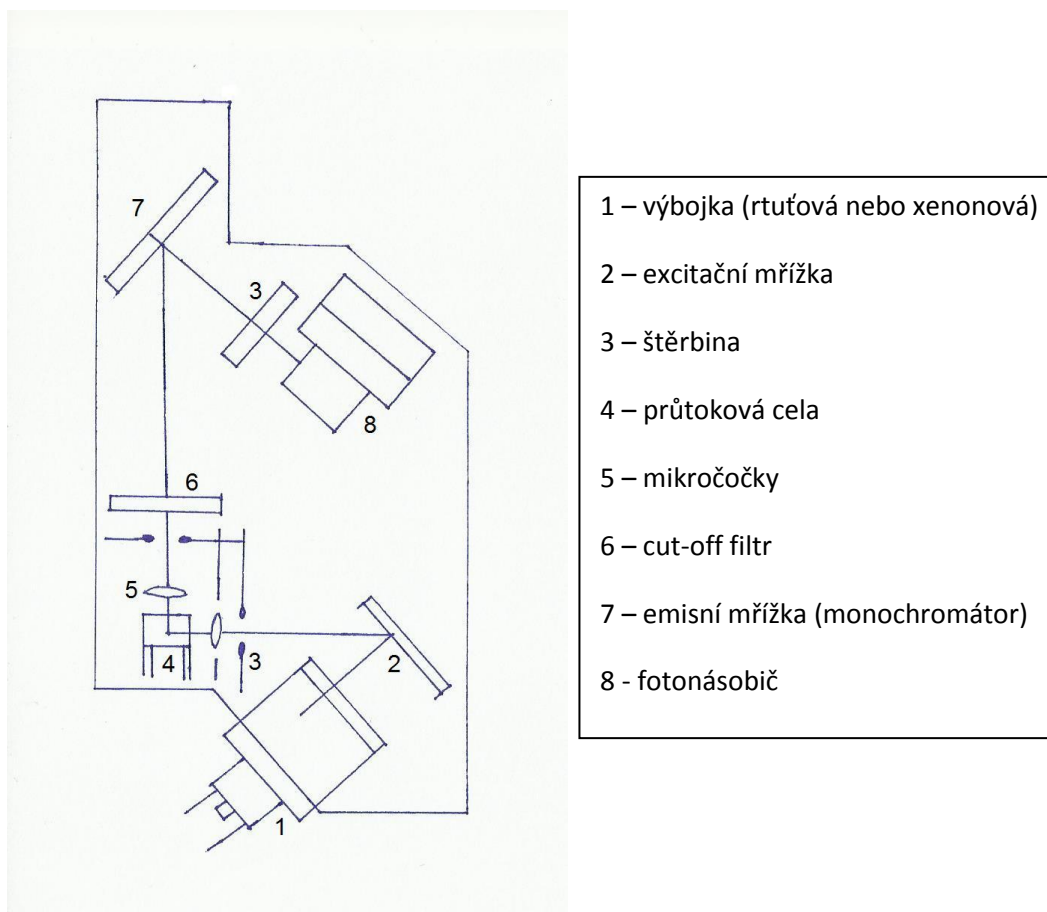
- Univerzálnost (detekce všech přítomných komponent)
- Okamžitá odezva, lineární v co nejširším koncentračním rozmezí
- Vysoká citlivost a nízká úroveň šumu
- Robustní vůči změnám tlaku, průtoku mobilní fáze a teploty
- Co nejmenší mimokolonový příspěvek k rozšiřování elučních zón
- Možnost gradientové eluce

Těmto požadavkům žádný detektor úplně nevyhovuje, různé typy se požadavkům víceméně přibližují.

2.5.6 Fluorescenční detektor

Definice fluorescence:

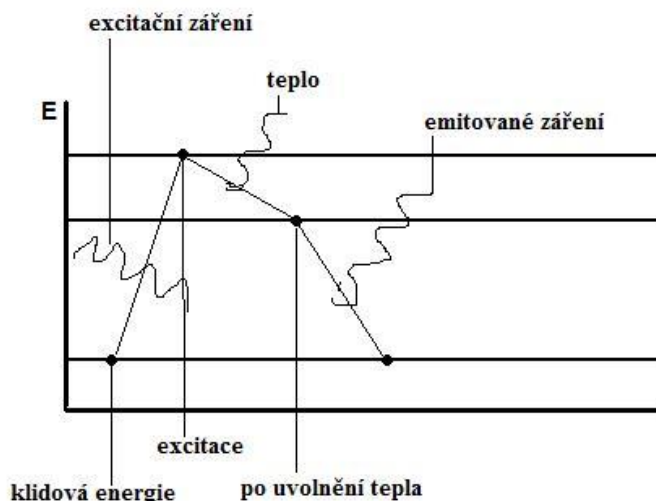
„Nastane-li emise záření z excitovaného singletového elektronového stavu jedním či více spontánními energetickými přechody jedná se o fluorescenci. Fluorescenci pozorujeme během buzení a po jeho vypnutí prakticky ihned mizí (doba dohasínání je obvykle řádově 10⁻⁸ s)³⁾



- 1 – výbojka (rtuťová nebo xenonová)
- 2 – excitační mřížka
- 3 – štěrbina
- 4 – průtoková cela
- 5 – mikročočky
- 6 – cut-off filtr
- 7 – emisní mřížka (monochromátor)
- 8 - fotonásobič

Obr.8 Zjednodušené schéma fluorescenčního detektoru

„Fluorescenční detektor (Obr.8) je založen na principu fluorescence a měření emisního záření, které vydá látka po absorpci excitačního elektromagnetického záření. Absorpcí elektromagnetického záření přechází molekuly látek ze základního elektronového stavu do různých vibračních hladin excitovaného singletového elektronového stavu.“⁴⁾ Absorbovanou energii může excitovaná molekula opět vyzářit jako fluorescenci, nebo ji přeměnit na energii vibrační. Molekula se může naabsorbované energie zbavit přechodem do základního stavu a následnou emisí fluorescenčního záření, které má stejnou nebo větší vlnovou délku jako absorbované záření (Obr.9).³⁾



Obr.9 Schéma energetických hladin při excitaci a emisi

Intenzivní fluorescenci vykazují některé aromatické sloučeniny jako heterocykly a polyaromáty.

Sloučeniny pohlcují světlo s jednou vlnovou délkou a po prostoupení látkou se vlnová délka mění. Pro tento fenomén je charakteristické, že látky absorbují světlo o nižší vlnové délce a emitují světlo s větší vlnovou délkou. Sloučeniny mají specifickou vlnovou délku absorpce a emise. Na Obr.10 je optický systém fluorescenčního detektoru. Ačkoliv UV/VIS detektor detekuje světlo procházející průtokovou celou se vzorkem, zatímco fluorescenční detektor detekuje emitovanou fluorescenci v přímém směru.

Detekce fluorescenčním detektorem je vhodná pro analýzu stopového množství vzorku. Obecně vzato má vysokou citlivost i selektivitu. Aminokyseliny mohou být tímto detektorem zjištěny až po derivatizaci. Touto metodou je možno měřit různé deriváty s vysokou citlivostí.³⁾

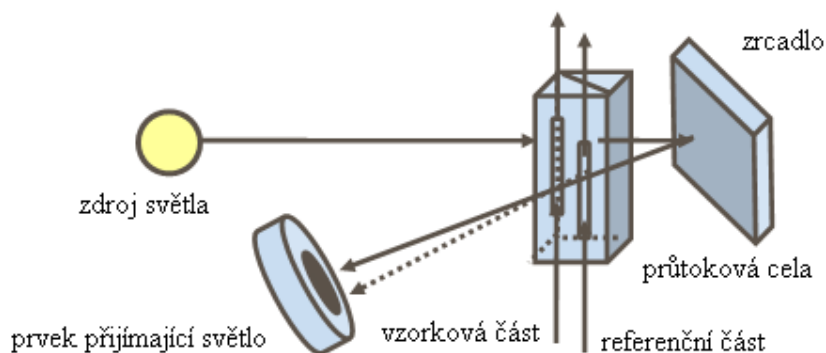
2.5.7 Detektor UV-VIS

Spektrofotometrické detektory jsou založeny na principu absorpce záření v oblasti vlnových délek od 190 do 800 nm. Měří se absorbance A , která je dána vztahem

$$A = \varepsilon \cdot c \cdot l$$

kde l je tloušťka absorbující vrstvy (cm), ε je molární absorpční koeficient (l/mol/cm) a c je koncentrace absorbující složky (mol/l).

UV/VIS detektory monitorují absorpci světla světla látkou při specifických vlnových délkách.³⁾



Obr.10 Schéma UV/VIS detektoru

2.6 Kolony pro kapalinovou chromatografii

2.6.1 Typy kolon

A) Monolitické kolony: Jejich náplň je tvořena jediným kusem pórovitého materiálu. Nachází se v nich velké póry (makropóry 2 μm) a středně velké póry (mesopóry 13 nm). Oproti částicovým kolonám se může použít mnohem větší průtok (až 10 ml/min) bez nebezpečí kritického zvýšení pracovního tlaku.

B) Částicové kolony: Skládají se z částic o velikosti 3–5 μm . Malé částice se používají z důvodu zvětšení počtu „teoretických pater“⁽⁵⁾ a tedy lepší separace při stejné délce kolony. Průtok těmito kolonami je omezený, neboť malé částice způsobují vysoký zpětný tlak, který by mohl poškodit vysokotlaké součásti chromatografu. Částice mohou být buď plně porézní, nebo s pevným jádrem a porézní vrstvou na povrchu.

C) Kolony s pevným jádrem: Kompromisem mezi malými částicemi s vysokou separační schopností a velkými částicemi s potřebou nižšího tlaku se staly částice „fused core“ (neporézní silikonové jádro s vrstvou slinutých nanočástic na povrchu).⁵⁾ Jádro má průměr 1,9 μm a je na něm 0,35 μm vrstva silikonových nanočástic. Vzdálenost, která musí být překonána v částici stacionární fáze difúzí, nikdy není delší než 0,5 μm . Pokles nebezpečně vysokého pracovního tlaku lze zajistit snížením viskozity mobilní fáze (například zvýšit teplotu - se zvyšující se teplotou viskozita klesá).³⁾

2.6.2 Kolona Kinetex PFP 100 mm x 4.60 mm; 2,6 µm

Tyto kolony mají pevné jádro typu core-shell (povrchová porézní vrstva s pevným jádrem) ze silikagelu a velmi vysokou účinnost. Přípustný pracovní tlak je u těchto kolon do 600 bar.

Technická data této kolony jsou uvedena v Tab.3.

Číslo:	00D-4477-E0
Popis:	Kinetex™ 2.6 µm PFP 100 Å LC kolona 100 x 4.6 mm
Stacionární fáze:	Pentafluorfenyl vázaný přes propylový můstek na silikagelový nosič, jehož povrch je chráněn TMS
Typ částice:	Core-shell Silica
Format:	kolona
Způsob separace:	reverzní fáze
Doporučené použití:	vysoceúčinná kapalinová chromatografie aromatických a halogenových sloučenin
USP název (označení):	L43

Tab.3 Technická data kolony Kinetex PFP

2.6.3 Technologie fused-core

Tato technologie se vyznačuje úzkým spektrem velikostí částic tvořící náplň kolony. Sypaná část kolony je mnohem kompaktnější, mezery mezi částicemi jsou menší a umožňují snadnější prostupnost pro mobilní fázi. Díky pevnému jádru částic a jejich poréznímu povrchu se zkracují retenční časy, výsledné píky jsou vyšší a užší. Toto uspořádání též umožňuje použít vyšších průtoků mobilní fáze, než u kolon s více diferencovanými velikostmi částic.⁸⁾¹³⁾

2.6.4 Kinetika přenosu sloučenin v chromatografické koloně s pelikulárními částicemi

Po téměř dvaceti letech stagnace zaznamenala technologie chromatografických kolon v průběhu několika posledních let podstatný vývoj. Motorem tohoto vývoje je zvyšující se poptávka po rychlejších a účinnějších analýzách vyplývající z prudkého růstu počtu vzorků k analýze a jejich složitosti.⁹⁾ Tento vývoj probíhá ve třech hlavních směrech:

A) Monolitické kolony dnes budí vyšší zájem pro jednoduchost analýzy. Stejně jako vrstvy náplňových částic, mají monolitické kolony bimodální rozdělení velikostí pórů. Velké póry jsou lépe přístupné průniku mobilní fáze. Vzhledem k tomu, že monolity jsou přirozeně

mechanicky stabilní, mohou mít větší vnější pórovitost než kolony s vrstvami. Proto mají vyšší propustnost pro mobilní fázi, než kolony plněné částicemi, které mají stejnou velikost jako prvky skeletu těchto monolitických kolon. Ukazuje se, že kinetika přenosu hmoty analytů monolitickými kolonami je rychlejší než náplňovými kolonami srovnatelné geometrie a podobné velikosti domén. Bohužel, v současné době jsou k dispozici jen krátké monolitické kolony s omezenou účinností.

B) Dnes jsou k dispozici i kolony s menšími částicemi, než konvenční, s průměry mezi 1 a 3 mikrometry. Tyto kolony se používají při vyšším průtoku mobilní fáze, takže pokud nejsou použity krátké kolony, vznikají extrémně vysoké tlaky, což způsobuje závažné potíže.

C) Kolony mohou být provozovány při vyšších teplotách, než laboratorních. Jejich účinnost je tak těžko ovlivněna, ale rychlost mobilní fáze může být zvýšena proporcionálně k poklesu její viskozity. Nový typ částic (pelikulární částice, core-shell částice) mohou chromatografisté obdivovat již téměř 40 let. Tyto částice se skládají z pevného jádra obklopeného porézní vrstvou, která má v podstatě vlastnosti zcela porézních částic. Částice s obalem (core-shell) mají silnou porézní vrstvu, pelikulární mají tenkou vrstvu, avšak jsou teoreticky možné všechny mezistupně. Předpokládá se, že axiální a vířivé disperze přispěly k vyšší účinnosti kolon plněných těmito částicemi, odpovídají vnějšímu průměru částic, ale vnitřní odpor proti přenosu hmoty odpovídá mocnosti porézní vrstvy. Bylo vyrobeno několik generací částic s pevným jádrem, na nichž je pórovitý obal.

Náplně Corasil I a II (Waters, Milford, MA) byly vyrobeny z pevných částic silikagelu, které mají v průměru 40 μm .¹¹⁾ Jejich porézní vrstva z oxidu křemičitého je 5 μm silná. Zipax (Hewlett-Packard, Palo Alto, CA) byl vyroben z tuhé částice oxidu křemičitého o průměru 37 - 44 μm s porézní vrstvou iontově-výměnných pryskyřic. Tyto materiály nebyly příliš úspěšné zejména proto, že menší porézní částice se staly dostupnějšími. Výše uvedené částice Corasil a Zipax jsou již zastaralé, zmiňuji je zde především z historických důvodů.

Porashell částice (Agilent Technologies) mají průměr 5 μm . Jsou šířeji použitelné, zvláště pro separaci peptidů, bílkovin a dalších vysokomolekulárních analytů.¹²⁾ Firma Carr a spol. nedávno ukázala, že kolony plněné těmito částicemi mají mnohem lepší účinnost u peptidů, než u látek s nízkou molekulovou hmotností (méně než 200). Pravděpodobně je difúze peptidů do pórů mnohem pomalejší, než u nízkomolekulárních sloučenin. Horvath připravil pelikulární částice, 1 μm mikrometr v průměru, s tenkou vrstvou iontově-výměnné pryskyřice. V poslední době představil Kirkland Halo⁸⁾, nový materiál vyrobený ze

sférických částic s velmi úzkými rozmezími velikosti částic. Mají 2,7 μm v průměru a jsou pokryty 0,5 μm silnou vrstvou z porézního oxidu křemičitého. ⁶⁾

3. Experimentální část

3.1 Použitý materiál

3.1.1 Chemikálie

Acetonitril for gradient elution (Aldrich)

Methanol for gradient elution (Aldrich)

Kyselina fosforečná 85% p. a. (Lachema Brno)

Kyselina octová 99% p. a. (Lach-Ner, s. r. o.)

Hydrogenfosforečnan sodný dodekahydrát (Lach-Ner, s. r. o.)

Hydrogenfosforečnan didraselný (Lach-Ner, s.r.o.)

Ultračistá voda čištěná reverzní osmózou

Standardní pufr pro kalibraci pH metru (WTW)

3.1.2 Pomůcky a přístroje

Analytické váhy (Sartorius)

pH-metr inoLab 720 s pH elektrodou Sentix 61 (WTW)

Membránová vývěva KNF, typ N810 (KNF Neuberger)

Filtrační zařízení (Supelco) s membránovými filtry Nylon 66 (Supelco) o průměru 47 mm s póry 0,45 μm

Kapalinový chromatograf (Shimadzu): degasér DGU A5, vysokotlaká pumpa LC-10ADvp, autosampler SIL-10ADvp, kolonový termostat CTO-10Avp, PDA detektor SPD-M10Avp, fluorescenční detektor RF-10AXL. Chromatograf byl řízen prostřednictvím řídicí jednotky SCL-10Avp z počítače pomocí chromatografického software CLASS-VP.

3.2 Příprava zásobních roztoků

V této části je uveden postup přípravy jednotlivých složek mobilních fází pro HPLC.

A) Příprava fosforečnanového pufru o pH 7,0 a koncentraci 0,025 M

Na analytických vahách jsem navážil potřebné množství (8,961 0 g) dodekahydrátu hydrogenfosforečnanu sodného a rozpustil v kádince v ultračisté vodě. Směs jsem přelil do větší kádinky s míchadlem a doplnil ultračistou vodou na cca 950 ml. Zapnul jsem pH metr a zkalibroval ho pomocí standardů pH. Potom jsem elektrodu ponořil do roztoku hydrogenfosforečnanu sodného. Za stálého míchání jsem do kádinky jsem pomocí pipety přidával koncentrovanou kyselinu fosforečnou tak dlouho, až pH metr ukazoval hodnotu 7,00.

Poté jsem vypnul míchadlo, přelil roztok do odměrné baňky (1 000 ml) a doplnil ultračistou vodou po rysku. Roztok v baňce jsem důkladně promísil.

Následně jsem roztok pufru pomalu přefiltroval přes membránové filtry Nylon za sníženého tlaku.

B) Příprava kyseliny octové o koncentraci 0,01 M

Pomocí automatické pipety jsem napipetoval vypočtené množství (0,575 ml) do odměrné baňky (1 000 ml) a nalil asi 800 ml ultračisté vody. Roztok jsem důkladně promíchal, doplnil ultračistou vodou po rysku a znovu promíchal.

3.3 Přehled elučních činidel

Kolona Kinetex PFP 100 mm x 4,6 mm; 2,6 μ m

1) Eluční činidlo 1 použité pro testování kolony

Roztok činidla byl připraven smísením ACN a AcAcet v poměru 20:80 (v/v) ve směšovači.

2) Eluční činidlo 2 použité pro testování kolony

Roztok činidla byl připraven smísením ACN a AcAcet v poměru 40:60 (v/v) ve směšovači.

3) Eluční činidlo 3 použité pro testování kolony

Roztok činidla byl připraven smísením ACN a AcAcet v poměru 60:40 (v/v) ve směšovači.

4) Eluční činidlo 4 použité pro testování kolony

Roztok činidla byl připraven smísením ACN a AcAcet v poměru 80:20 (v/v) ve směšovači.

5) Eluční činidlo 5 použité pro testování kolony

Roztok činidla byl připraven smísením MetOH a AcAcet v poměru 20:80 (v/v) ve směšovači.

6) Eluční činidlo 6 použité pro testování kolony

Roztok činidla byl připraven smísením MetOH a AcAcet v poměru 40:60 (v/v) ve směšovači.

7) Eluční činidlo 7 použité pro testování kolony

Roztok činidla byl připraven smísením MetOH a AcAcet v poměru 60:40 (v/v) ve směšovači.

8) Eluční činidlo 8 použité pro testování kolony

Roztok činidla byl připraven smísením MetOH a AcAcet v poměru 80:20 (v/v) ve směšovači.

9) Eluční činidlo 9 použité pro testování kolony

Roztok činidla byl připraven smísením fosforečnanového pufru a ACN v poměru 20:80 (v/v) ve směšovači.

10) Eluční činidlo 10 použité pro testování kolony

Roztok činidla byl připraven smísením fosforečnanového pufru a ACN v poměru 40:60 (v/v) ve směšovači.

11) Eluční činidlo 11 použité pro testování kolony

Roztok činidla byl připraven smísením fosforečnanového pufru a ACN v poměru 60:40 (v/v) ve směšovači.

12) Eluční činidlo 12 použité pro testování kolony

Roztok činidla byl připraven smísením fosforečnanového pufru a ACN v poměru 80:20 (v/v) ve směšovači.

13) Eluční činidlo 13 použité pro testování kolony

Roztok činidla byl připraven smísením fosforečnanového pufru a MetOH v poměru 20:80 (v/v) ve směšovači.

14) Eluční činidlo 14 použité pro testování kolony

Roztok činidla byl připraven smísením fosforečnanového pufru a MetOH v poměru 40:60 (v/v) ve směšovači.

15) Eluční činidlo 15 použité pro testování kolony

Roztok činidla byl připraven smísením fosforečnanového pufru a MetOH v poměru 60:40 (v/v) ve směšovači.

16) Eluční činidlo 16 použité pro testování kolony

Roztok činidla byl připraven smísením fosforečnanového pufru a MetOH v poměru 80:20 (v/v) ve směšovači.

3.4 Příprava vzorků

Ke studiu fyzikálně chemických vlastností benzimidazolů jsem použil vzorky sloučenin albendazol (dále jen ABZ), oxibendazol (OXI), albendazol sulfoxid (ABZSO) a albendazol sulfon (ABZSO₂).

Připravil jsem je rozpuštěním příslušné navážky v minimálním nutném množství DMSO a doplněním ACN na potřebný objem v odměrné baňce.

4. Výsledky studie vlivu složení mobilní fáze na délku eluce jednotlivých benzimidazolů.

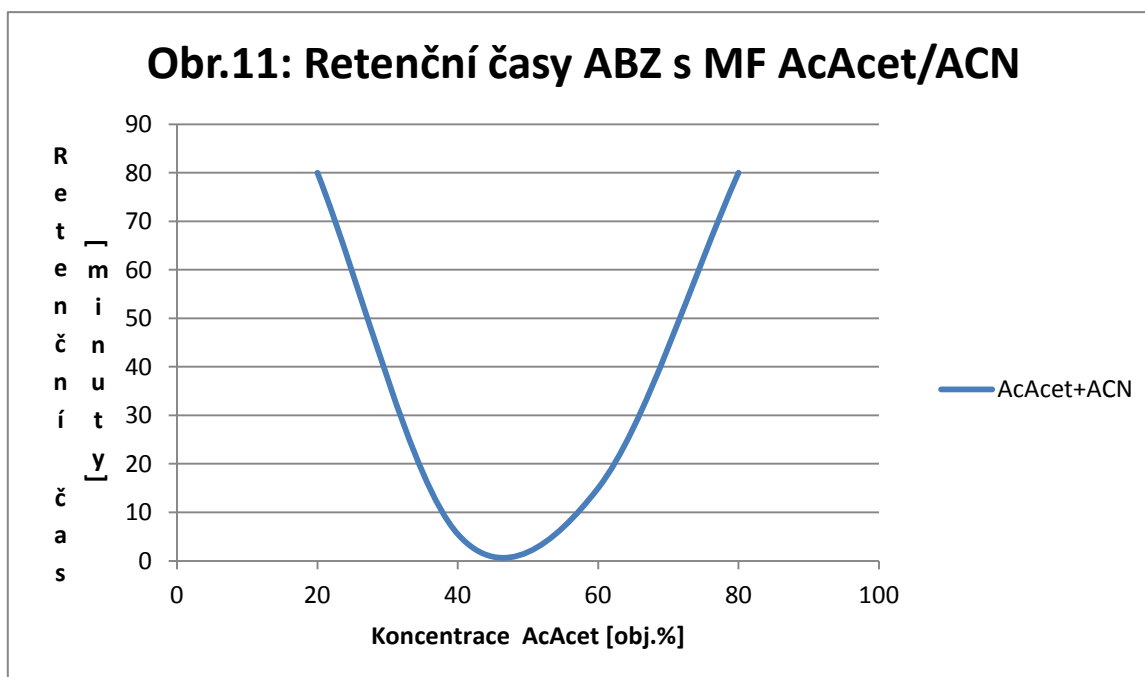
4.1 Výsledky studie ABZ

Naměřené retenční časy albendazolu (dále jen ABZ) pro různá složení mobilních fází jsou uvedeny v tabulce 4.

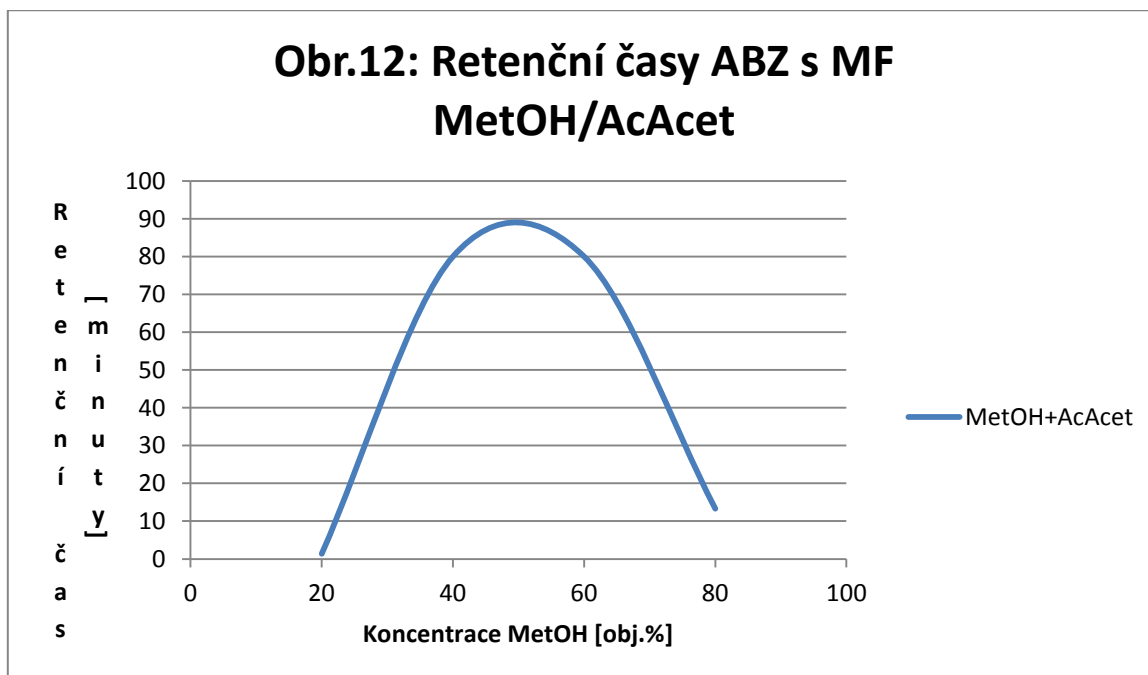
Poměry složek MF [obj.%]	20:80	40:60	60:40	80:20
ACN : AcAcet	>80	15,00	5,50	>80
MetOH : AcAcet	1,37	>80	>80	13,30
Pufr : ACN	1,28	3,78	3,75	1,32
Pufr : MetOH	2,32	7,45	>80	>80

Tab.4: Retenční časy (min.) ABZ ve studovaných mobilních fázích

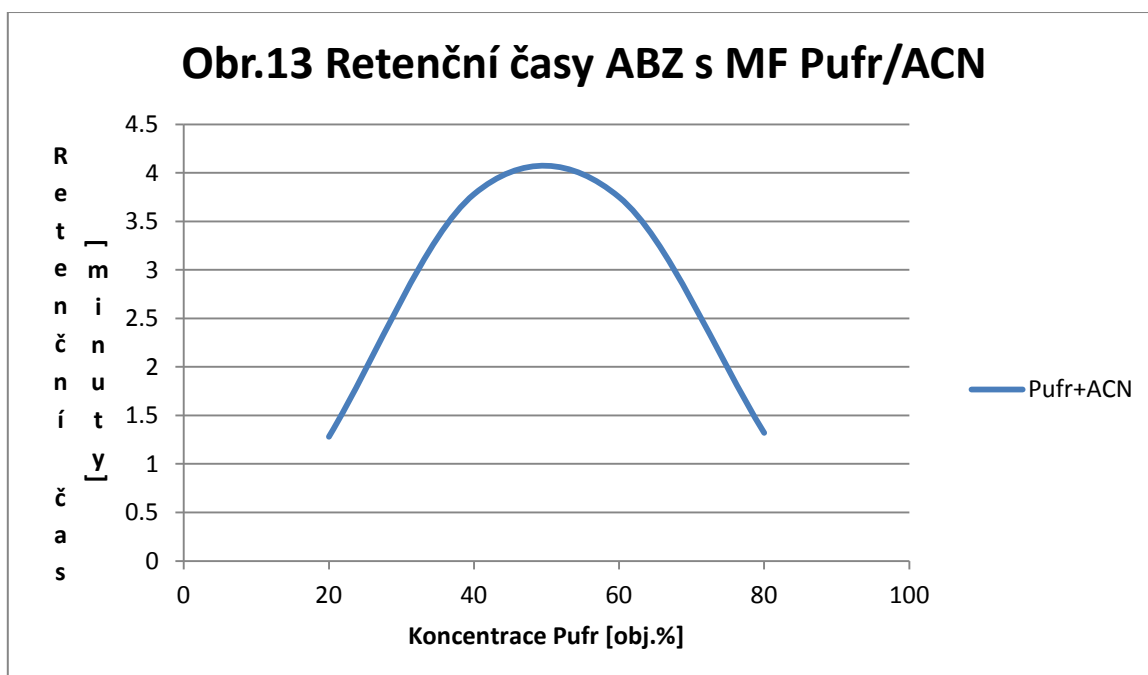
Na Obr.11 je vidět, že při nízkých nebo naopak vysokých koncentracích AcAcet jsou retenční časy velmi dlouhé. Při koncentracích AcAcet 20% a 80% dosahovaly retenční časy více jak 80 minut.



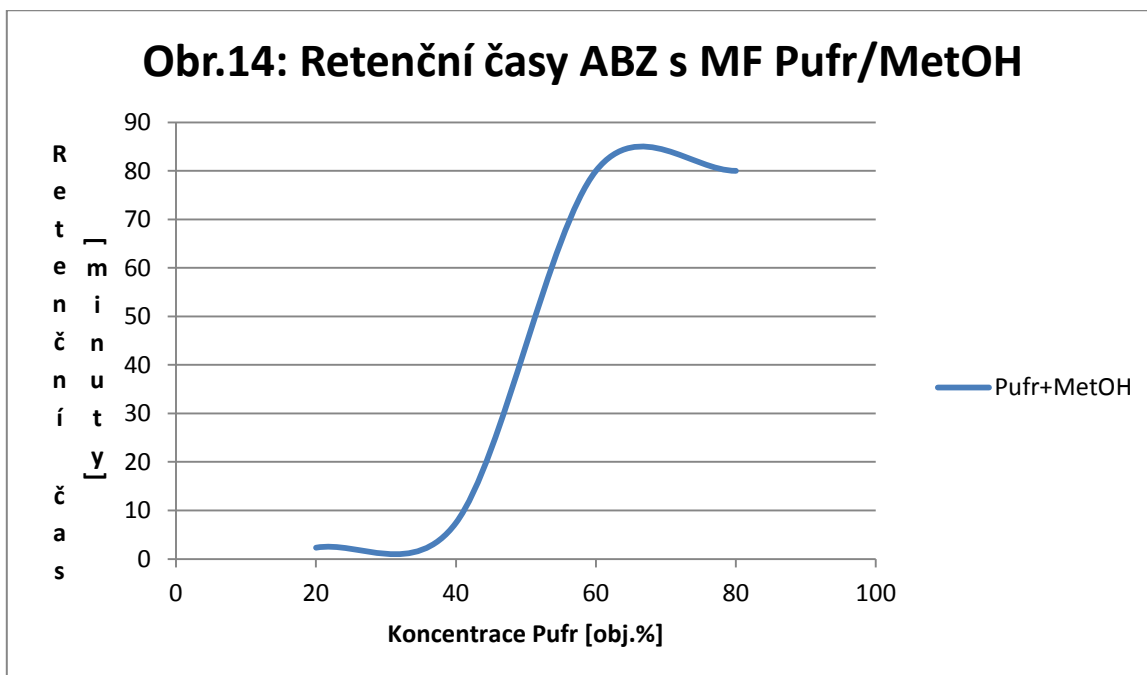
V grafu na Obr.12 jsou použitelné retenční časy při koncentraci 20% a 80% MetOH. Při koncentracích 40% a 60% byly retenční časy neúnosně dlouhé a tato složení MF jsou prakticky nepoužitelná. Použil jsem činidla 5-8.



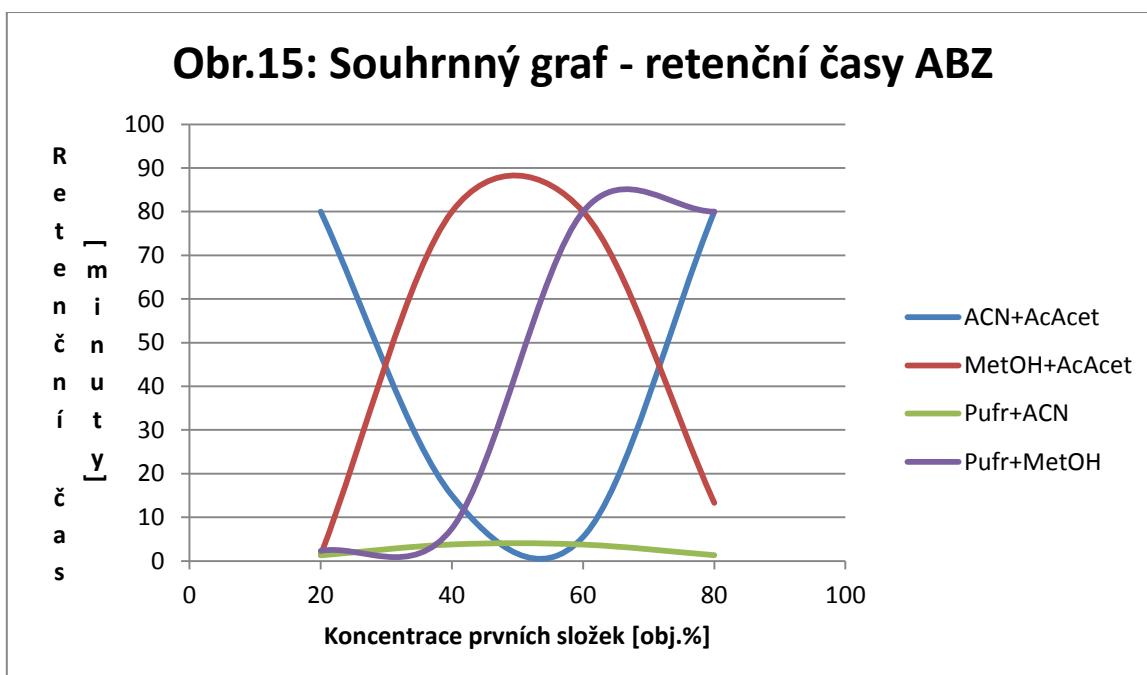
Při použití MF ve složení Pufř/ACN (Obr.13) vyšly všechny retenční časy pod 5 minut. Na grafu je vidět, že nejkratší retenční časy byly při koncentraci 20% resp. 80% Pufřu. Použil jsem MF Pufř/ACN ve čtyřech poměrech.



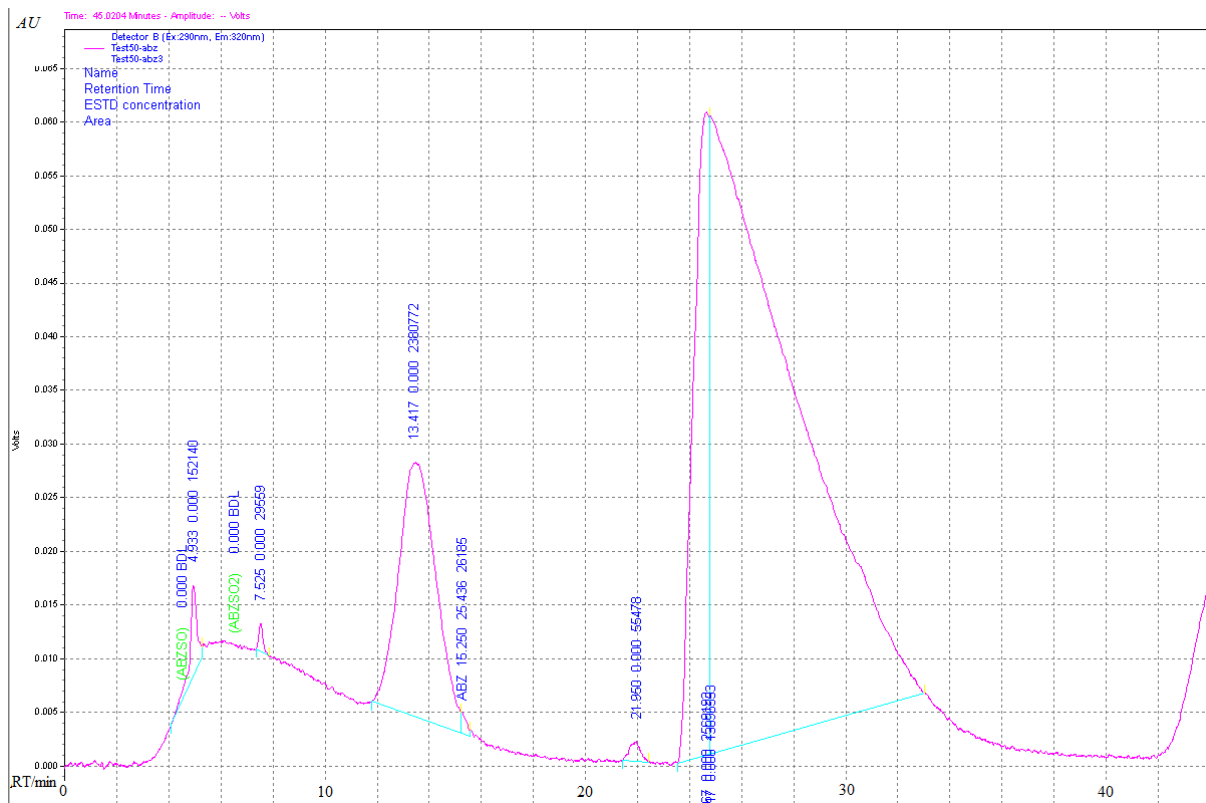
Na dalším grafu (Obr.14) jsou retenční časy albendazolu při použití mobilní fáze ve složení Pufř/MetOH. Při vysokých koncentracích pufřu (60% a 80%) byly retenční časy velmi dlouhé. Naopak při vysokých koncentracích MetOH se retenční časy držely pod 5 minut. Použil jsem činidla 13-16.



Dále je uveden souhrnný graf (Obr.15), kde na ose y jsou retenční časy ABZ a osu x tvoří koncentrace první složky mobilní fáze. Z něj je patrné, že nejkratší retenční čas byl při použití mobilní fáze Pufr/ACN v poměrech 20:80 a 80:20.

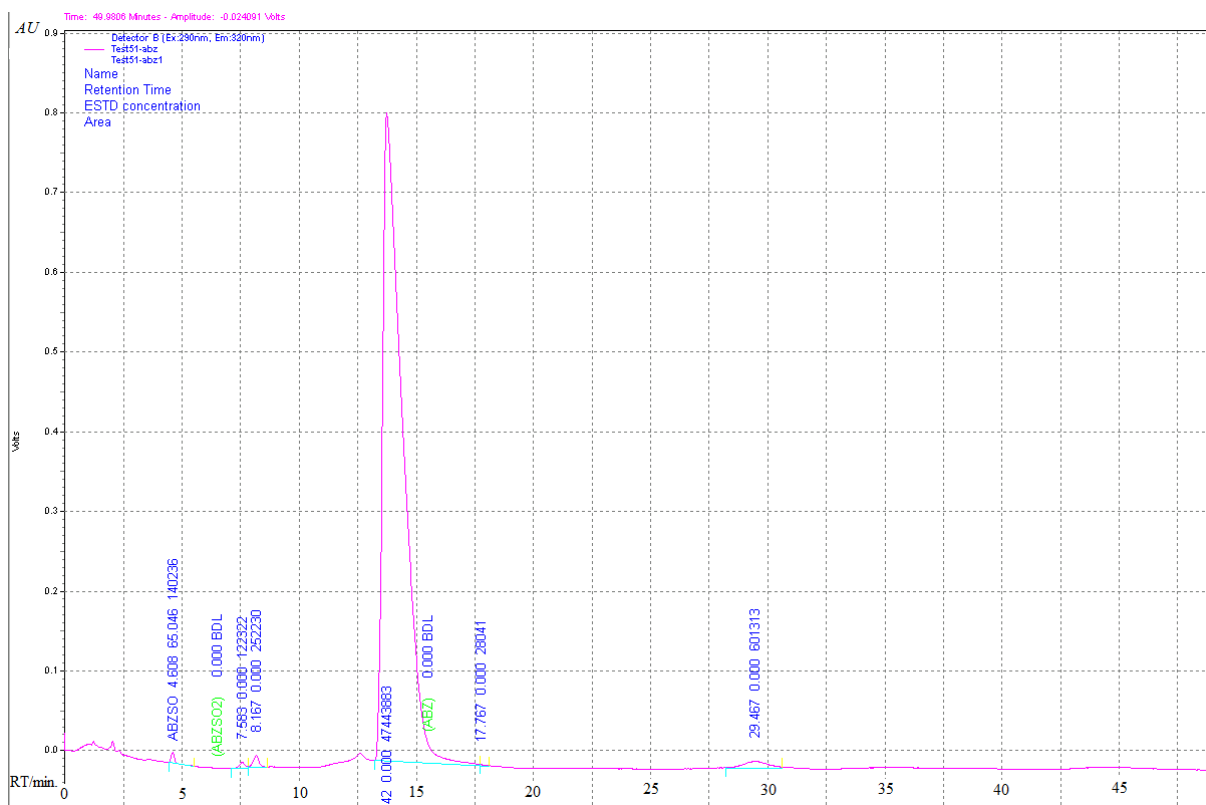


Na Obr.16 je chromatogram vzorku albendazolu. Mobilní fáze při tomto měření měla složení acetonitril a kyselina octová v poměru 20:80.



Obr.16 Chromatogram vzorku albendazolu s mobilní fází ACN/AcAcet 20:80

Na dalším chromatogramu (Obr.17) je vidět pík ABZ ve 14. minutě. Mobilní fáze při tomto měření byla ve složení ACN/AcAcet 60:40 %.



Obr.17 Chromatogram se vzorkem albendazolu - mobilní fáze ACN/AcAcet 60:40

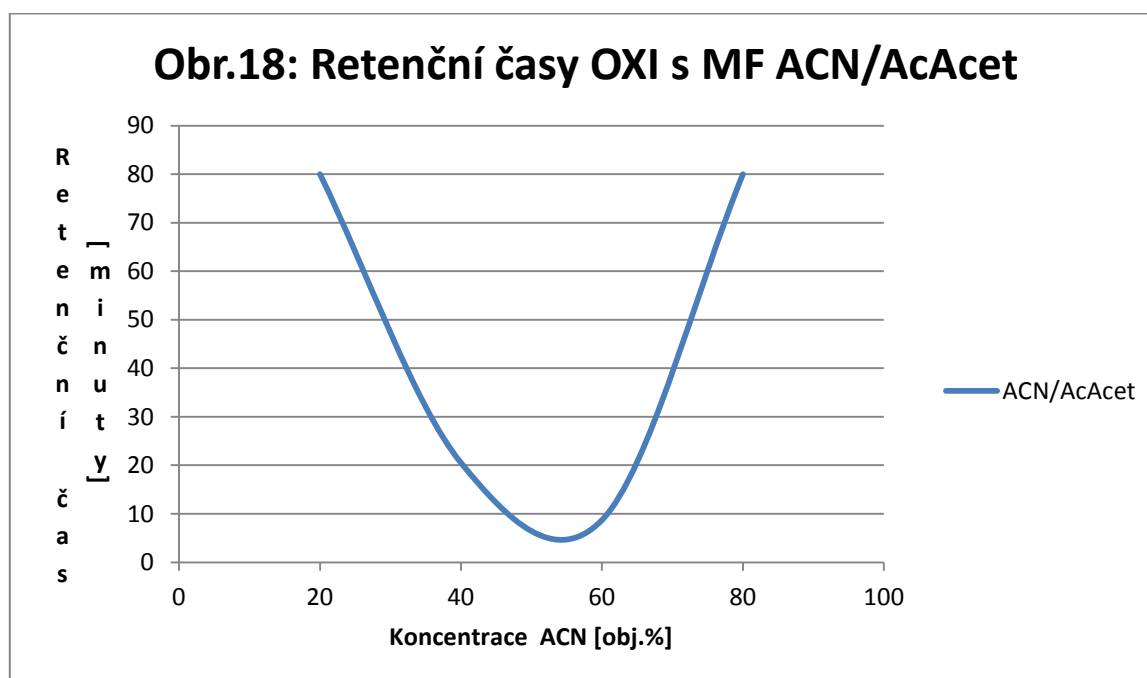
4.2 Výsledky studie OXI

Oxibendazol (dále jen OXI) byl navržen jako vnitřní standard. V tabulce 5 jsou uvedeny jeho retenční časy při jednotlivých poměrech složek mobilní fáze ACN, AcAcet, MetOH a Pufr.

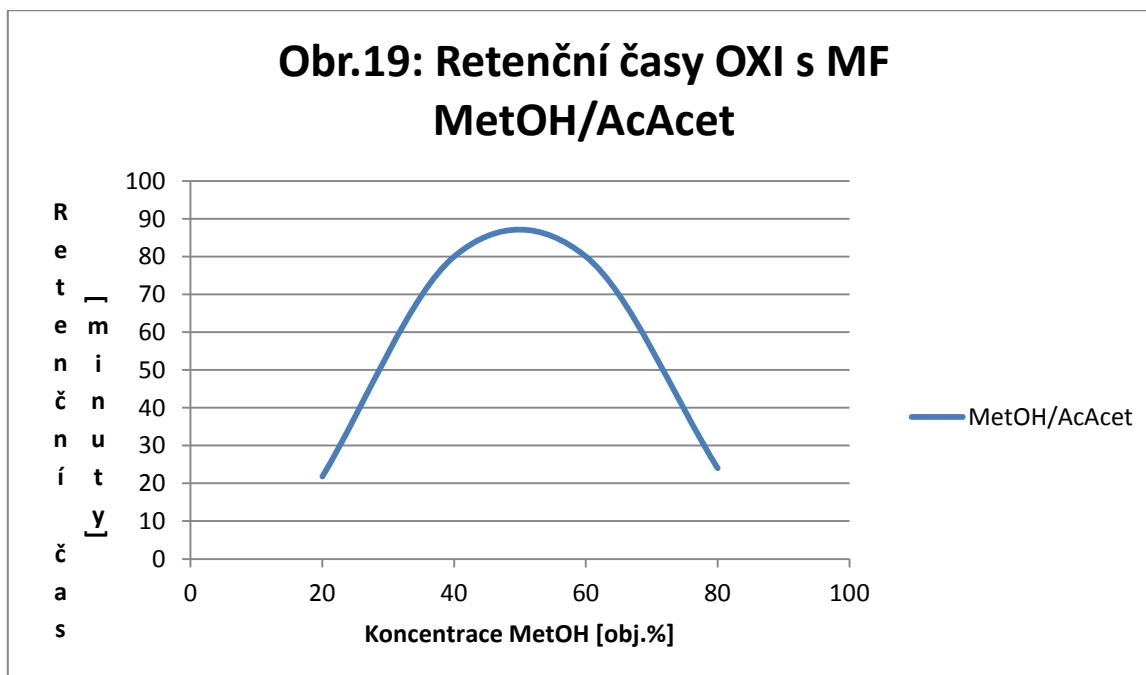
Poměry složek MF[obj. %]	20:80	40:60	60:40	80:20
ACN : AcAcet	>80	20,50	8,70	>80
MetOH : AcAcet	21,80	>80	>80	24,00
Pufr : ACN	18,00	2,83	2,68	19,00
Pufr : MetOH	2,39	4,47	>80	>80

Tab.5: Retenční časy (min.) OXI ve studovaných mobilních fázích

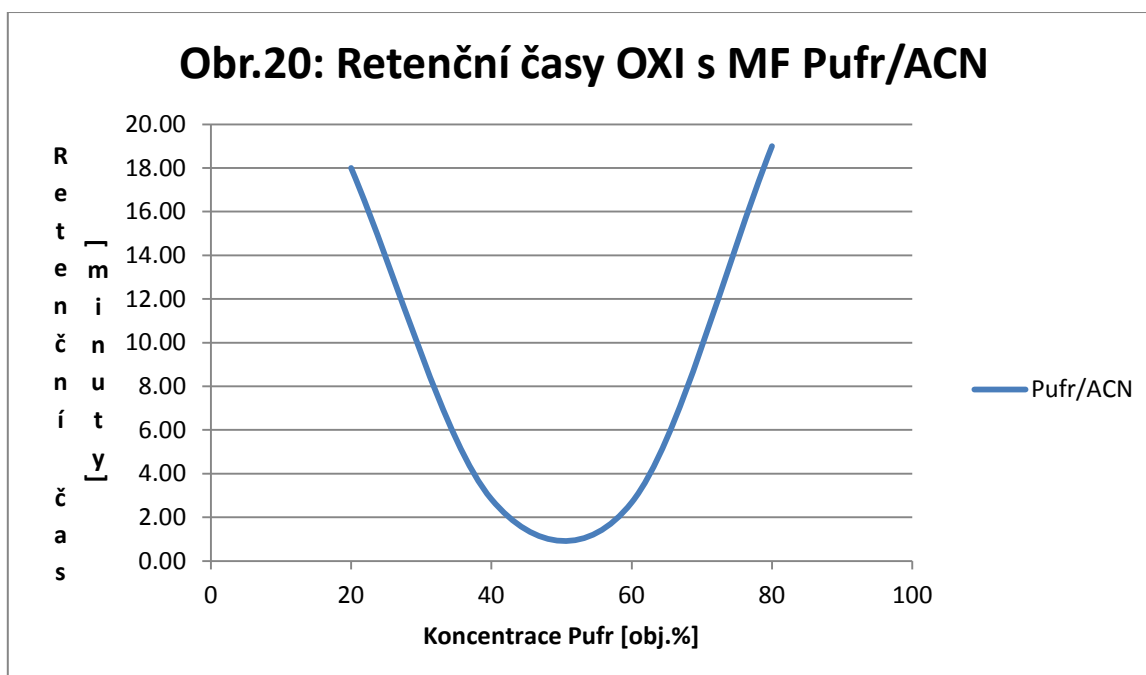
Retenční časy OXI jsou znázorněny na obr.18. Byla zde použita mobilní fáze ve složení ACN/AcAcet. Při poměrech MF 20:80 resp. 80:20 byly retenční časy látky velmi dlouhé. Může to být způsobeno vysokou afinitou k pentafluorfenylovým koncům, které jsou vázané na částice stacionární fáze.



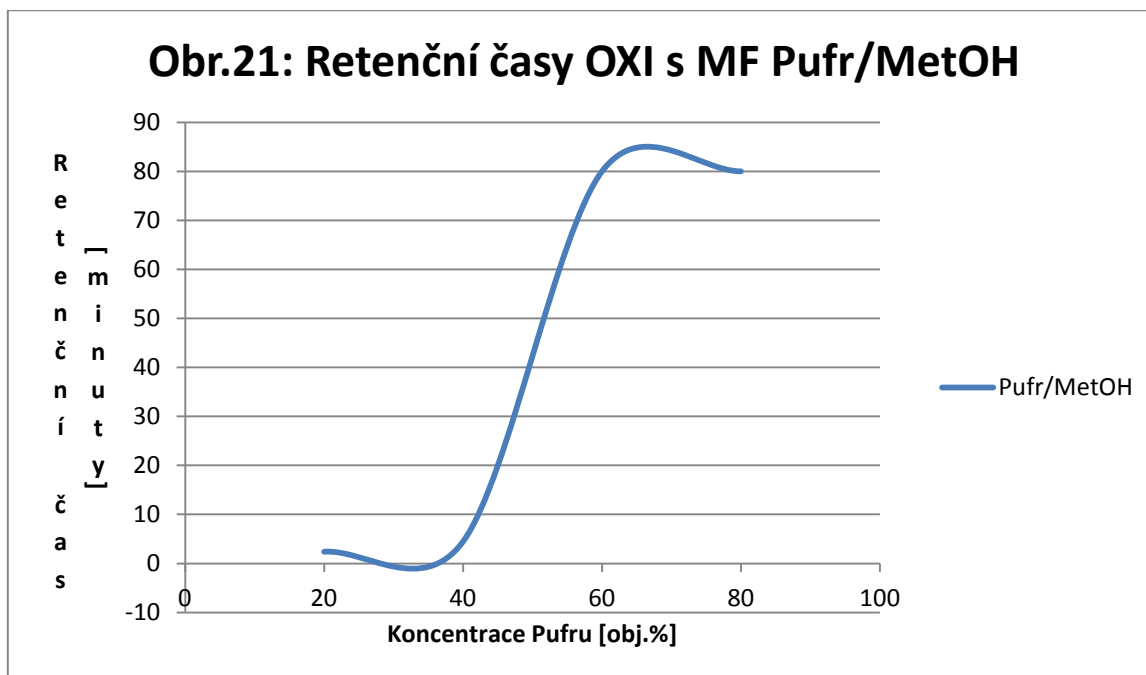
Na Obr.19 je studie OXI s MF ve složení MetOH/AcAcet. Při koncentracích MetOH 40% a 60% byly retenční časy OXI příliš dlouhé a tudíž je MF v tomto složení nepoužitelná. Z grafu je patrné, že prakticky použitelná koncentrace MetOH v mobilní fázi je 20 a 80 obj. %.



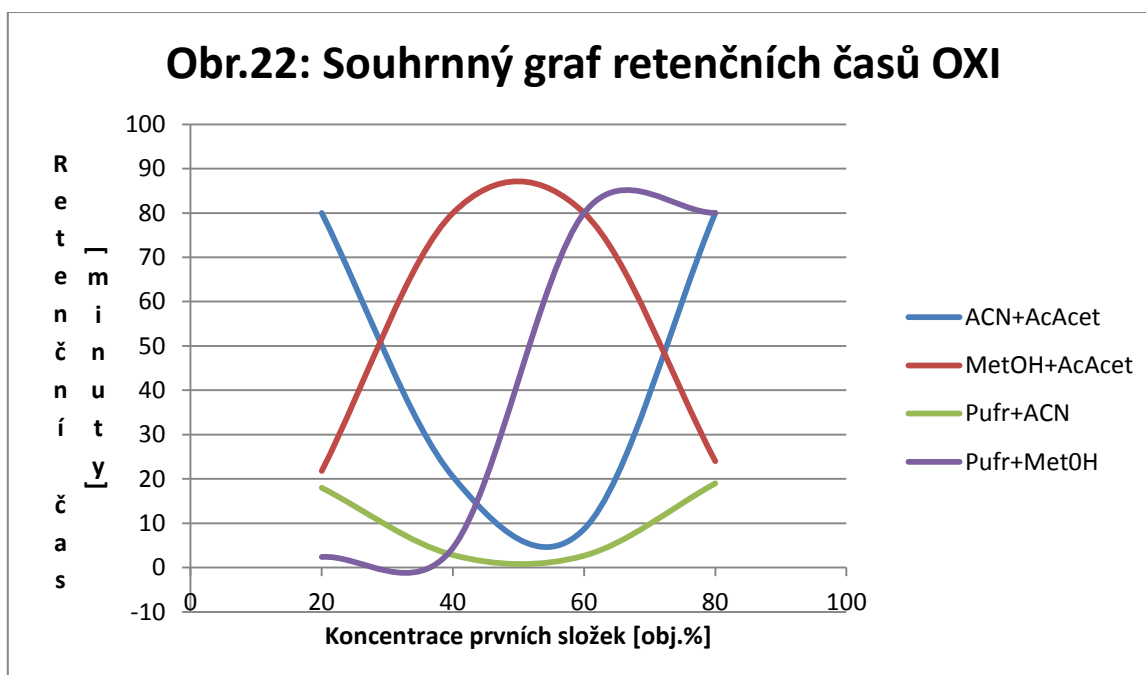
Na Obr.20 je graf s retenčními časy OXI po měření MF Pufr/ACN. Vyplývá z něj, že optimální koncentrace Pufru je mezi 40 a 60 objemovými %. Při vyšších a nižších koncentracích Pufru je výsledek testu nepoužitelný.



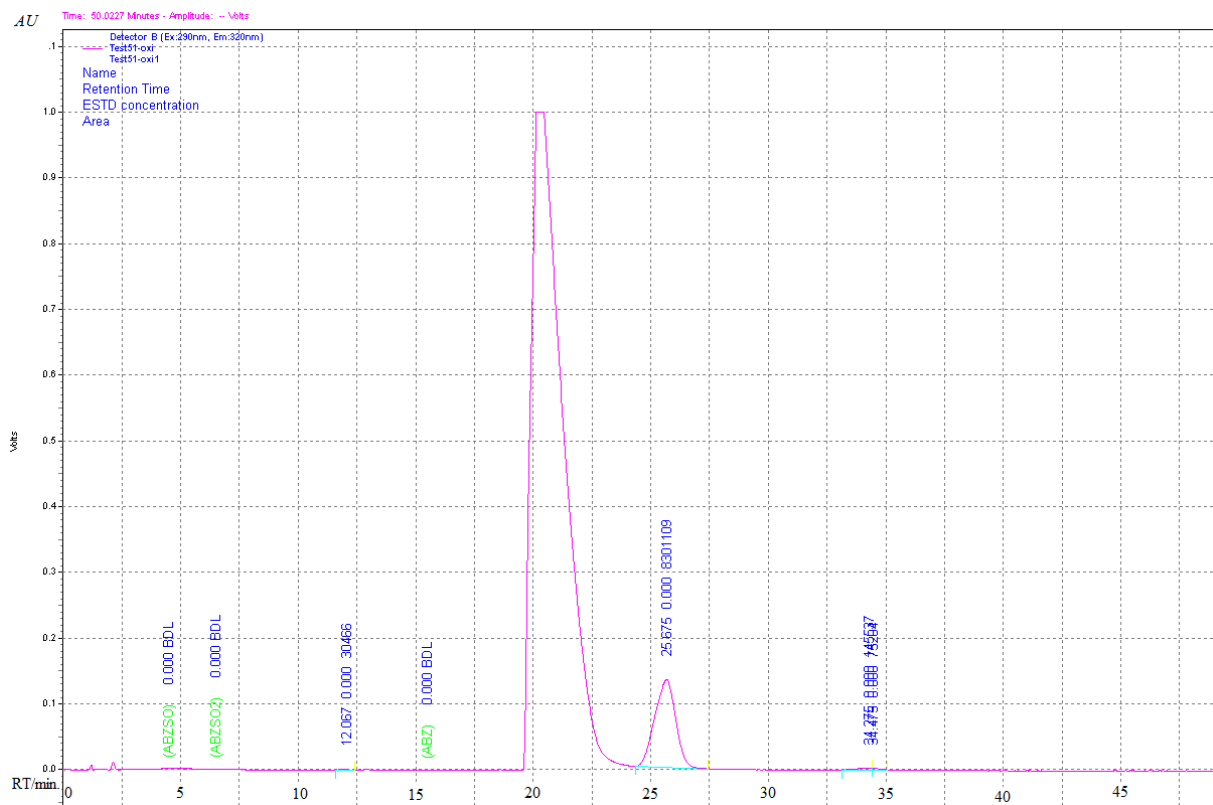
Na Obr.21 je graf závislosti koncentrace pufru na retenčním čase OXI. Mobilní fáze v tomto případě byla ve složení Pufr/MetOH v poměrech 20:80 až 80:20. Použitelné retenční časy při tomto pokusu byly pouze při koncentracích Pufru 20 a 40 obj. %.



Na Obr.22 je souhrnný graf závislosti koncentrací prvních složek mobilní fáze na retenčních časech OXI. Z grafu je patrné, že nejkratší retenční časy byly při složení MF Pufr/ACN. Jako jediné se vešly ve všech čtyřech poměrech do časového limitu.

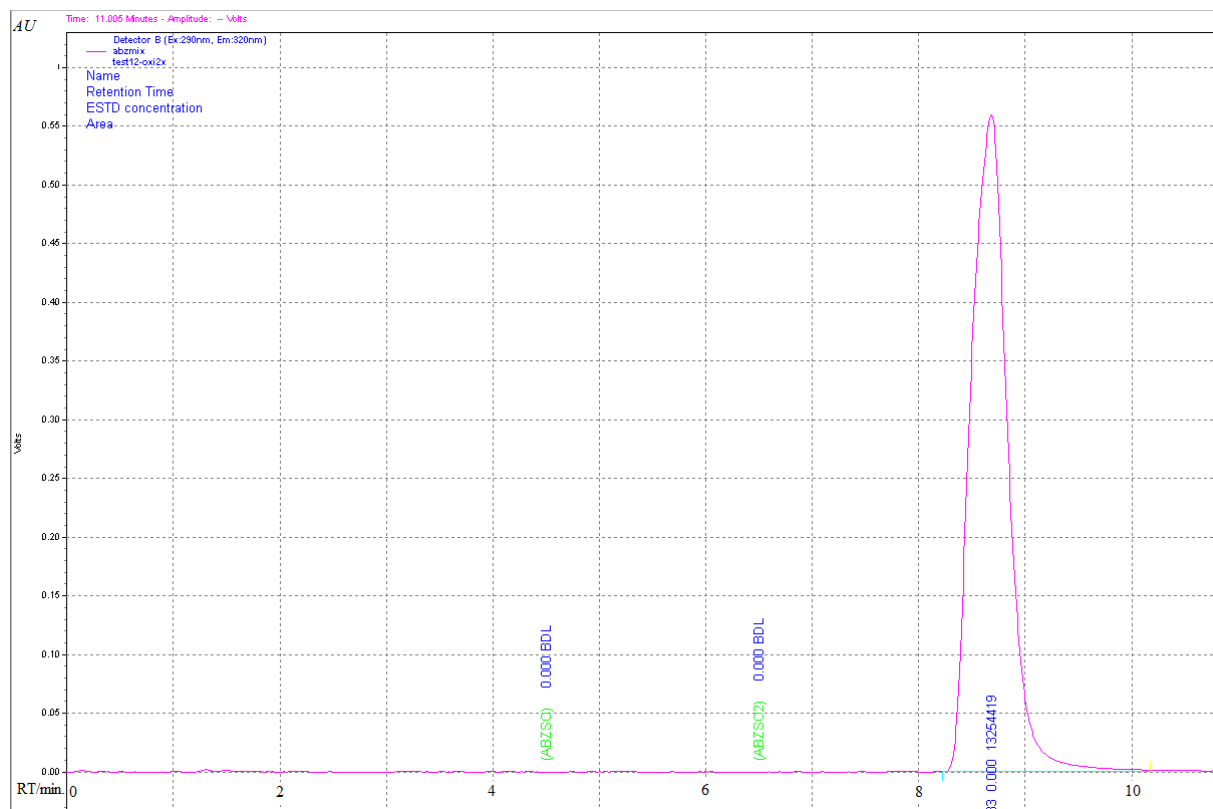


Na Obr.23 je vidět chromatogram měření OXI mobilní fází ve složení ACN/AcAcet v poměru 40:60. První pík má useknutou špičku kvůli vysoké koncentraci vzorku. Retenční čas OXI je přibližně 20 minut.



Obr.23 Chromatogram OXI – MF ACN/AcAcet 60:40

Na chromatogramu (Obr.24) je pík OXI asi v 9. minutě. Vzorek s OXI jsem měřil mobilní fází ACN/AcAcet v poměru 60:40.



Obr.24 Chromatogram vzorku OXI s mobilní fází ACN/AcAcet v poměru 60:40

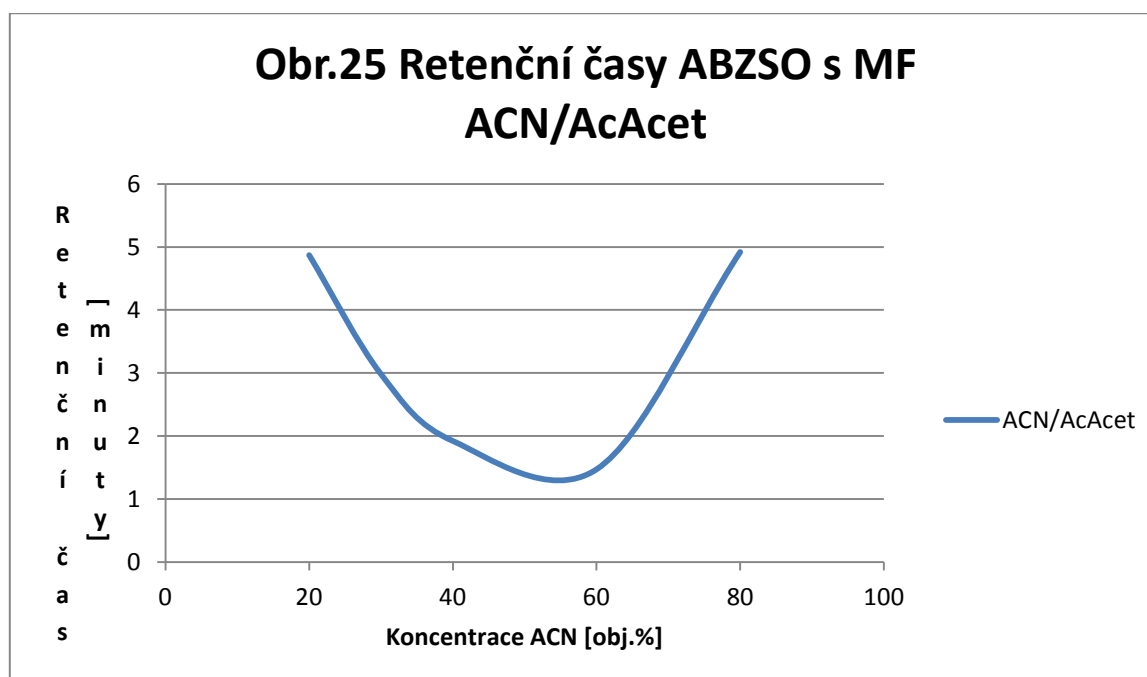
4.3 Výsledky studie ABZSO

V tabulce č.6 jsou shrnuty retenční časy ABZSO měřenými MF se složkami ACN, AcAcet, MetOH a Pufr. Koncentrace prvních složek se zvyšovala z 20 obj.% na 80 obj.%.

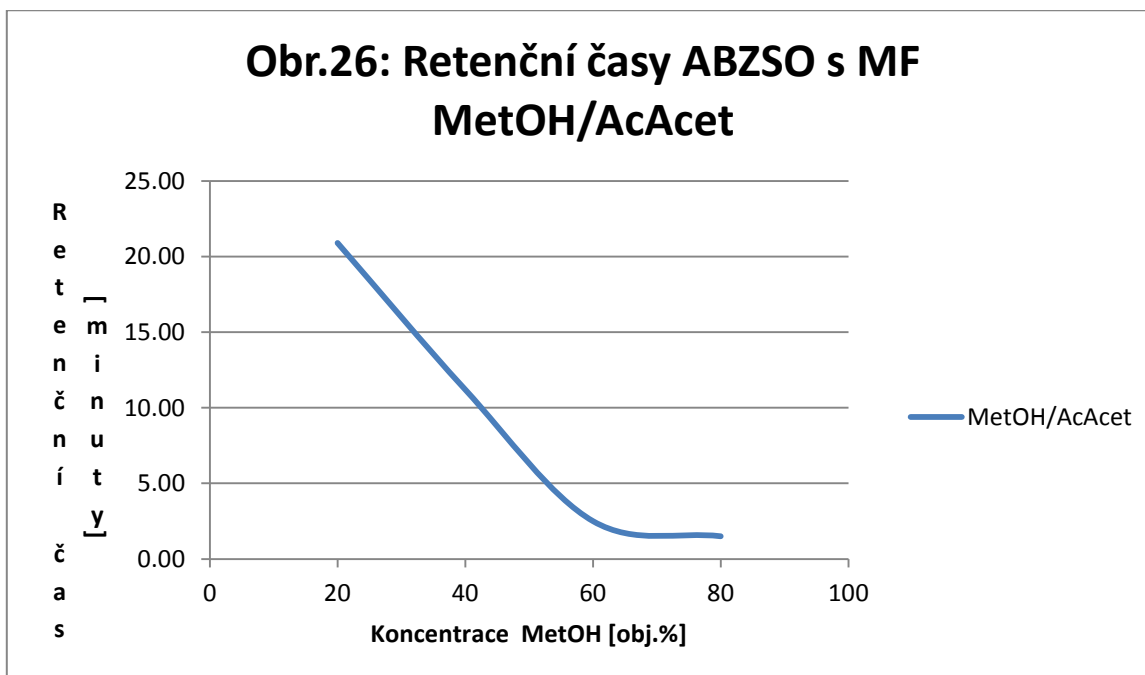
Poměry [%]	20:80	30:70	40:60	60:40	80:20
ACN : AcAcet	4,87	2,98	1,92	1,47	4,92
MetOH : AcAcet	20,90		11,20	2,50	1,50
Pufr : ACN	3,43		1,54	1,60	3,53
Pufr : MetOH	1,46		2,13	6,73	>80

Tab.6 Retenční časy (min.) ABZSO

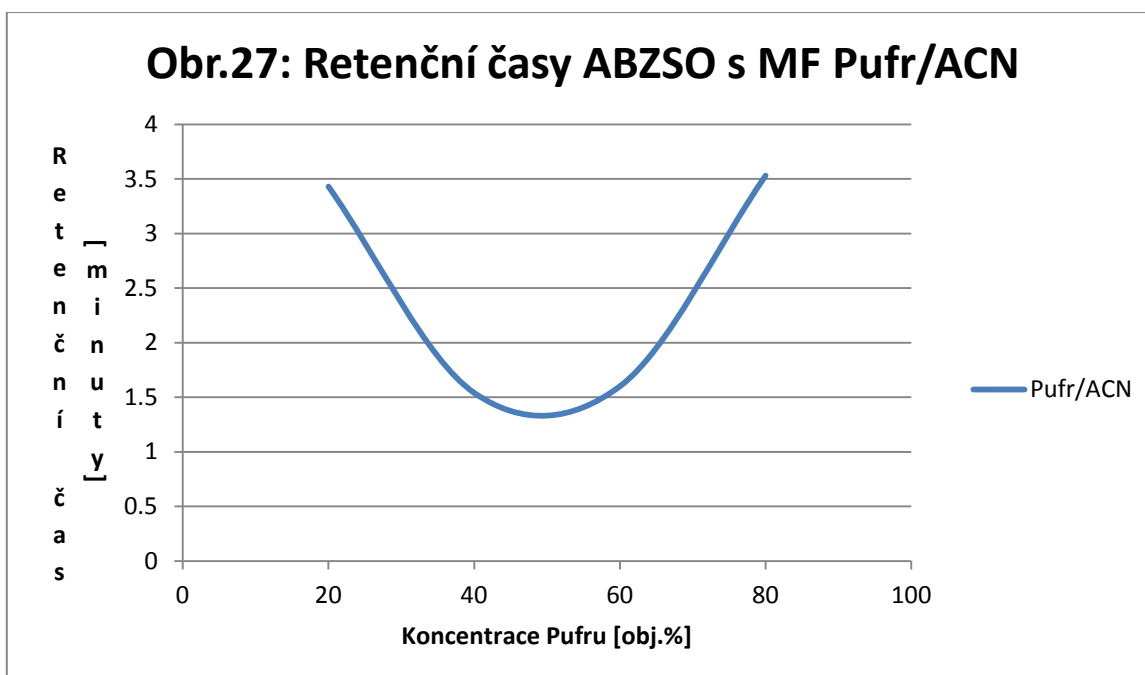
Vzorek ABZSO jsem měřil s mobilní fází v pěti poměrech. Retenční časy jsou vyneseny v grafu (Obr.25), na kterém je vidět pokles a prodloužení retenčního času v závislosti na změně složení MF. Při všech pěti poměrech ACN/AcAcet jsem naměřil poměrně krátké retenční časy.



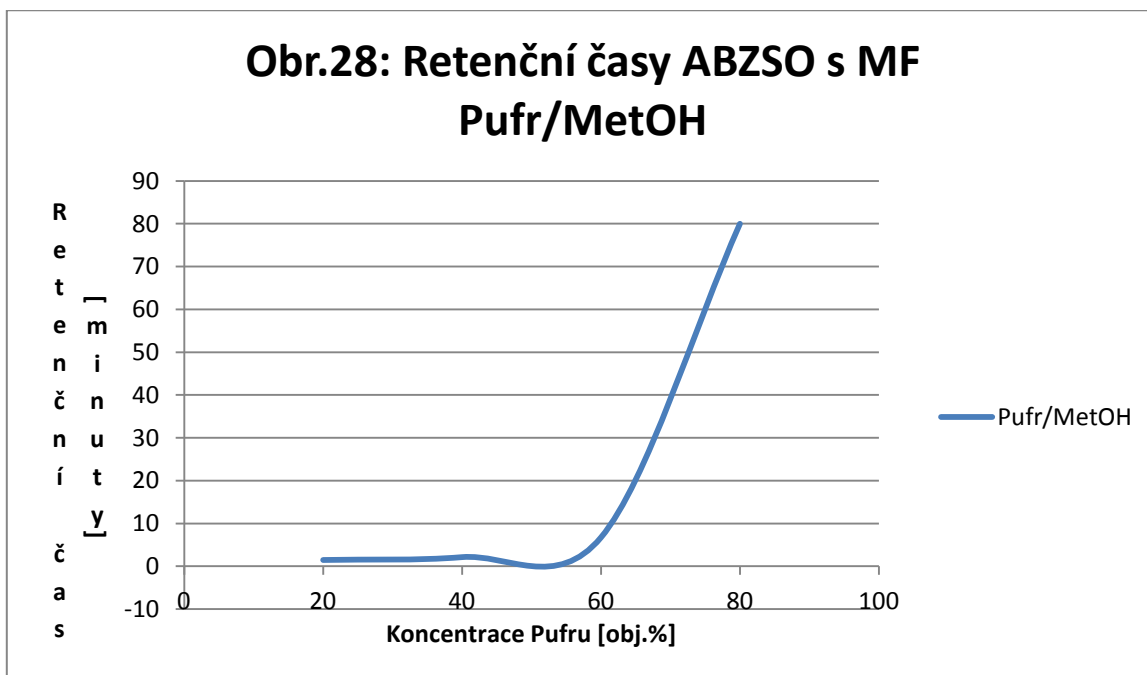
Na dalším grafu (Obr.26) jsou retenční časy ABZSO s MF ve složení MetOH/AcAcet. Nejdelší retenční časy byly při poměru 20:80 obj.%.



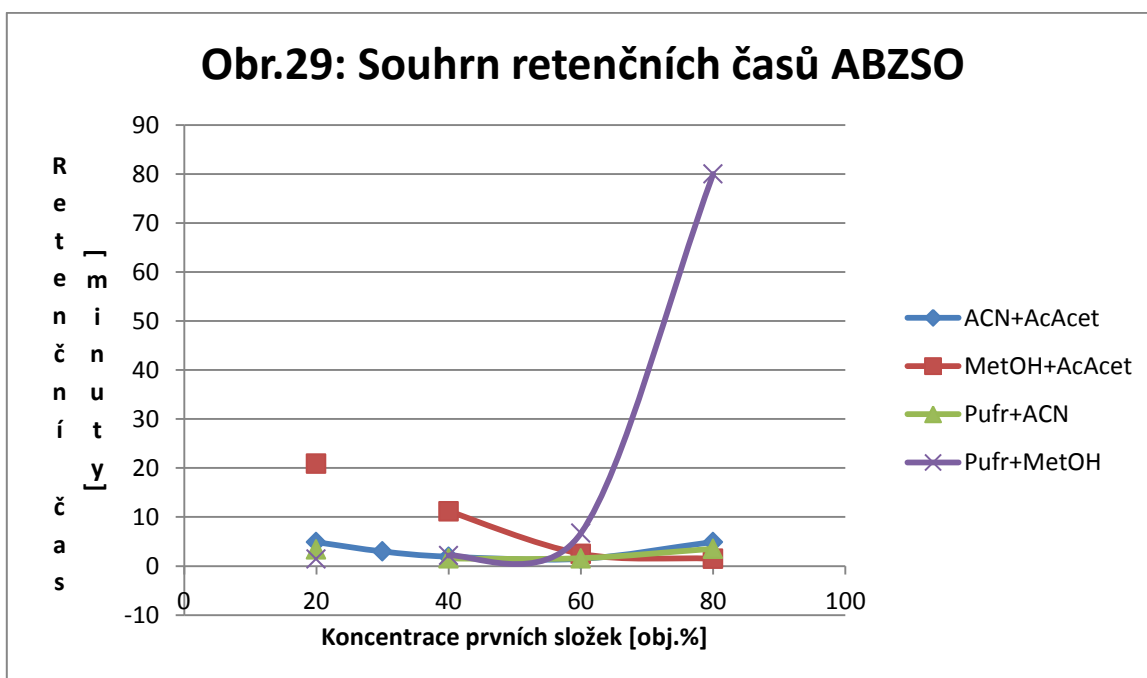
Na předposledním grafu (Obr.27) jsou retenční časy ABZSO v závislosti na vzrůstající koncentraci Pufru. Nejdéší retenční časy byly při koncentracích 20% a 80% Pufru. V tomto případě byla použita MF ve složení Pufir/ACN.



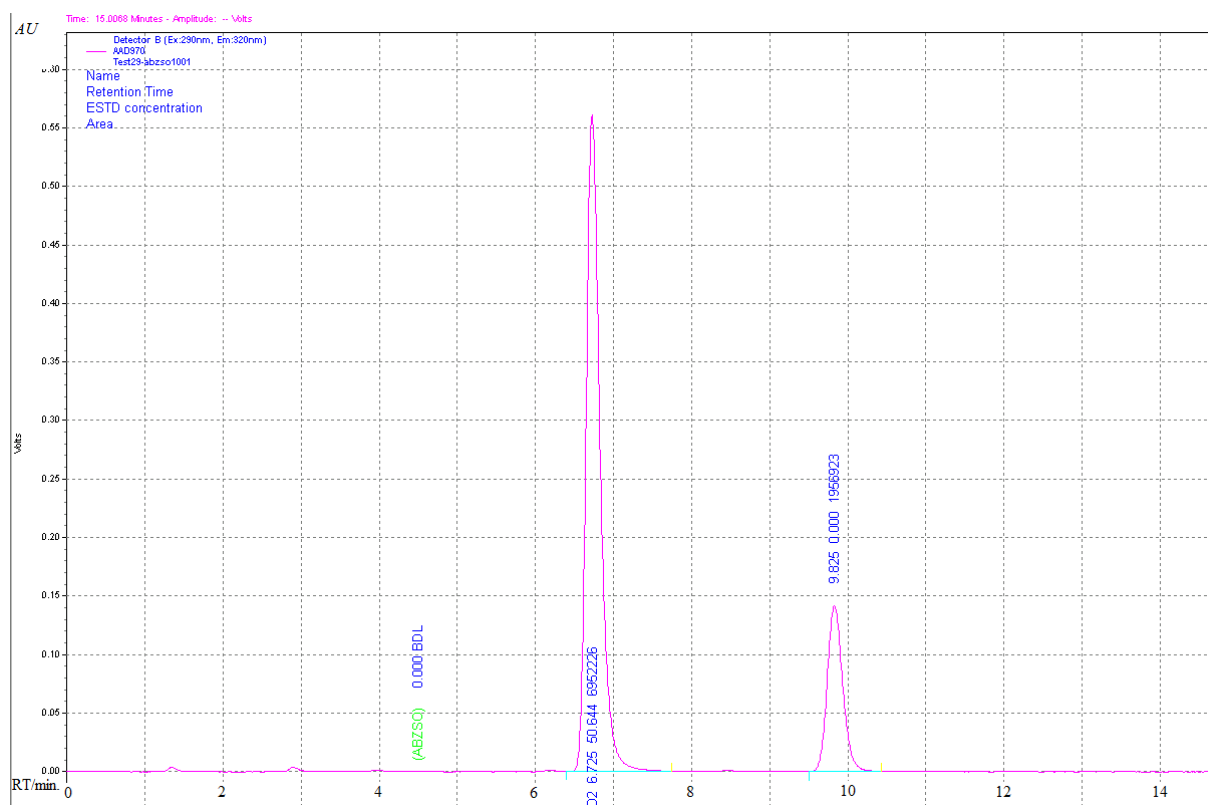
Na posledním grafu z této série (Obr.28) jsou vyneseny retenční časy ABZSO měřené MF ve složení Pufir/MetOH. Při koncentraci Pufru 80 obj.% byl retenční čas velmi dlouhý.



Souhrn retenčních časů (Obr.29) ukazuje, že u mobilních fází ACN/AcAcet, MetOH/AcAcet a Pufr/ACN vyšly ve všech čtyřech poměrech hodnoty nižší, než 20 minut.

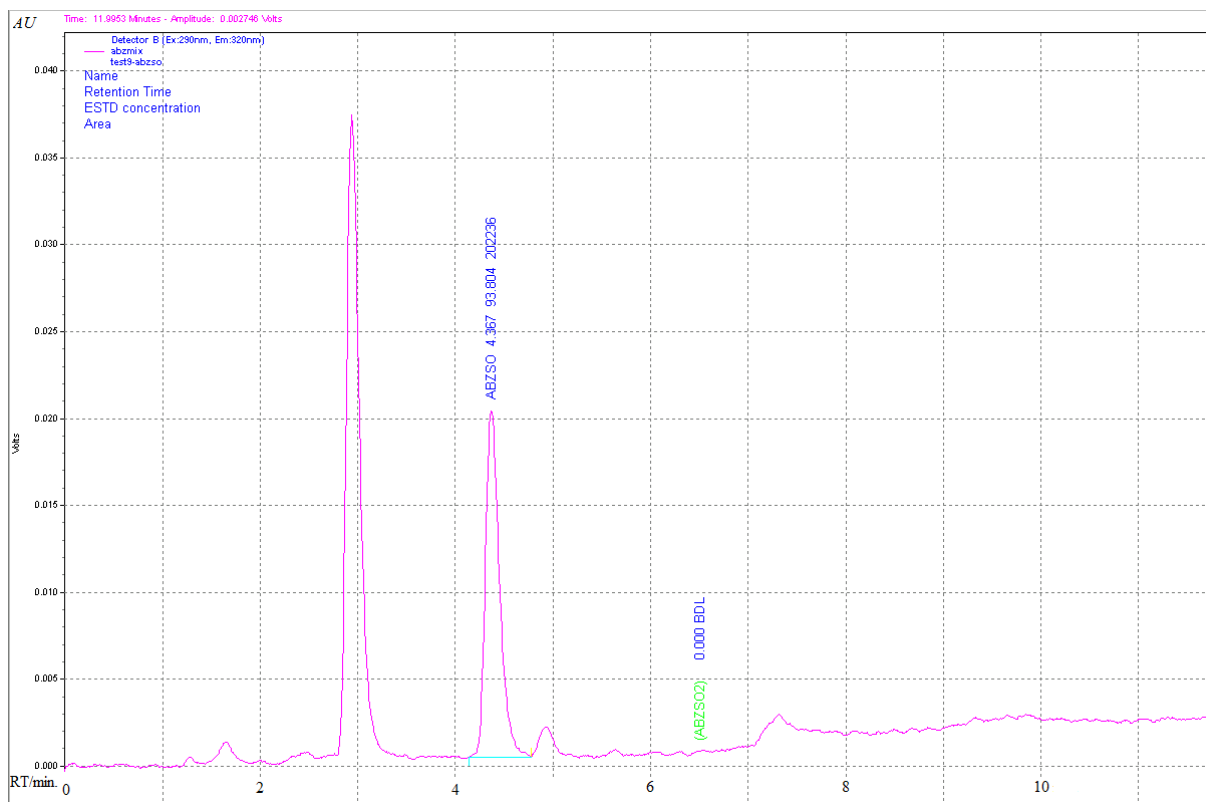


Na dalším chromatogramu (Obr.30) jsou vidět 2 píky. Vyšší pík v 7. minutě náleží ABZSO.



Obr.30 Chromatogram ABZSO – poměr mobilní fáze Pufr/MetOH 60:40

Na Obr.31 jsou vidět dva píky z nichž první patří ABZSO a druhý oxidovanému ABZSO2. Poměr mobilních fází ACN/AcAcet byl 30:70. Retenční čas ABZSO byl 2,90 min. a ABZSO2 4,40 min.



Obr.31 Chromatogram ABZSO s MF ACN/AcAcet v poměru 30:70

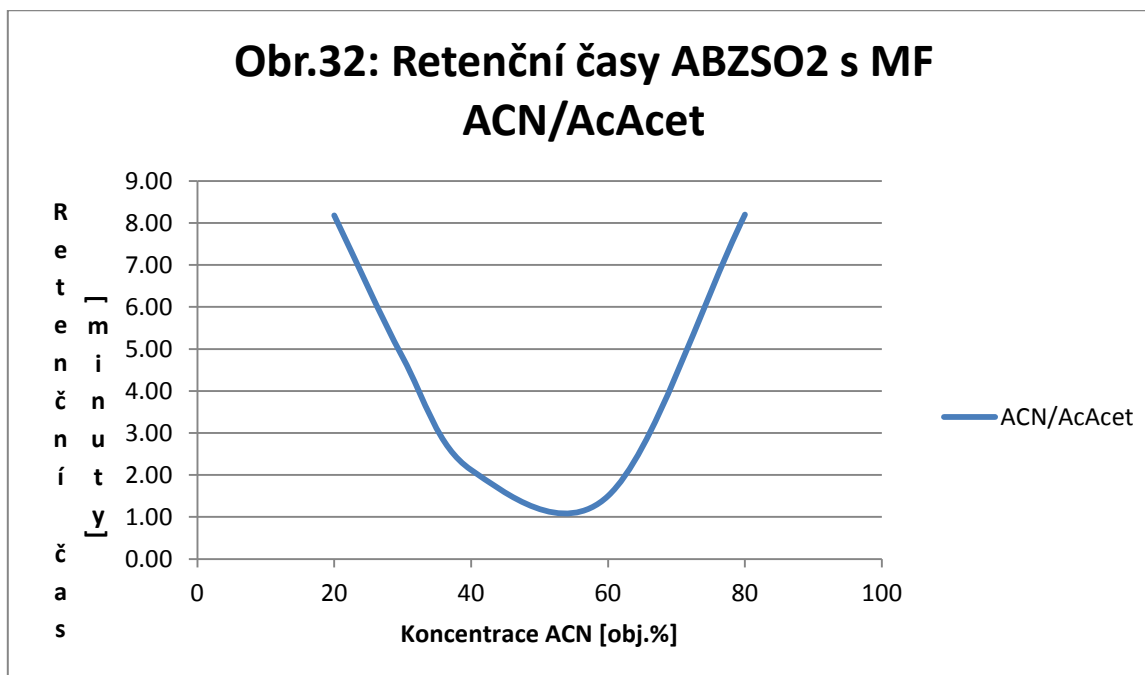
4.4 Výsledky studie ABZSO2

Při měření vzorku ABZSO2 jsem zaznamenal retenční časy uvedené v tabulce 7.

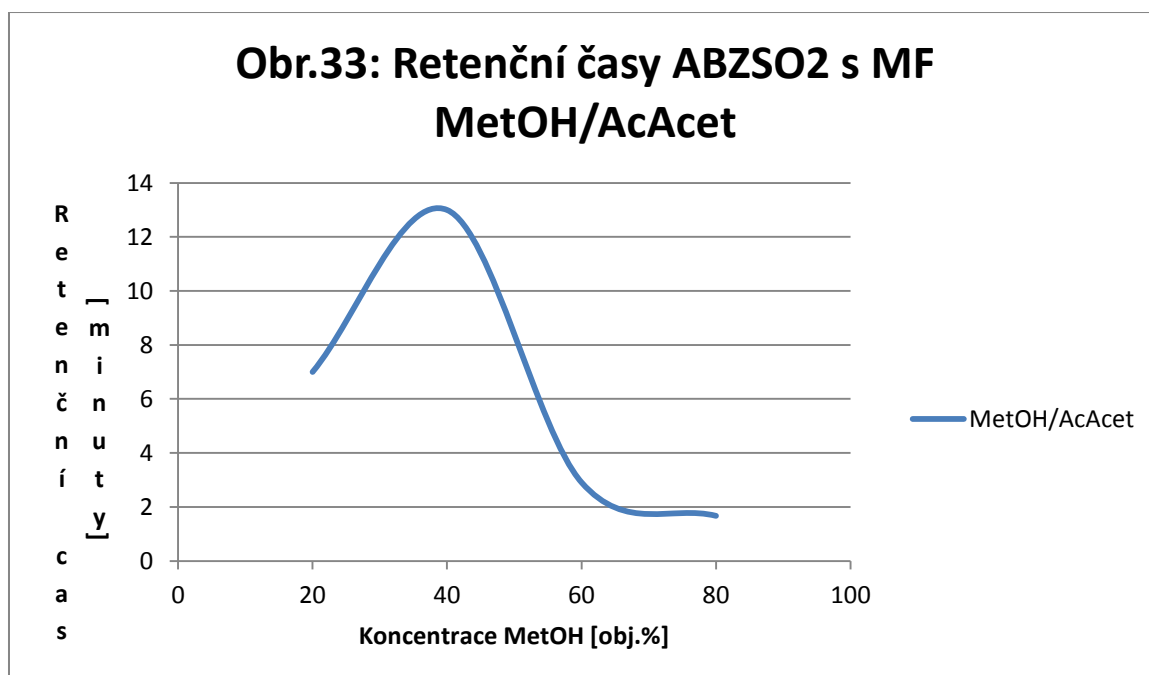
Poměry MF [obj.%]	20:80	30:70	40:60	60:40	80:20
ACN : AcAcet	8,18	4,80	2,12	1,50	8,20
MetOH : AcAcet	7,00		13,00	2,91	1,67
Pufr : ACN	7,00		1,98	1,92	7,13
Pufr : MetOH	1,52		2,53	9,85	28,15

Tab.7 Retenční časy (min.) ABZSO2

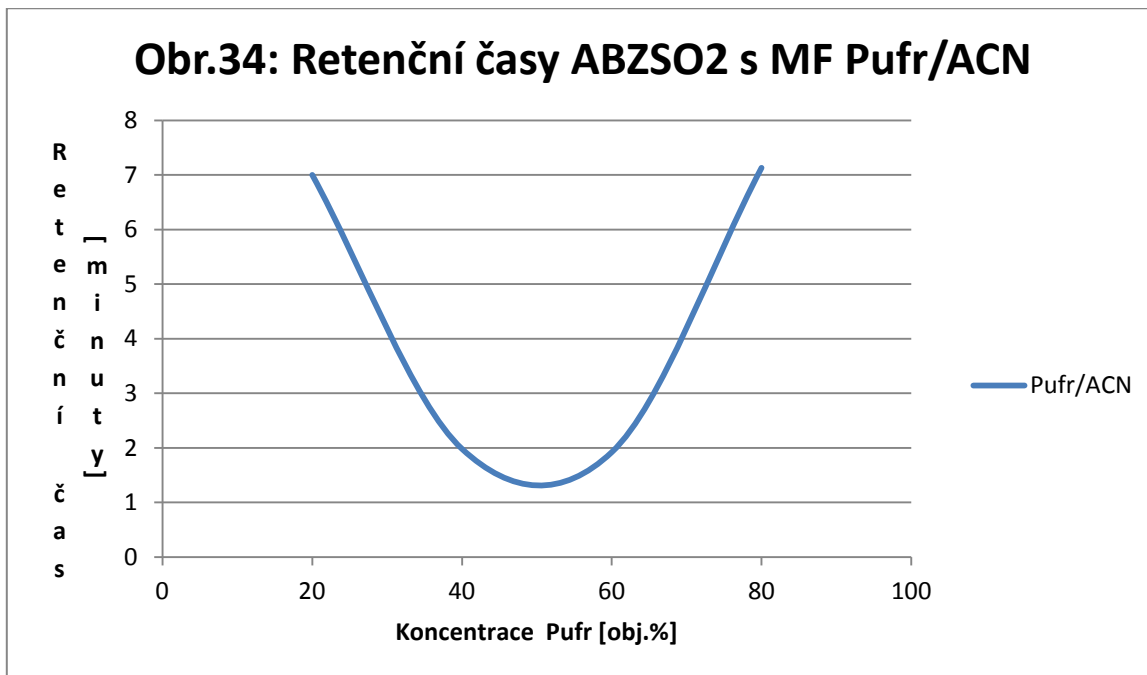
Na Obr.32 je vidět, že retenční časy ABZSO2 jsou nejkratší při koncentracích ACN 30, 40 a 60 obj.%. Vzorek s ABZSO2 jsem výjimečně měřil v pěti poměrech MF.



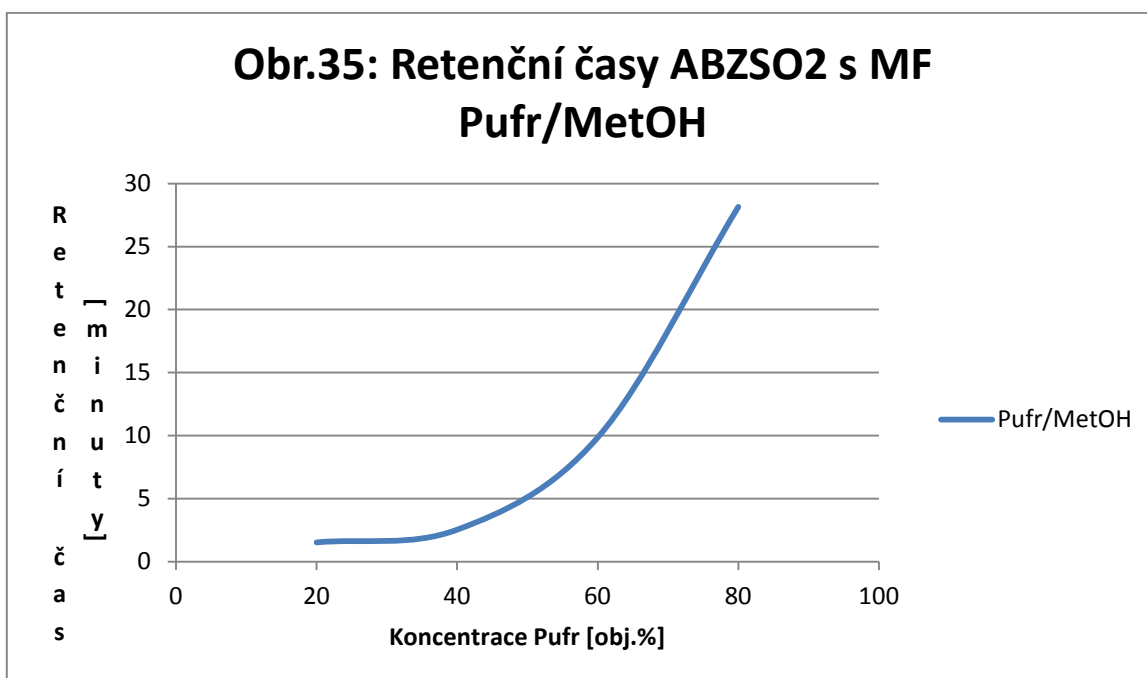
V dalším grafu (Obr.33) je vidět výrazné prodloužení retenčního času ABZSO2 při koncentraci 40 % MetOH v MF. Křivka na obr.42 vyšla poněkud nestandardně. Retenční čas při poměru MF 60/40 byl nezvykle krátký.



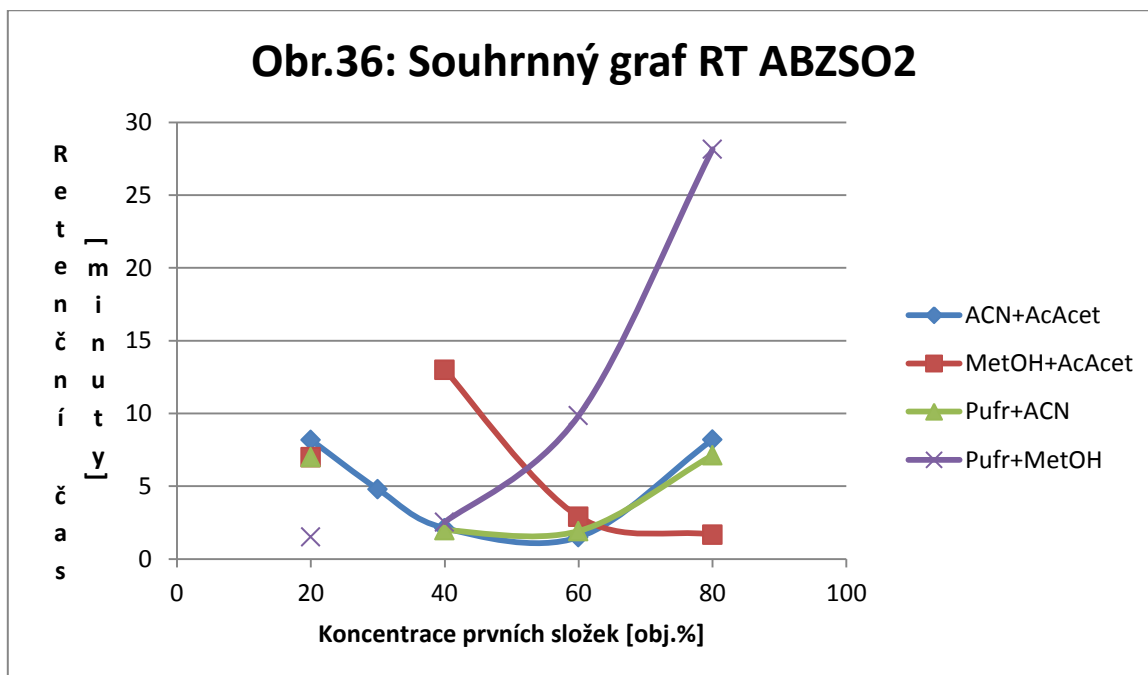
V dalším grafu Obr.34 vycházely retenční časy předpokládaným způsobem. Nejkratší byly v poměrech 40 a 60 obj.% Pufu.



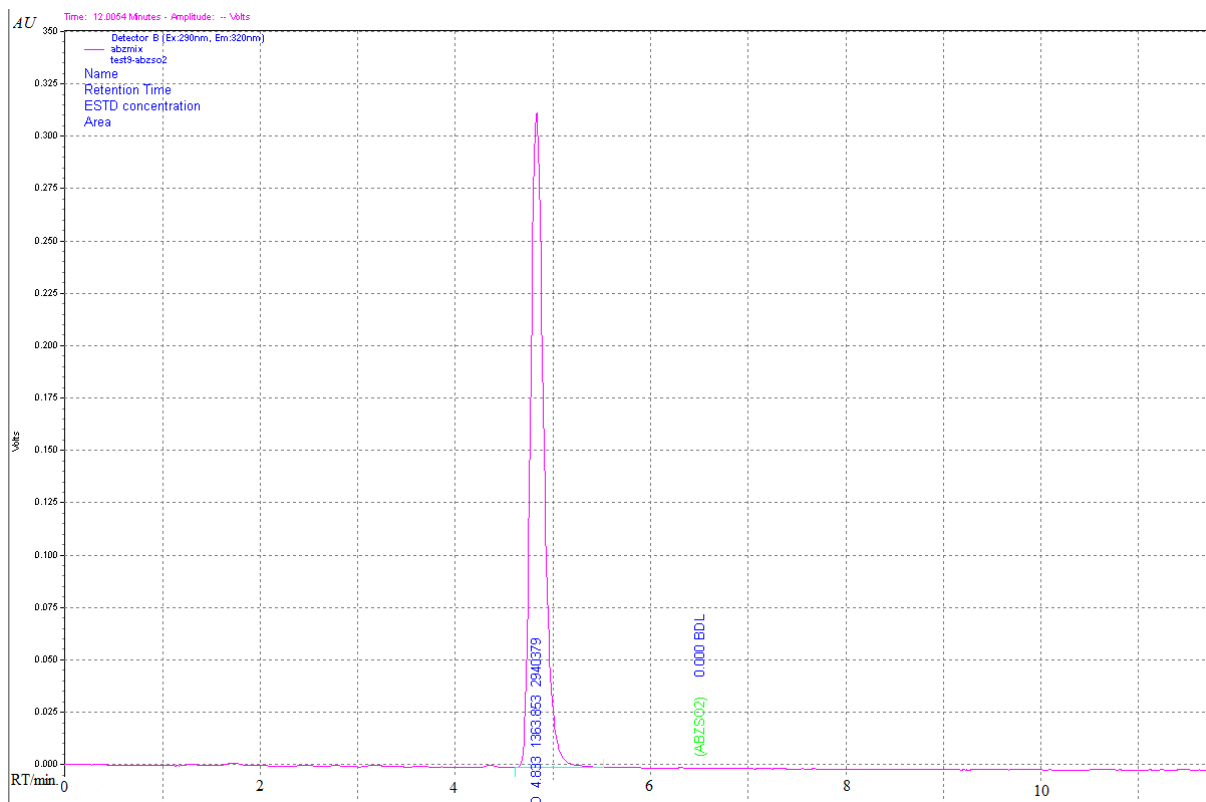
Graf na obr.35 opět vyšel nestandardně. Retenční časy rostly se zvyšující se koncentrací Pufru. Při koncentraci Pufru 80% dosahoval retenční čas až 28 minut.



Pro názornost jsem vytvořil souhrnný graf se všemi čtyřmi MF (Obr.36). Jsou na něm vyneseny hodnoty retenčních časů vzorku ABZSO₂ v závislosti na koncentraci prvních složek mobilních fází.



Na chromatogramu (Obr.37) je vidět pík ABZSO₂ přibližně v 5. minutě. Průtok MF byl 0,5 ml/min. Poměr mobilních fází ACN/AcAcet byl 30:70. Retenční čas ABZSO₂ byl v tomto pokuse 4,84 minut.



Obr.37 Chromatogram ABZSO₂ – mobilní fáze AcAcet/ACN v poměru 70:30

5. Diskuse

Mým úkolem bylo porovnávat jednotlivá složení mobilních fází mezi sebou podle účinnosti separace zkoumaných benzimidazolů. MF byly složeny z fosforečnanového pufru o pH 7, acetonitrilu, kyseliny octové 0,05 M a methanolu. Cílem bylo zjistit optimální složení MF pro studium ABZ, ABZSO, ABZSO₂ a OXI (použit jako vnitřní standard). Pro úspěšnost separace je výhodné, aby retenční časy jednotlivých látek byly co možná nejkratší a zároveň byly píky jednotlivých složek zřetelně odděleny.

Ke studiu byla použita kolona s pelikulárními částicemi s pevným jádrem. Na povrchu pevných částic je obal tvořený pentafluorphenylem (PFP). Lipofilní fáze PFP má odlišnou selektivitu ve srovnání s klasickým řetězcem C18 na silikagelu. Na rozdíl od fáze C18 může být separace sloučenin u PFP fáze postavena na dalších retenčních mechanismech tj. na možnosti vzniku vodíkových můstků, interakci dipól-dipól, iontově výměnném mechanismu, π - π interakci a tvarové selektivitě.

5.1 *Albendazol (ABZ)*

V případě sloučeniny ABZ křivky v prvních třech grafech vykazují průběh podle předpokladů. Mají tvar písmene U (Obr.11) v případě MF ACN/AcAcet. Při použití MF MetOH/AcAcet (Obr.12) měla křivka tvar obráceného U s vrcholem cca 80 minut. Takové retenční časy jsou příliš dlouhé, tudíž toto složení MF ke studiu ABZ nemohu doporučit. Při použití MF Pufr/ACN (Obr.13) se všechny retenční časy vešly do určeného limitu (15 minut) a křivka měla tvar obráceného U. V případě MF Pufr/MetOH (Obr.14) vyšla atypická křivka ve tvaru písmene S, kdy retence při krajních poměrech byla delší, než doba měření. Dva krajní poměry se do tohoto limitu 15 minut nevešly.

Pouze u MF Pufr/ACN (Obr.13), vyšly krátké retenční časy ve všech čtyřech poměrech. Optimální složení MF pro sloučeninu léčivou látku ABZ je tedy Pufr/ACN.

5.2 *Oxibendazol (OXI)*

Při analýze OXI jsem dosáhl neúnosně dlouhých retenčních časů při složení ACN/AcAcet a MetOH/AcAcet (Obr. 18 a 19). Při složení MF Pufr/MetOH (Obr.21) měla křivka tvar písmene S a retenční časy byly opět velmi dlouhé.

Pouze s MF Pufr/ACN (Obr. 20) jsem ve všech poměrech dosáhl retenčního času pod 20 minut. Pro vnitřní standard lze proto doporučit MF ve složení Pufr/ACN.

5.3 *Albendazol sulfoxid (ABZSO)*

ABZSO jsem měřil v pěti různých poměrech složek MF. Z grafů na (Obr.25-28) a tabulky č.6 vyplývá, že nejkratší retenční časy byly dosaženy při složení MF ACN/AcAcet a MF Pufr/ACN. Při použití MetOH/AcAcet byl retenční čas dlouhý a při měření s MF Pufr/MetOH byl retenční čas u krajních složení MF extrémně dlouhý.

Z uvedeného vyplývá, že nejlepší MF pro studium ABZSO je buď ACN/AcAcet, nebo Pufr/ACN.

5.4 *Albendazol sulfon (ABZSO2)*

Také ABZSO2 jsem měřil v pěti různých poměrech komponent MF. Při zkoumání vzorku s použitím MF ACN/AcAcet vyšly všechny retenční časy kratší než 10 minut (Obr.32). V případě kombinace MetOH/AcAcet byly všechny retenční časy v limitu, ale křivka měla atypický tvar (Obr.33). Při třetí kombinaci složky MF Pufr/ACN (Obr.34) byly při všech poměrech retenční časy do 10. minut a křivka měla očekávaný tvar. Ve čtvrtém složení MF Pufr/MetOH byl poslední retenční čas příliš dlouhý a křivka měla kromě toho atypický tvar (Obr.35).

Celkově se dá říci, že pro analýzu sloučeniny ABZSO2 nejlépe vyhovuje MF ve složení Pufr/ACN nebo ACN/AcAcet. V obou MF totiž ABZSO2 dosahoval příznivě krátkých retenčních časů při všech zkoušených poměrech složek.

5.5 *Shrnutí*

Jako nejvhodnější MF, která byla použitelná pro všechny sledované sloučeniny, se ukazuje MF ve složení Pufr/ACN. Při jejím použití dosahovaly všechny sledované sloučeniny akceptovatelné výsledky, tj. retenční časy byly vždy do 20 minut. Kromě toho měla MF Pufr/ACN kratší retenční časy ve všech čtyřech studovaných poměrech složek MF, než ostatní použité MF.

6. Závěr

Pro stanovení ABZ jsem zjistil nejvhodnější MF ve složení Pufr/ACN. Retenční časy mně vyšly v rozmezí od 1,5 do 4 minut.

Pro stanovení OXI jsem zjistil nevhodnější složení MF Pufr/ACN ovšem s poměrně velkým rozptylem retenčních časů a to od 1,5 minuty až do 18 minut.

Pro stanovení ABZSO mi vyšlo nejvhodnější složení MF ACN/AcAcet s retenčními časy 1,5 až 5 minut, nebo Pufr/ACN s retenčním časem 1,5 – 3,5 minut.

Pro stanovení ABZSO2 je podle mých výsledků nejvhodnější složení MF Pufr/ACN, s retenčním časem v rozmezí 1-7 minut.

Z provedených měření a porovnání usuzuji, že nejvhodnější MF pro studium výše uvedených benzimidazolů je složení MF Pufr/ACN. Nejdelší retenční časy se objevily u OXI. Bylo to dle poměru od 2 do 18 minut. V případě ostatních sloučenin, tj. ABZ, ABZSO a ABZSO2 byly retenční časy kratší a přibližně na stejné úrovni v rozmezí od 2 do 7 minut.

MF Pufr/ACN lze doporučit k další optimalizaci chromatografických podmínek pro stanovení ABZ a jeho metabolitů metodou HPLC s OXI v roli vnitřního standardu na PFP stacionární fázi.

Seznam literatury:

- 1) Lamka J., Ducháček L.; Veterinární léčiva pro posluchače farmacie, Karolinum, Praha 1998.
- 2) Lincová D., Farghali H.; Základní a aplikovaná farmakologie, Galén, Praha 2007, 538-539, 597.
- 3) Dowling G., Cantwell H., O'Keeffe M., R. Smyth M.; Multi-residue method for the determination of benzimidazoles in bovine liver; *Analytica Chimica Acta*, 529 (2005), 285–292.
- 4) Vardanyan R. S., Hruby V. J.; *Antihelmintic Drugs in Synthesis of Essential Drugs*, Elsevier, Amsterdam 2006, 583–593.
- 5) Blaszczyk-Swiatkiewicz K., Mirowski M., Kaplinska K., Kruszynski R., Trzesowska-Kruszynska A., Mikiciuk-Olasik E.; New benzimidazole derivatives with potential cytotoxic activity-study of their stability by RP-HPLC. *Acta Biochim. Pol.* 59, (2012), 279-288.
- 6) www.hplc.cz
- 7) http://www.hplc.cz/Teorie/FL_detector.html
- 8) Suying Wei, Qiang Wang, Jiahua Zhu, Luyi Sun, Hongfei Line and Zhanhu Guo; Multifunctional composite core–shell nanoparticles, *Nanoscale* 3 (2011), 4474-4502.
- 9) Kaczmarek K., Guiochon G.; Modelling of the Mass-Transfer Kinetics in Chromatographic Columns Packed with Shell and Pellicular Particles, *Anal. Chem.* 79 (2007), 4648-4656.
- 10) Kirkland J.J., Truszkowski F.A., Dilks Jr. C.H., Engel G.S.; Superficially Porous Silica Microspheres for Fast High-Performance Liquid Chromatography of Macromolecules, *J. Chromatogr. A* 890 (2000), 3-13.
- 11) <http://www.advanced-materials-tech.com/halo.html>
- 12) Guiochon G., Shirazi S. G., Felinger A., Katti A. M.; *Fundamentals of Preparative and Nonlinear Chromatography*, Academic Press, Boston, MA, 2006.
- 13) Abraham A., Al-Sayah M., Skrdla P., Bereznitski Y., Yadan Chen, Naijun Wu ; Practical comparison of 2.7 μm fused-core silica particles and porous sub-2 μm particles for fast separations in pharmaceutical process development, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* (2010), 131–137.
- 14) Clementi L.A., Vega J.R., Gugliotta L.M., Quirantes A.; Characterization of spherical core–shell particles by static light scattering. Estimation of the core- and particle-size

distributions; *Journal of Quantitative Spectroscopy and Radiative Transfer* (2012), 2255–2264.

- 15) Baecher S., Leinenbach A., Wright J.A., Pongratz S., Kobold U., Thiele R.; Simultaneous quantification of four vitamin D metabolites in human serum using high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry for vitamin D profiling ; *Clinical Biochemistry* (2012), 1491–1496.