

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

KATEDRA ANALYTICKÉ CHEMIE

**TESTOVÁNÍ CHROMATOGRAFICKÝCH
VLASTNOSTÍ ALTERNATIVNÍCH STACIONÁRNÍCH
FÁZÍ**

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Vedoucí diplomové práce Doc. RNDr. Dalibor Šatínský PhD.

Hradec Králové 2011

Michaela Havlátová

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

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

Abstrakt

Univerzita Karlova v Praze

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra analytické chemie

Kandidát: Michaela Havlátová

Konzultant: Doc. RNDr. Dalibor Šatínský, PhD.

Název diplomové práce: Testování chromatografických vlastností alternativních stacionárních fází

Byly testovány chromatografické vlastnosti HS F5 kolony u vybraných skupin látek. Jako testované skupiny látek byly vybrány látky ze skupiny β -sympatolytik (acebutolol, bopindolol), neuroleptik (thioridazin, perphenazin), lokálních anestetik (lidokain, prilokain), tetracyklinů (oxytetracyklin, minocyklin), derivátů methylxantinů (kofein, theofylin) a anilin. Při analýze byla sledována retence testovaných skupin látek v závislosti na charakteru mobilní fáze. Některé látky vykazovaly retenci ve tvaru „U“.

U každé testované skupiny byly provedeny tři série analýz, kdy při analýze č. 1 byla použita mobilní fáze acetonitril - voda, při analýze č. 2 mobilní fáze acetonitril – kyselina fosforečná 0,085% a při analýze č. 3 mobilní fáze acetonitril – acetátový pufr pH 7. Při každé jednotlivé analýze bylo současně měněno procentuální zastoupení acetonitrilu v mobilní fázi.

Z testovaných skupin látek vykazovaly retenci ve tvaru „U“ β -sympatolytika acebutolol, bopindolol v sérii analýz č. 2 a č. 3, neuroleptika thioridazin, perphenazin v sérii analýz č. 2 a thioridazin i v sérii analýz č. 3, lokální anestetika lidokain, prilokain v sérii analýz č. 2, tetracykliny oxytetracyklin, minocyklin v sérii analýz č. 2 a oxytetracyklin i v sérii analýz č. 1.

Abstract

Charles University in Prague

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Analytical Chemistry

Candidate: Michaela Havlátová

Consultant: Doc. RNDr. Dalibor Šatínský, PhD.

Diploma Thesis Title: Testing of Chromatographic Qualities of Alternative Stationary Phases

Chromatographic qualities of HS F5 column were tested at selected groups of substances. For testing there were chosen substances from the following groups: beta-sympatholytics (acebutolol, bopindolol), neuroleptics (thioridazine, perphenazine), local anesthetics (lidocaine, prilocaine), tetracyclins (oxytetracyclin, minocyclin), methylxanthine derivates (caffeine, theophylline) and aniline. During the analysis the retention of the tested substances was investigated as influenced by the character of the mobile phase. Some of the substances showed U-shaped retention.

Three series of analysis were carried out at each tested group. In analysis number 1 acetonitrile – water was used as the mobile phase, in analysis number 2 the mobile phase was acetonitrile – phosphoric acid 0.085%, and in analysis number 3 it was acetonitrile – acetate buffer solution pH 7. In each analysis the acetonitrile percentage in the mobile phase was changed.

In the group of the substances tested the U-shaped retention was shown by beta-sympatholytic acebutolol, bopindolol in analysis series number 2 and 3; neuroleptics thioridazine, perphenazine in analysis series number 2 and thioridazine in analysis series number 3 as well; local anesthetics lidocaine, prilocaine in analysis series number 2; tetracyclins oxytetracyclin, minocyclin in analysis series number 2 and oxytetracyclin in analysis series number 1 as well.

Obsah

OBSAH	6
SEZNAM ZKRATEK.....	8
1 ÚVOD.....	9
2 CÍL A ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE	10
3 TEORETICKÁ ČÁST	11
3.1 Chromatografie.....	11
3.1.1 Základní principy chromatografických metod	11
3.1.2 Vysokoučinná kapalinová chromatografie (High Performance Liquid Chromatography) – HPLC	11
3.1.3 Schéma kapalinového chromatografu.....	12
3.1.4 Charakteristiky HPLC	14
3.1.5 Typy HPLC.....	15
3.1.6 Chromatografie na reverzních fázích (Reversed phase HPLC)- RP – HPLC	15
3.1.7 Chromatografické kolony	17
3.1.8 Stacionární fáze	17
3.1.9 Alternativní stacionární fáze	18
3.2 Testované skupiny látek.....	28
3.2.1 β -SYMPATOLYTIKA	28
3.2.2 NEUROLEPTIKA.....	31
3.2.3 LOKÁLNÍ ANESTETIKA.....	34
3.2.4 TETRACYKLINY	36
3.2.5 DERIVÁTY METHYLYXANTINU	39
3.2.6 ANILIN	41
4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	42
4.1 Materiály a pomůcky	42
4.1.1 Standardy, vzorky a chemikálie.....	42
4.1.2 Přístroje, podmínky separace	42

4.2	Příprava roztoku standardů testovaných skupin látek	43
4.3	Příprava mobilní fáze.....	44
4.3.1	Mobilní fáze pro sérii analýz č. 1: Acetonitril – voda.....	44
4.3.2	Mobilní fáze pro sérii analýz č. 2: Acetonitril - kyselina fosforečná H ₃ PO ₄ 0,085%	44
4.3.3	Mobilní fáze pro sérii analýz č. 3: Acetonitril - acetátový pufr pH 7	44
4.4	Popis práce	44
4.5	Výsledky analýzy	46
4.5.1	Testovaná skupina látek č. 1: β-SYMPATOLYTIKA	46
4.5.2	Testovaná skupina látek č. 2: NEUROLEPTIKA.....	50
4.5.3	Testovaná skupina látek č. 3: LOKÁLNÍ ANESTETIKA.....	53
4.5.4	Testovaná skupina látek č. 4: TETRACYKLINY	56
4.5.5	Testovaná skupina látek č. 5: DERIVÁTY METHYLYXANTINU	60
4.5.6	Testovaná skupina látek č. 6: ANILIN	65
5	ZÁVĚR.....	67
6	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....	68

Seznam zkratek

5-HT	5- hydroxytryptamin
ACN	acetonitril
C18	Oktadecylová fáze
cAMP	cyklický adenosinmonofosfát
CNS	centrální nervová soustava
DAD	Diode Array detektor
GC	plynová chromatografie
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
HS F5	pentafluorofenylpropylová fáze
CHOPN	Chronická obstrukční plicní nemoc
ISA	Intrinsic sympatomimetic activity
MS	hmotnostní spektrometrie
RNA	Riboxynukleová kyselina
RP - HPLC	Chromatografie na reverzních fázích
UPLC	Ultra Performance Liquid Chromatography
UV/VIS	ultrafialová/viditelná oblast

1 Úvod

Během posledního desetiletí zaznamenala kapalinová chromatografie značný rozvoj v instrumentaci i na poli vývoje nových stacionárních fází. Trendy směřují k dosažení co nejúčinnějších separací v co nejkratším čase s dosažením co nejvyšší citlivosti. Jedním z nejvýznamnějších směrů je vývoj chromatografie za extrémně vysokých tlaků – „Ultra High Performance Liquid Chromatography“ (UHPLC) s tendencí zmenšování částic stacionární fáze pod velikost 2 mikrometrů. Tento krok vyústil k získání velice účinných separačních technik a metod. Dalším důležitým trendem je vývoj nových stacionárních fází založený na částicích s pevným jádrem, polymerních sorbentech, sorbentech jiného než silikagelového charakteru, a chemicky modifikovaných alternativních stacionárních fází s jinou polaritou než jsou doposud nejčastěji používané reverzní C-8 a C-18 stacionární fáze. Tyto pak umožňují dosažení účinnějších separací komplikovaných směsí látek velice podobných struktur, či látek polárního charakteru. Jednou z takových alternativních stacionárních fází je zatím poměrně málo používaná pentafluorofenylpropylová stacionární fáze (HS F5), jejíž testování pro analýzu bazických a polárních látek bylo náplní předkládané diplomové práce.

2 Cíl a zadání diplomové práce

Cílem předložené diplomové práce je testování retenčních profilů vybraných bazických látek z různých farmakologicky účinných skupin. Jako testované skupiny látek byly vybrány látky ze skupiny β -sympatolytik (acebutolol, bopindolol), neuroleptik (thioridazin, perphenazin), lokálních anestetik (lidokain, prilokain), tetracyklinů (oxytetracyklin, minocyklin), derivátů methylxantinů (kofein, theofylin) a jednoduchá aromatická bazická látka anilin. Cílem a zadáním diplomové práce bylo sledování retence testovaných skupin látek v závislosti na charakteru mobilní fáze s různým obsahem acetonitrilu a o různém pH. Snahou bylo nalézt ty látky, které by vykazovaly tzv. retenci ve tvaru „U“. Toto zjištění je pak možné využít pro analýzu bazických a polárních látek na HS F5 stacionární fázi, kdy je možné vyšším přídatkem acetonitrilu do mobilní fáze dosáhnout značného zvýšení retence tohoto problematického typu látek a tak je úspěšně separovat a analyzovat.

3 Teoretická část

3.1 Chromatografie

3.1.1 Základní principy chromatografických metod

Chromatografické metody jsou vysoce účinné separační metody, sloužící k oddělení složek směsi. Zároveň se používají ke kvalitativnímu i kvantitativnímu hodnocení separovaných složek.

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

Chromatografické metody můžeme rozdělit z hlediska:

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

[1], [2].

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

HPLC je separační a analytická metoda, která umožňuje současně jak kvalitativní, tak i kvantitativní hodnocení separovaných složek směsi, a to s vysokou selektivitou, citlivostí a v relativně krátkém čase. Pro analýzu pak postačuje minimální množství vzorku a díky možnosti využití automatického dávkovače lze

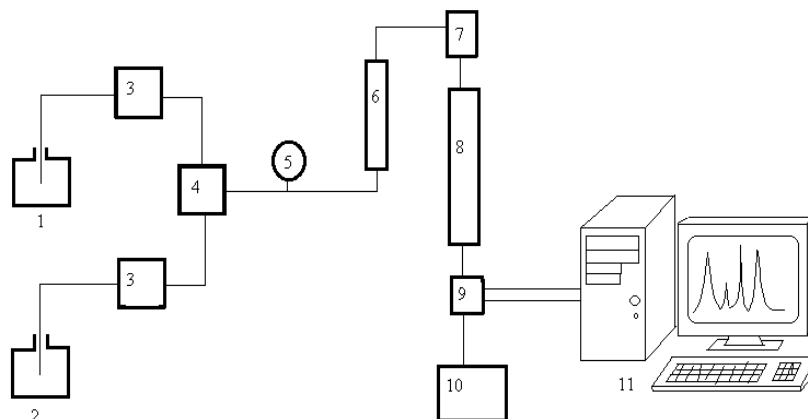
celou metodu plně automatizovat. Oproti plynové chromatografii umožňuje i analýzu tepelně nestálých nebo netěkavých látek a polymerů [2].

Z HPLC záznamu lze získat detailní informace o identitě, obsahu i čistotě analyzovaného vzorku. Protože umožňuje analyzovat od anorganických vzorků až po polymerní sloučeniny, je její využití v praxi velmi široké, zejména pro takové sloučeniny jako jsou steroidy, cukry, vitaminy, pesticidy, barviva. Důležitou oblast využití HPLC tvoří i analýza léčiv – identifikace léčiv, stanovení obsahu a čistoty, řešení problematiky stability léčiv, analýzy přírodních léčiv v rostlinném materiálu, monitorování léčiv a jejich metabolitů v tělních tekutinách [1], [2].

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

3.1.3 Schéma kapalinového chromatografu

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



Při chromatografii je mobilní fáze čerpána vysokotlakým čerpadlem, které musí umožňovat konstantní bezpulzní tok mobilní fáze o malé rychlosti (0,1 – 10 ml/min) za vysokého tlaku až 40 MPa.

Čerpadlo je spojeno s naprogramovaným směřovacím zařízením, pomocí kterého se nastavuje složení mobilní fáze. Při dělení směsi látek, jejichž eluční parametry se příliš neliší, se používá izokratická eluce jedinou mobilní fází, jejíž složení se během chromatografie nemění. U některých směsí látek však nelze tímto způsobem dosáhnout optimálního dělení, zejména jestliže se jednotlivé složky směsi svými elučními parametry významně liší. V tomto případě se s výhodou využívá gradientová eluce, při které se k jedné mobilní fázi plynule přimíchává rostoucí množství druhé mobilní fáze s větším elučním účinkem. Vytváří se tak plynulý koncentrační gradient mobilní fáze. Obdobným způsobem lze pro eluci využít i gradient pH.

Dávkování roztoku vzorku lze provést ručně nebo automaticky speciální injekční mikrostříkačkou nebo pomocí dávkovacího kohoutu. Kohoutem lze dávkovat pevně daný objem roztoku avšak mnohem přesněji a navíc eliminuje některé další nedostatky injekčního zařízení, jako jsou netěsnost, problém udržení tlaku a vnášení stop materiálu injekční stříkačky. Dnes jsou však již výhradně používány moderní autosamplery pro několik desítek až stovek vzorků.

K separaci směsi na jednotlivé složky, které jsou unášeny mobilní fází do detektoru, dojde na chromatografické koloně (viz kap. 3.1.7). Jako ochrana hlavní kolony jsou hojně používány předkolony umístěné mezi dávkovací zařízení a analytickou kolonu. Způsobují jen malé rozšíření píků a chrání kolonu před nečistotami a nerozpustnými materiály.

Jednotlivé složky analyzované směsi jsou poté detekovány pomocí detektoru, který zaznamenaný a upravený signál přenáší do počítače, kde je zpracován. Používají se detektory spektrofotometrické (UV, UV/VIS, DAD), fluorimetrické, refraktometrické a elektrochemické. Na detektor jsou kladeny určité ideální požadavky. Je požadována vysoká citlivost, která umožňuje detekci látek v roztoku v koncentracích ng až $\mu\text{g/ml}$, reprodukovatelnost a linearita odezvy, nezávislost odezvy na změně mobilní fáze při gradientové eluci a univerzálnost (detekce všech oddělených složek vzorku).

Mobilní fáze používané při HPLC musí být čisté a zbavené rozpuštěných plynů probubláváním heliem nebo působením ultrazvuku za vakua. K získání přiměřených elučních parametrů je nutný výběr vhodné mobilní fáze. Podle rostoucí eluční účinnosti jsou rozpouštědla seřazena do eluotropní řady: heptan < cyklohexan < tetrachlormethan < toluen < éther < chloroform < aceton < acetonitril < ethanol < methanol < octová kyselina < voda. Při RP – HPLC (viz. kap. 3.1.6) eluotropní řada platí v obráceném pořadí a polární methanol má zde vyšší eluční účinnost než voda [1], [2], [3], [5].

3.1.4 Charakteristiky HPLC

Chromatogram představuje záznam odezvy detektoru, koncentrace eluované látky nebo jiné veličiny použité jako měřítko této koncentrace v závislosti na čase, objemu nebo vzdálenosti. Idealizovaný chromatogram představuje řada gaussovských píků rozdělených na základní linii [4].

Kvalitativní analýza

Základní kvalitativní charakteristikou pro každou separovanou látku v daném systému je eluční (retenční) čas t_R nebo eluční (retenční) objem V_R . Retenční čas je doba, která uplyne od nástřiku vzorku do dosažení maxima eluční křivky a retenční objem je proteklý objem kolonou za tuto dobu. Mezi retenčním časem a retenčním objemem existuje vztah [5]:

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

t_R – retenční čas;

v – průtoková rychlost mobilní fáze [4]

Kvantitativní analýza

Kvantitativní charakteristikou HPLC je plocha pod křivkou. U symetrických píků lze ke zjištění koncentrace stanovované složky využít způsob přímého srovnání výšek píků standardu a stanovované složky. V jiném případě je výhodnější pro kvantitativní vyhodnocování na základě kalibrační závislosti nebo metody standardního přípravku použít plochu pod píkem [1], [2].

3.1.5 Typy HPLC

Dle procesu separace rozlišujeme následující typy HPLC

- a) s normální fází – k analýze používá polární stacionární fázi a nepolární mobilní fáze
- b) s reverzní fází – vzhledem k polaritě fází je obrácená k HPLC s normální fází
- c) iontovýměnná – zde je stacionární fází měnič iontů. Tak dochází k výměně iontů mezi stacionární fází a fází mobilní. Přitom se uplatňují elektrostatické přitažlivé síly mezi ionty opačného náboje (Coulombovy síly)
- d) gelová permeační – kde jsou molekuly separovány dle své velikosti, přičemž nedochází k interakci molekul analytu se stacionární fází
- e) afinitní – využívá výjimečné biologické schopnosti některých látek specificky a reversibilně vázat jiné látky [3], [6], [7]

3.1.6 Chromatografie na reverzních fázích (Reversed phase HPLC)- RP – HPLC

Tento typ HPLC využívá obrácený systém fází, kdy stacionární fáze má nepolární charakter a mobilní fáze je mírně polární. Jako stacionární fáze se nejčastěji používají chemicky modifikované fáze například s navázanými uhlovodíkovými řetězci různé délky (C8, C18), na vhodném nosiči (silikagel). Mobilní fází je pak nejčastěji voda ve směsi s methanolem nebo acetonitrilem [1].

Strukturní vlastnosti analytů hrají důležitou roli v retenčních charakteristikách analýzy. Obecně platí, že molekuly s větší hydrofobicitou, tj. molekuly obsahující nepolární vazby jako například C-H, C-C, nebo S-S, mají delší retenční čas, protože nejsou schopny interagovat s polární mobilní fází. Pokud ale molekula obsahuje polární skupiny -OH, -NH₂, COO⁻ nebo -NH₃⁺, retence je menší. U velkých molekul může být pak retence ovlivněna i stericným stíněním, které může bránit interakci molekul analytu se stacionární fází.

Retenční čas je dále ovlivňován hydrofobní (nepolární) plochou povrchu, kdy platí, že rozvětvené molekuly se eluují rychleji, než jim odpovídající lineární isomery, které mají celkovou plochu povrchu větší. Obdobně to platí i u organických

sloučenin, kdy molekuly s jednoduchými vazbami C-C jsou eluovány později, než molekuly s dvojnými nebo trojnými vazbami mezi uhlíky, protože jednoduché vazby jsou delší.

Retenci molekul při dělení na reverzních fázích ovlivňuje i pH, které má vliv na hydrofobicitu analytu. Z tohoto důvodu se při mnoha analýzách pro kontrolu pH používají pufrы, jako je například acetátový pufr. Tyto pufrы slouží k mnoha účelům. Mimo kontroly pH zajišťují neutralizaci náboje residuí silikagelu stacionární fáze a působí i neutralizaci náboje analytu [6].

Problematika analýzy malých polárních molekul u RP – HPLC

Z velké většiny je pro separaci malých organických molekul za pomoci RP – HPLC používána konvenční C18 kolona. Tento typ kolony však postrádá schopnost adekvátní retence malých polárních molekul pro jejich spolehlivou kvantifikaci. Tato skutečnost je významným limitem pro analýzu mnoha léčiv, jejich metabolitů nebo jiných biologicky významných sloučenin, které jsou přirozeně polární.

Jednou z možností, jak retenci polárních sloučenin při RP – HPLC na C18 koloně zvýšit, je derivatizace polárních skupin sloučenin na méně polární. Jedná se však o časově náročnou metodu a může vést ke vzniku vedlejších produktů. Druhou možností je přidání reagentu do mobilní fáze, který s polárními analyty vytvoří nepolární komplexy na základě párování iontů. Obě možnosti však často vedou k metodám, které postrádají reprodukovatelnost a robustnost. Navíc nízká těkavost (stálost) a eliminace iontů v důsledku párování iontů vedou k omezení možnosti použití detekce za pomoci hmotnostní spektrometrie při RP – HPLC.

Z těchto důvodů lze s výhodou použít stacionárních fází pro RP – HPLC, které vykazují retenci a selektivitu polárních analytů. Jedná se o chemicky modifikované fáze, kdy na uhlíkovém řetězci je navíc navázána polární skupina. Prostřednictvím této polární skupiny dochází k interakci s polárními analyty na základě různých mechanismů, a tak i k retenci analyzovaných látek, které konvenční kolona C18 nezadržuje [8].

3.1.7 Chromatografické kolony

Kolony pro HPLC jsou z materiálu, který musí odolávat relativně vysokým pracovním tlakům a zároveň chemickému působení mobilních fází a separovaných složek. Materiálem chromatografických kolon je většinou antikorozivní ocel nebo speciálně tvrzené borosilikátové sklo, lze použít i kombinaci obou materiálů. Jsou 5 – 30 cm dlouhé o vnitřním průměru 2 – 5 cm naplněné homogenní stacionární fází. Spoje mezi kolonou, dávkovacím zařízením a detektorem jsou kapilární (vnitřní průměr 0,5 mm) nejčastěji z nerez oceli [1].

3.1.8 Stacionární fáze

Pro účinné dělení látek hraje rozhodující roli náplň kolony, tj. kvalita sorbentu, velikost a stejnoměrnost částic, tvar, porozita, struktura. Je třeba použít dostatečně malá zrníčka sorbentu, která kladou prostupující kapalině značný odpor. Proto je nutno pracovat při vysokém tlaku [1].

Pro většinu HPLC aplikací se používají nemodifikované a nebo chemicky modifikované mikročástice silikagelu (velikost 3, 5, nebo 10 μm) nebo oxid hlinitý [1]. Tzv. chemicky vázané stacionární fáze se v HPLC používají nejčastěji. Na hydroxylové skupiny na povrchu silikagelových zrněk jsou vhodnou chemickou reakcí navázány různé radikály udávající fázi různou polaritou. Tak rozlišujeme nepolární chemicky vázané fáze (tzv. reverzní fáze) obsahující navázané uhlovodíkové řetězce zpravidla 18 (případně 8) uhlíkových atomů, středně polární fáze obsahující řetězec zakončený skupinami $-\text{NH}_2$, $-\text{CN}$ aj. nebo polární fáze s navázaným tříuhlíkatým řetězcem zakončený skupinami $-\text{O}-\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_2\text{OH}$ [2].

Pro dělení látek iontového charakteru ve vodě rozpustných léčiv, vitamínů, aminokyselin jsou určeny stacionární fáze s vlastnostmi iontoměničů. K dělení vysokomolekulárních sloučenin, jako jsou například bílkoviny a polysacharidy, se pak s výhodou používají polymerní gely. Chirální stacionární fáze umožňují separaci a stanovení optických izomerů [1].

3.1.9 Alternativní stacionární fáze

Pentafluorofenylpropylová fáze HS F5

HS F5 stacionární fáze nabízí vynikající selektivitu, která není tak běžná u tradičních alkylových stacionárních fází (C18, C8). Při analýze využívá několik selektivních mechanismů (vodíkové vazby, dipólové a aromatické interakce) včetně hydrofobních interakcí, čímž je zajištěno zvýšené rozlišení obtížně separovatelných sloučenin včetně vysoce polárních sloučenin, komplexních přírodních produktů, halogenovaných sloučenin, polohových izomerů a aromatických sloučenin [10], [14].

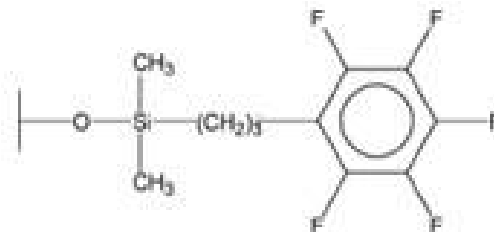
Pentafluorofenylpropylová kolona je vhodná svou retencí a selektivitou zejména pro bazické a halogenované látky. Navázaná fáze na této koloně umožňuje separaci, která je zpravidla odlišná od separace na C18, nicméně retenční časy jsou většinou stejné. Zpravidla jsou bazické látky zadržovány na HS F5 více než na C18 [11].

Charakteristiky HS F5 kolony

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

Struktura

obrázek 2 – struktura HS F5 fáze



Tento typ stacionární fáze obsahuje pentafluorofenylpropylový ligand navázaný na silikagel. Přestože struktura HS F5 je tvořena aromatickým jádrem (fenyl), je retence i selektivita od fenylové fáze odlišná. Díky přítomnosti navázaných atomů fluoru na fenylovém jádře se HS F5 stacionární fáze chová jako silná Lewisova kyselina. Dochází k přenosu elektronů atomů fluoru na fenyl. Elektrony jsou tak soustředěny na aromatickém jádře a atomy fluoru jsou elektrondeficitní, jsou tedy akceptory elektronového páru.

Discovery HS F5 separuje to, co C18 ne. Oproti stacionární fázi C18 vykazuje HS F5 i řadu dalších výhod. Nabízí jedinečnou selektivitu, výborný tvar píků, možnost použití i pro transparentní systém LC/MS a vysokou reprodukovatelnost výsledků. V závislosti na parametrech analýzy pracuje jako normální fáze nebo jako fáze reverzní.

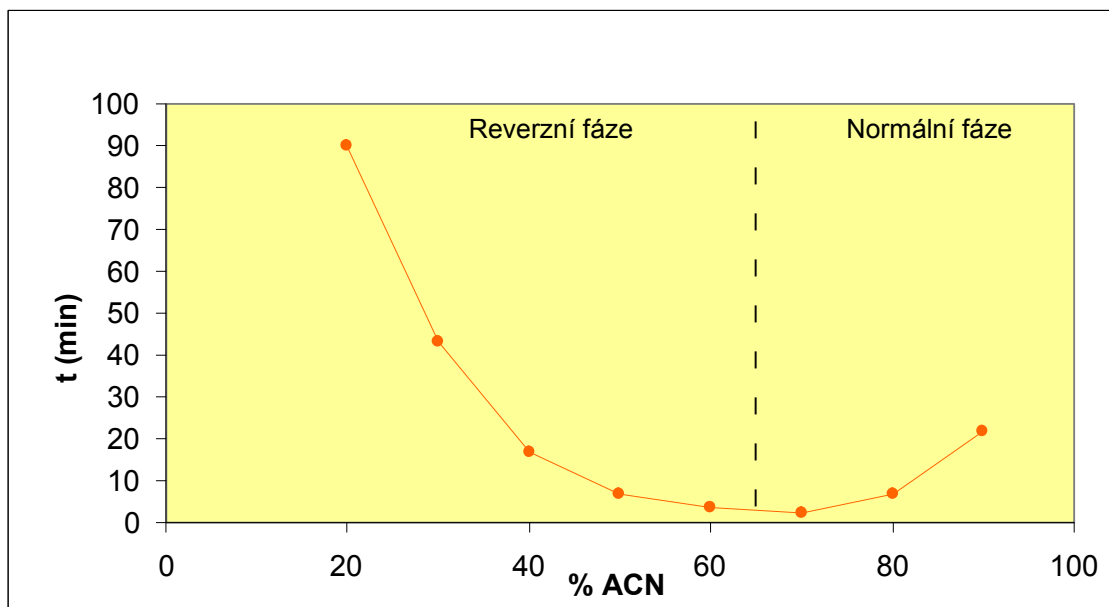
Retence a selektivita HS F5 stacionární fáze je ovlivňována charakterem mobilní fáze, zejména pH mobilní fáze a koncentrací a typem pufrů [10], [12], [13], [15].

U – profily

Při analýze látek na HS F5 je sledována změna retence v závislosti na měnícím se charakteru mobilní fáze. U některých látek jsou pak vykazovány tzv. U – profily retence, tzn. HS F5 se za určitých podmínek chová jako normální fáze, v jiném případě pak jako fáze reverzní.

Při zkoumání U- profilů na HS F5 koloně, byla sledována retence současně u látek bazických, neutrálních a látek kyselých. Významná retence ve tvaru U – profilu byla poskytována pouze látkami bazickými.

obrázek 3 - Schéma znázorňující závislost retenčního času analyzované látky v souvislosti s měnícím se procentuálním zastoupením acetonitrilu v mobilní fázi



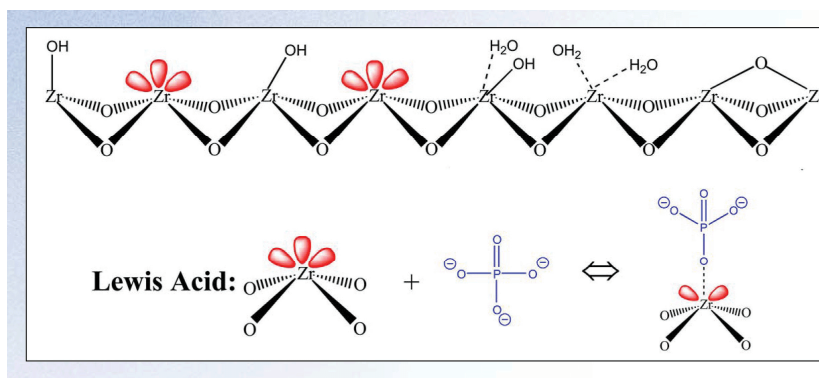
Na retenci se podílí jak hydrofobní mechanismy, tak iontová výměna, která je zprostředkována nejen pentafluorofenylpropylovou skupinou, ale i silanolovými skupinami, které musí být ionizovány. Oblast na schématu, kde se HS F5 fáze chová jako fáze normální (polární) je dána iontovou silou mobilní fáze [16].

Stacionární fáze na bázi oxidu zirkoničitého

Oxid zirkoničitý vykazuje mnoho vlastností vyhledávaných v HPLC. Vyznačuje se velkým povrchem, který lze reprodukovatelně připravit. Tvar jeho částic je sférický a velikost částic se nachází v úzkém intervalu 3 - 25 μ m. Vykazuje neobyčejnou chemickou a mechanickou stabilitu a odolnost. V závislosti na modifikaci stacionární fáze mohou být zirkoniové kolony stabilní v celém rozsahu pH (1-14) a při teplotách až do 200°C. Mechanická stabilita částic sorbentu je nezávislá na iontové síle mobilní fáze sorbentu.

Jeho vlastnosti jsou naprosto odlišné od vlastností silikagelu. Na jeho povrchu se nevyskytují silanolové skupiny, ale díky kladnému náboji Zr^{4+} se oxid zirkoničitý chová jako silná Lewisova kyselina. Z tohoto důvodu se musí do mobilních fází přidávat pufrы, které kompenzují silné interakce těchto center například s hydroxylovými, fosfátovými či karboxylovými skupinami v molekulách látek.

obrázek 4 – Povrch oxidu zirkoničitého a způsob vazby s Lewisovými bázemi.



Při analýze látek se uplatňují polární i nepolární interakce. Retence jednotlivých látek závisí na pH nebo koncentraci pufrů či solí. Selektivita kolony se stacionární fází na bázi oxidu zirkoničitého je ovlivněna chemickou strukturou aditiv použitých do mobilní fáze.

Kolony se stacionární fází na bázi oxidu zirkoničitého jsou široce užívány jak při normální HPLC, tak i při HPLC na reverzních fázích. Podobně jako silikagel může být stacionární fáze oxidu zirkoničitého na povrchu chemicky modifikována různými skupinami. Nemodifikovaný oxid zirkoničitý se používá v systému s normálními fázemi. Častěji je ale využíván v RP-HPLC. Povrch oxidu zirkoničitého může být modifikován tenkou vrstvou polybutadienu, polystyrenu nebo pyrolyticky vyloučeného uhlíku, které lze případně modifikovat ligandem C18. Zirkoniové kolony mohou být dále užívány i v iontově výměnné chromatografii, kdy je povrch oxidu zirkoničitého modifikován například tenkou vrstvou zesíťovaného polyetheleniminu – anexové kolony. Katexové kolony pak obsahují oxid zirkoničitý modifikovaný fosfáty.

Discovery Zr-PBD nabízí separaci podobnou separaci na C18. Výhodou oproti C18 je vysoká stabilita v širokém rozmezí hodnot pH a při vysokých teplotách. Discovery Zr-PS je zirkoniová stacionární fáze modifikovaná polystyrenem, která je vhodná pro separaci hydrofobních sloučenin a aminů. Discovery Zr-CarbonC18 poskytuje selektivitu velice odlišnou od C18. Je určena pro separaci látek kyselých, bazických a neutrálních. Discovery Zr-Carbon umožňuje separaci geometrických izomerů a diastereomerů [17], [18], [19], [20].

Stacionární fáze pro HILIC (Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography)

Hydrofilní interakční kapalinová chromatografie (HILIC) je jedním z nových trendů v kapalinové chromatografii. Tato chromatografická technika používá organické mobilní fáze a neutrální hydrofilní stacionární fáze a je určena pro separaci silně polárních a hydrofilních sloučenin, které mají často nízkou nebo vůbec žádnou retenci na reverzní fázi kolony.

HILIC může být chápána jako alternativní metoda chromatografie na normálních fázích, která využívá mobilní fáze mísitelné s vodou. Voda v mobilní fázi vytváří stagnantní vodnou vrstvu na povrchu stacionární fáze a přitom umožňuje rozdělování mezi vodnou vrstvou a mobilní fází. Separace látek je dosaženo prostřednictvím elektrostatických interakcí a mechanismu rozdělování. K eluci dochází zvýšením obsahu vody v mobilní fázi, tj. zvýšením polaritu mobilní fáze. Analyty jsou pak eluovány v pořadí rostoucí hydrofility, tedy v pořadí obráceném než při RP-HPLC. Retence je závislá na koncentraci a typu použitého pufru v mobilní fázi a pH mobilní fáze.

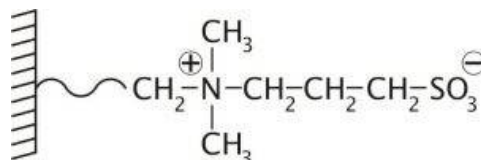
Jako mobilní fáze se nejčastěji používá acetonitril ve směsi s pufrem. Jako alternativu lze místo acetonitrilu použít isopropanol. Pro dosažení stejné retence je však nutné použít vyšší koncentrace isopropanolu, výsledná viskozita mobilní fáze je vyšší.

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

- a) neutrální stacionární fáze, u kterých se neuplatňují elektrostatické interakce (diolová stacionární fáze, amidová stacionární fáze)
- b) elektricky nabitě stacionární fáze, kdy se při separaci silně uplatňují i mechanismy elektrostatické interakce (aminopropylová stacionární fáze, samotný silikagel)
- c) „zwitterionické“ stacionární fáze, kdy se elektrostatické interakce uplatňují jen slabě (ZIC-HILIC, ZIC-pHILIC)

Jedná se o stacionární fáze na bázi silikagelu (ZIC-HILIC) nebo polymeru (ZIC-pHILIC) s kovalentně vázanou vysoce polární „zwitterionickou“ funkční skupinou (hybridní iontová skupina), která zaručuje vyšší stabilitu a robustnější HILIC separaci než konvenční fáze silikagelu nebo amino fáze [5], [21], [22], [23], [24].

obrázek 5 – „Zwitterionická“ skupina u ZIC-HILIC



ZIC-HILIC

Analytická kolona ZIC-HILIC je ideální pro separaci polárních a hydrofilních sloučenin jako jsou kyseliny a zásady, anionty a kationty, karbohydráty, metabolity, komplexy kovů, aminokyseliny, peptidy a další polární látky, které mají slabou retenci a neschopno se separují na reverzní fázi HPLC kolony.

ZIC-pHILIC

Tato analytická kolona se podobně jako ZIC-HILIC kolona užívá pro separaci polárních a hydrofilních látek. „Zwitterionická“ skupina je ale navázána na porézní částice polymeru a při separaci se uplatňují mechanismy hydrofilních interakcí společně s elektrostatickými mechanismy. Polymerní nosič umožňuje použití této analytické kolony i při extrémních hodnotách pH [23].

Jiné speciální stacionární fáze pro HILIC se prezentují různými principy separačních mechanismů.

Polymerní stacionární fáze

Polymerní stacionární fáze jsou stacionární fáze na bázi polymeru, nejčastěji polystyrendivynylbenzenu nebo polymethakrylátu. Vyznačují se velkým adsorpčním povrchem a stabilitou v celém rozsahu hodnot pH (1-14) a teplotní stabilitou při teplotách až do 200°C. Důležitou vlastností je pak zesíťování polymerní stacionární fáze, kdy více zesíťovaný polymer je tvrdší, ale křehčí. Nevýhodou polymerních fází je skutečnost, že částičky obsahují mikropóry o velikosti asi 1 nm, což zabraňuje přenosu hmoty zejména pro malé molekuly. Polymerní stacionární fáze jsou dále

omezeny maximálním pracovním tlakem na koloně a to 20 MPa. Stabilita polymerních stacionárních fází je omezena stabilitou funkčních skupin polymeru – pro methylakrylát je limitující stabilita esterové skupiny, pro akrylamid je limitující stabilita amidové skupiny. Další nevýhodou polymerních fází je závislost jejich účinnosti na organické složce mobilní fáze. Preferují se mobilní fáze ve složení tetrahydrofuran/voda nebo acetonitril/voda ve směsi s pufrem, který upravuje pH mobilní fáze [5], [25].

K dispozici jsou polymerní stacionární fáze na bázi polystyrendivynylbenzenu (Polymer X Phenomenex, PRP Hamilton, PL Hi-Plex Varian-Polymer Laboriem), polymerní stacionární fáze tvořené kopolymerem vinylalkoholu s vázanými uhlíkovými řetězci C18, C8, C4 (apHera Astec) nebo polymerní stacionární fáze na bázi polymethakrylátu (Hema Separon Tessek), které mohou navíc obsahovat vázané amoniové skupiny a epoxyskupiny (Hema Separon Bio Tessek).

Polymerní stacionární fáze se v závislosti na typu polymeru, který je tvoří, užívají k separaci látek charakteru proteinů, peptidů, malých proteinů, sacharidů, cukerných alkoholů, organických kyselin a tetracyklinů [26], [27], [28], [29], [30].

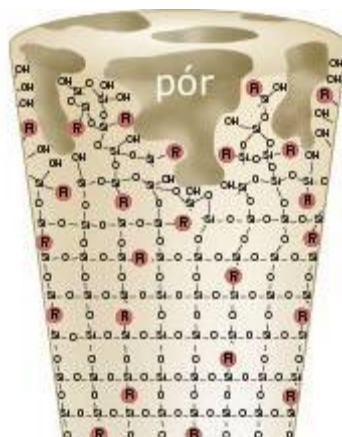
Hybridní stacionární fáze

Hybridní anorganicko-organické stacionární fáze kombinují nejlepší vlastnosti silikagelu, tj. vysokou účinnost a vynikající mechanickou stabilitu, s nejlepšími vlastnostmi polymerních sorbentů, tj. mimořádnou pH stabilitou a sníženým efektem reziduálních silanolů. Hlavní výhodou hybridních stacionárních fází je tedy možnost analýzy v širokém rozsahu hodnot pH. Ve srovnání se silikagelovou stacionární fází je počet volných silanolových skupin nižší, a proto se při separaci látek uplatňují podstatně slabší interakce. To se projeví zejména v bazickém prostředí, kdy dochází k ionizaci volných silanolových skupin. Díky hybridní stacionární fázi dochází k výraznému omezení chvostování bazických látek a symetrie píků je tak daleko lepší [25], [31].

Analytická kolona Gemini Phenomenex

Analytická kolona Gemini je produkována tzv. Twin-In-One technologií (Twin). Jedná se o analytickou kolonu na bázi silikagelu, kdy hybridní částice obsahují v celém svém objemu rovnoměrně rozložené částečně alkylované křemíkové atomy.

obrázek 6 – Struktura hybridní částice získané Twin technologií



Díky této skutečnosti se kolona Gemini vyznačuje mnoha výhodnými vlastnostmi. Vysoká účinnost je dána silikagelovým jádrem, ke kterému se analyzované látky dostanou prostřednictvím přítomnosti pórů ve struktuře povrchové vrstvy, odolnost stacionární fáze je dána organickou složkou na povrchu. Analytická kolona Gemini může pracovat v rozmezí hodnot pH 1-12 při zachování účinnosti a životnosti kolony a umožňuje analýzu širokého spektra látek od polárních bází až po nepolární kyseliny [26].

Analytická kolona Pathfinder Shimadzu

Analytická kolona Pathfinder je vhodná pro analýzu kyselých i bazických látek. Využívá technologii polymerní enkapsulace. Na základě chemické modifikace se rozlišuje několik druhů kolon Pathfinder:

a) Pathfinder AP

Je tvořena primárně hydrofobní vnější částí (C18), přičemž v blízkosti povrchu se nacházejí hydrofilní skupiny. Tato fáze je určena pro separace při podmínkách se sterickou selektivitou.

b) Pathfinder AS

Je optimalizovaná jako klasická C18.

c) Pathfinder EP

Jedná se o stacionární fázi, která má na povrchu přítomny aminové skupiny. Je vhodná pro analýzu polárních látek.

d) Pathfinder MR

Tato kolona obsahuje vnější část hydrofilní a je určena pro separaci polárních látek, aminů, proteinů či peptidů [34].

Analytická kolona XTERRA Waters

Syntéza této stacionární fáze je založena na reakci dvou organosilanů, jeden z nich tvoří silikagelovou matici, druhý do vznikající matrice vnáší methylsiloxanové jednotky. Vzniklé hybridní částice obsahují methylsiloxanové jednotky uvnitř i na povrchu. Patentově chráněná technologie OBD (Optimal Bed Density) zajišťuje stabilitu sorbentu. Pro potřeby RP-HPLC je povrch dále kovalentně chemicky modifikován buď trifunkčními silany za vzniku fází MS C8 a MS C18 optimalizovaných pro maximální chemickou stabilitu a určených pro LC-MS, nebo monofunkčními silany za vzniku fází RP8 a RP18, s vloženými karbamáty optimalizovaných pro minimální chvostování bazických látek.

Analytická kolona XTERRA je používána pro separaci kyselých, neutrálních nebo bazických látek [31], [32].

Analytická kolona XBridge Waters

Stacionární fáze XBridge strukturně vychází ze stacionární fáze XTERRA a v některé literatuře je označována jako XTERRA 2. generace. Využívá patentově chráněnou BEH technologii (Bridged Ethyl Hybrid), připravuje se reakcí tetraethoxysilanu s bis(triethoxysilyl)ethanem za vzniku polyethoxysilanové jednotky. Oproti stacionární fáze XTERRA se vyznačuje podstatně zvýšenou chemickou odolností v silně bazickém prostředí a separační účinností. Výborná tlaková odolnost umožňuje použití stacionární fáze XBridge i pro UPLC.

Stacionární fáze XBridge může být dále chemicky modifikována uhlovodíkovým alkylem C8 nebo C18. Stacionární fáze Shield RP C18 obsahuje vložené polární skupiny a uplatňuje se při separaci v bazické oblasti pH. Dále je k dispozici stacionární fáze s fenylovým ligandem navázaným na silikagel

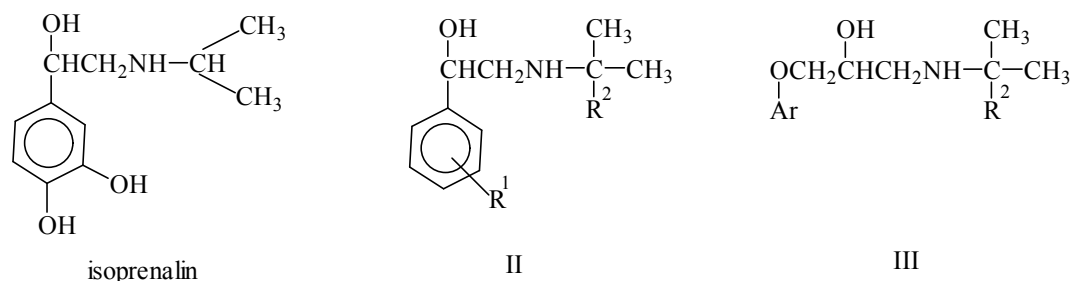
alkylovým spojovacím řetězcem C6, která je vhodná pro analyty s aromatickým jádrem [31], [32], [33].

3.2 Testované skupiny látek

3.2.1 β -SYMPATOLYTIKA

Tyto látky (také zvané β -adrenolytika či β -blokátory) jsou kompetitivní antagonisté β -receptorů. Jedná se o terapeuticky velmi významnou skupinu. Strukturně jsou si běžná β -sympatolytika (s výjimkou timololu a sotalolu) chemicky vzájemně blízce příbuzná a mají jednotnou strukturu odvozenou od isoprenalinu [35], [36].

obrázek 7 – Struktura β -sympatolytik



β -sympatolytika typu II vznikají obměnou aromatické části molekuly

β -sympatolytika typu III vznikají prodloužením spojovacího řetězce vsunutím skupiny -OCH₂- mezi aromatickou část molekuly a uhlík s alkoholickou skupinou [38]

Na izopropanolovou strukturu je připojena izopropylaminová skupina, respektive terciární butylaminová skupina a substituovaná fenoxyskupina. Substituenti určují stupeň hydrofobie. V základní struktuře se nachází chirální uhlík. Sympatolytický účinek má pouze (-)-forma [35].

Mechanismus účinku

β -sympatolytika reagují jak s β_1 -receptory, tak i s β_2 -receptory. Jejich farmakologický účinek a tím i terapeutické použití jsou dány vyřazením přednostně β_1 -receptorů. Na srdci oslabují pozitivně chronotropní, pozitivně dromotropní, pozitivně batmotropní a pozitivně ionotropní účinek sympatiku a stejně i zvýšení spotřeby kyslíku. Po podání β -sympatolytik proto klesá tepová frekvence, snižuje se excitabilita srdce, redukuje se maximální síla kontrakce i spotřeba kyslíku

myokardem. Účinek je tím větší, čím silněji byl tonus sympatiku zvýšen. β -sympatolytika mají i metabolické účinky. Antagonizují katabolické účinky sympatiku (tj. glykogenolýzu, lipolýzu a kalorigenní účinek). Při terapii β -sympatolytiky může být významně omezena schopnost organismu kompenzovat rozvíjející se hypoglykémii prostřednictvím zvýšení tonu sympatiku. U kardioselektivních sympatolytik je riziko vzniku metabolických účinků nižší, protože probíhají pod vlivem β_2 -receptorů. Metabolické účinky jsou účinky nežádoucí stejně tak jako účinky na bronchiální systém, kdy je inhibován relaxační β_2 -účinek na hladké svalstvo bronchů [35], [36].

Klasifikace β -sympatolytik

Betablokátory dělíme dle jejich afinity a vazby k β_1 - a β_2 -receptorům na neselektivní a kardioselektivní. Některé betablokátory mohou mít i částečnou β -agonistickou aktivitu – vnitřní sympatomimetickou aktivitu (ISA), případně i aditivní vazodilatační efekt, nejčastěji zprostředkovaný současnou blokadou α -receptorů [37].

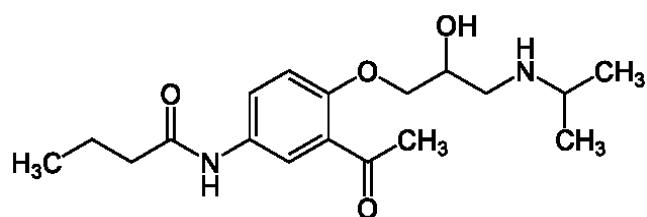
Použití

Tyto látky jsou používány k terapii hypertenze, ischemické chorobě srdeční, srdečních arytmií, srdeční nedostatečnosti, infarkt myokardu a profylaxi reinfarktu. Z nekardiálních indikací jsou užívány k léčbě hyperthyreózy, úzkostných stavů, lokální léčbě glaukomu a profylaxi migrény [36].

Vybrané látky ze skupiny:

Acebutolol

obrázek 8 – Struktura acebutololu



Sumární vzorec: $C_{18}H_{28}N_2O$

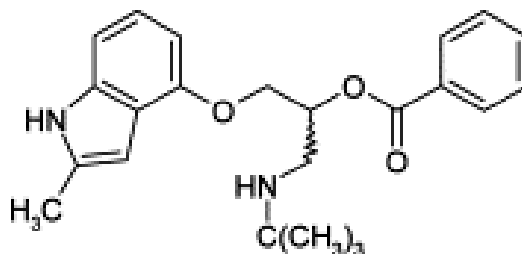
Molární hmotnost: 336.426 g/mol

pK_a: 9.4

Bopindolol

Jedná se o proléčivo, které se metabolickými pochody v organismu přemění na aktivní substanci pindolol [39].

obrázek 9 – Struktura bopindololu



Sumární vzorec: C₂₃H₂₈N₂O₃ *Molární hmotnost:* 380,48 g/mol

3.2.2 NEUROLEPTIKA

Neuroleptika (antipsychotika) jsou látky, které mají při dlouhodobém podávání schopnost potlačovat psychotické symptomy (především halucinace a bludy) u schizofrenie, schizoafektivních psychóz a manické fáze maniodepresivní psychózy. Upravují chorobně narušené myšlení, chování, vnímání a jednání. Látky jednotlivých chemických skupin se od sebe liší nejen intenzitou účinku, ale i farmakodynamickými vlastnostmi [39].

Mechanismus účinku

Všechna neuroleptika mají afinitu k dopaminovým a 5-hydroxytryptaminovým (5-HT) receptorům a v rozdílné míře i k receptorům pro acetylcholin, noradrenalin a histamin. Částečná blokáda uvedených receptorů při terapeutickém dávkování může vyvolat rozdílné nežádoucí účinky. Jakým způsobem je antipsychotický účinek vyvolán a proč nastává teprve po dlouhé latenci, není stále detailně vyjasněno. Antipsychotický účinek však zřejmě koreluje s „akutní“ afinitou neuroleptik k určitým podtypům dopaminového receptoru a 5-HT-receptoru [35].

Klasifikace neuroleptik

Neuroleptika se dělí dle chemické struktury nebo dle jejich klinického účinku.

Dle chemické struktury se neuroleptika rozlišují na:

- a) deriváty fenothiazinu
- b) deriváty thioxanthenu
- c) deriváty dibenzo[*b,f*]thiepinu a jejich analoga
- d) deriváty butyrofenonu a difenylbutylpiperidinu
- e) neuroleptika jiných struktur[41]

Dle klinického účinku se rozlišují neuroleptika:

- a) klasická („1.generace“), která se dále dělí na neuroleptika sedativní a incizivní
Sedativní neuroleptika jsou málo selektivní, ovlivňují řadu receptorů. V důsledku toho se po podání těchto neuroleptik může dostavit řada účinků, a to i nežádoucích. Typická je výrazná sedace, která je způsobena blokádou α_1 -

adrenergních a H_1 receptorů, úprava spánku a nálady (blokáda $5-HT_2$ receptorů). Často se po podání sedativních neuroleptik vyskytují i antimuskarinové nežádoucí účinky v důsledku blokády cholinergních receptorů. Naopak oproti incizivním neuroleptikům se méně často dostaví nežádoucí účinky extrapyramidové (blok D_2 -receptorů ve striatu).

Oproti sedativním neuroleptikům incizivní neuroleptika blokují D_2 -receptory mnohem selektivněji. Jsou tak vhodnější pro udržovací léčbu, protože po jejich podání není hypnosedativní účinek tak výrazný a výskyt antimuskarinových nežádoucích účinků je méně častý. Na druhou stranu se však extrapyramidové nežádoucí účinky vyskytují s vyšší frekvencí [42].

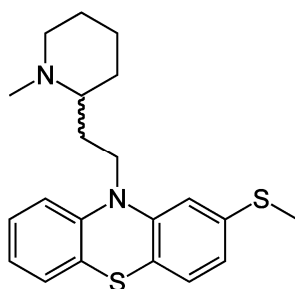
b) Atypická („2.generace“), která se dále rozlišují na:

- Multireceptorové antagonisty (MARTA) – současně blokují $D_1 - D_4$, $5-HT_2$, H_1 , α_1 a cholinergní receptory
- Antagonisty serotoninových a dopaminových receptorů (SDA) – blokace D_2 , $5-HT_2$ a α_1 receptorů
- Selektivní D_2/ D_3 antagonisté
- Parciální dopaminoví agonisté – parciální agonisté D_2 , D_3 , a $5-HT_{1A}$ receptorů [42]

Vybrané látky ze skupiny:

Thioridazin

obrázek 10 – Strukturní vzorec thioridazinu



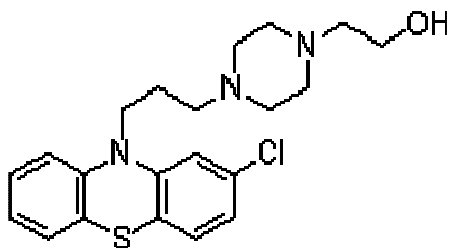
Sumární vzorec: $C_{21}H_{26}N_2S_2$

Molární hmotnost: 370,577 g/mol

pK_a : 9,5 [40]

Perphenazin

obrázek 11 – Strukturní vzorec perphenazinu



Sumární vzorec: C₂₁H₂₆ClN₃OS *Molární hmotnost:* 403,97 g/mol

pK_a: 7,94 [40]

3.2.3 LOKÁLNÍ ANESTETIKA

Lokální anestetika jsou látky, které přechodně tlumí vyvolání bolesti reverzibilní blokádou vedení vzruchu senzitivním neuronem, používají se k místnímu znecitlivění v blízkosti místa jejich aplikace nebo v úseku inervovaném příslušným nervovým kmenem. Vedou tedy ke stavu, který nazýváme lokální anestézie. Podle místa podání, případně dle ovlivněné oblasti, se rozeznává lokální anestézie povrchová (topická na kůži a sliznice), infiltrační (v místě infiltrovaném anestetikem), svodná (blok nervového kmene, anestézie v místě zásobovaném určitým nervovým svazkem; sem patří i anestézie epidurální) a míšní (subarachnoidální - anestetikum podáno do mozkomíšního moku) [35], [43].

Lokálně anestetický účinek je podmíněn chemickou strukturou, která je pro všechny lokální anestetika společná. Nezbytná je přítomnost sekundární nebo terciární aminoskupiny, která je po kvarternizaci hydrofilní, polárního karboxylového uhlíku buď esterického, nebo amidového, přičemž odstup mezi oběma aktivními centry je tvořen 2-4 atomy, a apolárním jádrem. Lokální anestetika jsou látky amfifilní. Vedle chemické struktury je účinek lokálních anestetik určován jejich lipofilitou a bazicitou. Bazicita je vyjádřena hodnotou pK_a , jejíž hodnota se u klinicky významných anestetik pohybuje v rozmezí 7,6-8,9 [38].

Mechanismus účinku

Místem zásahu lokálních anestetik jsou aferentní nervy a vnímavé periferní orgány, kde způsobují inhibici vstupu sodíkových iontů napěťově řízenými sodíkovými kanály. Vstup sodíku je podmínkou vzniku vedení impulzu. Blokáda senzitivních neuronů není specifická a při vyšších koncentracích lokálních anestetik může docházet i k blokáde nervů motorických. Při celkovém podání jsou lokální anestetika značně toxická, protože dochází k ovlivnění i jiných struktur – například buněk CNS a buněk myokardu. Četná lokální anestetika vykazují i účinek vasodilatační, proto se k nim při praktickém použití často přidává vazokonstrikční látka [35].

Klasifikace lokálních anestetik

Z praktického hlediska se při jejich třídění uplatňuje chemické kritérium, kterým je charakter řetězce mezi lipofilní aromatickou částí a bazickou hydrofilní částí. S přihlédnutím k této skutečnosti se lokální anestetika rozdělují na:

- anestetika esterového typu
- anestetika amidového a anilinového typu

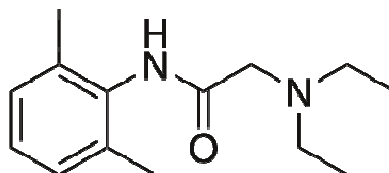
Použití

Lokální anestetika se používají především k znecitlivění ohraničených oblastí tkáně při chirurgických a bolestivých diagnostických zákrocích. Dále mohou být indikovány při delších bolestivých stavech jako jsou například popáleniny, pooperační bolesti. Některá lokální anestetika se používají i k terapii srdečních arytmií [38].

Vybrané látky ze skupiny:

Lidokain

obrázek 12 – Strukturální vzorec lidokainu



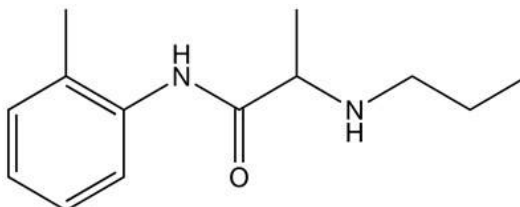
Sumární vzorec: C₁₄H₂₂N₂O

Molární hmotnost: 234,34 g/mol

pK_a: 7,86

Prilokain

obrázek 13 – Strukturální vzorec prilokainu



Sumární vzorec: C₁₃H₂₀N₂O

Molární hmotnost: 220,31 g/mol

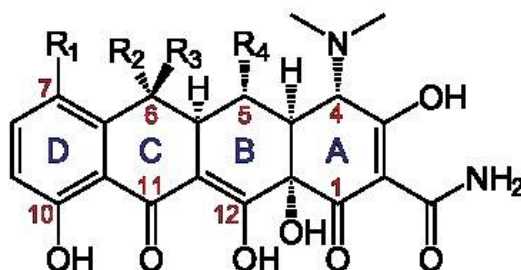
pK_a: 7,89

3.2.4 TETRACYKLINY

Tetracykliny tvoří velkou skupinou širokospektrálních antibiotik, které jsou produkovány některými druhy rodu *Streptomyces*. Získávají se biosynteticky jako produkt metabolismu těchto bakterií, polosyntetické deriváty potom chemickou modifikací izolovaných produktů. Působí primárně bakteriostaticky především proti intracelulárním gramnegativním bakteriím a též proti mnoha druhům grampozitivních bakterií, i když v současnosti je již problémem velké rozšíření rezistence.

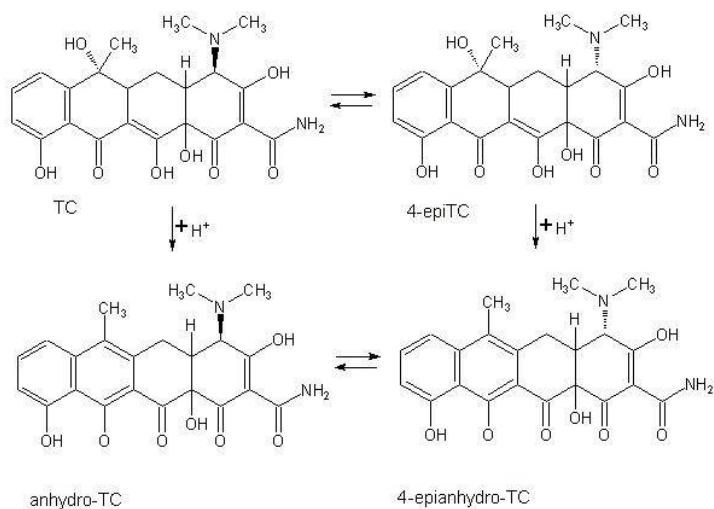
Chemicky se jedná o deriváty oktahydrotetracenu a jejich molekula je tedy tvořena čtyřmi šestičlennými lineárně kondenzovanými cykly, odtud tedy název tetracykliny. V závislosti na charakteru substituce obsahují až 6 chirálních center na uhlících 4, 4a, 5, 5a, 6 a 12a, přičemž v látkách přírodního původu i v polosyntetických derivátech je obsažen vždy jen jeden izomer.

obrázek 14 – Základní struktura tetracyklinů



Vzhledem k přítomnosti kyselých fenolických a enolických skupin a bazické dimethylaminoskupiny jsou to amfoterní molekuly, které tvoří soli s bazemi i s kyselinami. V klinické praxi se nejvíce používají hydrochloridy, případně dusičnany. Podmínkou pro zachování aktivity tetracyklinů je nutná přítomnost základního skeletu vytvářejícího dva chromoforní keto-enol systémy na uhlíku C₍₁₎ až C₍₄₎ a C₍₇₎ až C₍₁₂₎, hydroxylové skupiny na C_(12a) a bazické funkce na C₍₄₎, přítomnost amidové funkce na C₍₂₎ a zachování prostorového uspořádání molekuly na C₍₄₎ a C₍₅₎. Působením silně kyselého nebo silně bazického prostředí vede u tetracyklinů s hydroxylovou skupinou na uhlíku C₍₆₎ k dehydrataci a následně aromatizaci kruhu C (anhydrotetracykliny). K epimerizaci dimethylaminoskupiny na uhlíku C₍₄₎ naopak dochází v roztoku mírně kyselém prostředí. Tyto jevy jsou u tetracyklinů nežádoucí a vedou ke vzniku méně účinných a více toxických produktů [39], [44].

obrázek 15 – Degradace tetracyklinů



Mechanismus účinku

Tetracykliny pronikají difúzí přes buněčnou stěnu bakterií a přes cytoplasmatickou membránu se do bakteriální buňky dostávají aktivním transportem. Uvnitř buňky citlivých mikroorganismů se reverzibilně váží na receptor 30S podjednotky ribozomů. Na tomto místě tetracyklin zabrání vazbě aminoacyl-transferové-RNA a messenger-RNA a nemůže tak dojít k přidávání aminokyselin k prodlužujícímu se, právě tvořenému peptidovému řetězci. Dochází k inhibici proteosyntézy a zástavě růstu bakterie, tetracykliny působí bakteriostaticky. Bakteriostatická účinnost tetracyklinů se týká všech mikroorganismů citlivých na penicilin a navíc i značné množství gramnegativních patogenů. Jedná se o širokospektrá antibiotika, která jsou účinná proti řadě aerobních i anaerobních mikroorganismů, vůči působení tetracyklinů jsou citlivé i chlamydie, mykoplazmata, rickettsie, spirochety a rovněž působí i na některá protozoa [35], [44].

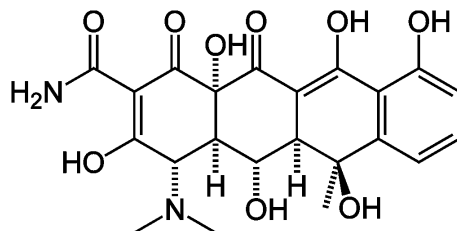
Použití

Tetracykliny jsou léčiva volby při infekcích vyvolaných *Mycoplasma pneumoniae*, chlamydiemi, při lymfagranuloma inguinale, při ornitózách, brucelózách a rickettsiázách, dále při infekcích vyvolaných yersiniemi a boreliózách. Tetracykliny jsou dokonce účinné u amebióz a lze je účelně použít i k profylaxi malárie. Indikovány jsou i při bakteriálních infekcích žlučových, močových a pohlavních cest. Je-li k dispozici antibiogram, který podává informace o citlivosti původců vůči tetracyklinům, spektrum použití tetracyklinů se dále rozšiřuje [35].

Vybrané látky ze skupiny:

Oxytetracyklin

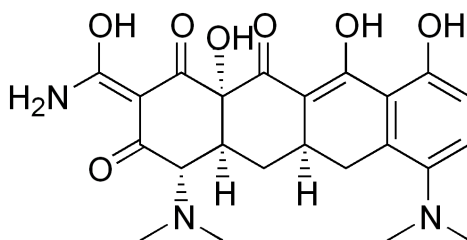
obrázek 16 – Struktura tetracyklinu



Sumární vzorec: $C_{22}H_{24}N_2O_9$ *Molární hmotnost:* 460,434 g/mol
pK_a: 9,1 (dimethylaminoskupina)

Minocyklin

obrázek 17 – Struktura minocyklinu



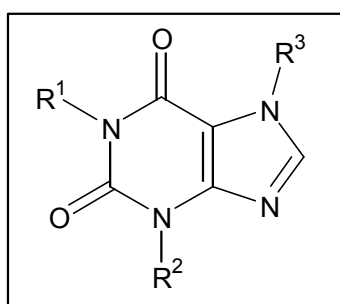
Sumární vzorec: $C_{23}H_{27}N_3O_7$ *Molární hmotnost:* 457,477 g/mol

3.2.5 DERIVÁTY METHYLYXANTINU

Deriváty methylxantinu jsou methylované deriváty xantinu (2,6-dioxypurin), které se řadí mezi malou skupinu purinových alkaloidů. Zahrnují farmaceuticky významné látky jako jsou kofein, theofylin, theobromin. Drogy, které tyto přírodní methylxantiny obsahují, se řadí k potravinám a slouží jako surovina pro izolaci čistých alkaloidů, které jsou produkty jejich sekundárního metabolismu. Jinou možností získání methylxantinů je jejich průmyslová výroba methylací xantinu, který se získává z kyseliny močové. Zdrojem kyseliny močové je guano (obsah až 25%).

Deriváty methylxantinu jsou dusíkaté sloučeniny převážně bazického charakteru. Atomy dusíku, které se v jejich molekule nacházejí, však nejsou původem z aminokyselin, a proto se purinové alkaloidy označují jako pseudoalkaloidy. Chemicky se tyto pseudoalkaloidy mezi sebou liší počtem methylových skupin a jejich umístěním na xantinovém bicyklu. V důsledku toho se mění i jejich fyzikálně-chemické vlastnosti [45], [46], [47].

obrázek 18 – Struktura methylxantinů



R1	R2	R3	Pseudoalkaloid
CH3	CH3	H	theofylin
H	CH3	CH3	theobromin
CH3	CH3	CH3	kofein

Methylxantiny jsou nejdůležitější skupinou analeptik, látek s centrálně stimulačním účinkem působících na oběhové a dýchací ústrojí. Ovlivňují stimulaci CNS, uvolnění hladkého svalstva především plic a cév a stimulaci sekrece různých tkání. Analeptický účinek na centra v prodloužené míše se projevuje až sekundárně, primární je jejich psychostimulační efekt. Centrální účinek methylxantinových derivátů do jisté míry vzájemně souvisí s jejich fyzikálně-chemickými vlastnostmi, zejména s jejich rozpustností ve vodě (rozdělovacím koeficientem) a s hodnotami jejich pK_a a pK_b . Kofein má výrazněji vyznačený účinek centrální než theofylin. Užívá se jako centrální analeptikum a psychostimulans. Theobromin centrálně budivý účinek prakticky nemá, ale s theofylinem mají naopak silný diuretický efekt,

který je u kofeinu menší. Theofylin a theobromin se vyznačují především účinkem periferním [35], [39], [48].

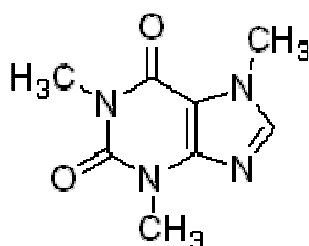
Mechanismus účinku

Deriváty methylxantinů působí na organismus pravděpodobně prostřednictvím neselektivní inhibice adenosinových receptorů. V důsledku strukturální podobnosti kofeinu, theofylinu a theobrominu s adenosinem dochází k jejich navázání na adenosinové receptory, a tak k ovlivnění řady fyziologických procesů v organismu. Další možností působení methylxantinů je neselektivní inhibice fosfodiesterázy, která aktivuje dekompozici 3',5'-cAMP [35], [39], [49].

Vybrané látky ze skupiny:

Kofein

obrázek 19 – Struktura kofeinu

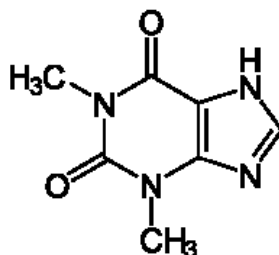


Sumární vzorec: C₈H₁₀N₄O₂

Molární hmotnost: 194,19 g/mol

Theofylin

obrázek 20 – Struktura theofylinu



Sumární vzorec: C₇H₈N₄O₂

Molární hmotnost: 180,164 g/mol

pK_a: 8,79, *pK_b:* 13-14

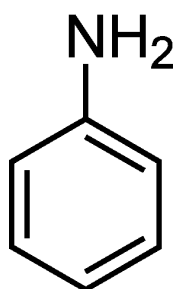
3.2.6 ANILIN

Anilin

Anilin, nazývaný též aminobenzen, benzenamin nebo fenylamin, je bezbarvá olejovitá kapalina pro lidský organismus značně toxická. V přírodě se nachází v černouhelném dehtu, průmyslově se vyrábí redukcí nitrobenzenu. Používá se při výrobě barviv a léčiv. V současnosti má tato látka největší využití jako reakční komponenta při výrobě polyuretanů.

Jedná se o nejjednodušší primární aromatický amin, kdy je primární aminoskupina vázána přímo na aromatické jádro. Anilin se chová jako slabá báze a ve srovnání s alifatickými aminy je to báze nejslabší, protože volný elektronový pár dusíku je součástí konjugovaného systému π elektronů aromatického jádra [39], [50]. Tato látka byla vybrána k testovanému souboru látek jako příklad jednoduché aromatické bazické sloučeniny.

obrázek 21 – Struktura anilinu



Sumární vzorec: C₆H₇N

Molární hmotnost: 93,13 g/mol

pK_a: 4.63 (pK_b = 9,3) [50]

4 Experimentální část

4.1 Materiály a pomůcky

4.1.1 Standardy, vzorky a chemikálie

Acebutolol (Sigma Aldrich Chemie, Germany)
Bopindolol (Sigma Aldrich Chemie, Germany)
Thioridazin (Sigma Aldrich Chemie, Germany)
Perphenazin (Sigma Aldrich Chemie, Germany)
Lidokain (Sigma Aldrich Chemie, Germany)
Prilokain (Sigma Aldrich Chemie, Germany)
Oxytetracyklin (Sigma Aldrich Chemie, Germany)
Minocyklin (Sigma Aldrich Chemie, Germany)
Kofein (Sigma Aldrich Chemie, Germany)
Theofylin (Sigma Aldrich Chemie, Germany)
Anilin (Lachema Brno, ČR)
Acetonitril (Sigma Aldrich Chemie, Germany)
Destilovaná voda
Amoniak 25% (Sigma Aldrich Chemie, Germany)
Kyselina fosforečná 85% (Sigma Aldrich Chemie, Germany)
Kyselina octová (Sigma Aldrich Chemie, Germany)

4.1.2 Přístroje, podmínky separace

Chromatografický systém LC Shimadzu Prominence

<i>Chromatograf:</i>	3xpumpa LC-20AD Degasser DGU-20A5 Autosampler SIL-20AC Termostat CTO-20AC Komunikační modul CBM-20A
<i>Detektor:</i>	DAD detektor SPD-M20A
<i>Kolona:</i>	Discovery HS F5, 100x4 mm, 3 µm částice (Sigma Aldrich)

<i>Dávkování:</i>	15 µl
<i>Detekce:</i>	zvolena podle absorpčního maxima testované látky
<i>Mobilní fáze:</i>	acetonitril - voda acetonitril - kyselina fosforečná 0,085% acetonitril - acetátový pufr pH 7
<i>Typ eluce:</i>	isokratická eluce v různých testovaných poměrech organické a vodné složky
<i>Průtoková rychlost:</i>	1,0 - 2,0 ml/min
<i>Vyhodnocení:</i>	chromatografický software Shimadzu LC Solution

Ultrazvuková lázeň: Bandelin SONOREX RK100, Berlín, SRN

Analytické váhy: Sartorius 2004 MP, SRN

pH metr: Hanna instruments

4.2 Příprava roztoku standardů testovaných skupin látek

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

Navážky látek:

Acebutolol m = 0,0093 g	Bopindolol m = 0,0092 g
Perphenazin m = 0,0103 g	Thioridazin m = 0,0104 g
Lidokain m = 0,0098 g	Prilokain m = 0,0097 g

Oxytetracyklin

m = 0,0095 g

Minocyklin

m = 0,0093 g

Kofein

m = 0,0095 g

Theofylin

m = 0,0097 g

Anilin

m = 0,0092 g

4.3 Příprava mobilní fáze

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

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

4.3.2 Mobilní fáze pro sérii analýz č. 2: Acetonitril - kyselina fosforečná H₃PO₄ 0,085%

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

4.3.3 Mobilní fáze pro sérii analýz č. 3: Acetonitril - acetátový pufr pH 7

Vodná fáze mobilní fáze obsahující acetátový pufr byla připravena smísením 570,00 µl kyseliny octové a 1000 ml destilované vody v kádince, upravením pH vodné fáze na pH metru pomocí amoniaku 25% na pH 7 za stálého míchání magnetickým míchadlem a následným přefiltrováním za pomoci vakuové filtrace z důvodu odstranění možných nečistot.

4.4 Popis práce

Na koloně Discovery HS F5 byly sledovány retenční časy testovaných skupin látek v závislosti na změnách složení mobilní fáze při teplotě 30 °C.

Při sledování U – profilů na Discovery HS F5 koloně byly použity tři různé mobilní fáze. Ve všech byl obsažen acetonitril, rozdíl byl ve složení vodné fáze, která udávala pH mobilní fáze. Všechny retenční časy látek byly přepočítány na jednotný průtok $2,0 \text{ ml min}^{-1}$. Při jednotlivých měřeních bylo za pomoci chromatografického softwaru LC Solution a směšovacího zařízení HPLC měněno procentuální zastoupení acetonitrilu a vodné fáze v mobilní fázi.

4.5 Výsledky analýzy

4.5.1 Testovaná skupina látek č. 1: β -SYMPATOLYTIKA

Analýza č. 1: Mobilní fáze: Acetonitril - H₂O

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

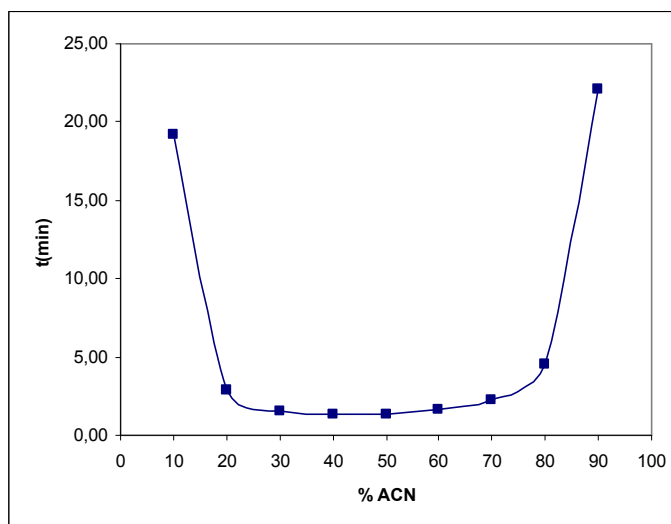
Analýza č. 2: Mobilní fáze: Acetonitril - H₃PO₄ 0,085%

Acebutolol

tabulka 1 – Vliv složení mobilní fáze na retenční časy acebutololu

obrázek 22 – Závislost retenčního času na procentuálním zastoupení acetonitrilu v MF

Acebutolol	
ACN(%)	t _r (min)
10	19,25
20	2,92
30	1,55
40	1,33
50	1,37
60	1,68
70	2,30
80	4,57
90	22,06

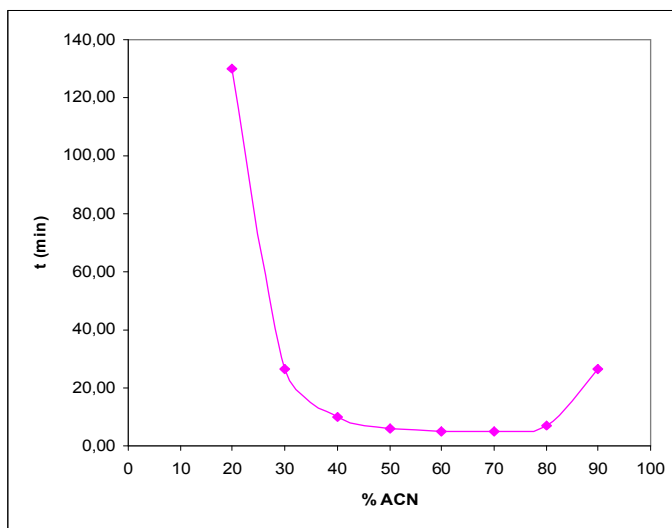


Bopindolol

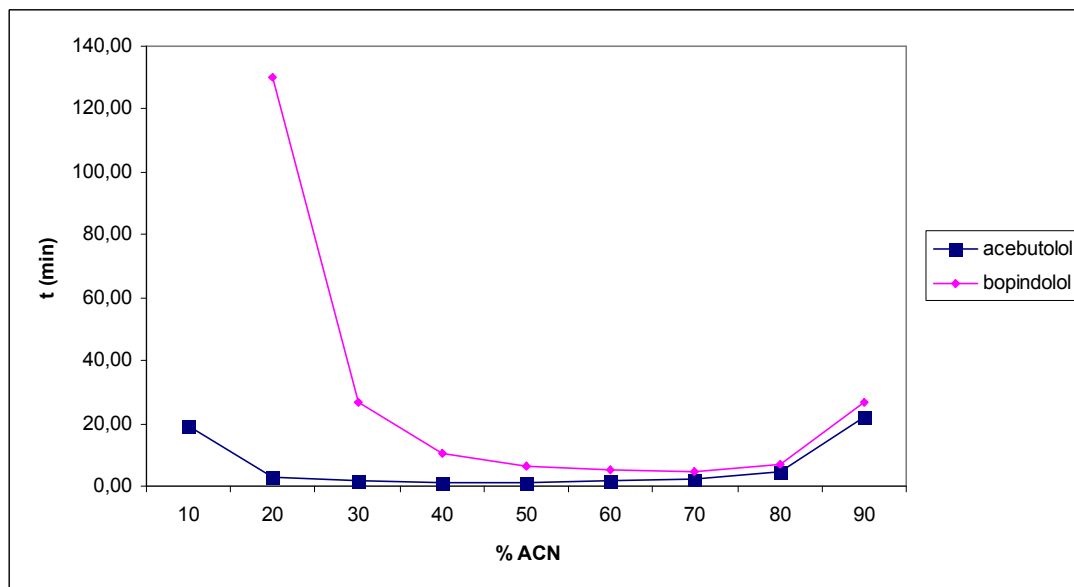
tabulka 2 – Vliv složení mobilní fáze na retenční časy bopindololu

obrázek 23 – Závislost retenčního času na procentuálním zastoupení acetonitrilu v MF

Bopindolol	
ACN(%)	t _r (min)
10	-
20	130,00
30	26,67
40	10,24
50	6,13
60	4,97
70	4,88
80	7,23
90	26,65



obrázek 24 – Retence acebutololu a bopindololu v závislosti na procentuálním zastoupení ACN v MF



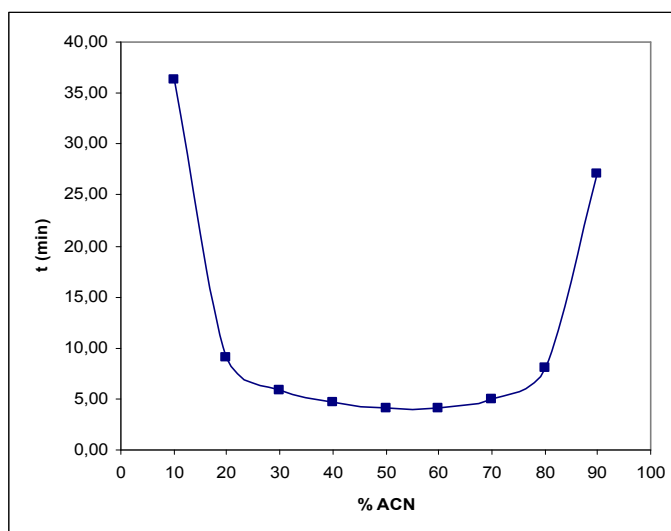
Analýza č. 3: Mobilní fáze: Acetonitril – Acetátový pufr pH 7

Acebutolol

tabulka 3 – Vliv složení mobilní fáze na retenční časy acebutololu

obrázek 25 – Závislost retenčního času na procentuálním zastoupení acetonitrilu v MF

Acebutolol	
ACN(%)	t _r (min)
10	36,31
20	9,14
30	5,83
40	4,62
50	4,11
60	4,14
70	4,92
80	8,08
90	27,09

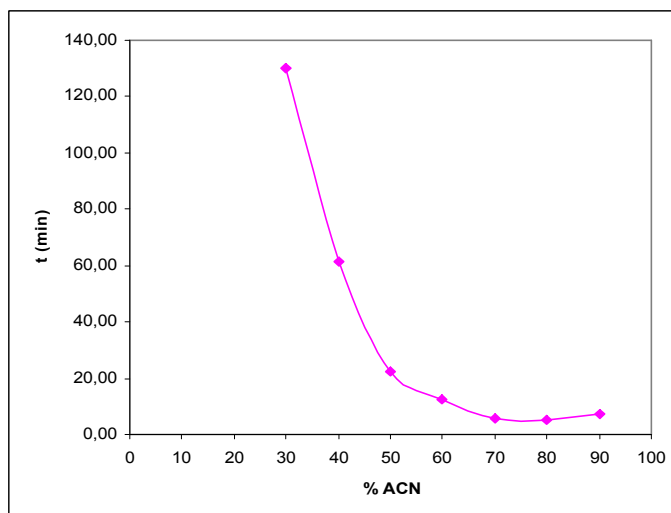


Bopindolol

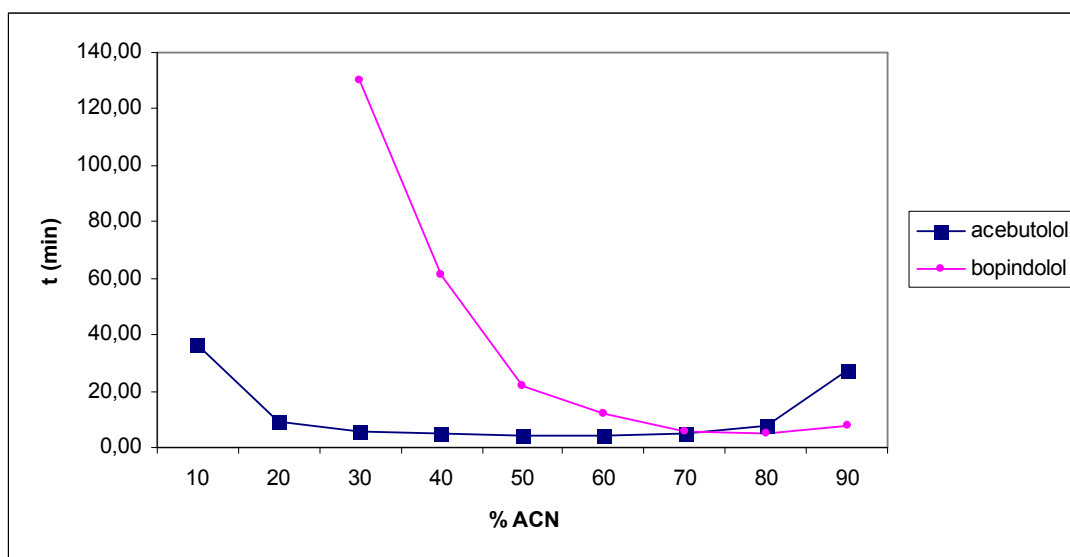
tabulka 4 – Vliv složení mobilní fáze na retenční časy bopindololu

obrázek 26 – Závislost retenčního času na procentuálním zastoupení acetonitrilu v MF

Bopindolol	
ACN(%)	t _r (min)
10	-
20	-
30	130,00
40	61,30
50	22,13
60	12,30
70	5,48
80	5,07
90	7,48



obrázek 27 – Retence acebutololu a bopindololu v závislosti na procentuálním zastoupení ACN v MF



4.5.2 Testovaná skupina látek č. 2: NEUROLEPTIKA

Analýza č. 1: Mobilní fáze: Acetonitril – H₂O

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

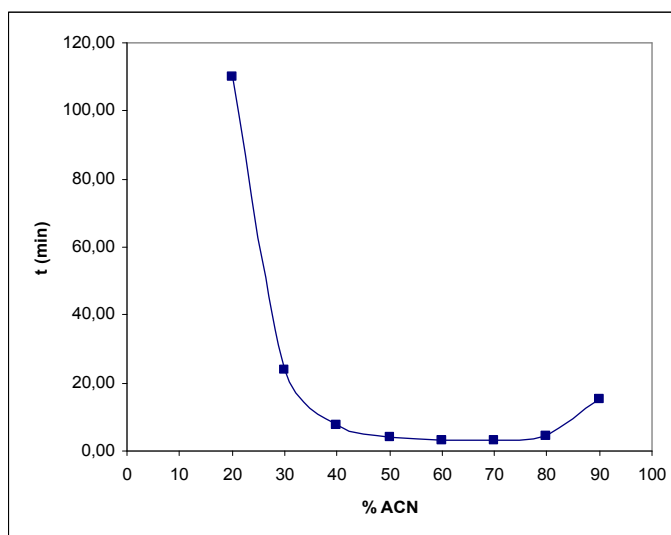
Analýza č. 2: Mobilní fáze: Acetonitril – H₃PO₄ 0,085%

Thioridazin

tabulka 5 – Vliv složení mobilní fáze na retenční časy thioridazinu

obrázek 28 – Závislost retenčního času na procentuálním zastoupení acetonitrilu v MF

Thioridazin	
ACN(%)	t _r (min)
10	-
20	110,00
30	24,00
40	7,73
50	4,17
60	3,09
70	3,07
80	4,53
90	15,41

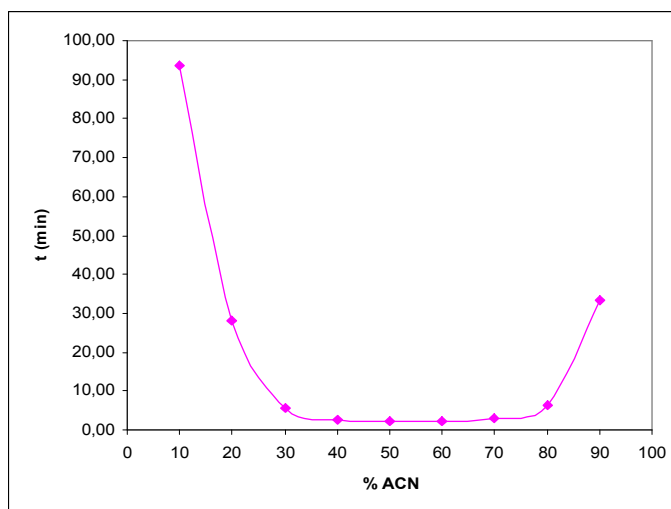


Perphenazin

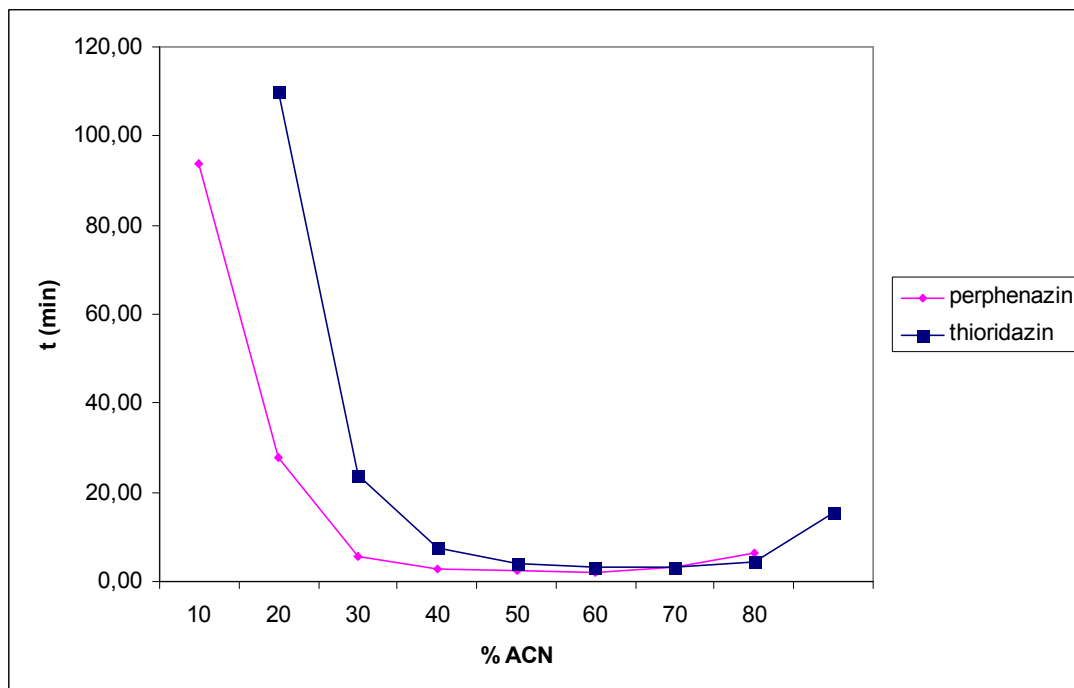
tabulka 6 – Vliv složení mobilní fáze na retenční časy perphenazinu

obrázek 29 – Závislost retenčního času na procentuálním zastoupení acetonitrilu v MF

Perphenazin	
ACN(%)	t _r (min)
10	93,75
20	28,00
30	5,75
40	2,72
50	2,25
60	2,15
70	3,05
80	6,42
90	33,41



obrázek 30 – Retence thioridazinu a perphenazinu v závislosti na procentuálním zastoupení ACN v MF



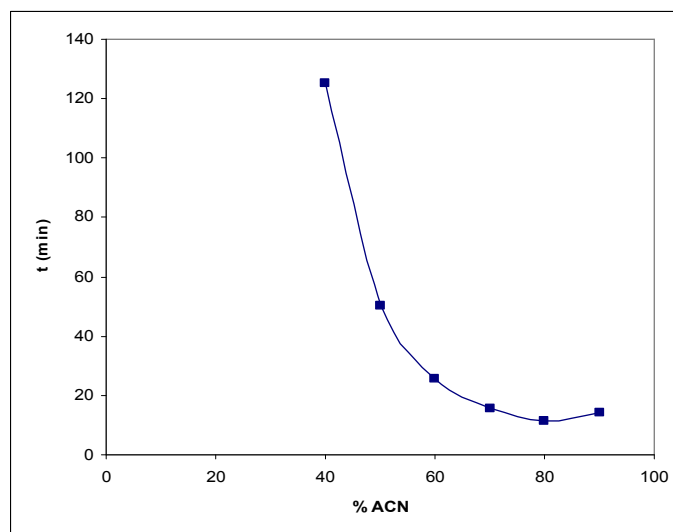
Analýza č. 3: Mobilní fáze: Acetonitril – Acetátový pufr pH 7

Thioridazin

tabulka 7 – Vliv složení mobilní fáze na retenční časy thioridazinu

obrázek 31 – Závislost retenčního času na procentuálním zastoupení acetonitrilu v MF

Thioridazin	
ACN(%)	t _r (min)
10	-
20	-
30	-
40	125,25
50	50,45
60	25,70
70	15,52
80	11,37
90	14,14

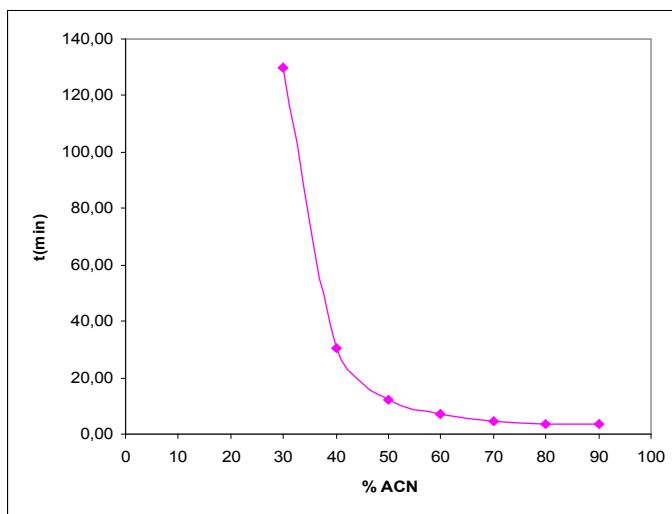


Perphenazin

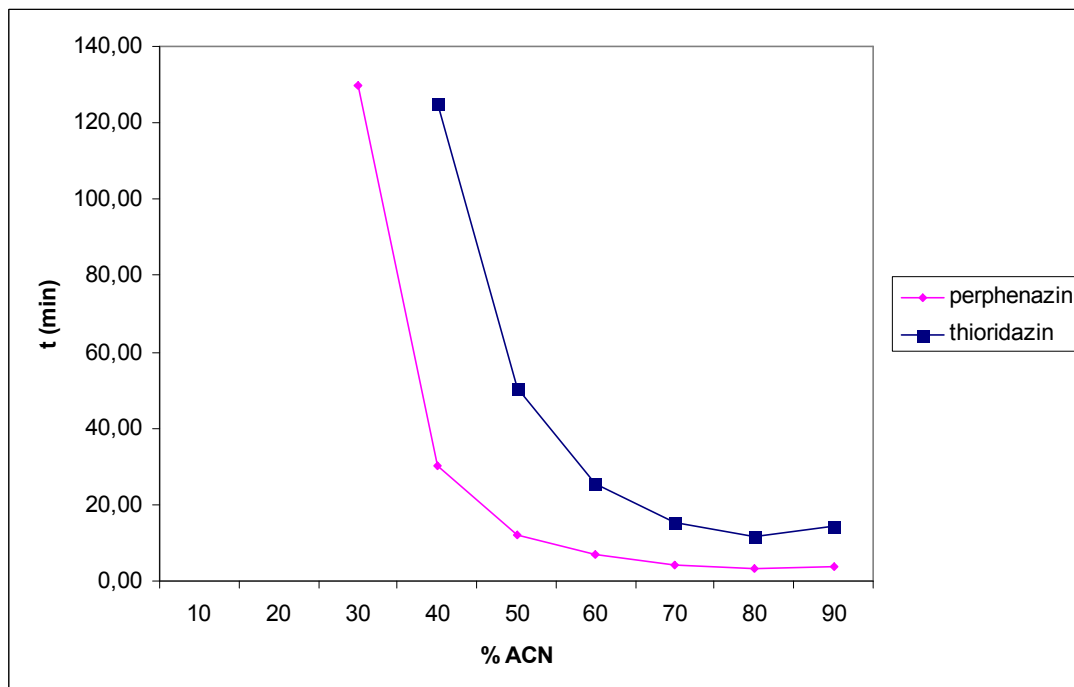
tabulka 8 – Vliv složení mobilní fáze na retenční časy perphenazinu

obrázek 32 – Závislost retenčního času na procentuálním zastoupení acetonitrilu v MF

Perphenazin	
ACN(%)	t _r (min)
10	-
20	-
30	130,00
40	30,19
50	12,00
60	6,87
70	4,38
80	3,31
90	3,48



obrázek 33 – Retence thioridazinu a perphenazinu v závislosti na procentuálním zastoupení ACN v MF



4.5.3 Testovaná skupina látek č. 3: LOKÁLNÍ ANESTETIKA

Analýza č. 1: Mobilní fáze: Acetonitril – H₂O

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

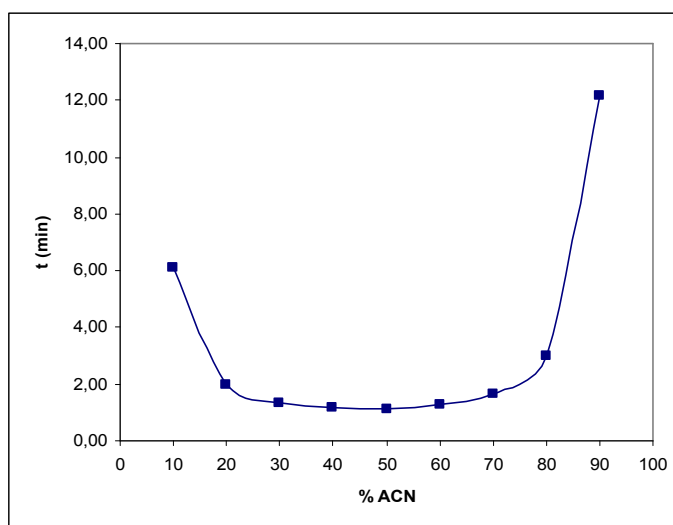
Analýza č. 2: Mobilní fáze: Acetonitril – H₃PO₄ 0,085%

Lidokain

tabulka 9 – Vliv složení mobilní fáze na retenční časy lidokainu

obrázek 34 – Závislost retenčního času na procentuálním zastoupení acetonitrilu v MF

Lidokain	
ACN(%)	t _r (min)
10	6,11
20	1,98
30	1,33
40	1,17
50	1,10
60	1,30
70	1,66
80	2,99
90	12,17

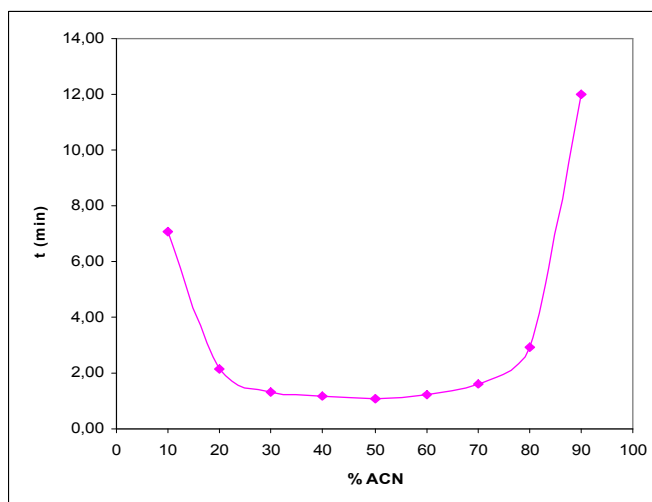


Prilokain

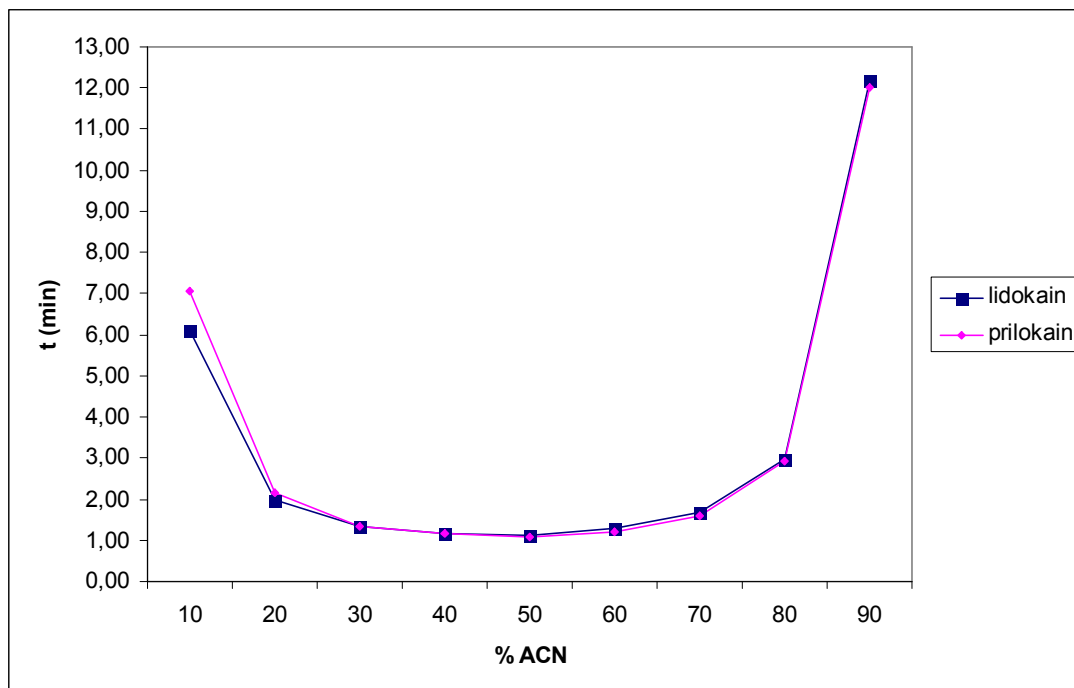
tabulka 10 – Vliv složení mobilní fáze na retenční časy prilokainu

obrázek 35 – Závislost retenčního času na procentuálním zastoupení acetonitrilu v MF

Prilokain	
ACN(%)	t _r (min)
10	7,05
20	2,14
30	1,33
40	1,15
50	1,07
60	1,21
70	1,61
80	2,91
90	11,99



obrázek 36 – Retence lidokainu a prilokainu v závislosti na procentuálním zastoupení ACN v MF



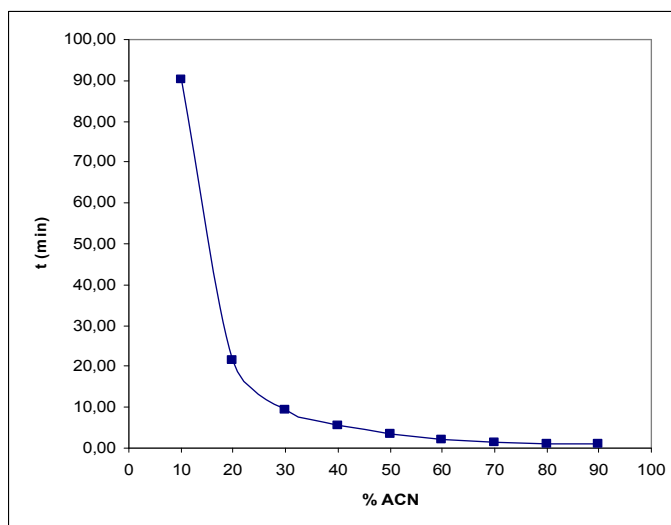
Analýza č. 3: Mobilní fáze: Acetonitril – Acetátový pufr pH 7

Lidokain

tabulka 11 – Vliv složení mobilní fáze na retenční časy lidokainu

obrázek 37 – Závislost retenčního času na procentuálním zastoupení acetonitrilu v MF

Lidokain	
ACN(%)	t _r (min)
10	90,28
20	21,43
30	9,50
40	5,39
50	3,43
60	2,05
70	1,36
80	0,98
90	0,90

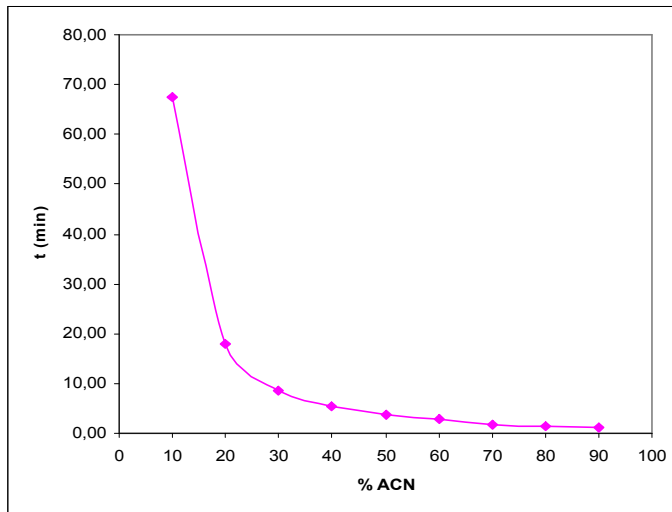


Prilokain

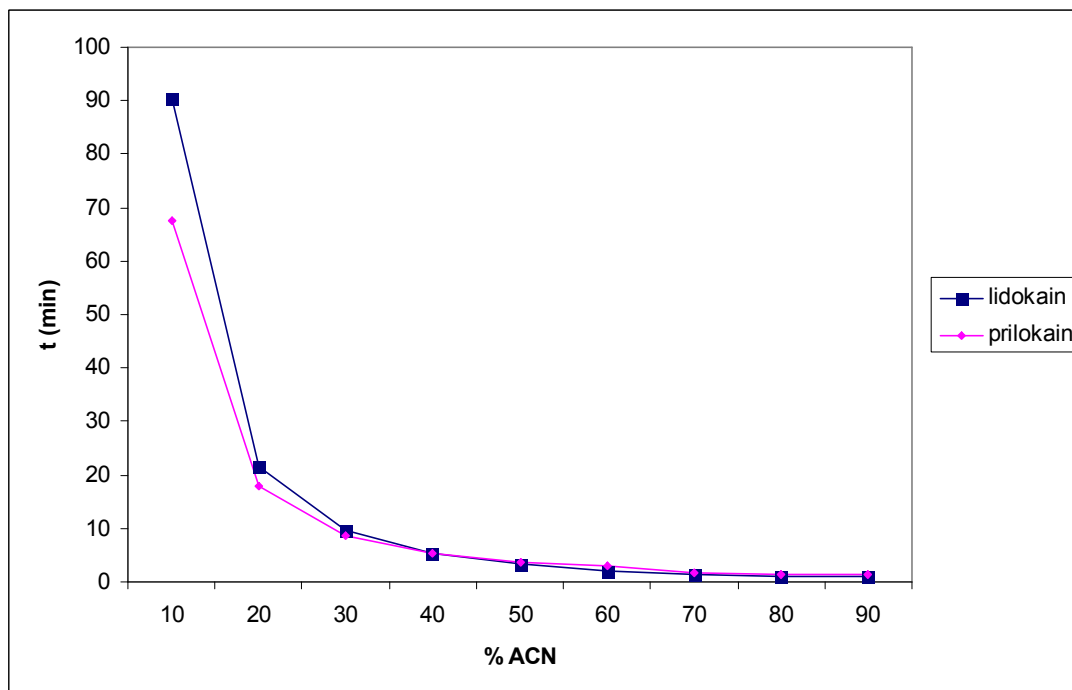
tabulka 12 – Vliv složení mobilní fáze na retenční časy prilokainu

obrázek 38 – Závislost retenčního času na procentuálním zastoupení acetonitrilu v MF

Prilokain	
ACN(%)	t _r (min)
10	67,50
20	17,81
30	8,62
40	5,45
50	3,77
60	2,95
70	1,80
80	1,30
90	1,20



obrázek 39 – Retence lidokainu a prilokainu v závislosti na procentuálním zastoupení ACN v MF



4.5.4 Testovaná skupina látek č. 4: TETRACYKLINY

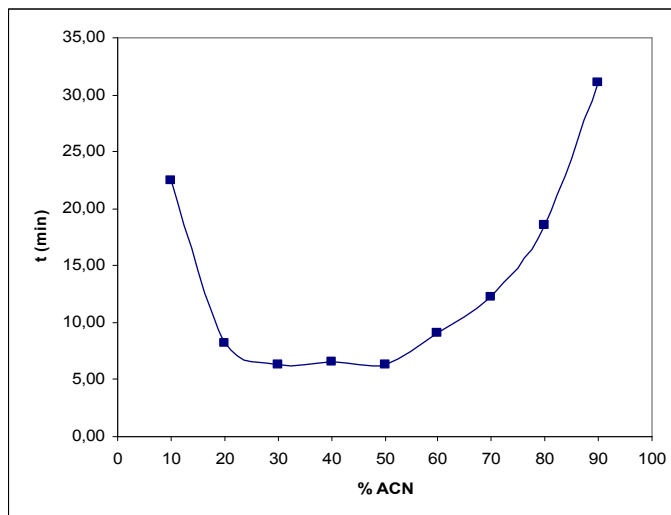
Analýza č. 1: Mobilní fáze: Acetonitril – H₂O

Oxytetracyklin

tabulka 13 – Vliv složení mobilní fáze na retenční časy oxytetracyklinu

obrázek 40 – Závislost retenčního času na procentuálním zastoupení acetonitrilu v MF

Oxytetracyklin	
ACN(%)	t _r (min)
10	22,50
20	8,25
30	6,38
40	6,63
50	6,29
60	9,04
70	12,27
80	18,58
90	31,13



Minocyklin

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

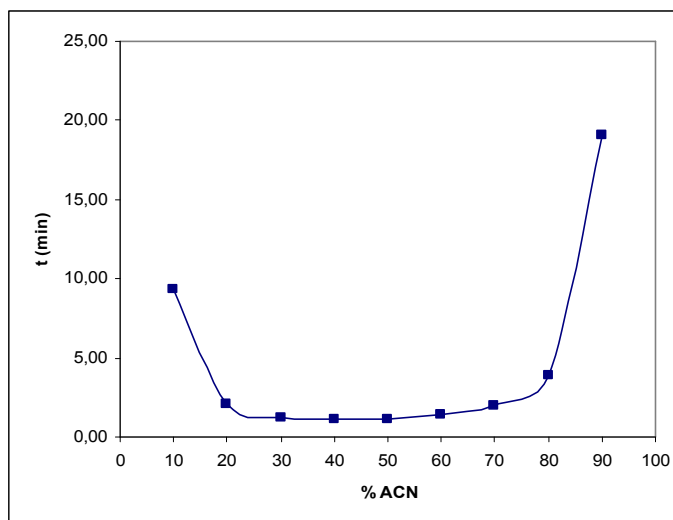
Analýza č. 2: Mobilní fáze: Acetonitril – H₃PO₄ 0,085%

Oxytetracyklin

tabulka 14 – Vliv složení mobilní fáze na retenční časy oxytetracyklinu

obrázek 41 – Závislost retenčního času na procentuálním zastoupení acetonitrilu v MF

Oxytetracyklin	
ACN(%)	t _r (min)
10	9,33
20	2,12
30	1,24
40	1,10
50	1,17
60	1,41
70	1,96
80	3,95
90	19,05

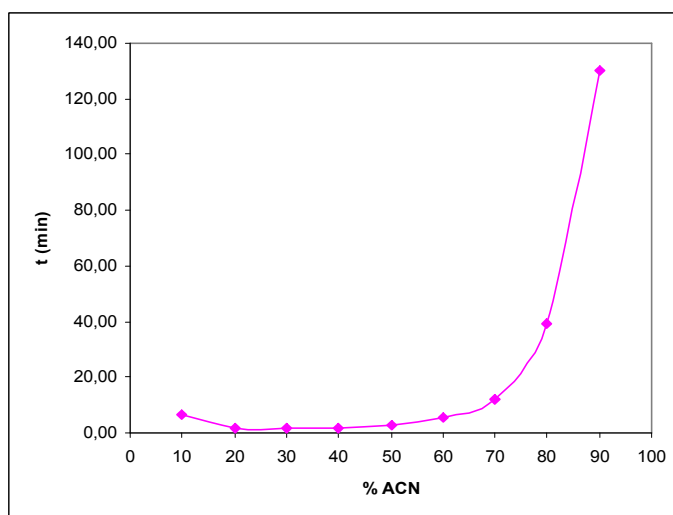


Minocyklin

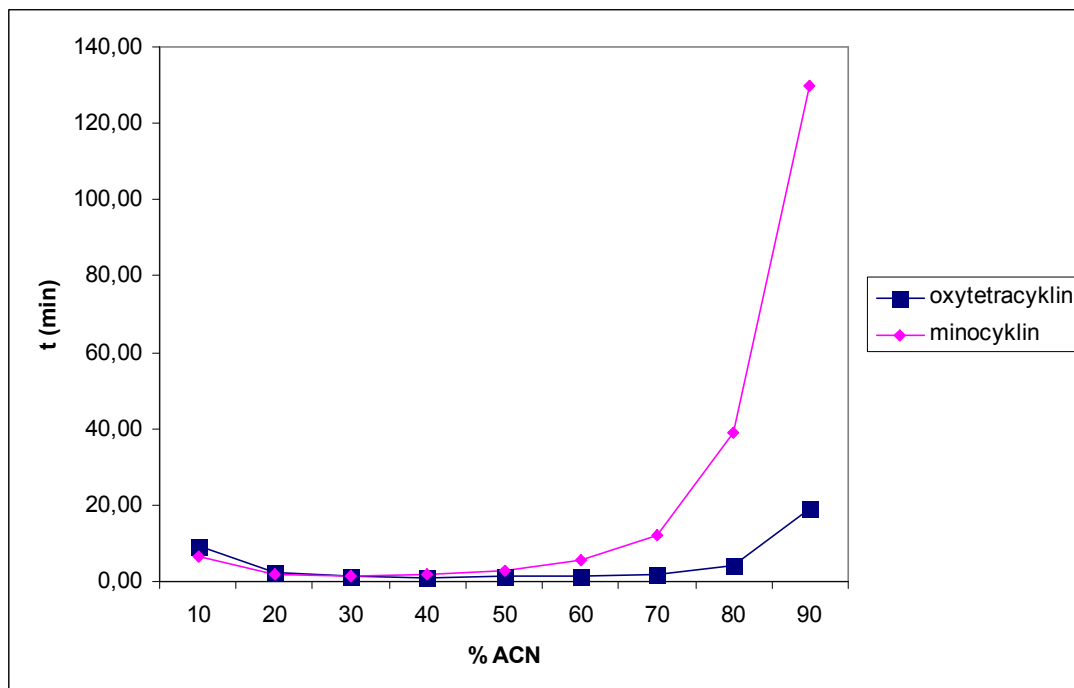
tabulka 15 – Vliv složení mobilní fáze na retenční časy minocyklinu

obrázek 42 – Závislost retenčního času na procentuálním zastoupení acetonitrilu v MF

Minocyklin	
ACN(%)	t _r (min)
10	6,41
20	1,74
30	1,44
40	1,78
50	2,62
60	5,54
70	12,01
80	38,97
90	130,00



obrázek 43 – Retence oxytetracyklinu a minocyklinu v závislosti na procentuálním zastoupení ACN v MF



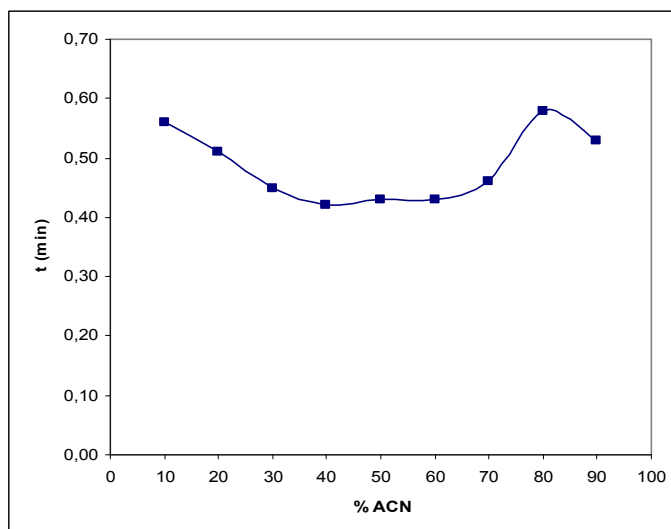
Analýza č. 3: Mobilní fáze: Acetonitril – Acetátový pufr pH 7

Oxytetracyklin

tabulka 16 – Vliv složení mobilní fáze na retenční časy oxytetracyklinu

obrázek 44 – Závislost retenčního času na procentuálním zastoupení acetonitrilu v MF

Oxytetracyklin	
ACN(%)	t_r (min)
10	0,56
20	0,51
30	0,45
40	0,42
50	0,43
60	0,43
70	0,46
80	0,58
90	0,53

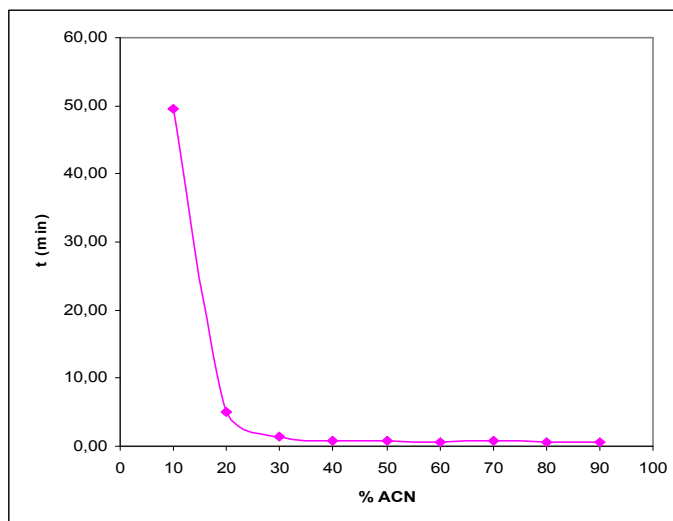


Minocyklin

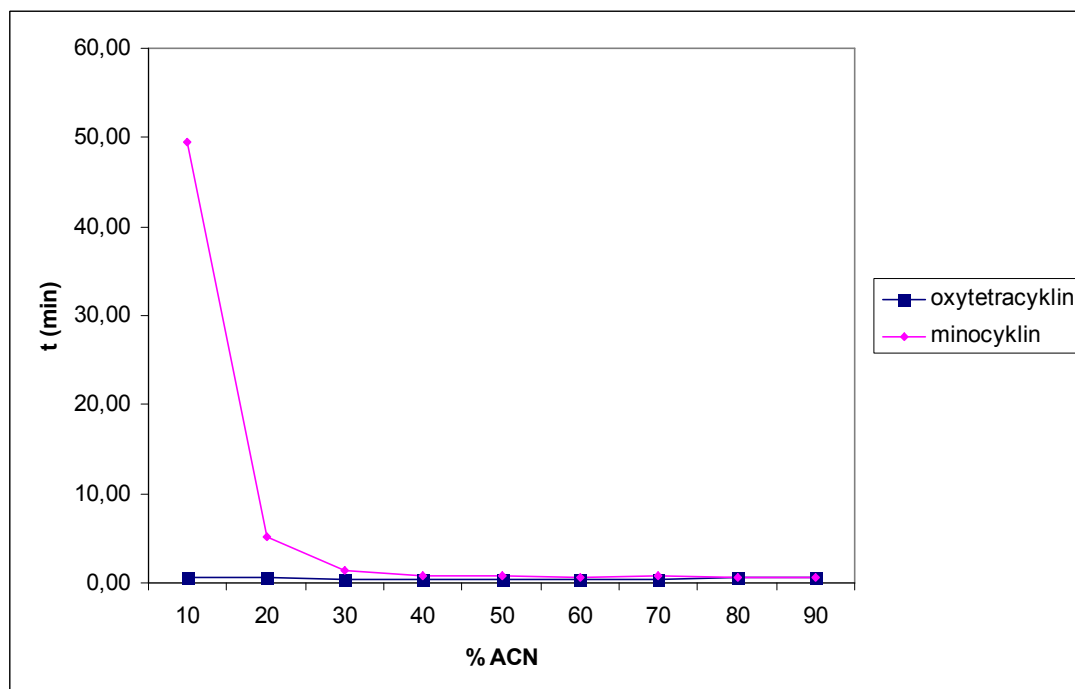
tabulka 17 – Vliv složení mobilní fáze na retenční časy minocyklinu

obrázek 45 – Závislost retenčního času na procentuálním zastoupení acetonitrilu v MF

Minocyklin	
ACN(%)	t _r (min)
10	49,50
20	5,11
30	1,43
40	0,89
50	0,87
60	0,63
70	0,79
80	0,68
90	0,55



obrázek 46 – Retence oxytetracyklinu a minocyklinu v závislosti na procentuálním zastoupení ACN v MF



4.5.5 Testovaná skupina látek č. 5: DERIVÁTY METHYLYXANTINU

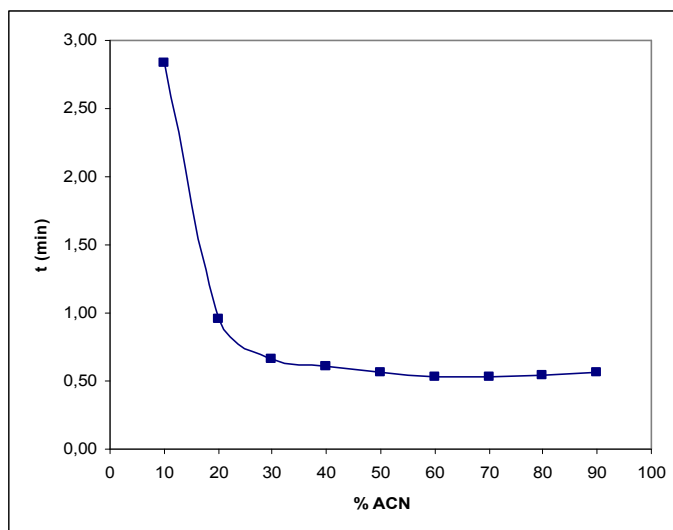
Analýza č. 1: Mobilní fáze: Acetonitril – H₂O

Kofein

tabulka 18 – Vliv složení mobilní fáze na retenční časy kofeinu

obrázek 47 – Závislost retenčního času na procentuálním zastoupení acetonitrilu v MF

Kofein	
ACN(%)	t _r (min)
10	2,84
20	0,96
30	0,66
40	0,61
50	0,57
60	0,53
70	0,53
80	0,54
90	0,56

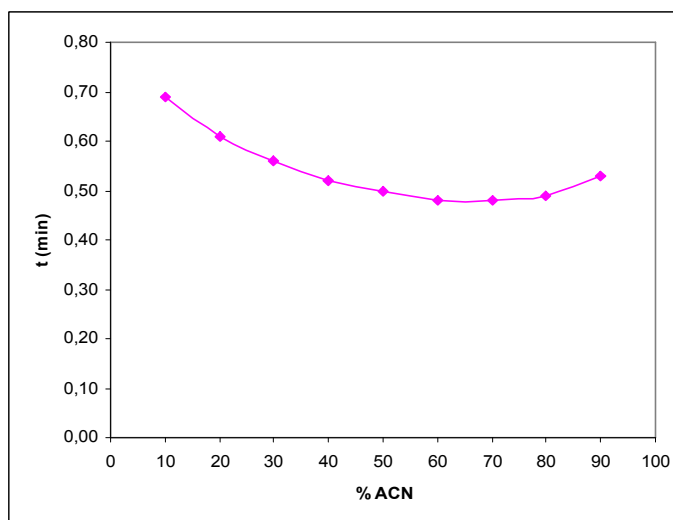


Theofylin

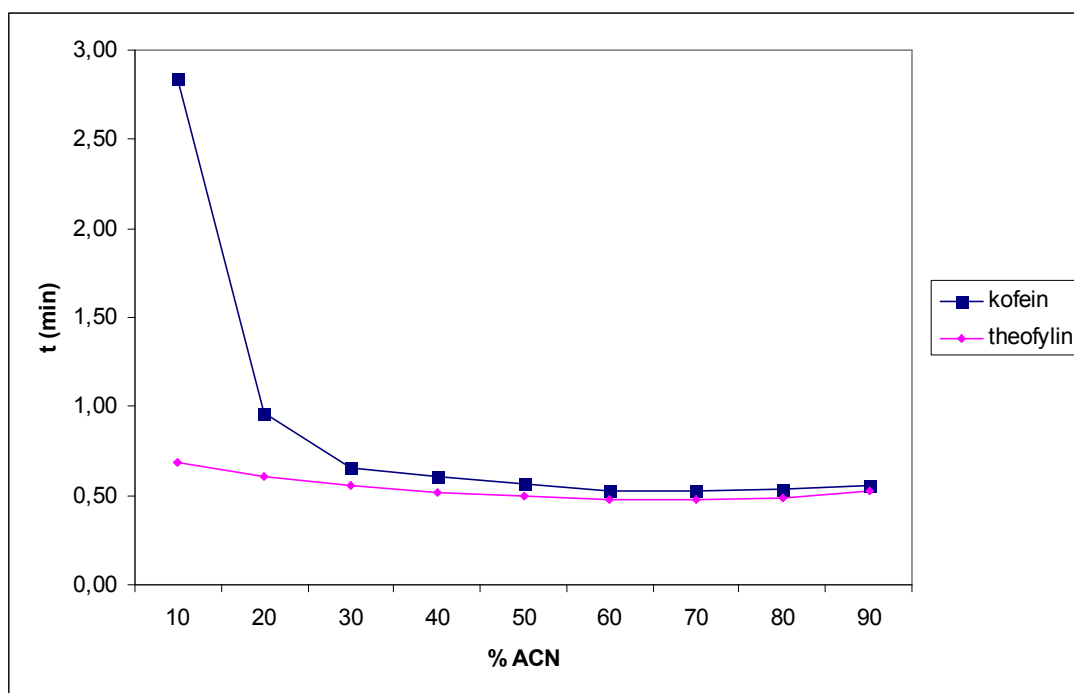
tabulka 19 – Vliv složení mobilní fáze na retenční časy theofylinu

obrázek 48 – Závislost retenčního času na procentuálním zastoupení acetonitrilu v MF

Theofylin	
ACN(%)	t _r (min)
10	0,69
20	0,61
30	0,56
40	0,52
50	0,50
60	0,48
70	0,48
80	0,49
90	0,53



obrázek 49 – Retence kofeinu a theofylinu v závislosti na procentuálním zastoupení ACN v MF



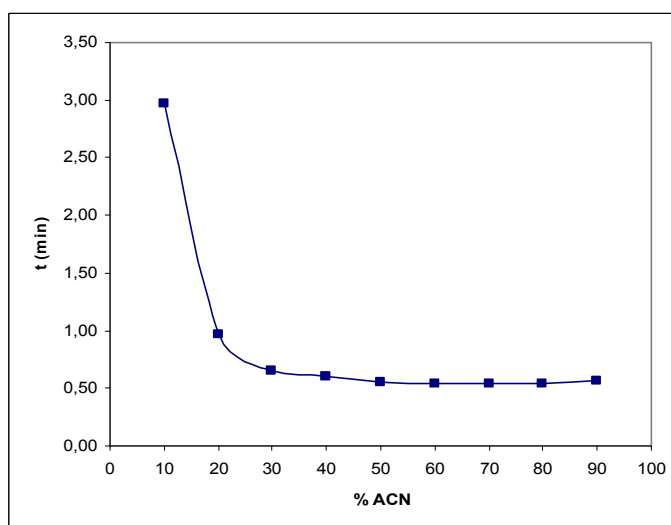
Analýza č. 2: Mobilní fáze: Acetonitril – H₃PO₄ 0,085%

Kofein

tabulka 20 – Vliv složení mobilní fáze na retenční časy kofeinu

obrázek 50 – Závislost retenčního času na procentuálním zastoupení acetonitrilu v MF

Kofein	
ACN(%)	t _r (min)
10	2,97
20	0,97
30	0,65
40	0,60
50	0,56
60	0,54
70	0,54
80	0,54
90	0,57

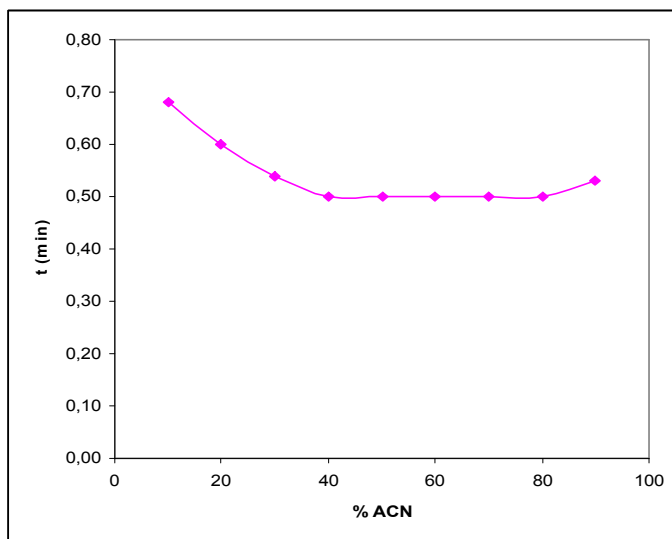


Theofylin

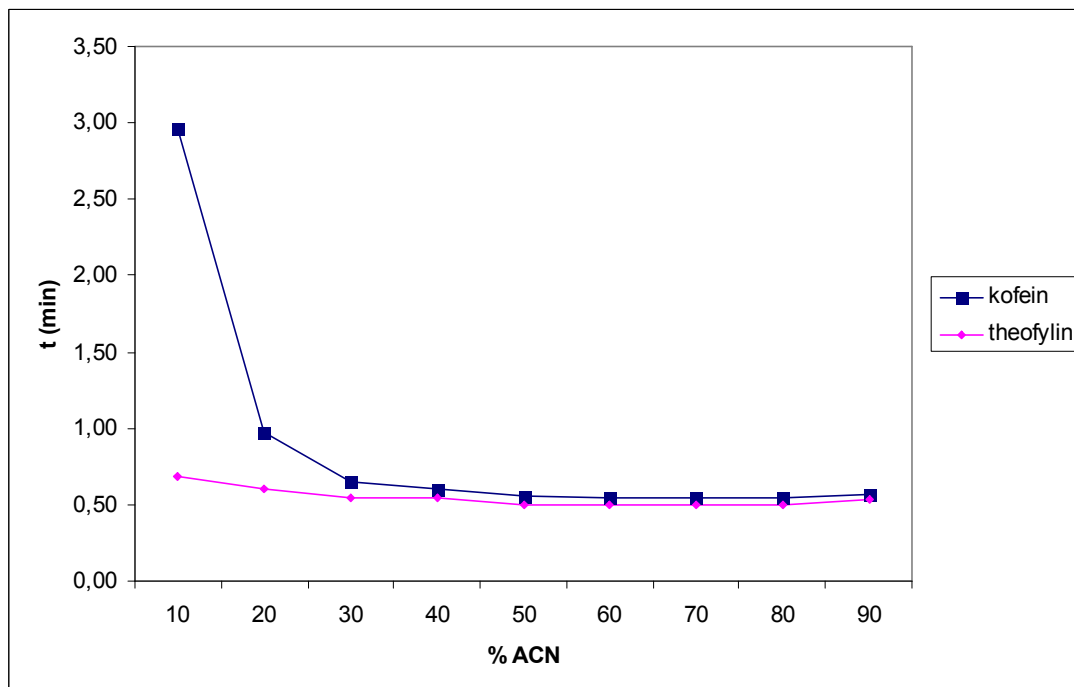
tabulka 21 – Vliv složení mobilní fáze na retenční časy theofylinu

obrázek 51 – Závislost retenčního času na procentuálním zastoupení acetonitrilu v MF

Theofylin	
ACN(%)	t _r (min)
10	0,68
20	0,60
30	0,54
40	0,50
50	0,50
60	0,50
70	0,50
80	0,50
90	0,53



obrázek 52 – Retence kofeinu a theofylinu v závislosti na procentuálním zastoupení ACN v MF



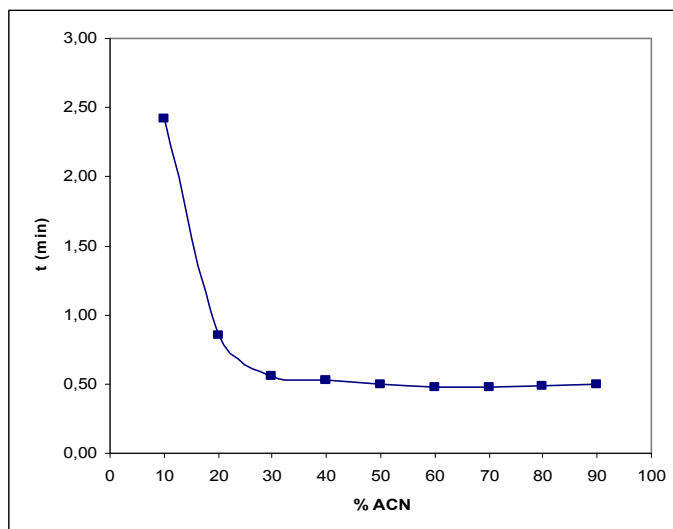
Analýza č. 3: Mobilní fáze: Acetonitril – Acetátový pufr pH 7

Kofein

tabulka 22 – Vliv složení mobilní fáze na retenční časy kofeinu

obrázek 53 – Závislost retenčního času na procentuálním zastoupení acetonitrilu v MF

Kofein	
ACN(%)	t _r (min)
10	2,42
20	0,85
30	0,56
40	0,53
50	0,50
60	0,48
70	0,48
80	0,49
90	0,50

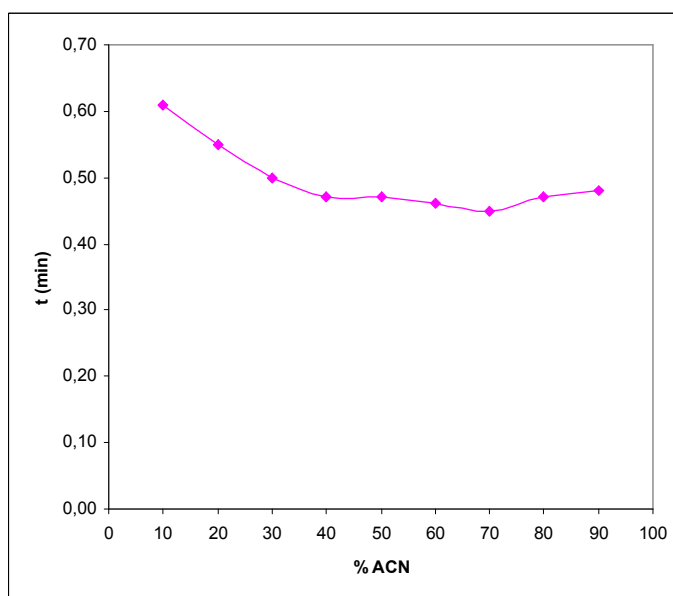


Theofylin

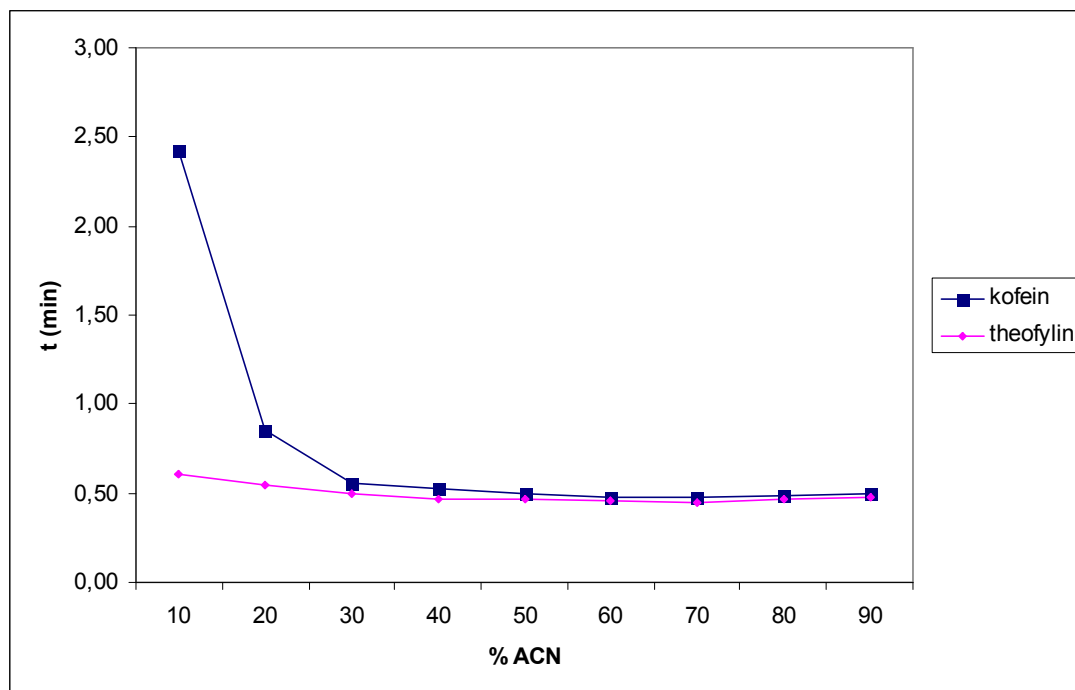
tabulka 23 – Vliv složení mobilní fáze na retenční časy theofylinu

obrázek 54 – Závislost retenčního času na procentuálním zastoupení acetonitrilu v MF

Theofylin	
ACN(%)	t _r (min)
10	0,61
20	0,55
30	0,50
40	0,47
50	0,47
60	0,46
70	0,45
80	0,47
90	0,48



obrázek 55 – Retence kofeinu a theofylinu v závislosti na procentuálním zastoupení ACN v MF



4.5.6 Testovaná skupina látek č. 6: ANILIN

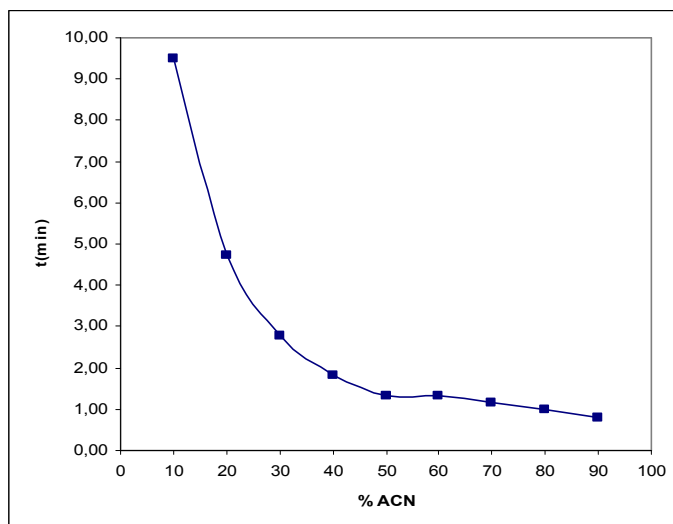
Analýza č. 1: Mobilní fáze: Acetonitril – H₂O

Anilin

tabulka 24 – Vliv složení mobilní fáze na retenční časy anilinu

obrázek 56 – Závislost retenčního času na procentuálním zastoupení acetonitrilu v MF

Anilin	
ACN(%)	t _r (min)
10	9,49
20	4,75
30	2,77
40	1,83
50	1,32
60	1,31
70	1,15
80	0,98
90	0,81



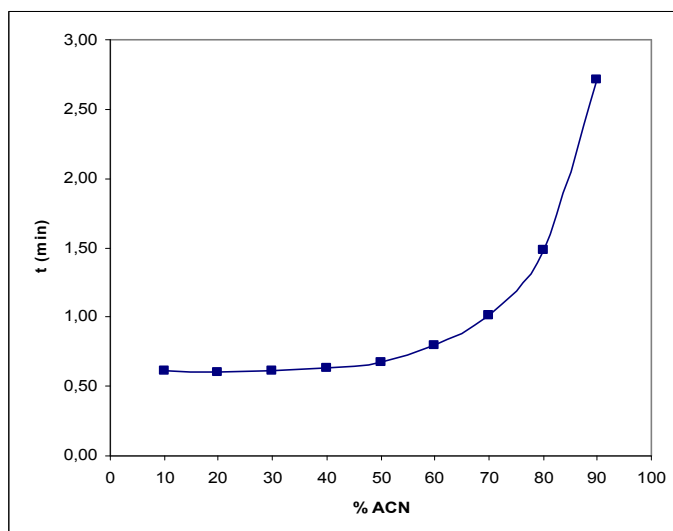
Analýza č. 2: Mobilní fáze: Acetonitril – H₃PO₄ 0,085%

Anilin

tabulka 25 – Vliv složení mobilní fáze na retenční časy anilinu

obrázek 57 – Závislost retenčního času na procentuálním zastoupení acetonitrilu v MF

Anilin	
ACN(%)	t _r (min)
10	0,61
20	0,60
30	0,61
40	0,63
50	0,68
60	0,80
70	1,01
80	1,48
90	2,71



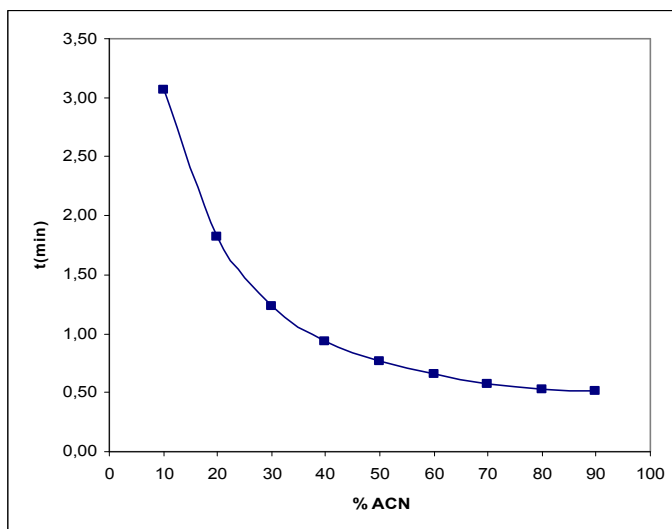
Analýza č. 3: Mobilní fáze: Acetonitril – Acetátový pufr pH 7

Anilin

tabulka 26 – Vliv složení mobilní fáze na retenční časy anilinu

obrázek 58 – Závislost retenčního času na procentuálním zastoupení acetonitrilu v MF

Anilin	
ACN(%)	t _r (min)
10	3,07
20	1,82
30	1,24
40	0,94
50	0,77
60	0,66
70	0,58
80	0,53
90	0,51



5 Závěr

Zadaným cílem diplomové práce bylo testovat chromatografické vlastnosti HS F5 kolony u vybraných skupin látek. Jako testované skupiny látek byly vybrány látky ze skupiny β -sympatolytik (acebutolol, bopindolol), neuroleptik (thioridazin, perphenazin), lokálních anestetik (lidokain, prilokain), tetracyklinů (oxytetracyklin, minocyklin), derivátů methylxantinů (kofeín, theofylin) a anilin. Při analýze byla sledována retenční testovaných skupin látek v závislosti na charakteru mobilní fáze. Cílem bylo zjistit, které látky z vybraných skupin vykazují retenci ve tvaru „U“.

U každé testované skupiny byly provedeny tři série analýz, kdy při analýze č. 1 byla použita mobilní fáze acetonitril - voda, při analýze č. 2 mobilní fáze acetonitril – kyselina fosforečná 0,085% a při analýze č. 3 mobilní fáze acetonitril – acetátový pufr pH 7. Při každé jednotlivé analýze bylo současně měněno procentuální zastoupení acetonitrilu v mobilní fázi.

Z testovaných skupin látek bylo zjištěno, že retenci ve tvaru „U“ vykazují β -sympatolytika acebutolol, bopindolol v sérii analýz č. 2 a č. 3, neuroleptika thioridazin, perphenazin v sérii analýz č. 2 a thioridazin i v sérii analýz č. 3, lokální anestetika lidokain, prilokain v sérii analýz č. 2, tetracykliny oxytetracyklin, minocyklin v sérii analýz č. 2 a oxytetracyklin i v sérii analýz č. 1. Aromatická bazická látka anilin, retenční profil ve tvaru „U“ nevykazoval, ale byla zjištěna jeho vyšší retenční s rostoucím obsahem acetonitrilu v mobilní fázi v kyselém pH.

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

Překvapením bylo retenční chování anilinu, kde byla pro tento typ jednoduché aromatické bazické látky retenční ve tvaru „U“ očekávána a nebyla dosažena.

6 Seznam použité literatury

- [1] Karlíček R., Polášek M., Pospíšilová M.: Analytická chemie pro farmaceuty, Karolinum, Praha 2005
- [2] Klimeš J., Sochor J., Mokry M.: Kontrola léčiv I., II., Karolinum, Praha 2002
- [3] Klouda P.: Moderní analytické metody, Pavel Klouda, Ostrava, 2003
- [4] Český lékopis 2009, Grada Publishing a.s., Praha 2009
- [5] www.hplc.cz (2/2011)
- [6] [http://en.wikipedia.org/wiki/High-performance liquid chromatography](http://en.wikipedia.org/wiki/High-performance_liquid_chromatography) (2/2011)
- [7] <http://web.natur.cuni.cz/~pcoufal/ac.pdf> (2/2011)
- [8] Kazakevich Y., LoBrutto R.: HPLC for pharmaceutical scientists, John Wiley & Sons, Inc., publication, New Jersey 2007
- [9] <http://oldweb.izip.cz/ds3/hypertext/BOAJALB.htm> (2/2011)
- [10] <http://www.sigmaaldrich.com/analytical-chromatography/hplc/columns/discovery-hplc/hs-f5.html#scalable> (2/2011)
- [11] Žáková P., Sklenářová H., Havlíková L., Matysová L., Šatínský D.: Optimalizace HPLC stanovení klotrimazolu, Chem. Listy 103 (2009) 251–255
- [12] Bell D. S.: “Advantages of Polar Reversed-Phase Chemistries for LC/MS Analyses”. Supelco, Bellefonte, PA..(2003), Supelco Publication Number T403121
- [13] Bell D. S., “Unique Retention and Selectivity of Pentafluorophenylpropyl Phases for High-Throughput LC/MS Analysis.” ASMS Annual Meeting. Orlando, Florida. (2002), Supelco Publication Number T402119
- [14] Kindena W., Dekay C., Koziol W.W., Ali Z., Ahmed H., Poole C.F.: Insights into the retention mechanism on a pentafluorophenylpropylsiloxane-bonded silica stationary phase (Discovery HSF5) in RP-LC, Chromatographia 63 (9-10) (2006) 407-417
- [15] Havlíková L., Matysová L., Hájková R., Šatínský D., Solich P.: Advantages of pentafluorophenylpropyl stationary phase over conventional C18

- stationary phase - Application to analysis of triamcinolone acetonide, *Talanta* 76 (3) (2008) 597-601
- [16] Bell D. S., Jones A. D.: Solute Attributes and Molecular Interactions Contributing to U-Shape Retention on Fluorinated HPLC Stationary Phase. Lecture presented at Montreux (2003), Supelco Publication Number T403154
- [17] Dohnal J., Jampilek J., Král V., Řezačová A.: Moderní přístupy k farmaceutické analýze, Farmaceutická fakulta Veterinární a farmaceutické univerzity Brno, Praha 2010
- [18] Santasania C. T., Henderson T. J., Snyder E. M., Sarker M., Ascah T. L.: HPLC Separation at pH Extremes Using Zirconia Solid Supports, Supelco Publication Number T403057
- [19] Discovery Zr: High pH and High Temperature HPLC, Supelco Publication Number T102931
- [20] <http://www.zirchrom.com/newsletter.asp> (3/2011)
- [21] <http://www.sequant.com/default.asp> (3/2011)
- [22] <http://www.chromatech.ch/PolyLC/MainFram.html> (3/2011)
- [23] <http://www.merck-chemicals.cz/sequant-zic-hilic-hplc-columns> (3/2011)
- [24] www.westernanalytical.com/pdf/cat_227.pdf (3/2011)
- [25] Heftman E.: Chromatography 6th edition, *Journal of chromatography* (2004)
- [26] <http://www.phenomenex.com/Products/Search/HPLC#url> (3/2011)
- [27] <http://www.hamiltoncompany.com/products/hplc-columns-and-accessories/c/329/> (3/2011)
- [28] <http://www.tessek.com/cat4.htm> (3/2011)
- [29] <http://sigmaaldrich.com/analytical-chromatography/hplc/columns/aphera-high-ph.html> (3/2011)
- [30] http://www.hicorpo.com/s_menu/pdf/page128%20hiplex%20apps.pdf (3/2011)
- [31] Sýkora D., Tesařová E., Vosmanská M., Zvolánková M.: Moderní stacionární fáze pro RP-HPLC, *Chem. Listy* 101 (2007) 190-199
- [32] <http://www.waters.com> (3/2011)
- [33] <http://www.selectscience.net/products/xbridge> (3/2011)
- [34] <http://www.shimadzu.eu/sitemap/search.aspx?search=columns> (3/2011)

- [35] Lullmann H., Mohr K., Wehling M.: Farmakologie a toxikologie, Grada Publishing, a.s., Praha 2004
- [36] Geršl V., Štěrba M.: Farmakologie pro farmaceuty II., Karolinum, Praha 2007
- [37] Marek J. a kolektiv: Farmakoterapie vnitřních nemocí, Grada Publishing, Praha 2010
- [38] Doležal M. a kolektiv: Farmaceutická chemie léčiv působících na autonomní nervový systém, Karolinum, Praha 2009
- [39] <http://en.wikipedia.org/wiki/> (2/2011)
- [40] <http://www.drugbank.ca/drugs/> (2/2011)
- [41] Hartl J., Palát K. a kolektiv: Farmaceutická chemie II., Karolinum, Praha
- [42] Fendrich Z. a kolektiv: Farmakologie pro farmaceuty III., Karolinum, Praha 2007
- [43] <http://www.scribde.com/limba/ceha-slovaca/Lokln-anestetika211121139.php> (2/2011)
- [44] Hartl J., Doležal M., Miletín M., Opletalová V., Zimčík P.: Farmaceutická chemie IV., Karolinum, Praha 2006
- [45] ("methylxanthine." Encyclopædia Britannica. Encyclopædia Britannica Online. Encyclopædia Britannica, 2011. Web. 21 Feb. 2011. <<http://www.britannica.com/EBchecked/topic/378687/methylxanthine>>.)
- [46] lekarske.slovniky.cz/lexikon-pojem/purinove-alkaloidy/ (2/2011)
- [47] Jahodář L.: Farmakobotanika – semenné rostliny, Karolinum, Praha 2006
- [48] Borovanský, A., Beneš, L.: Farmaceutická chemie. 2 (Farmakochemie) - Léčiva s účinkem na centrální a periferní nervový systém, Veterinární a farmaceutická univerzita, Brno 1999. 234 s. ISBN 80-85114-78-X.
- [49] Ukena D, Schudt C, Sybrecht GW (February 1993). "Adenosine receptor-blocking xanthines as inhibitors of phosphodiesterase isozymes". *Biochemical Pharmacology* 45 (4): 847–51. doi:10.1016/0006-2952(93)90168-V. PMID 7680859 (2/2011)
- [50] Hornback J. M.: Organic chemistry, Thomson Brooks/Cole, USA Belmont 2006