

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Fakulta přírodovědecká

Katedra organické chemie

Markéta Ponížilová

**Vývoj HPLC a TLC metody pro syntézu
nových biologicky aktivních derivátů
indolu**

Bakalářská práce

Studijní obor: Bioorganická chemie B1407

Vedoucí práce: Prof. Ing. Pavel Hradil, CSc.

Olomouc 2011

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu.

V Olomouci dne

.....

Markéta Ponížilová

Děkuji pracovníkům laboratoří výzkumného oddělení společnosti Farmak a.s. za pomoc a cenné rady při vypracování bakalářské práce.

Bibliografická identifikace:

Jméno a příjmení autora: Markéta Ponížilová

Název práce: Vývoj HPLC a TLC metody pro syntézu nových biologicky aktivních derivátů indolu

Typ práce: bakalářská práce

Pracoviště: katedra organické chemie

Školitel: Prof. Ing. Pavel Hradil, CSc.

Školitel-konzultant: Ing. Martin Grepl, Ph.D.

Rok obhajoby práce: 2011

Abstrakt: Předkládaná práce se zabývá vývojem analytických metod pro rychlý servis doprovázející syntézu. Je zaměřena na metody HPLC a TLC, přičemž větší pozornosti se dostává metodě HPLC. Teoretická část se věnuje základním principům a instrumentaci použitých metod, obecným postupům optimalizace a praktickému využití ve farmaceutickém průmyslu.

Klíčová slova: HPLC, TLC, optimalizace, vývoj metod, indol

Počet stran: 48

Počet příloh: 0

Jazyk: čeština

Bibliographical identification:

Author's first name and surname: Markéta Ponižilová

Title: The development of HPLC and TLC methods for the synthesis of new biologically active indole derivatives

Type of thesis: Bachelor thesis

Department: Department of Organic Chemistry

Advisor: Prof. Ing. Pavel Hradil, CSc.

Advisor-consultant: Ing. Martin Grepl, Ph.D.

The year of presentation: 2011

Abstract: This thesis deals with the development of analytical methods for rapid service of accompanying synthesis. It is focused on HPLC and TLC methods, whereas more attention is getting to HPLC. The theoretical part deals with basic principles and instrumentation of used methods, the general optimization procedures and practical improvement in the pharmaceutical industry.

Keywords: HPLC, TLC, optimization, method development, indole

Number of pages: 48

Number of appendixes: 0

Language: czech

Obsah

1. Úvod.....	8
2. Základní princip chromatografie	9
2.1. Princip separace v HPLC.....	10
2.1.1. Systém obrácených fází (RP-HPLC)	10
2.2. Princip separace v TLC	11
3. Vybrané separační metody HPLC a TLC.....	13
3.1. Instrumentace.....	13
3.1.1. Instrumentace v HPLC.....	13
3.1.2. Instrumentace v TLC	14
3.2. Využití ve farmaceutickém průmyslu	15
3.2.1. HPLC	15
3.2.2. TLC.....	16
4. HPLC a TLC metody popsané pro analýzy indolu a jeho derivátů	17
5. Vývoj a optimalizace metod	22
5.1. Obecný postup optimalizace	22
5.2. Optimalizace HPLC.....	23
5.3. Optimalizace TLC.....	24
6. Analyzované sloučeniny	25
7. Experimentální část	27
7.1. Technika TLC	27
7.1.1. Použité chemikálie	27
7.1.2. Použité tenké vrstvy.....	27
7.1.3. Příprava vzorku a vyvíjecích soustav	27
7.1.4. Způsob detekce.....	27
7.2. Technika HPLC.....	27
7.2.1. Použité chemikálie	27
7.2.2. Použitý přístroj.....	28
7.2.3. Příprava vzorků	28
7.2.4. Příprava mobilních fází	29

8. Výsledky a diskuse	31
8.1. Technika TLC	31
8.2. Technika HPLC.....	32
9. Souhrn výsledků	46
10. Závěr	47
11. Seznam literatury	48

1. Úvod

Vysoko účinná kapalinová chromatografie (high performance liquid chromatography; HPLC) a chromatografie na tenké vrstvě (thin layer chromatography; TLC) jsou separační metody, které nacházejí využití v různých odvětvích chemie, ale také v medicíně a potravinářství.

První popisy zařízení pro HPLC se datují do roku 1967 a historie TLC sahá do první poloviny dvacátého století.¹ Vývoj obou chromatografických technik a použitých materiálů rozšířil jejich aplikační možnosti. V současné době se těší velké oblibě a lze je využít k analýze širokého spektra látek (např. vzorky tělních tekutin, potraviny nebo jiné organické sloučeniny).

Práce je zaměřena na využití těchto separačních metod pro rychlý analytický servis doprovázející syntézu látek potenciálně zajímavých pro farmaceutický průmysl.

Cílem teoretické části práce je seznámení se základními principy používaných chromatografických metod a jejich vybavením. Budou zde popsány analytické metody dostupné pro deriváty indolu podobné studovaným látkám, obecné postupy při optimalizaci metod a ve stručnosti bude nastíněno využití HPLC a TLC ve farmaceutickém průmyslu.

Experimentální část se věnuje dělení modelové směsi předložených látek v systému RP-HPLC a také za použití TLC. Jejím cílem je nalézt analytickou metodu, jejíž separaci bychom mohli považovat za dostatečnou.

2. Základní princip chromatografie

Základy chromatografie položil již začátkem 20. století ruský botanik M. S. Cvet, který rozdělil listová barviva na sloupci sorbentu. Na těchto pracích jsou založeny všechny pozdější chromatografické techniky. Ve své klasické podobě se kolonová chromatografie rozvinula až začátkem čtyřicátých let, kdy byla objevena rozdělovací chromatografie. Díky používaným materiálům, způsobům protékání mobilní fáze (pouze působením gravitační síly) a způsobům detekce, byla tato technika velice pracná a zdlouhavá. Po využití řady teoretických a praktických poznatků z plynové chromatografie se kapalinová chromatografie postupně stala moderní, vysoce účinnou metodou. Její výraznější rozvoj však přišel až s technickým pokrokem v oblasti laboratorní instrumentace, díky kterému se stala jednou z nejpoužívanějších technik pro separaci složek vzorku.^{1;2}

Chromatografické metody využívají dělení složek mezi dvě fáze – nepohyblivou (stacionární, SF) a pohyblivou (mobilní, MF).

Při dělení složek dochází k opakovanému transportu molekul složek do stacionární fáze a zpět do fáze mobilní. Přitom se chromatografický systém natolik přiblíží rovnováze, že distribuci složky mezi dvě fáze lze popsat distribuční konstantou:

$$K_D = \frac{[A]_s}{[A]_m} = \frac{(n_A)_s \cdot V_m}{(n_A)_m \cdot V_s}$$

Kde $(n_A)_{s(m)}$ je látkové množství látky A ve stacionární (mobilní) fázi a $V_{s(m)}$ je objem stacionární (mobilní) fáze v daném systému.

Trvalý pohyb mobilní fáze však zabrání dosažení skutečné termodynamické rovnováhy a posune molekuly složek k další části stacionární fáze, kde se znovu vytvoří přibližně rovnovážný stav.²

Lze tedy říci, že separace složek ve směsi vzorku je zapříčiněna rozdílnou rychlostí migrace těchto složek, což je způsobeno jejich různou interakcí s mobilní a stacionární fází, tzn. látka, která nejméně interaguje se stacionární fází, je mobilní fází unášena nejrychleji a naopak.

2.1. Princip separace v HPLC

Mechanismus separace v HPLC závisí na zvoleném systému. V literatuře jsou popsány různé teoretické mechanismy separace, které mohou působit i společně. Nejčastěji je dělení založeno na adsorpci, rozdělování, síťovém efektu nebo chemisorpci.

Při adsorpční chromatografii dochází k sorpci látky na povrchu adsorbentu na tzv. aktivních centrech adsorpce. Sorpce látky je důsledkem rozdílných polárních sil působících mezi povrchem adsorbentu a chromatografovanou látkou a mezi povrchem adsorbentu a mobilní fází. Adsorpční proces je charakterizován vzájemným soutěžením molekul vzorku s mobilní fází o aktivní centra na povrchu adsorbentu a možností interakce s větším počtem aktivních center u molekul se dvěma nebo více polárními skupinami.²

Síťový efekt při separaci využívá gelová permeační chromatografie a k dělení složek dochází na základě rozdílné velikosti molekul. Na chemisorpci je založena iontově výměnná chromatografie, při které v podstatě dochází k chemické reakci (výměna iontů).¹

2.1.1. Systém obrácených fází (RP-HPLC)

Tato technika je běžnější než chromatografie na normálních fázích (polární stacionární fáze) a častěji vede k dostatečné separaci vzorků. Odhaduje se, že se využívá v 80 – 90% všech aplikací.

V systému obrácených (reversních) fází se využívají nepolární stacionární fáze a polární fáze mobilní. Detailní mechanismus retence v těchto systémech není zcela jednoznačně vyřešen. Na nepolárních stacionárních fázích se v ideálním případě nevyskytují aktivní adsorpční centra. Předpokládá se, že nejvýrazněji se uplatňuje solvofobní efekt. Mezi nepolární stacionární fází a dělenými látkami nebo složkami mobilní fáze se uplatňují pouze disperzní interakce, které však také působí mezi složkami mobilní fáze a chromatografovanými látkami ve fázi mobilní, což vede do značné míry ke kompenzaci těchto interakcí v obou fázích. Převažující hnací silou retence látek jsou polární interakce mezi molekulami mobilní fáze, zejména vody, které jsou silnější než polární interakce mezi molekulami dělených látek a složkami mobilní

fáze, což vede k vytěšňování chromatografovaných látek z mobilní fáze do fáze stacionární a látky jsou tím více zadržovány, čím nižší je jejich polarita.²

Selektivita nepolárních stacionárních fází k málo polárním látkám je určována téměř vždy vlastnostmi mobilní fáze a lze ji ovlivňovat volbou organické složky MF a využitím jejich selektivních interakcí s chromatografovanými látkami.¹

2.2. Princip separace v TLC

Podobně jako u HPLC princip chromatografie na tenké vrstvě spočívá v tom, že při průchodu rozpouštědla vrstvou sorbentu dochází k separaci látek. Vrstva sorbentu se volí podle povahy separovaných látek, čímž se také určuje mechanismus separace, např. pro nepolární látky rozpustné v organických rozpouštědlech lze volit buď adsorpční chromatografii, nebo rozdělovací chromatografii na obrácených fázích.²

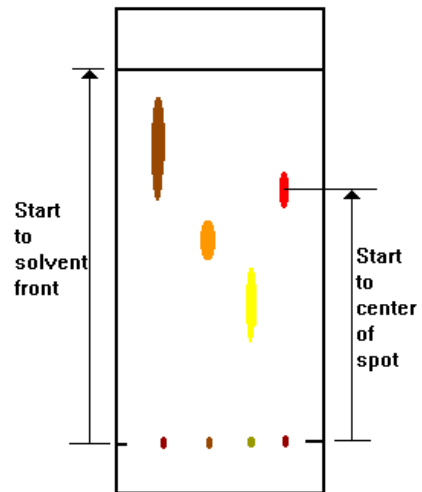
V TLC systému s polárním sorbentem (mechanismus adsorpční chromatografie) je rozpouštědlo použité jako mobilní fáze samo adsorbováno - dochází k soutěži mezi chromatografovanou látkou a rozpouštědlem. Čím je chromatografovaná látka ve vztahu k mobilní fázi polárnější, tím je více zadržována adsorbentem a hodnoty R_f se snižují.²

Hodnoty R_f (retardačního faktoru) určují relativní zádrž chromatografovaných látek v poměru k samotnému rozpouštědлу. Dané hodnoty lze vypočítat podle vzorce:

$$R_f = \frac{d_a}{d}$$

kde d_a značí vzdálenost těžiště (středu) skvrny chromatografované látky od startu a d vzdálenost čela rozpouštědla od startu (viz obr. 2).

Pokud $R_f=0$, potom látka nepřechází do mobilní fáze a zůstává adsorbována ve fázi stacionární. Naopak pokud $R_f=1$, látka se neadsorbuje na stacionární fázi, ale zůstává pouze ve fázi mobilní.²



Obr. 2 Tenká vrstva s vyznačenými vzdálenostmi důležitými pro výpočet R_f ³

3. Vybrané separační metody HPLC a TLC

3.1. Instrumentace

3.1.1. Instrumentace v HPLC

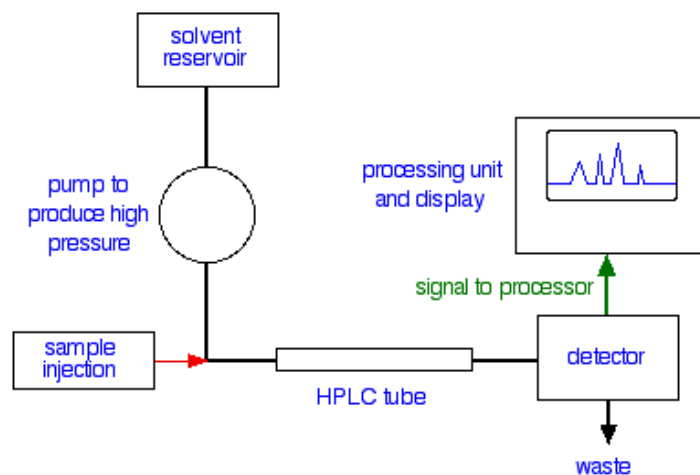
Moderní kapalinový chromatograf se skládá z částí zabezpečujících transport mobilní fáze, dávkování vzorku, separaci látek a jejich detekci, záznam a zpracování signálu.

Mobilní fáze se nachází v zásobníku, ze kterého je dávkována vysokotlakým, nejčastěji pulzním čerpadlem. Provozní tlaky dosahují běžně desítek MPa.

Dávkování vzorku bývá realizováno přes dávkovací ventily nebo zařízením pro automatické dávkování (tzv. autosampler).

Součástí chromatografického systému, na kterém dochází k separaci látek, se nazývá chromatografická kolona – obvykle nerezová trubice naplněná stacionární fází. Pro vysokou účinnost separace bývá kolona plněna velmi jemnými částicemi (se zrněním řádově v jednotkách mikrometrů). Jednotlivé kolony se od sebe liší délkou i velikostí a chemickým složením částic sorbentu. Kolona v analytickém módu je obvykle dlouhá 4 -25 cm a její vnitřní průměr je 2,1 - 4,6 mm. V nejběžněji užívané RP-HPLC se jako náplně kolon používají převážně chemicky vázané nepolární fáze na silikagelu jako nosiči. Chemicky vázané fáze jsou stabilnější (ve srovnání s fyzikálně vázanými), neboť nedochází k jejich vymývání z kolony. Běžně užívané jsou kolony, kdy stacionární fázi tvoří na silikagel navázané oktadecylové nebo oktylové řetězce (tzv. C18 nebo C8).^{2;4}

Další součástí chromatografu je detektor. Jedním z nejrozšířenějších detektorů je spektrofotometrický detektor - jednokanálový nebo vícekanálový, umožňující sledovat až několik vlnových délek, nebo tzv. detektor diodového pole, který v krátkých časových intervalech skenuje opakovaně celé spektrum. Zpracování signálu a ovládání celého přístroje probíhá nejčastěji pomocí počítače. Schéma zapojení přístroje pro HPLC (viz obrázek 3).

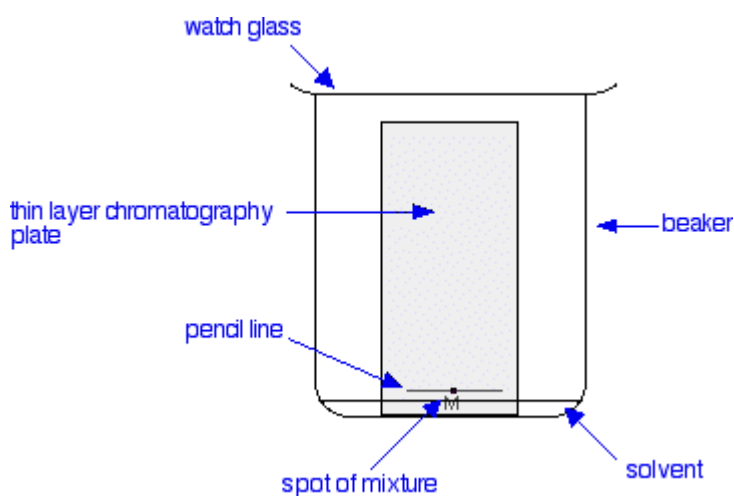


Obr. 3 Schéma zapojení přístroje pro HPLC⁵

3.1.2. Instrumentace v TLC

Separace na tenké vrstvě nevyžaduje žádný speciální přístroj. K jejímu provedení je dostačující destička, na které je nanesena tenká vrstva sorbentu. Nejčastěji používané jsou komerčně vyráběné vrstvy, které mají sorbent pro snazší manipulaci zpevněn vhodným pojivem (např. škrobem nebo sádrou). Tloušťka zafixované vrstvy se pohybuje od 0,1 do 0,25mm. Běžně užívané tenké vrstvy mají jako sorbent silikagel nebo oxid hlinitý, ale lze použít i modifikované sorbenty na bázi silikagelu s navázanými polárními i nepolárními funkčními skupinami.²

Mobilní fáze je umístěna ve vyvíjecí komoře, do které se vloží tenká vrstva s naneseným vzorkem. Mobilní fáze vzlíná tenkou vrstvou pomocí kapilárních sil. (Uspořádání viz obr. 4)



Obr. 4 Příklad uspořádání chromatografie na tenké vrstvě⁶

Detekce v tenkovrstevné chromatografii lze provádět na základě dvou způsobů: fyzikální (k detekci využívá záření v oblasti viditelné, ultrafialové nebo infračervené) a chemické (tenká vrstva je postříkána vhodným detekčním činidlem).²

3.2. Využití ve farmaceutickém průmyslu

3.2.1. HPLC

HPLC je přední analytická technika ve farmaceutických laboratořích, která se používá na různé druhy vzorků a v moderním farmaceutickém průmyslu je hlavním analytickým nástrojem užívaným ve všech fázích výzkumu, vývoje a výroby léčiv.^{7;8}

Zejména v posledním desetiletí došlo ve výzkumu a vývoji léčiv k výrazným změnám. Byla zdokonalena metodologie a technologie včetně automatické vysokoúčinné chromatografie, fast HPLC, spojení HPLC s MS nebo NMR a high-throughput čistících metod.⁸

Efektivní a rychlý vývoj metod má mimořádný význam v celém cyklu vývoje léčiva.⁸

Vývoj léčiv začíná objevem molekuly s terapeutickým významem (se zajímavou biologickou aktivitou). V prvních fázích syntéz a následných analýz může být proveden tzv. High Throughput Screening, při němž jsou separace prováděny pomocí fast nebo ultra fast HPLC.⁹

LC-MS nebo LC-MS/MS jsou metody, které vynikají vysokou citlivostí a selektivitou. Jsou používány při testování metabolismu a farmakokinetiky u tzv. kandidátů budoucích léčiv. Bioanalytické studie zahrnují stanovení množství cílové sloučeniny v různých biologických matricích, jako je plasma, sérum, tkáňový extrakt nebo moč zvířat a lidí. Uvedené metody v posledním desetiletí nahrazují běžnou HPLC spojenou s fluorescenční nebo elektrochemickou detekcí, která zahrnovala komplikované čištění vzorků. Čištění vzorků u těchto metod je jednodušší a více automatizované.⁹

Ve vývoji léčiv se dále HPLC používá pro charakterizaci produktů chemické syntézy. Tuto techniku lze použít pro analýzu aktivních farmaceutických substancí, jejich nečistot a pro testování jejich stability.⁹

HPLC metody pro finální substance z farmaceutické výroby musí být validovány. Validace zajišťuje jejich přesnost, správnost, reprodukovatelnost a další požadované parametry.

3.2.2. TLC

TLC je jednou z metod, kterou lze použít při ověřování meziproduktů nebo za účelem mezioperační kontroly stejně dobře, jako pro ověřování čistoty látek ve výzkumu a vývoji. Ačkoliv je dnes ve farmaceutickém průmyslu při analýzách favorizována technika HPLC, TLC stále zůstává velmi populární a často užívanou analytickou metodou.¹⁰

Nejběžněji se TLC využívá ke kontrole průběhu reakce, kdy lze touto metodou snadno a rychle stanovit, zda je možno reakci zastavit či ne, tzn. je určována přítomnost výchozích látek v reakční směsi.

V posledních letech také technika TLC prošla určitým vývojem. Ve farmaceutickém průmyslu lze proto v současné době využít i její vysoce účinnou variantu (HPTLC). Jako dobře využitelné se jeví spojení TLC s hmotnostní spektrometrií.¹¹

Velkou výhodou této techniky je možnost současné separace většího množství vzorků za nízkou cenu, s minimálním vybavením a zaškolením obsluhy. Naproti tomu lze u TLC najít hned několik nevýhod. Patří mezi ně problematická reprodukovatelnost, subjektivní vyhodnocení výsledku, nemožnost automatizace, získání a ukládání elektronických dat.^{12; 11}

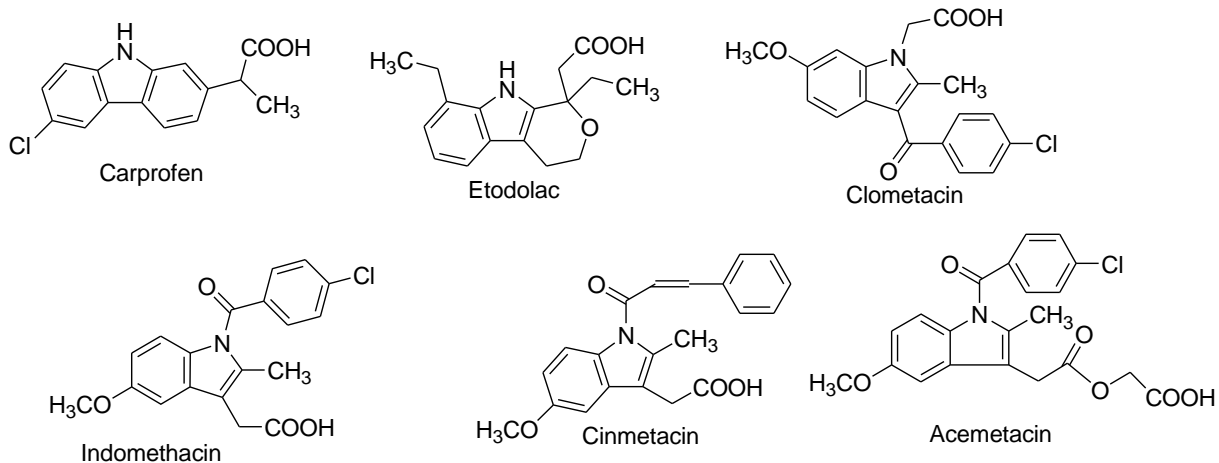
4. HPLC a TLC metody popsané pro analýzy indolu a jeho derivátů

SciFinder poskytuje víc než 173 tisíc indolových derivátů ve více než 775 tisících publikací a z toho se více než 20 tisíc prací zabývá jejich HPLC či TLC analýzou. Toto množství je příliš vysoké pro přečtení všech článků, navíc se popsané metody většinou zabývají analýzou biologických materiálů, a proto jsem se rozhodla - vzhledem k zadanému úkolu, nalézt analytickou metodu použitelnou pro operativní sledování syntézy nových, dosud nepopsaných molekul – využít metody používané pro hodnocení léčiv. Byl vytvořen přehled metodik používaných pro hodnocení indolových léčiv, které jsou uvedeny v lékopisech (Český lékopis - ČL a americký lékopis - USP).

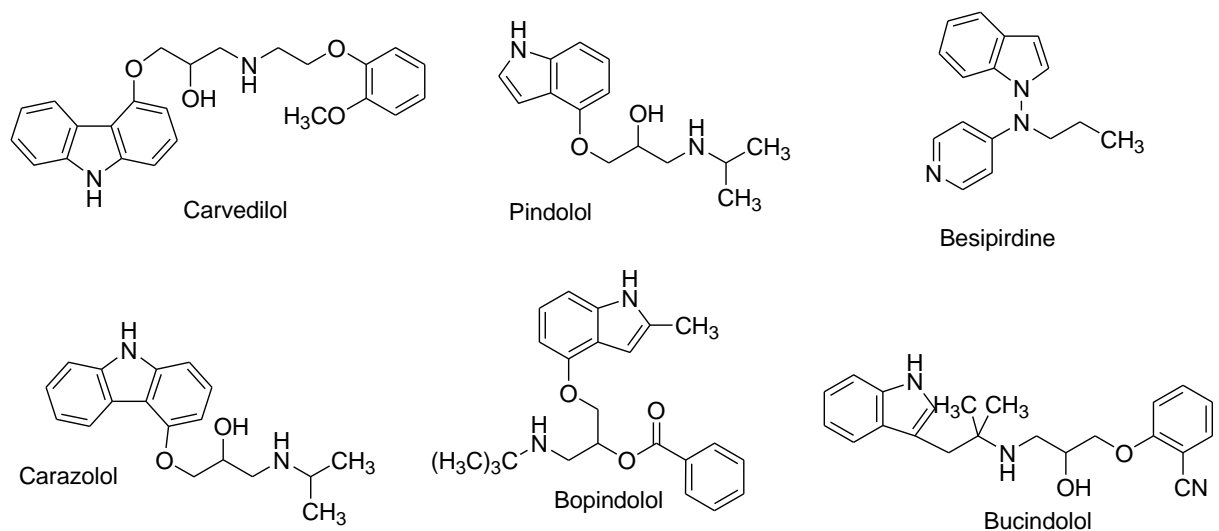
Deriváty indolu jsou obsaženy ve více než dvou stech používaných léčiv a biologicky aktivních sloučenin, avšak struktura některých z nich je velmi vzdálená od látek, jejichž analýzu jsem studovala. Molekuly, které se blíží látkám, jejichž analýzu jsem studovala, jsou uvedeny na obrázcích 5 – 10. Tyto látky lze rozdělit do následujících terapeutických kategorií:

- Látky protizánětlivé (obr. 5)
- Antihypertenziva (obr. 6) – látky k léčbě vysokého krevního tlaku (hypertenze)
- Antimigrentetika (obr. 7)
- Antiemetika (obr. 8) – látka předcházející nevolnosti nebo tlumící nevolnost a zvracení

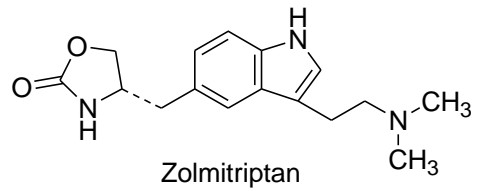
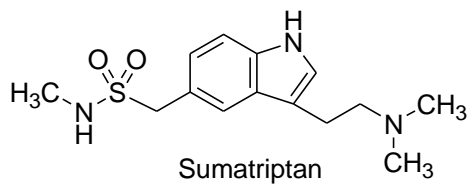
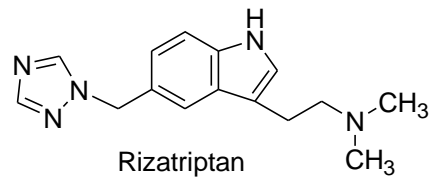
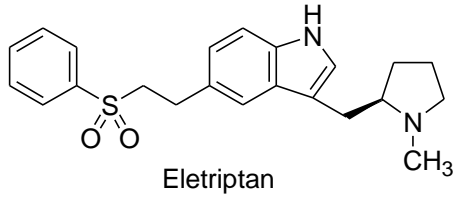
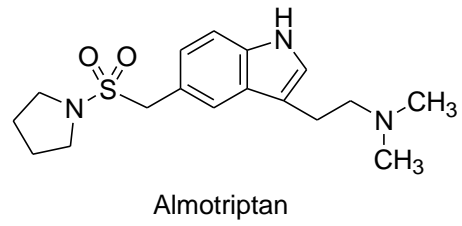
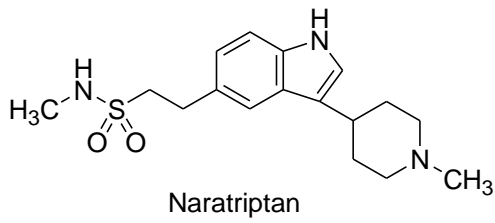
Řadí se sem také některé látky ze skupiny antivirotik (obr. 9) nebo fluvastatin, který patří do skupiny antilipidemik (obr. 10).



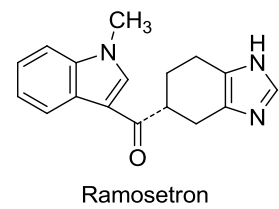
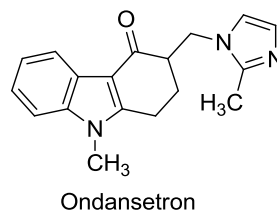
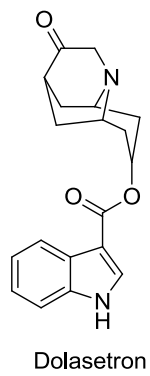
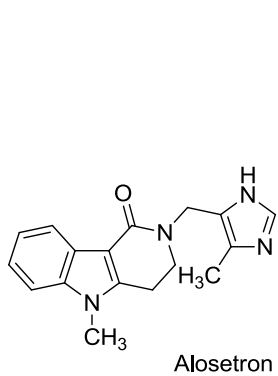
Obr. 5 Látky používané jako protizánětlivé



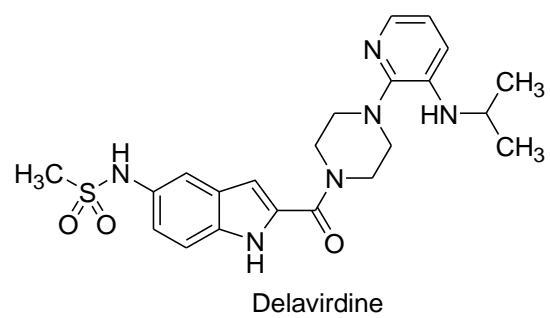
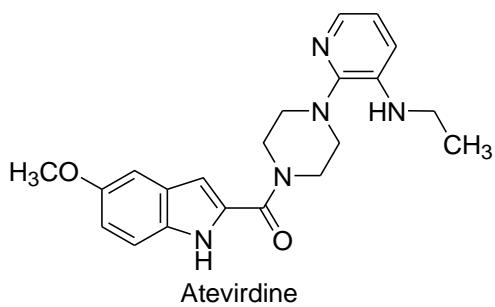
Obr. 6 Látky používané jako antihypertenziva



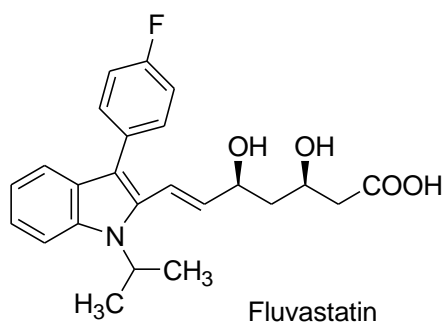
Obr. 7 Látky používané jako antimigrenetika



Obr. 8 Látky používané jako antiemetika



Obr. 9 Látky používané jako antivirotika



Obr. 10 Zástupce antilipidemik

Tyto látky byly hledány v lékopisech. Z uvedených struktur je v českém lékopise popsáno 6 látek a v americkém 10 (viz tabulka 1 a 2).

Tab. 1 Analytické metody pro vybrané deriváty indolu popsané v českém lékopise¹³

léčivo	metoda TLC	metoda HPLC
Carvedilol (obr. 6)	-	kolona: C8 MF: 0,02M KH ₂ PO ₄ pH 2 / ACN (65/35)
Etodolac (Obr. 5)	Deska: silikagel GF ₂₅₄ (úprava – kys. Askorbová/ methanol 20/80) MF: CH ₃ COOH/EtOH/Tol. 0,5/30/70	kolona: C18 MF: A: MeOH/0,1M KH ₂ PO ₄ pH7; B: ACN gradient 0-20min od 90 do 80%A; 20-40min 80-50%A
Indomethacin (obr. 5)	deska: Silikagel HF ₂₅₄ MF: petrolejový ether/ ether (30/70)	-
Ondansetron ^a (obr. 8)	deska: silikagel F ₂₅₄ MF: amoniak (26%) / MeOH/ EtAc./Cl ₂ CH ₂	kolona: nitrilová MF: ACN/ NaH ₂ PO ₄ pH 5,4
Pindolol (obr. 6)	deska: silikagel GF ₂₅₄ MF: amoniak (26%)/EtAc./MeOH 4/50/50	-
Sumatriptan ^b (obr. 7)	-	a) kolona: silikagel MF: CH ₃ COONH ₄ /MeOH 10/90 b) kolona: C18 MF: ACN/dibutylamin+H ₃ PO ₄ +NaH ₂ PO ₄ pH6,5 (25/75)

^a Popsán jako Ondansetron hydrochlorid dihydrát

^b Popsán jako Sumatriptan sukcinát

Tab. 2 Analytické metody pro vybrané deriváty indolu popsané v americkém lékopise¹⁴

léčivo	TLC	HPLC
Carprofen (obr. 5)	-	kolona: C18 MF: ACN/voda/MeOH/CH ₃ COOH
Carvedilol (obr. 6)	-	kolona: C8 MF: 0,02M K ₂ HPO ₄ pH2/ACN 69/31
Dolasetron (obr. 8)	-	a) kolona: C8 MF: A 0,01M NH ₄ H ₂ PO ₄ /ACN (1000/53); B 0,01M NH ₄ H ₂ PO ₄ /ACN (295/795) gradient 0-28min 100-0%A; 28-38min isocratic 0%A b) kolona: C18 MF: ACN/voda/HCOONH ₄ + 0,19ml trimethylamin (450/440/110)
Etodolac (obr. 5)	-	kolona: C8 MF: A voda + H ₃ PO ₄ (0,6ml/100ml); B ACN + H ₃ PO ₄ (0,6ml/100ml), gradient 5-35min 60-20%A
Fluvastatin (obr. 10)	-	kolona: C18 MF: A vodný roztok hydroxidu tetramethylamonného (pH7,2) + MeOH/ACN 3/2 (9+1); B stejná rozpouštědla jako A, ale poměr 1+9, gradient 6-20min 60-15%A
Indomethacin (obr. 5)	-	kolona: C18 MF: 0,01M Na ₂ HPO ₄ + 0,01M NaH ₂ PO ₄ v ACN a vodě (1:1)
Naratriptan (obr. 7)	-	kolona: C18 MF: A 0,05M NH ₄ H ₂ PO ₄ pH3/ACN (97/3); B 0,05M NH ₄ H ₂ PO ₄ pH3/ACN (4/1), gradient 0-35min 100-0%A 35-40min isocratic
Ondansetron (obr. 8)	-	kolona: nitrilová MF: 0,02M K ₂ HPO ₄ pH4/ACN 80/20
Pindolol (obr. 6)	-	kolona: nitrilová MF: 0,05M CH ₃ COONa pH5/ACN (65/35)
Sumatriptan (obr. 7)	-	kolona: C18 MF: dibutylamin+H ₃ PO ₄ +NaH ₂ PO ₄ pH6,5

Popsané metody využívají různé kolony, více či méně složité mobilní fáze a různé gradienty. Z dat uvedených v tabulkách 1 a 2 je zřejmé, že pro separaci daných sloučenin existuje více vhodných metod, avšak tyto jsou jen obtížně využitelné pro rychlý analytický servis, neboť jsou specifické pro danou substanci a separaci jejich nečistot a nedají se použít univerzálně.

5. Vývoj a optimalizace metod

Efektivní a rychlý vývoj metod má mimořádný vliv na celý cyklus vývoje léčiva.

5.1. Obecný postup optimalizace

Při vývoji a optimalizaci metod se hledají podmínky, které vedou k dostatečnému (optimálnímu) rozlišení (tj. kvantitativnímu měřítku rozdělení dvou látek). K rozlišení přispívají tři členy - selektivita, účinnost a kapacita (viz rovnice):

$$R_{1;2} = \frac{1}{4} \cdot \frac{r_{1;2} - 1}{r_{1;2}} \cdot \frac{k_2}{k_2 + 1} \cdot \sqrt{n}$$

selektivita kapacita

V případě kapalinové chromatografie existuje hned několik možností, kterými lze změnit jeden, dva nebo všechny tři členy a tím změnit rozlišení. Při hledání vhodných podmínek dělení lze měnit charakter náplně (SF), rozměry částic náplně a kolony (v případě TLC délku vyvíjecí dráhy), složení a průtok MF a pracovní teplotu.²

Při vyšší pracovní teplotě dochází k poklesu viskozity a zvýšení difuzních koeficientů, což vede k mírnému zvýšení účinnosti separace. Teplota má vedle účinnosti vliv i na retenci, protože ovlivňuje kapacitní poměry:

$$\log k = a + \frac{b}{T}$$

k...kapacitní poměr; a,bexperimentální konstanty závislé na chromatografickém systému a na vlastnostech separovaných látek²

Mimo jiné lze při optimalizaci chromatografického procesu dále měnit např. způsob detekce nebo typ a citlivost detektoru. Nicméně platí, že výběr experimentálních parametrů, které se mohou optimalizovat, je závislý na charakteru vzorku, zařízení, které máme k dispozici, a efektu, který je od separace požadován. Vhodnou kombinací je možné dosáhnout požadovaného rozdělení látek v nejkratším čase. V praxi obvykle stačí, když se podmínky separace přiblíží optimálním podmínkám obměnou jedné nebo několika málo veličin. Pracnost a doba potřebná k nalezení vhodných podmínek se zvyšuje s rostoucím počtem látek ve vzorku a s rostoucími nároky na rozlišení a klesá s většími praktickými zkušenostmi a teoretickými znalostmi pracovníka.^{1;2}

Mezi používané způsoby optimalizace analytických metod doprovázejících syntézu patří tzv. empirické postupy, kdy se obměňují podmínky separace až do dosažení požadované kvality. Před zahájením vývoje a optimalizace metody je nutné položit si několik otázek a tím si ujasnit povahu separačního problému, který se má řešit. Mezi základní otázky, na které by měla být dána odpověď před zahájením vývoje metody, patří především tyto:

- Co chci? Jinými slovy, jaký je pravý účel separace.
- Co mám? To znamená, které důležité informace o analytickém záměru a vzorku jsou k dispozici.
- Jak to můžu udělat? Mám všechno, co potřebuji a je to, co chci dělat, opravdu možné?

Správné zodpovězení těchto otázek může ovlivnit úspěch a rychlost optimalizace metody.^{1;2;14}

Ve většině případů není jediné optimální řešení daného separačního problému a obvykle je zlepšováno jedno ze tří hlavních hledisek separace (rozlišení, rychlost separace a množství separovaných látek), např. lepšího rozlišení lze dosáhnout pomalejší analýzou nebo s menším množstvím vzorku.²

5.2. Optimalizace HPLC

U této metody výběr pracovních podmínek a jejich optimalizace nabízí více možností, než je tomu u chromatografie na tenké vrstvě. Obecně lze postupovat v několika krocích:

- Volba chromatografického systému (systém normálních fází, obrácených fází, apod.)
- Volba určité kolony
- Volba vhodných pracovních podmínek

Ke zvolení správné náplně kolony a mobilní fáze mohou pomoci údaje o dělení podobného typu sloučenin, popřípadě předběžné pokusy na TLC se stejným adsorbentem a obměňováním MF. Složení mobilní fáze, které se jeví jako optimální pro TLC, však není bez určité obměny vhodné pro použití na kolonové chromatografii.²

Při volbě odpovídající kolony má pro úspěšnou separaci v HPLC největší význam složení mobilní fáze. Výběr mobilní fáze výrazně ovlivňuje selektivitu a kapacitní příspěvky k rozlišení. Vliv na separaci se tedy projeví především prostřednictvím kapacitních poměrů. K ovlivňování retence (kapacitních poměrů, retenčních objemů, elučních poměrů) se používají dvousložkové, třísložkové i složitější mobilní fáze, jež jsou složeny z různých rozpouštědel, někdy s přísadou soli, tlumivých roztoků, bází nebo kyselin. Výběr mobilní fáze má určitý vliv i na účinnost separace, protože její viskozita ovlivňuje difuzní koeficienty chromatografovaných látek (čím nižší viskozita tím lepší). Viskozitu mobilní fáze ovlivňuje také teplota.² Výběr rozpouštědel do mobilní fáze u HPLC je ovšem značně omezen. Kromě nezbytné mísitelnosti s vodou (u RP-HPLC), resp. vzájemné mísitelnosti a rozpustnosti analytu v mobilní fázi, přibývá i omezení v souvislosti s typem detekce. (UV detekce versus MeOH/ACN/THF/V ve většině případů).

5.3. Optimalizace TLC

V případě chromatografie na tenké vrstvě je pro ovlivnění rozlišení nejdůležitější selektivita systému, která je dána volbou stacionární a mobilní fáze. V TLC nelze ovlivnit účinnost ani faktor kapacity změnou rychlosti toku mobilní fáze. Výběr mobilní a stacionární fáze proto rozhoduje o kvalitě rozdělení látek na chromatogramu.² Výhodou TLC metodiky při její optimalizaci je možnost velmi rychlé změny selektivity systému pomoci změny rozpouštědel, kde je možné vybírat z daleko větší škály oproti HPLC.

6. Analyzované sloučeniny

Tato práce je zaměřena na vypracování analytické metody pro dělení látek, které připravil doktor Mělnický v rámci své doktorské práce. Látky jsou studovány jako potenciálně biologicky aktivní sloučeniny, především s cytostatickou aktivitou.

Syntéza těchto sloučenin je patrná ze schématu 1. Vzhledem k tomu, že sloučeniny často vznikají ve směsi, je pro optimalizaci jejich syntézy nutné nalézt vhodnou analytickou metodu, která by tyto látky separovala.

Analytická metoda byla vypracována pro sloučeniny:

název sloučeniny	označení sloučeniny	typ substituentu R (viz schéma 1)
2-Oxo-2-fenyletyl (1 <i>E</i>)- <i>N</i> -fenyletanhydrazonoát	6a	H
2-Oxo-2-fenyletyl 1 <i>H</i> -indol-2-karboxylát	7a	H
4-Fenyl-1 <i>H</i> -[1,4]oxazino[4,3- <i>a</i>]indol-1-on	8a	H
4-Fenylpyrano[4,3- <i>b</i>]indol-1(5 <i>H</i>)-on	9a	H
2-(4-Fluorofenyl)-2-oxoethyl (2 <i>E</i>)-2-(fenylhydrazono)propanoát	6b	F
2-(4-Fluorofenyl)-2-oxoethyl 1 <i>H</i> -indol-2-karboxylát	7b	F
4-(4-Fluorofenyl)-1 <i>H</i> -[1,4]oxazino[4,3- <i>a</i>]indol-1-on	8b	F
4-(4-Fluorofenyl)pyrano[3,4- <i>b</i>]indol-1(9 <i>H</i>)-on	9b	F

Tyto látky byly identifikovány a charakterizovány pomocí NMR. V případě látky 6a a 8a rovněž pomocí RTG. ¹⁵

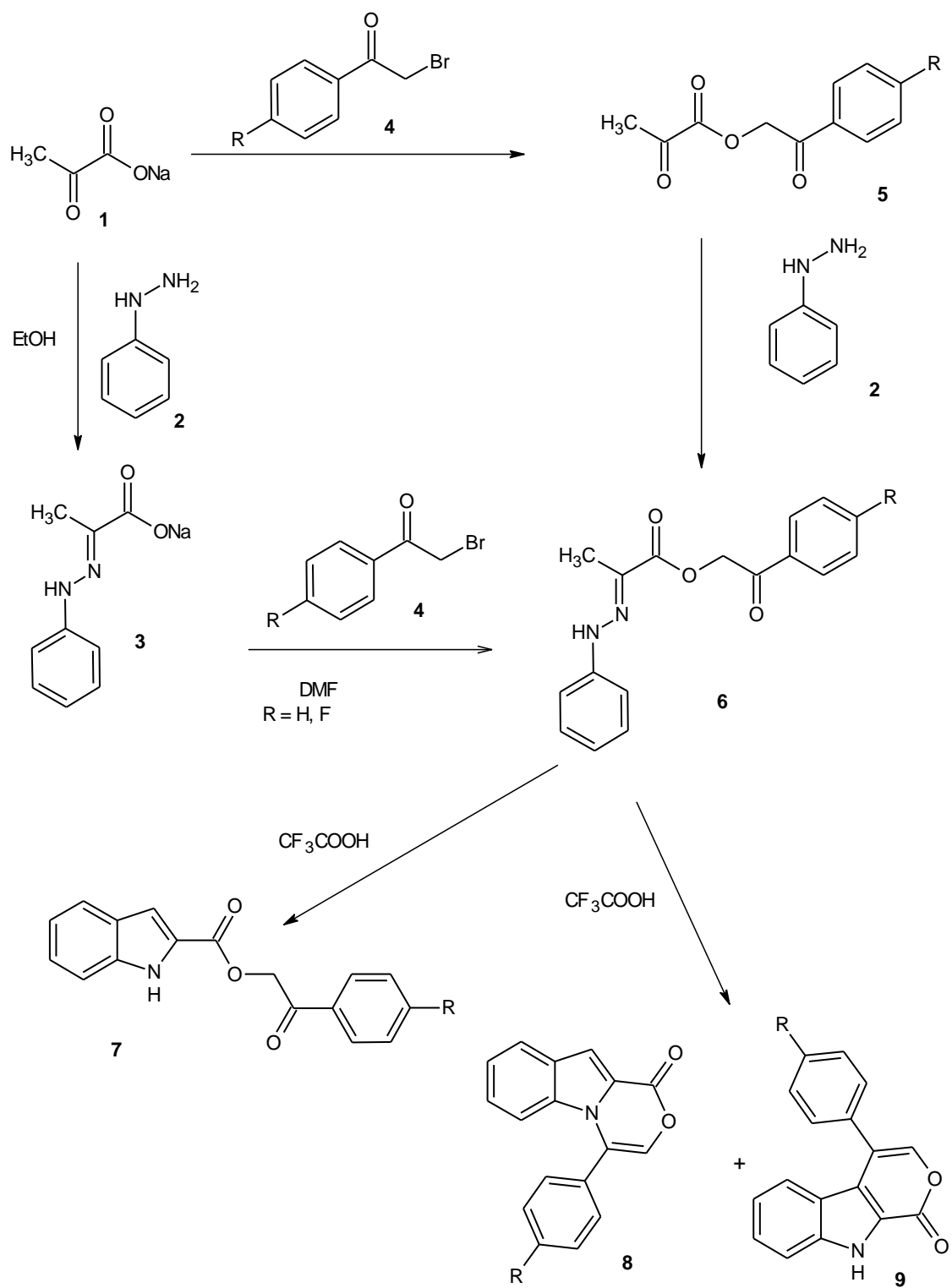


Schéma 1 Syntéza studovaných látek

7. Experimentální část

7.1. Technika TLC

7.1.1. Použité chemikálie

Toluen p.a; ethylacetát p.a; acetonitril Lichrosolv isocratic grade (MERCK Německo); analyzované sloučeniny

7.1.2. Použité tenké vrstvy

Aluminium oxid 60 F₂₅₄ neutral; POLYGRAM SIL G/UV₂₅₄ (tloušťka vrstvy 0,2 mm)

7.1.3. Příprava vzorku a vyvíjecích soustav

Do vialek o objemu 1,5 ml bylo naváženo 0,5 mg vzorku a toto množství bylo rozpuštěno v 1 ml acetonitrilu.

Do kádinky bylo připraveno 20 ml mobilní fáze, jejíž složení odpovídá zvolené metodě, tzn. pro metodu TLC1 byla připravena mobilní fáze o složení Toluen/Ethylacetát (1/1) smícháním 10 ml toluenu a 10 ml ethylacetátu; metoda TLC2 měla složení Toluen/Ethylacetát v poměru 7/3 a metoda TLC3 obsahovala Toluen/Ethylacetát v poměru 9/1. Kádinka byla přiklopena Petriho miskou a několik minut ponechána uzavřena.

Z komerčně vyráběných tenkých vrstev byla vystřižena vrstva s požadovaným rozměrem (delší strana cca 10 cm), přičemž skutečná vyvíjecí dráha se potom pohybovala od 8 do 9 cm. Na takto připravenou vrstvu byly nanášeny pomocí mikropipet roztoky vzorků a to tak, že celková nanáška každého roztoku byla 6 μ l.

7.1.4. Způsob detekce

Detekce byla prováděna pomocí UV záření o vlnové délce 254 nm.

7.2. Technika HPLC

7.2.1. Použité chemikálie

Acetonitril Lichrosolv isocratic grade (MERCK Německo), voda pro HPLC Lichrosolv, methanol Lichrosolv (MERCK Německo), hydrogenfosforečnan draselný p.a, kyselina

octová p.a (99,8%), kyselina fosforečná (85%), dihydrogenfosforečnan amonný p.a, tetrahydrofuran Lichrosolv (MERCK Německo)

7.2.2. Použitý přístroj

Měření bylo prováděno na kapalinovém chromatografu SHIMADZU LC-10AD VP (viz obr. 11), přičemž dávkování bylo realizováno pomocí autosampleru, objem nástřiku činil 10 μ l. Při analýzách byla snímána UV/VIS spektra v rozmezí vlnových délek 200 – 400 nm. Vlnová délka detekce pro vyhodnocení byla zvolena 210 nm nebo 240 nm. Měření bylo realizováno na koloně LUNA C18 (4,6x100 mm) s rozměrem částic 3 μ m.



Obr. 11 Chromatograf použitý při měření

7.2.3. Příprava vzorků

Pro přípravu vzorků byl do vzorkovniček navažován minimálně 1 mg a maximálně 1,2 mg dané látky. Toto množství bylo rozpuštěno v 10 ml roztoku o složení, které obvykle odpovídalo složení mobilní fáze. V případě, že mobilní fáze obsahovala pufr, byl tento pufr nahrazen při rozpouštění navážky vodou. Pokud byla do použité mobilní fáze přidávána kyselina, do roztoku, ve kterém se navážka rozpouštěla, se tato kyselina nepřidávala.

Při vlastním rozpouštění látek se postupovalo následujícím způsobem: K navážce dané látky se nejprve přidalo požadované množství odpovídajících

organických rozpouštědel. Navážka se za použití ultrazvukové lázně dokonale rozpustila a k roztoku se přidalo požadované množství vody.

Vlastní modelová směs byla smíchána z připravených roztoků studovaných látek tak, že konečný roztok obsahoval 300 µl každého ze studovaných roztoků.

7.2.4. Příprava mobilních fází

Mobilní fáze byla připravována smícháním požadovaného množství organického rozpouštědla a vody (pufru), a to v závislosti na použité metodě (viz tabulka 3). Pufr byl připravován rozpuštěním vypočteného množství dané soli kyseliny fosforečné ve vodě vhodné pro HPLC. Jeho pH bylo upravováno pomocí koncentrované kyseliny trihydrogenfosforečné (85%). Po smíchání složek mobilní fáze bylo provedeno její odplynění v ultrazvukové lázni.

Tab. 3 Poměry rozpouštědel v mobilní fázi

metoda	ACN	MeOH	THF	voda	pufr	CH ₃ COOH	H ₃ PO ₄
CYKLIS1	50	-	-	50	-	-	-
CYKLIS2	-	70	-	30	-	-	-
CYKLIS3	50	-	-	-	50 ^c	-	-
CYKLIS4	50	-	-	-	50 ^d	-	-
CYKLIS5	50	-	-	50	-	0,1% (v/v)	-
CYKLIS6	50	-	-	50	-	1% (v/v)	-
CYKLIS7	50	-	-	50	-	-	0,1% (v/v)
CYKLIS8	50	-	-	50	-	-	0,5% (v/v)
CYKLIS9	50	-	-	-	50 ^e	-	-
CYKLIS10	50	-	-	-	50 ^f	-	-
CYKLIS11	50	-	-	-	50 ^g	-	-
CYKLIS12	50	-	-	-	50 ^h	-	-
CYKLIS13	50	-	-	-	50 ⁱ	-	-
CYKLIS14	-	-	30	70	-	-	-
CYKLIS15	-	-	50	50	-	-	-
CYKLIS16	-	-	45	55	-	-	-

^c Pufr: 0,025M K₂HPO₄ pH7

^d Pufr: 0,05M K₂HPO₄ pH7

^e Pufr: 0,025M K₂HPO₄ pH5

^f Pufr: 0,025M KH₂PO₄ pH3

^g Pufr: 0,05M KH₂PO₄ pH3

^h Pufr: 0,025M (NH₄)H₂PO₄ pH3

ⁱ Pufr: 0,025M (NH₄)H₂PO₄ pH4,7

metoda	ACN	MeOH	THF	voda	pufn	CH ₃ COOH	H ₃ PO ₄
CYKLIS17	30	-	20	50	-	-	-
CYKLIS18	25	-	25	50	-	-	-

ACN=acetonitril, MeOH=metanol, THF=tetrahydrofuran

8. Výsledky a diskuse

Tato práce je zaměřena na vývoj metody pro rychlý analytický servis doprovázející syntézu látek potenciálně zajímavých pro farmaceutický průmysl.

8.1. Technika TLC

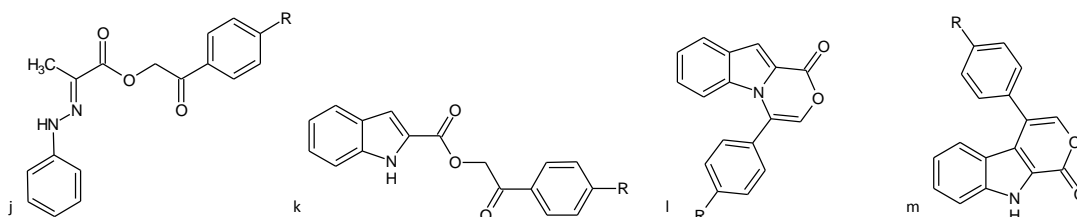
Při analýze vzorků touto technikou bylo studováno jejich chování při využití tenké vrstvy, jejímž sorbentem byl oxid hlinitý. Rozpouštědly tvořícími mobilní soustavu byly toluen a ethylacetát. Tato primární kombinace byla zvolena na základě konzultace a zkušeností pracovníků výzkumu, kteří tato rozpouštědla při chromatografii využívají velmi často, a také na základě dobré rozpustnosti studovaných látek v těchto rozpouštědlech.

Již při první zvolené soustavě (TLC1) je vidět náznak dělení (tabulka 4). Eluční síla mobilní fáze se však ukázala být příliš velká, proto byla snížena změnou poměru rozpouštědel. Druhá zvolená soustava (TLC2) nám přinesla lepší separaci látek, a však ty měly příliš malou zádrž na desce (tabulka 2), a proto byla ještě více zeslabena eluční síla mobilní fáze (TLC3). Toto zeslabení se ukázalo být velmi účinné a separace byla považována za dostatečnou (tabulka 4).

Tab. 4 retardační faktor studovaných látek, u kterých R je H

metoda	poměr tol./etac.	R _f			
		látka 6a ^j	látka 7a ^k	látka 8a ^l	látka 9a ^m
TLC1	1/1	0,90	0,94	0,98	0,85
TLC2	7/3	0,79	0,85	0,95	0,72
TLC3	9/1	0,46	0,68	0,88	0,39

Tol. = toluen, etac. = ethylacetát, R_f = retardační faktor



Stejné metody byly použity i pro látky, kde substituent R byl fluor. Porovnájí – li se data uvedená v tabulce 4 s daty v tabulce 5, zjistíme, že chování látek obsahujících fluor je při dělení velmi podobné chování látek, kde R je vodík.

Tab. 5 retardační faktor studovaných látek, kde substituent R je F

metoda	Poměr tol./etac.	R_f			
		látka 6b ^j	látka 7b ^k	látka 8b ^l	látka 9b ^m
TLC1	1/1	0,88	0,92	0,95	0,80
TLC2	7/3	0,76	0,84	0,93	0,65
TLC3	9/1	0,51	0,65	0,88	0,88

Zvolená mobilní soustava byla nakonec spíše jen pro srovnání použita i na silikagelovou tenkou vrstvu, která je rovněž běžně užívána. Srovnání retardačních faktorů látek substituované syntézy poskytuje tabulka 6.

Tab. 6 retardační faktor studovaných látek v závislosti na materiálu tenké vrstvy

materiál tenké vrstvy	R_f			
	látka 6b	látka 7b	látka 8b	látka 9b
oxid hlinitý	0,51	0,65	0,88	0,42
silikagel	0,34	0,52	0,76	0,32

8.2. Technika HPLC

Informace o podobném chování látek, kde R je vodík, a látek substituovaných fluorem, získané pomocí techniky TLC, byly důvodem k tomu, aby vývoj a optimalizace metody pro HPLC probíhal pouze pro látky, u kterých R je vodík. Výsledná metoda byla potom vyzkoušena i na látky se substitucí fluorem. Tento postup nám výrazně zkrátil dobu potřebnou k nalezení vhodné metodiky.

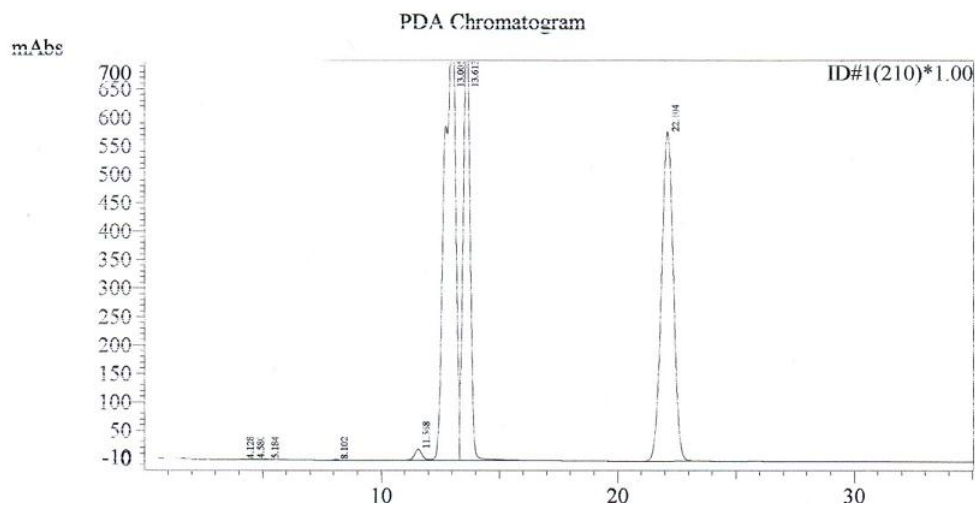
System, kterým bylo postupováno při analýzách, nám dovoluje srovnat chování látek v souvislosti s různými modifikacemi MF. Celé měření bylo realizováno na koloně LUNA C18 (4,6x100 mm) s rozměrem částic 3 μ m. Pro všechny metody byly nastaveny některé společné parametry. Nastavení průtoku bylo zvoleno podle optimálních parametrů doporučených výrobcem (průtok 0,6 ml/min). Při všech analýzách byla kolona termostatem udržována při teplotě 30 °C a nastříkovaný objem vzorku byl

10 µl. Celkový přehled použitých metod přináší tabulka 7 (složení pufru viz tabulka 1 poznámky pod čarou).

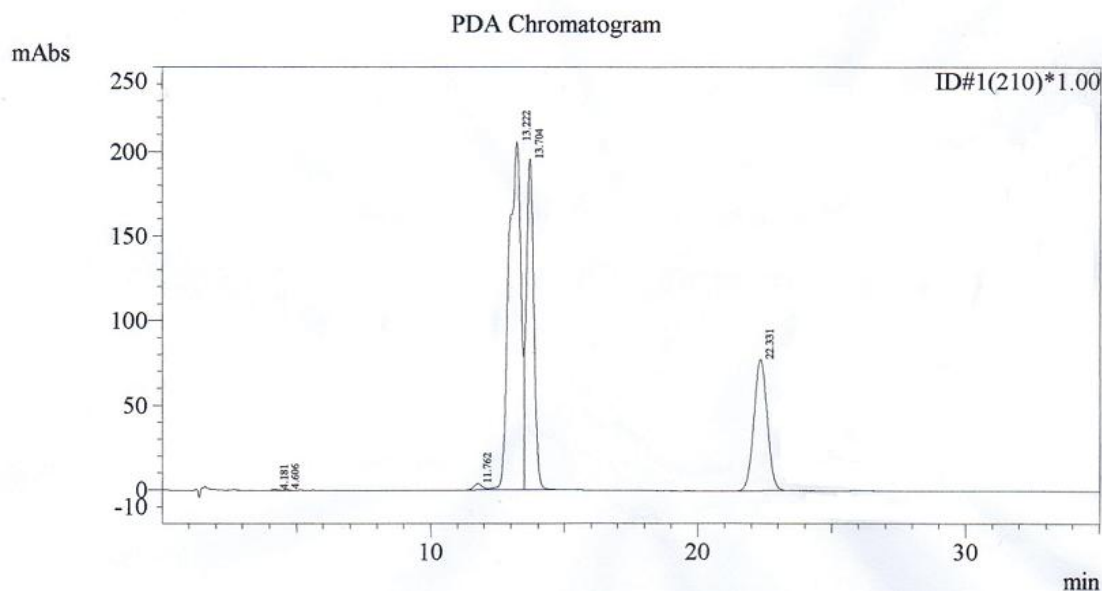
Tab. 7 celkový přehled použitých metod při HPLC

metoda	průtok MF (ml/min)	teplota kolony (°C)	vlnová délka detekce (nm)	nástřik (µl)	mobilní fáze
CYKLIS1	0,6	30	210	10	ACN/voda 50/50
CYKLIS2	0,6	30	210	10	MeOH/voda 70/30
CYKLIS3	0,6	30	210	10	ACN/pufr 50/50
CYKLIS4	0,6	30	210	10	ACN/pufr 50/50
CYKLIS5	0,6	30	240	10	ACN/voda+kys.octová 50/50+0,1%obj.
CYKLIS6	0,6	30	240	10	ACN/voda+kys.octová 50/50 + 1%obj.
CYKLIS7	0,6	30	210	10	ACN/voda+kys.fosforečná 50/50+0,1%obj.
CYKLIS8	0,6	30	210	10	ACN/voda+kys.fosforečná 50/50+0,5%obj.
CYKLIS9	0,6	30	210	10	ACN/pufr 50/50
CYKLIS10	0,6	30	210	10	ACN/pufr 50/50
CYKLIS11	0,6	30	210	10	ACN/pufr 50/50
CYKLIS12	0,6	30	210	10	ACN/pufr 50/50
CYKLIS13	0,6	30	210	10	ACN/pufr 50/50
CYKLIS14	0,6	30	240	10	THF/voda 30/70
CYKLIS15	0,6	30	240	10	THF/voda 50/50
CYKLIS16	0,6	30	240	10	THF/voda 45/55
CYKLIS17	0,6	30	240	10	ACN/THF/voda 30/20/50
CYKLIS18	0,6	30	240	10	ACN/THF/voda 25/25/50

Provedené metody nám umožňují mimo jiné srovnat chování studovaných látek v systémech, které jako polárnější složku mobilní fáze obsahují vodu nebo pufr. Jak ukazují obrázky 12a a 12b, separace u obou použitých metod je srovnatelná (rozdíly v absorbanci jsou způsobeny nestejným namícháním první modelové směsi).

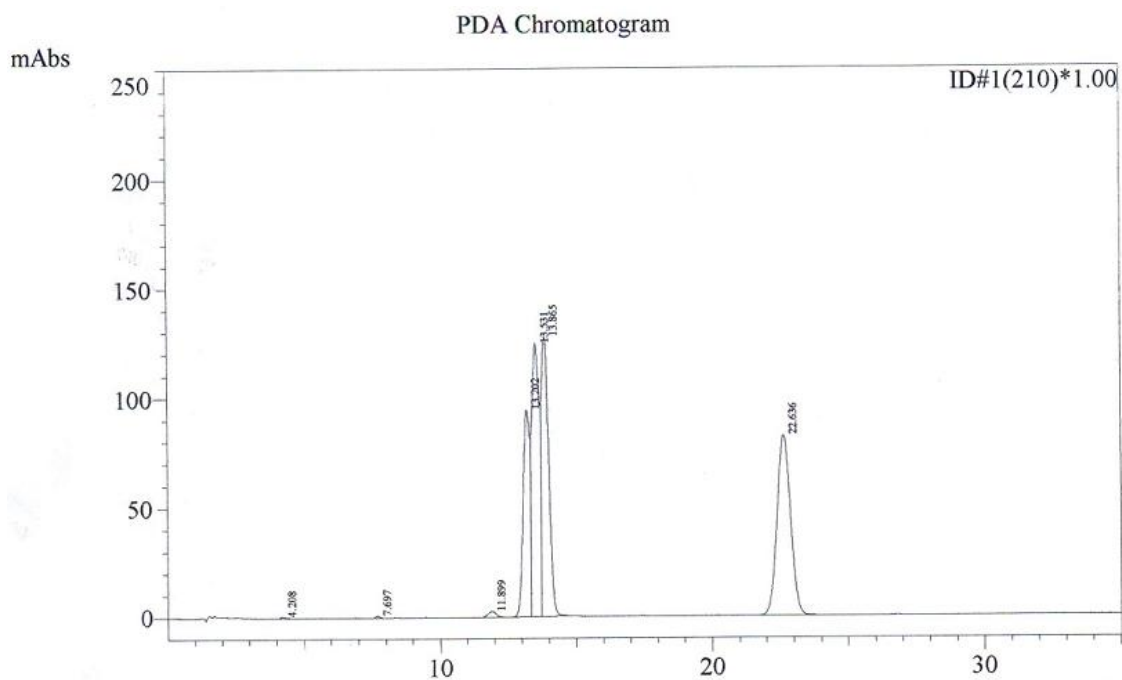


Obr. 12a chromatogram metody CYKLIS1 (viz tabulka 1)

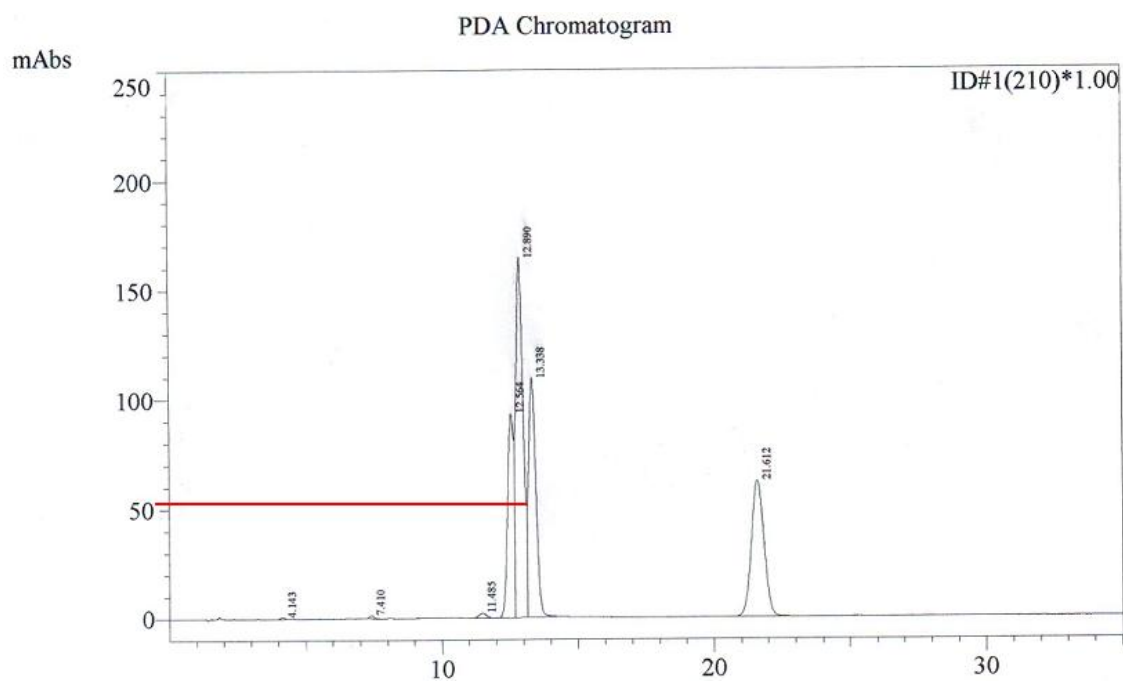


Obr. 12b chromatogram metody CYKLIS3 (viz tabulka 1)

Porovnáváme-li chování studovaných látek v závislosti na pH pufru použitého v mobilní fázi, můžeme pozorovat postupné, avšak poměrně malé, zlepšení separace s klesajícím pH (viz obr. 12b, 13a-b).

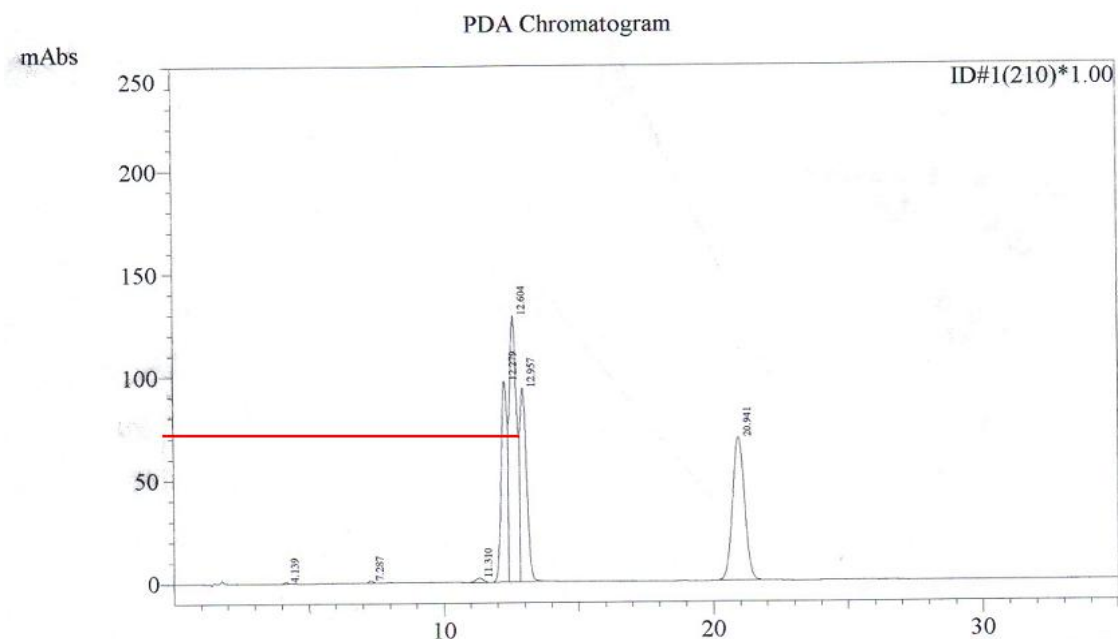


Obr. 13a Chromatogram metody CYKLIS9



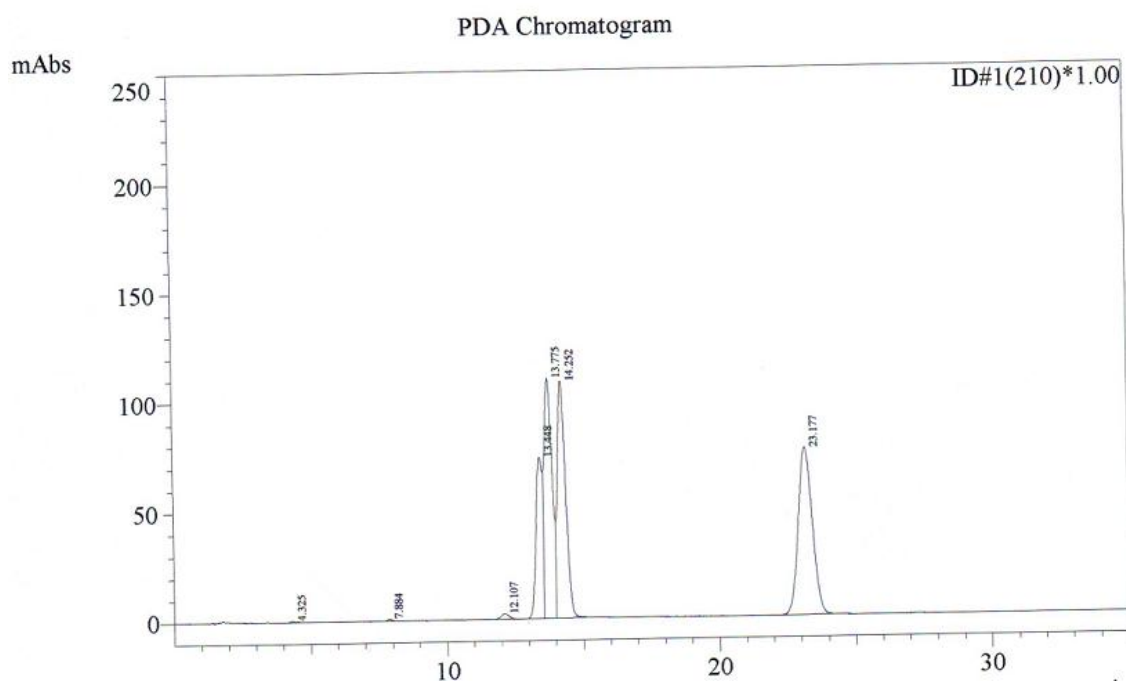
Obr. 13b chromatogram metody CYKLIS10

Zvýšení koncentrace pufru nemělo významný efekt na rozlišení látek, jak ukazuje porovnání obrázků 13b a 14.



Obr. 14 Chromatogram metody CYKLIS11

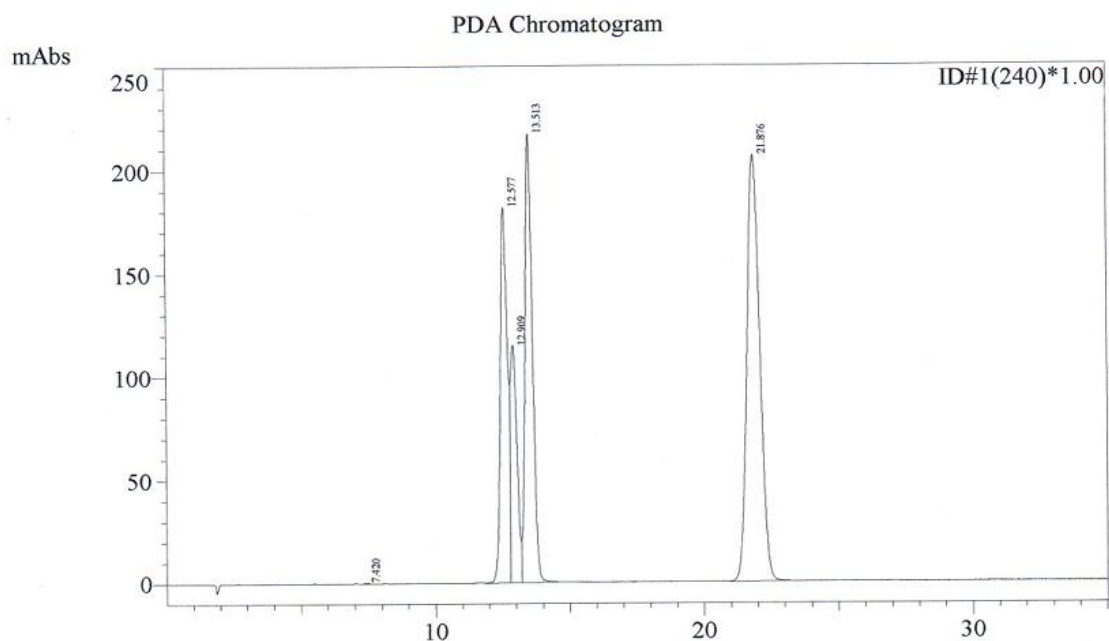
Výraznou změnu v separaci nepřinesla ani změna v soli použité k přípravě pufru, jak dokazuje porovnání obrázků 13b a 15. Obrázek 13b vyobrazuje chromatogram metody, ve které byl na přípravu pufru použit dihydrogenfosforečnan draselný, ve druhém případě je použit dihydrogenfosforečnan amonný.



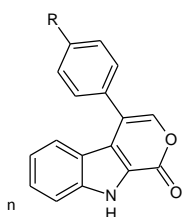
Obr. 15 Chromatogram metody CYKLIS12

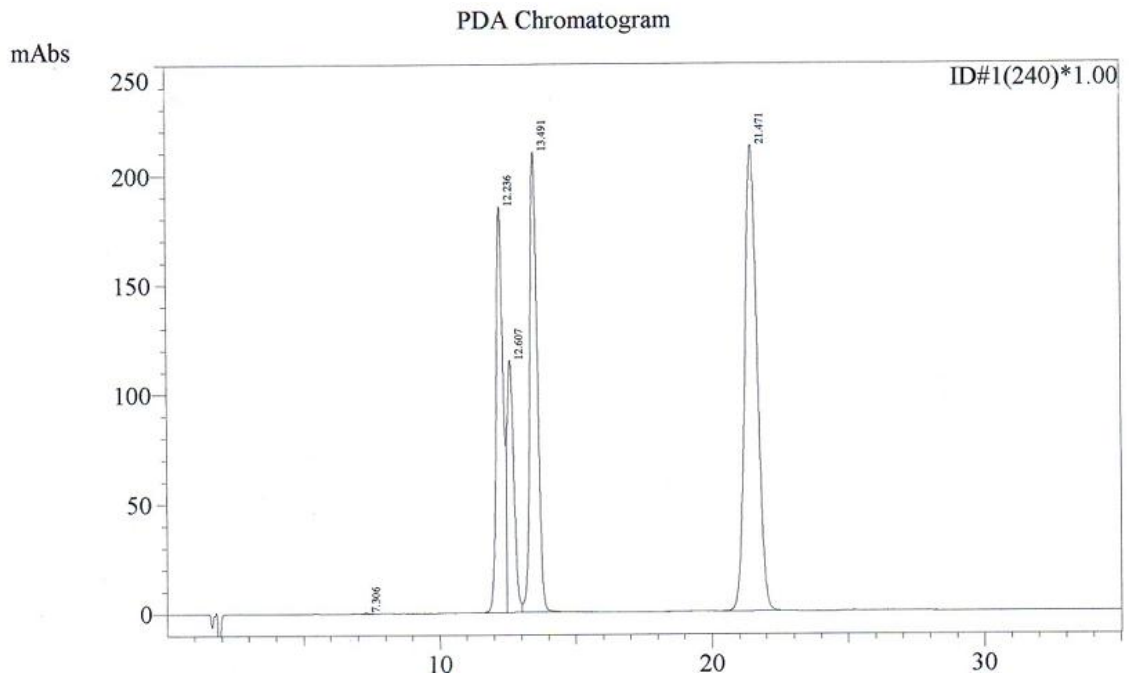
Znatelné zlepšení separace jsme mohli pozorovat, pokud byla k mobilní fázi ACN/voda přidána kyselina. Jako přídavek k mobilní fázi byla volena nejprve kyselina octová

(obr. 16a-b), a potom také kyselina fosforečná (obr. 17a-b). Při přidavku 1% (v/v) kyseliny octové bylo dosaženo úplného vydělení píku látky 9aⁿ (obr.16b). Pro detekci při analýze v případě MF obsahující kyselinu octovou byla použita vlnová délka 240 nm, protože při běžně používaných 210 nm tato kyselina záření absorbuje. V případě kyseliny fosforečné došlo k viditelnému oddělení látek, ale separace nebyla dostatečná (viz obr. 17b).

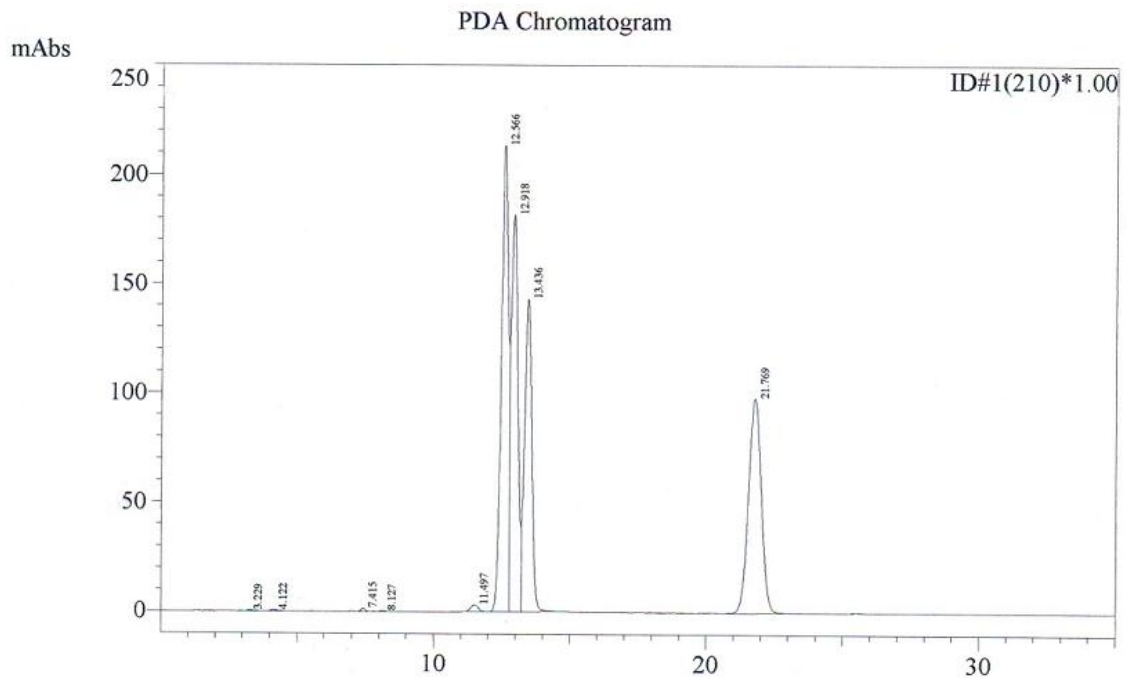


Obr. 16a Chromatogram metody CYKLIS5

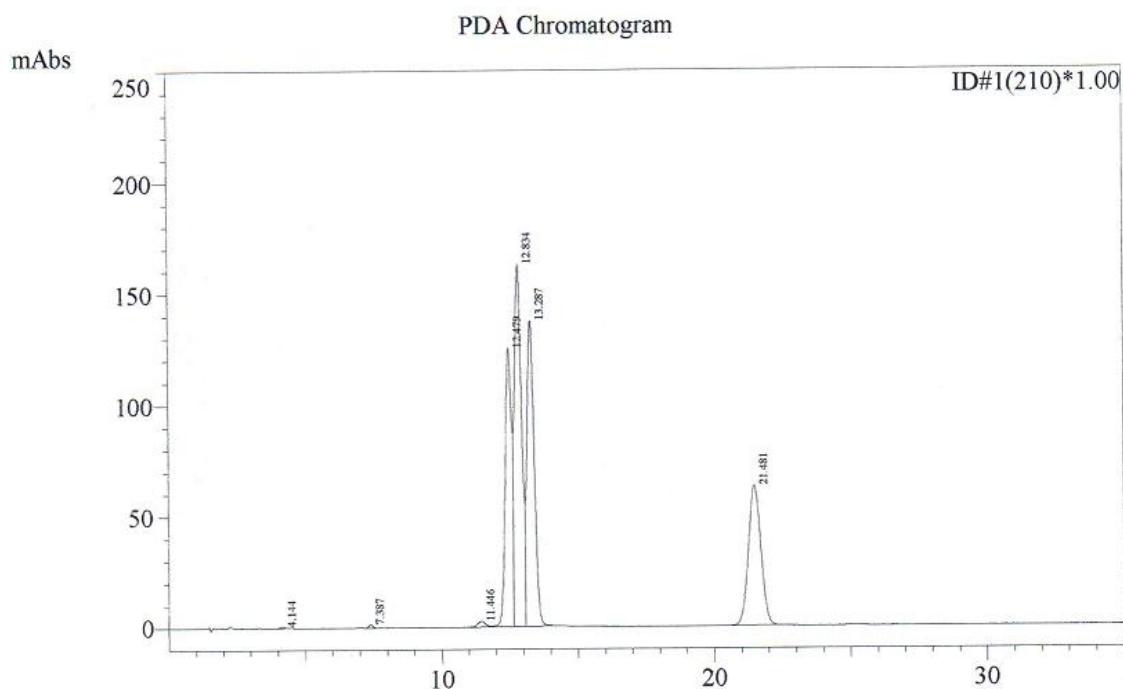




Obr. 16b Chromatogram metody CYKLIS6



Obr. 17a Chromatogram metody CYKLIS7



Obr. 17b Chromatogram metody CYKLIS8

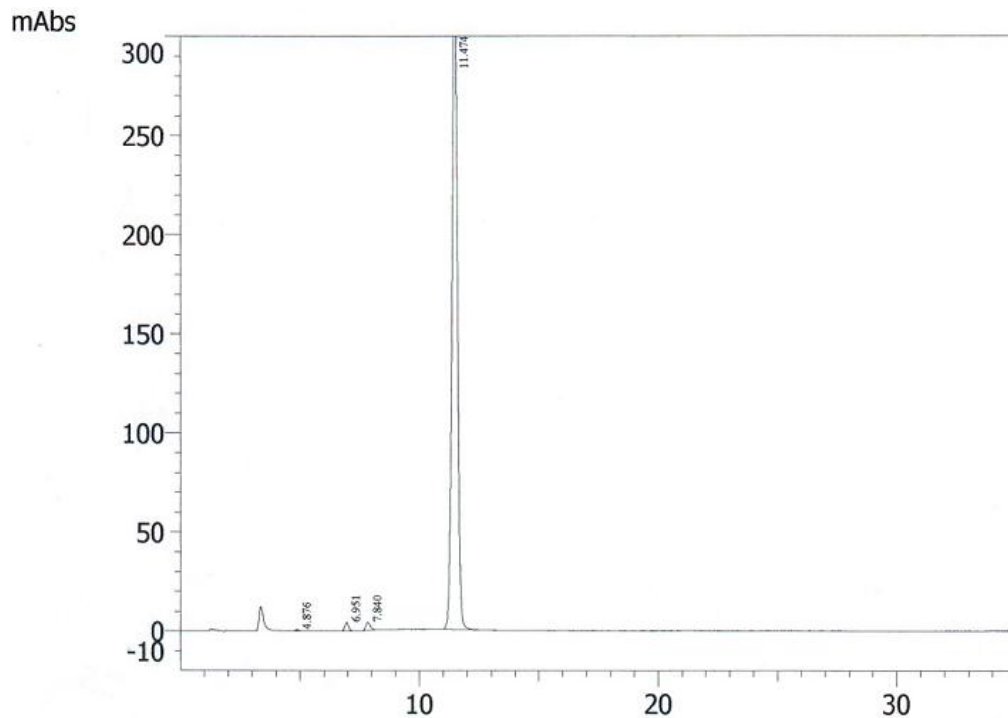
V rámci dalšího testování, respektive pokračujícího vývoje metody, bylo přistoupeno ke změně selektivity systému změnou organické složky mobilní fáze, přičemž byl volen takový poměr organická fáze/voda, aby zůstala zachována eluční síla mobilní fáze.

Nejprve byl acetonitril nahrazen methanolem a analýza byla provedena pro každou látku samostatně. Porovnáme – li retenční časy látek v systému s mobilní fází ACN/voda a MeOH/voda, zjistíme, že se výrazně snížila zadrž látek na koloně (viz tabulka 8).

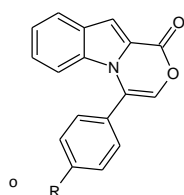
Tab. 8 retenční časy v závislosti na organickém rozpouštědle použitém v mobilní fázi

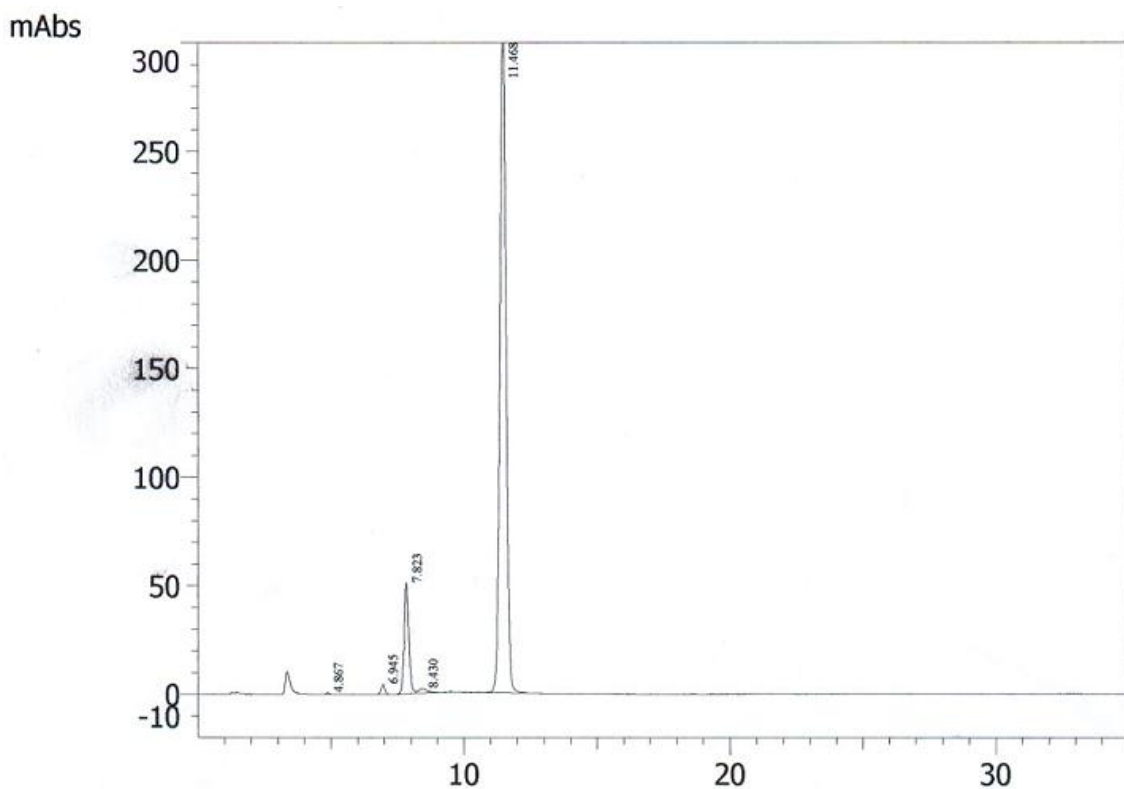
mobilní fáze	retenční čas			
	látka 6a	látka 7a	látka 8a	látka 9a
ACN/voda	12,248	12,560	21,297	13,177
MeOH/voda	5,135	5,981	11,474	11,527

Samostatné analýzy navíc odhalily nestabilitu látky 8a^o (viz obr. 18a-b). Z tohoto důvodu byl methanol jako součást mobilní fáze zavrhnut. Produkty, které v tomto rozpouštědle vznikají, dále studovány nebyly.



Obr. 18a Chromatogram metody CYKLIS2 – látka rozpuštěna těsně před nástřikem

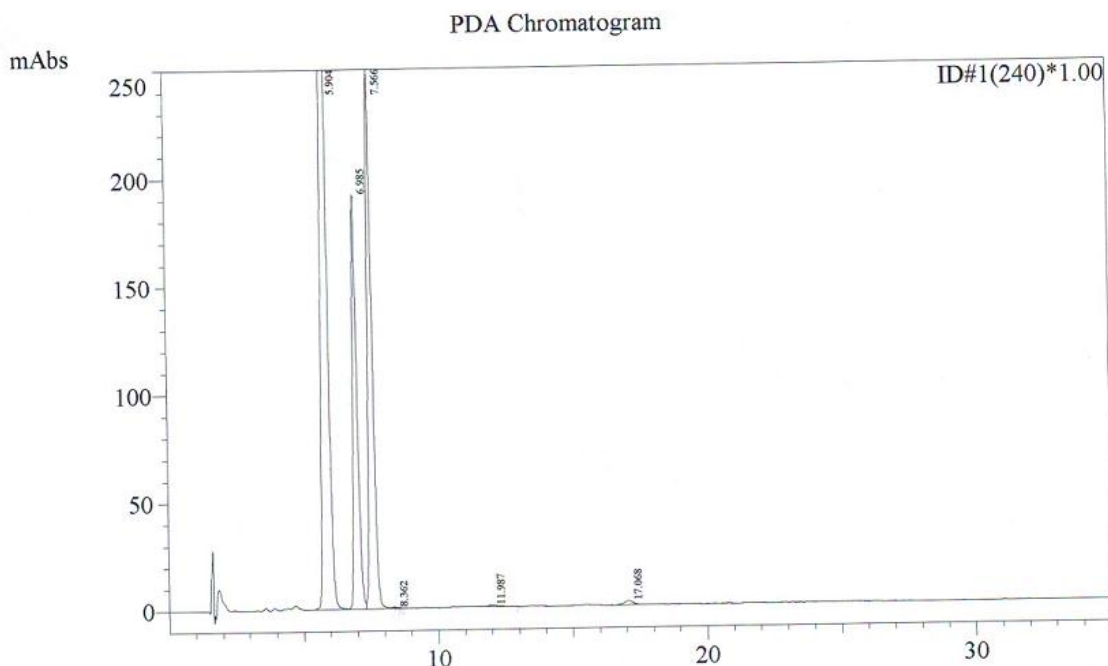




Obr. 18b Chromatogram metoda CYKLIS2 – nástřik cca 60minut od rozpuštění látky

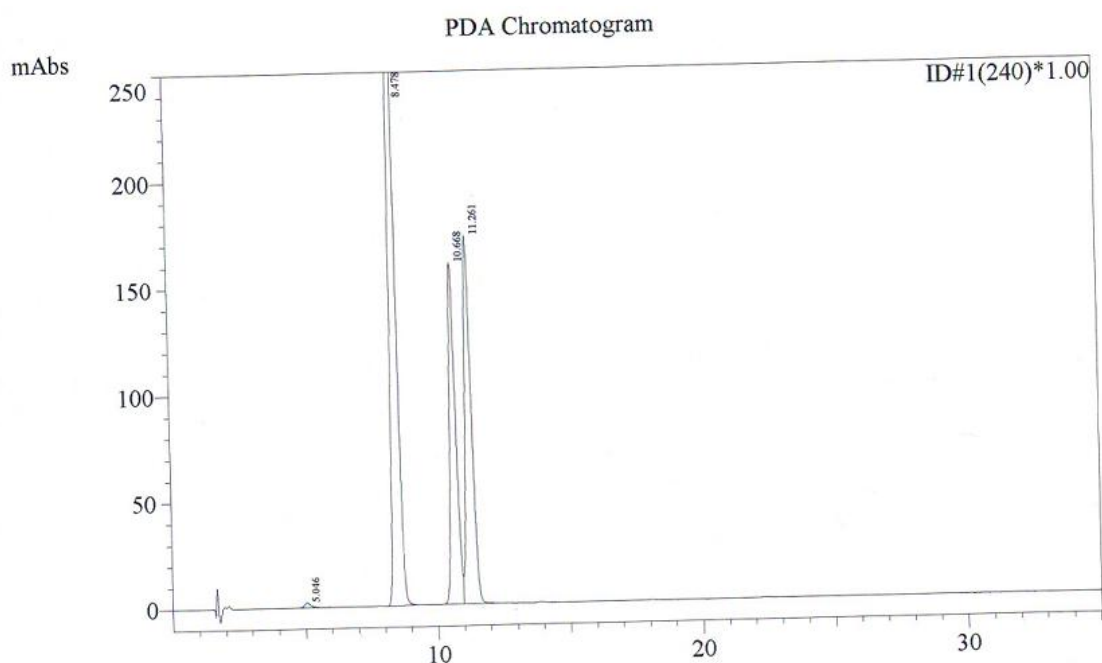
Druhou volbou pro změnu organické složky mobilní fáze byl tetrahydrofuran, který mění selektivitu systému a má větší eluční sílu na nepolární koloně. U metod používajících toto rozpouštědlo byla vlnová délka detekce opět 240 nm, protože při 210 nm tetrahydrofuran absorbuje.

První metoda využívající toto rozpouštědlo měla nastaven poměr THF/voda 30/70. Při použití této mobilní fáze se ukázalo, že její eluční síla nestačí k vymytí studovaných látek z kolony za dobu nastavenou pro jednu analýzu (35minut). Proto byla zvýšena eluční síla a zvolený poměr složek mobilní fáze byl určen 50/50 (viz obr. 19a).



Obr.19a Chromatogram metody CYKLIS15

Z chromatogramu je zřetelně vidět, že zvolený poměr složek značně zvýšil eluční sílu. Dále byla testována mobilní fáze THF/voda 45/55, která má nižší eluční sílu (viz obr. 19b). Při porovnání obrázků 19a a 19b můžeme pozorovat, že ke zlepšení separace téměř nedochází.

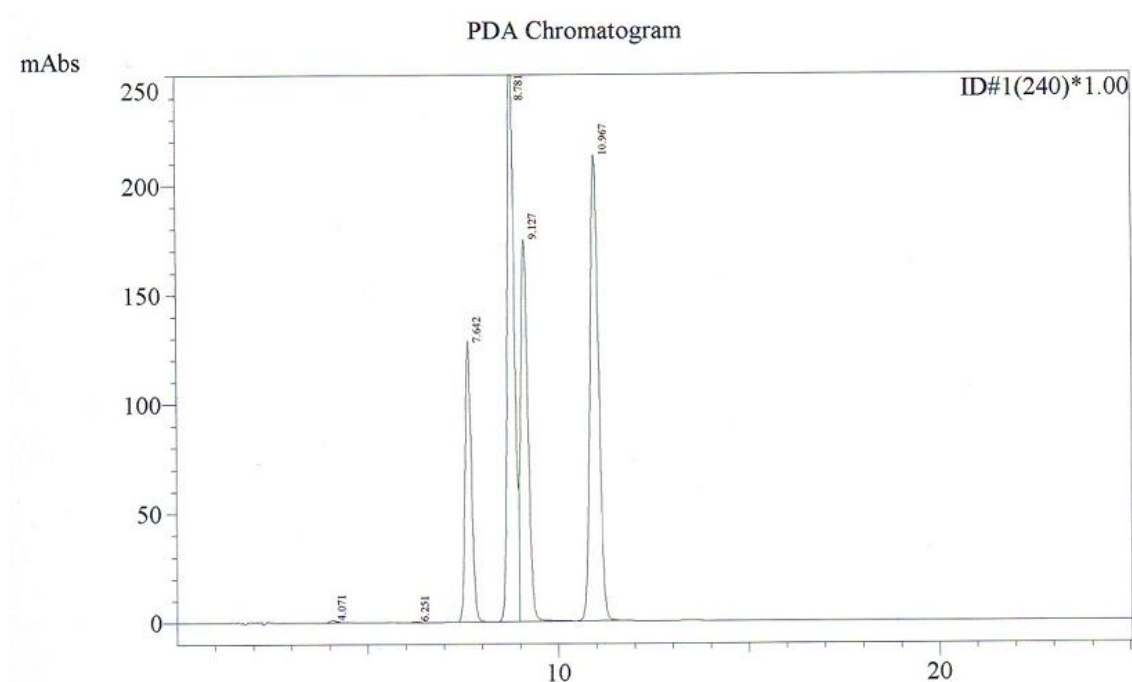


Obr. 19b Chromatogram metody CKLIS16

Po identifikaci jednotlivých signálů v záznamu bylo zjištěno, že se významně změnila selektivita systému, byla proto vyzkoušena kombinace ACN/THF/voda.

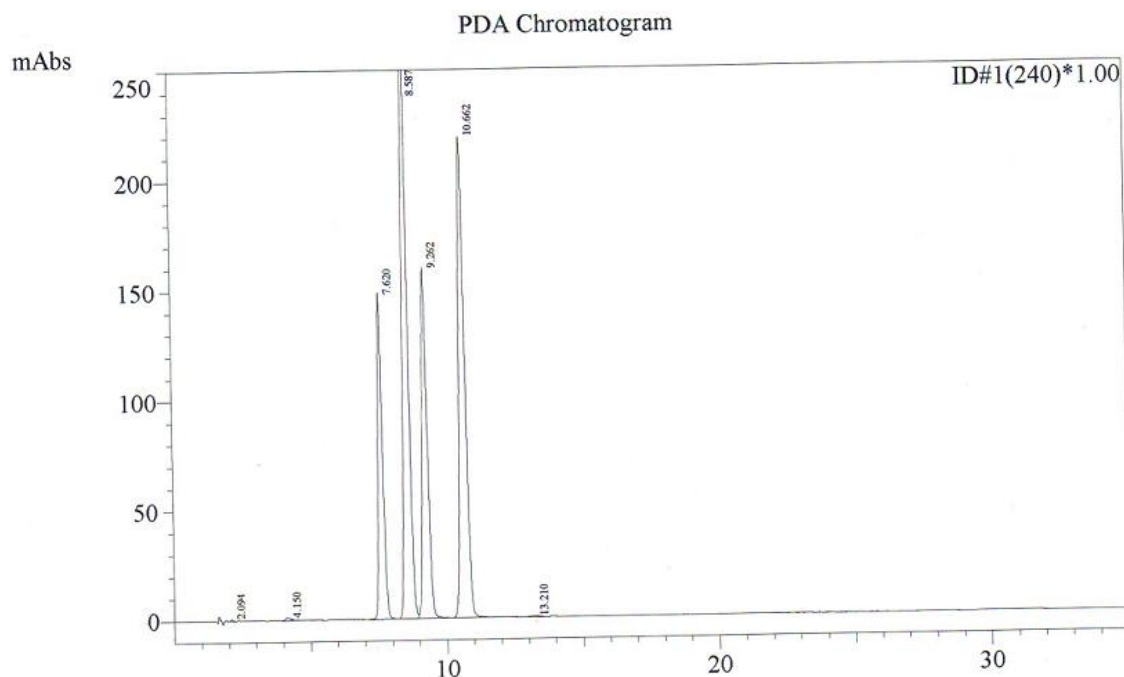
U první metody, která měla organickou složku obsahující tetrahydrofuran i acetonitril, byl poměr všech rozpouštědel stanoven 30/20/50 (ACN/THF/voda).

Analýza poskytla poměrně dobré výsledky, avšak rozlišení všech signálů ještě nebylo ideální (viz obr. 20).



Obr. 20 Chromatogram metody CYKLIS17

Pro úpravu selektivity systému byl zvolen vyšší obsah tetrahydrofuranu a nižší obsah acetonitrilu. Výsledné složení mobilní fáze potom bylo ACN/THF/voda 25/25/50. Volba této směsi se ukázala být úspěšnou. Separace je zcela uspokojivá (rozlišení všech separovaných komponent by mělo být min 1.5) a metodika je využitelná pro praktické aplikace a pro případné ověření a optimalizaci syntézy. (viz obr. 21 a výpočet rozlišení).



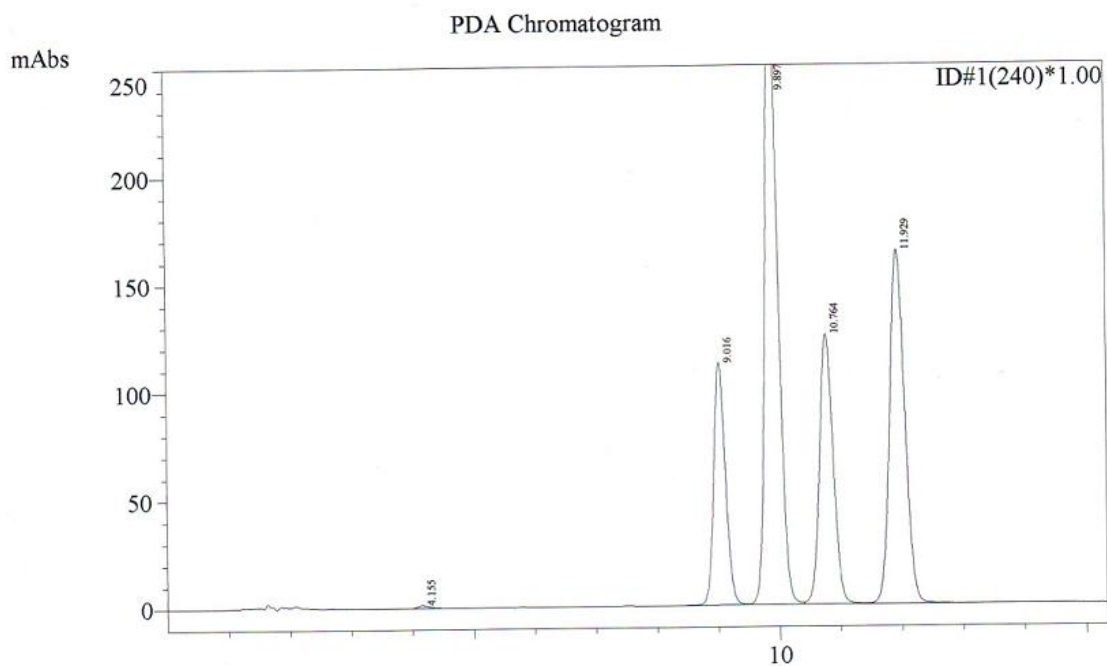
Obr. 21 Chromatogram metody CYKLIS18

Rozlišení dvou nejbližších signálů:

$$R_{1,2} = \frac{2 \cdot (t_{r2} - t_{r1})}{w_1 + w_2} = \frac{2 \cdot (9,262 - 8,587)}{0,309 + 0,292} = 2,25$$

Kde $w_{1,2}$ jsou šířky příslušných signálů na základní linii.

Poslední uvedená metoda, jako metoda úspěšné separace, byla vyzkoušena i na látky substituované fluorem. Srovnáme – li rozlišení nejbližších signálů látek z obou syntéz, zjistíme, že nalezená metoda je ještě o něco vhodnější pro látky substituované fluorem, u kterých je rozlišení o několik desetin lepší než u látek obsahujících vodík (viz obr. 22 a výpočet rozlišení).



Obr. 22 Chromatogram metody CYKLIS18 – substituovaná syntéza

Výpočet rozlišení

$$R_{1,2} = \frac{2 \cdot (t_{r2} - t_{r1})}{w_1 + w_2} = \frac{2 \cdot (10,764 - 9,897)}{0,349 + 0,325} = 2,57$$

Z retenčních časů studovaných látek, které jsou eluovány jako poslední, lze usuzovat, že k analýze jedné směsi je dostačujících 20 minut.

9. Souhrn výsledků

V experimentální části práce bylo vyzkoušeno několik metod s větší či menší úspěšností separace. Metody, u nichž byla separace brána za dostatečnou, jsou uvedeny v tabulce 9 a 10.

Tab. 9 Výsledné metody pro TLC

studované látky	složení mobilní fáze	stacionární fáze	detekce
látky, kde R je H	toluen/ethylacetát 9/1	oxid hlinitý	UV 254 nm
látky, kde R je F	toluen/ethylacetát 9/1	oxid hlinitý	UV 254 nm

Tab. 10 Výsledné metody pro HPLC

studované látky	mobilní fáze	kolona	detekce	průtok	nástřik	teplota
látky, kde R je H	THF/ACN/voda 25/25/50	LUNA C18	UV 240 nm	6 ml/min	10 µl	30 °C
látky, kde R je F	THF/ACN/voda 25/25/50	LUNA C18	UV 240 nm	6 ml/min	10 µl	30 °C

10. Závěr

V předložené práci jsem se zabývala vývojem HPLC a TLC metod při syntéze derivátů heterocyklických sloučenin. Jednalo se o deriváty indolu, které jsou zajímavé svojí biologickou aktivitou.

Podobné deriváty jsou existujícími léčivy a metodiky pro jejich testování jsou uvedeny v lékopise, ale tyto nejsou příliš vhodné pro rychlý analytický servis, neboť jsou specifické pro danou látku a nejsou univerzálně využitelné.

Teoretická část práce byla věnována základním principům vhodných a pro daný účel použitých analytických technik, jejich základní instrumentaci a obecným možnostem optimalizace metod.

V experimentální části jsem podrobně rozepsala postup vývoje metodiky, volbu experimentálních parametrů a diskutovala jsem důvod pro změnu těchto parametrů, která poté vedla k nalezení finální metodiky. HPLC metodika úspěšně (s dostatečným rozlišením a v krátkém čase) dělí všechny deriváty resp. meziprodukty dané syntézy a je tudíž přínosem pro další výzkumnou (syntetickou) práci na těchto látkách.

11. Seznam literatury

1. Churáček, J. a Jandera, P. *Úvod do vysokoúčinné kapalinové chromatografie*, SNTL-NAKLADATELSTVÍ TECHNICKÉ LITERATURY, 1. ed. Praha , **1984**.
2. Churáček, J. a kolektiv. *Analytická separace látek*, SNTL - Nakladatelství technické literatury, 1.ed. Praha , **1990**,ISBN 80-03-00569-8.
3.
http://www.google.cz/imgres?imgurl=http://www.uwplatt.edu/chemep/chem/chemscape/labdocs/catofp/chromato/tlc/pic/rfcalc.gif&imgrefurl=http://www.uwplatt.edu/chemep/chem/chemscape/labdocs/catofp/chromato/tlc/tlc.htm&usg=__m9iiz3eV0TUjOWCRAsJbQC1kpxs=&h=384& [Citace: 26. leden 2011.]
4. Lindsay, S. *High Performance Liquid Chromatography*, John Wiley & sons, 2.ed Chichester, **1992**, ISBN 0 471 93180 2
5. http://www.google.cz/imgres?imgurl=http://pharmatestseries.com/wp-content/uploads/hplc.png&imgrefurl=http://pharmatestseries.com/archives/2010/11/05/hplc-an-introduction/hplc/&usg=__VxLtJwabGByKhUnWw-wX84v9MEs=&h=311&w=429&sz=5&hl=cs&start=110&zoom=1&tbni [Citace: 29. prosinec 2010.]
6.
http://www.google.cz/imgres?imgurl=http://www.chemguide.co.uk/analysis/chromatography/tlc1.gif&imgrefurl=http://www.chemguide.co.uk/analysis/chromatography/thinlayer.html&usg=__bfuyPigSaCgmuTFMkoM5MdK8l04=&h=240&w=361&sz=5&hl=cs&start=55&zoom=1&tbid=uimO [Citace: 12. leden 2011.]
7. Ahuja, S.a Dong, M. W. *Handbook of pharmaceutical analysis by HPLC*, Elsevier, 1.ed. Londýn ,**2005**,ISBN 0-12-088547-6.
8. Kazakevich, Y. a LoBrutto, R. *HPLC for pharmaceutical scientists*, John Wiley & sons Hoboken , **2007**,ISBN: 0-471-68162-5.
9. http://www.forumsci.co.il/HPLC/WEB-Pharm_Review/HPLC_pharma_Stages.html. [Citace: 1. únor 2011.]

10. Ferenczi-Fodor, K., Végh, Z. a Renger, B. Impurity profiling of pharmaceuticals by thin-layer chromatography. *J CHROMATOGR A*. **2011**.
11.
<http://chromatographyonline.findanalytichem.com/lcgc/data/articlestandard//lcgceurope/142003/52469/article.pdf>. [Citace: 6. duben 2011.]
12. Ahuja, S. a Scypinski, S. *Handbook of modern pharmaceutical analysis*, Academic press, 3.ed. Londýn ,**2001**,ISBN 0-12-045555-2.
13. Český lékopis 2002 + doplněk 2003
14. US pharmacopoeia 2009
15. Kromidas, S. *HPLC Made to Measure: A Practical Handbook for Optimization*, WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim , **2006**,ISBN 3-527-31377-X.
16. Mělnický, R. Nепublikované údaje.