

# **Izolace a charakterizace látek vhodných pro přípravu standardů biologických materiálů**

Bc. Pavla Haburová

---

Diplomová práce  
2011



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně  
Fakulta technologická

---

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně

Fakulta technologická

Ústav biochemie a analýzy potravin

akademický rok: 2010/2011

## ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: Bc. Pavla HABUROVÁ

Osobní číslo: T090570

Studijní program: N 2901 Chemie a technologie potravin

Studijní obor: Technologie, hygiena a ekonomika výroby potravin

Téma práce: Izolace a charakterizace látek vhodných pro přípravu standardů biologických materiálů.

Zásady pro vypracování:

### I. Teoretická část

1. Standardní látky.
2. Charakterizace izolovaných standardů.
3. Chromatografické metody.
4. Charakterizační techniky.

### II. Praktická část

1. Příprava nečistot k mofetilu.
2. Izolace cyclosporine V.
3. Fotodegradant paclitaxelu.

Rozsah diplomové práce:

Rozsah příloh:

Forma zpracování diplomové práce: **tištěná/elektronická**

Seznam odborné literatury:

- [1] Schmidt–Traub, Henner. *Preparative Chromatography*, Wiley–VCH, Weinheim, 2005.
- [2] *Effective organic compound purification*, Edition 3rd, Teledyne Isco, Inc., 2008.
- [3] GASPARIČ, J., CHURÁČEK, J. *Papírová a tenkovrstvá chromatografie organických sloučenin*, 1. vydání, SNTL, Praha 1981.

Vedoucí diplomové práce:

**doc. Ing. Miroslav Fišera, CSc.**

Ústav biochemie a analýzy potravin

Datum zadání diplomové práce:

**25. února 2011**

Termín odevzdání diplomové práce:

**20. května 2011**

Ve Zlíně dne 21. března 2011

doc. Ing. Petr Hlaváček, CSc.  
*děkan*



doc. Ing. Miroslav Fišera, CSc.  
*ředitel ústavu*

Příjmení a jméno: HABUROVA' PAVLA

Obor: THEVP

## PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že

- beru na vědomí, že odevzdáním diplomové/bakalářské práce souhlasím se zveřejněním své práce podle zákona č. 111/1998 Sb. o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších právních předpisů, bez ohledu na výsledek obhajoby<sup>1)</sup>;
- beru na vědomí, že diplomová/bakalářská práce bude uložena v elektronické podobě v univerzitním informačním systému dostupná k nahlédnutí, že jeden výtisk diplomové/bakalářské práce bude uložen na příslušném ústavu Fakulty technologické UTB ve Zlíně a jeden výtisk bude uložen u vedoucího práce;
- byl/a jsem seznámen/a s tím, že na moji diplomovou/bakalářskou práci se plně vztahuje zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, zejm. § 35 odst. 3<sup>2)</sup>;
- beru na vědomí, že podle § 60<sup>3)</sup> odst. 1 autorského zákona má UTB ve Zlíně právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla v rozsahu § 12 odst. 4 autorského zákona;
- beru na vědomí, že podle § 60<sup>3)</sup> odst. 2 a 3 mohu užít své dílo – diplomovou/bakalářskou práci nebo poskytnout licenci k jejímu využití jen s předchozím písemným souhlasem Univerzity Tomáše Bati ve Zlíně, která je oprávněna v takovém případě ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které byly Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně na vytvoření díla vynaloženy (až do jejich skutečné výše);
- beru na vědomí, že pokud bylo k vypracování diplomové/bakalářské práce využito softwaru poskytnutého Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně nebo jinými subjekty pouze ke studijním a výzkumným účelům (tedy pouze k nekomerčnímu využití), nelze výsledky diplomové/bakalářské práce využít ke komerčním účelům;
- beru na vědomí, že pokud je výstupem diplomové/bakalářské práce jakýkoliv softwarový produkt, považují se za součást práce rovněž i zdrojové kódy, popř. soubory, ze kterých se projekt skládá. Neodevzdání této součásti může být důvodem k neobhájení práce.

Ve Zlíně .....

.....

---

<sup>1)</sup> zákon č. 111/1998 Sb. o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších právních předpisů, § 47 Zveřejňování závěrečných prací:

(1) Vysoká škola nevydělčně zveřejňuje disertační, diplomové, bakalářské a rigorózní práce, u kterých proběhla obhajoba, včetně posudků oponentů a výsledku obhajoby prostřednictvím databáze kvalifikačních prací, kterou spravuje. Způsob zveřejnění stanoví vnitřní předpis vysoké školy.

(2) Disertační, diplomové, bakalářské a rigorózní práce odevzdané uchazečem k obhajobě musí být též nejméně pět pracovních dnů před konáním obhajoby zveřejněny k nahlížení veřejnosti v místě určeném vnitřním předpisem vysoké školy nebo není-li tak určeno, v místě pracoviště vysoké školy, kde se má konat obhajoba práce. Každý si může ze zveřejněné práce pořizovat na své náklady výpisy, opisy nebo rozmnoženiny.

(3) Platí, že odevzdáním práce autor souhlasí se zveřejněním své práce podle tohoto zákona, bez ohledu na výsledek obhajoby.

<sup>2)</sup> zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, § 35 odst. 3:

(3) Do práva autorského také nezasahuje škola nebo školské či vzdělávací zařízení, užije-li nikoli za účelem přímého nebo nepřímého hospodářského nebo obchodního prospěchu k výuce nebo k vlastní potřebě dílo vytvořené žákem nebo studentem ke splnění školních nebo studijních povinností vyplývajících z jeho právního vztahu ke škole nebo školskému či vzdělávacímu zařízení (školní dílo).

<sup>3)</sup> zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, § 60 Školní dílo:

(1) Škola nebo školské či vzdělávací zařízení mají za obvyklých podmínek právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla (§ 35 odst. 3). Odpírá-li autor takového díla udělit svolení bez vážného důvodu, mohou se tyto osoby domáhat nahrazení chybějícího projevu jeho vůle u soudu. Ustanovení § 35 odst. 3 zůstává nedotčeno.

(2) Není-li sjednáno jinak, může autor školního díla své dílo užít či poskytnout jinému licenci, není-li to v rozporu s oprávněnými zájmy školy nebo školského či vzdělávacího zařízení.

(3) Škola nebo školské či vzdělávací zařízení jsou oprávněny požadovat, aby jim autor školního díla z výdělku jím dosaženého v souvislosti s užitím díla či poskytnutím licence podle odstavce 2 přiměřeně přispěl na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložily, a to podle okolností až do jejich skutečné výše; přitom se přihlídně k výši výdělku dosaženého školou nebo školským či vzdělávacím zařízením z užití školního díla podle odstavce 1.

## **ABSTRAKT**

Diplomová práce se zabývá problematikou přípravy standardů. Cílem práce bylo připravit tři nečistoty, které jsou specifikované v lékopisech. Jednalo se mofetil N-oxid, který je degradační produkt vznikající oxidací mykofenolátu mofetilu. Dále o cyklosporin V, který je nečistotou doprovázející výrobu cyklosporinu A. A fotodegradant paclitaxelu, který je specifikovanou nečistotou vyskytující se v substanci semisyntetického paclitaxelu vznikající degradací světlem. Při přípravě se využilo metod vysoce účinné kapalinové chromatografie, chromatografie na tenké vrstvě, preparativní chromatografie a organické syntézy. Součástí práce je potvrzení totožnosti a charakterizace připravených standardů metodami hmotnostní spektrometrie, infračervené spektrometrie a nukleární magnetické rezonance.

Klíčová slova: mykofenolát mofetil, cyklosporin V, fotodegradant paclitaxelu, izolace, preparativní chromatografie, vysoce účinná kapalinová chromatografie, chromatografie na tenké vrstvě

## **ABSTRACT**

This thesis deals with preparation of standards. The aim was to prepare three impurities, which are specified in the pharmacopoeias. It is mofetil N-oxide, which is a degradation product arising from oxidation of mycophenolate mofetil. The second was cyclosporine V, which is impurity accompanying the production of cyclosporin A. Product of photodegradation of paclitaxel, which is occurring in a specified impurity in a substance resulting from the degradation of semisynthetic paclitaxel with light was prepared too. The preparation methods as. high-performance liquid chromatography, thin layer chromatography, preparative chromatography and organic synthesis was used. The identity and characterization of prepared standards was confirmed by following methods of analysis – mass spectrometry, infrared spectrometry and nuclear magnetic resonance.

Keywords: mycophenolate mofetil, cyclosporine V, product of photodegradation of paclitaxel, isolation, high performance chromatography, preparative chromatography, thin layer chromatography

Ráda bych poděkovala mému školiteli Doc.Ing. Miroslavu Fišerovi, CSc. a mému konzultantovi Mgr. Jiřímu Malečkovi, PhD. za cenné rady při řešení a vedení diplomové práce.

Také chci poděkovat rodině a všem mým přátelům za všestrannou podporu při studiu.

Prohlašuji, že odevzdaná verze bakalářské/diplomové práce a verze elektronická nahraná do IS/STAG jsou totožné.

# OBSAH

ÚVOD.....	11
<b>I</b> <b>TEORETICKÁ ČÁST</b> .....	<b>13</b>
1 <b>STANDARDNÍ LÁTKY</b> .....	<b>14</b>
2 <b>CHARAKTERIZACE IZOLOVANÝCH STANDARDŮ</b> .....	<b>17</b>
2.1    IMUNOSUPRESIVA .....	17
2.1.1    Mykofenolát mofetil.....	17
2.1.2    Cyklosporin .....	18
2.2    CYTOSTATIKA .....	18
2.2.1    Paclitaxel .....	19
<b>3</b> <b>CHROMATOGRAFICKÉ METODY</b> .....	<b>20</b>
3.1    TENKOVRSŤVÁ CHROMATOGRAFIE .....	24
3.2    VYSOCE ÚČINNÁ KAPALINOVÁ CHROMATOGRAFIE .....	24
<b>4</b> <b>PREPARATIVNÍ CHROMATOGRAFIE</b> .....	<b>27</b>
<b>5</b> <b>CHARAKTERIZAČNÍ METODY</b> .....	<b>29</b>
5.1    INFRAČERVENÁ SPEKTROMETRIE .....	29
5.2    HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETRIE .....	30
5.3    NUKLEÁRNÍ MAGNETICKÁ REZONANCE .....	31
<b>II</b> <b>PRAKTICKÁ ČÁST</b> .....	<b>32</b>
<b>6</b> <b>PŘÍPRAVA NEČISTOT K MOFETILU</b> .....	<b>33</b>
6.1    CHEMICKÁ A FYZIKÁLNÍ CHARAKTERISTIKA .....	33
6.2    POUŽITÉ CHEMIKÁLIE A PŘÍSTROJE .....	33
6.2.1    Chemikálie .....	33
6.2.2    Přístroje .....	34
6.3    PŘÍPRAVA MOFETILU <i>N</i> -OXIDU .....	34
6.4    VÝVOJ PREPARATIVNÍ CHROMATOGRAFIE .....	34
6.4.1    Vývoj TLC metody.....	34
6.4.2    Sledování průběhu reakce HPLC metodou .....	35
6.5    POTVRZENÍ TOTOŽNOSTI.....	37
6.5.1    Kapalinová chromatografie .....	37
6.5.2    Hmotnostní spektrometrie .....	38
<b>7</b> <b>IZOLACE CYCLOSPORINU V</b> .....	<b>41</b>



7.1	CHEMICKÁ A FYZIKÁLNÍ CHARAKTERISTIKA .....	41
7.2	POUŽITÉ CHEMIKÁLIE .....	42
7.3	POUŽITÉ PŘÍSTROJE .....	42
7.4	VÝBĚR VHODNÉHO MATERIÁLU.....	42
7.5	OPTIMALIZACE PREPARATIVNÍ METODY .....	44
7.5.1	Optimalizace složení mobilní fáze .....	45
7.5.2	Vliv teploty na separaci.....	47
7.5.3	Vliv obsahu <i>tert</i> -butyl metyl éteru .....	48
7.6	OPTIMALIZACE PODMÍNEK DÁVKOVÁNÍ.....	51
7.7	IZOLACE NEČISTOTY .....	53
<b>8</b>	<b>CHARAKTERIZACE A POTVRZENÍ TOTOŽNOSTI .....</b>	<b>58</b>
8.1.1	Infračervená spektrometrie.....	58
8.1.2	Hmotnostní spektrometrie.....	59
8.1.3	Nukleární magnetická rezonance .....	61
<b>9</b>	<b>FOTODEGRADANT PACLITAXELU .....</b>	<b>70</b>
9.1	POSTUP PŘÍPRAVY FOTODEGRADANTU PACLITAXELU .....	70
9.2	POUŽITÉ CHEMIKÁLIE A PŘÍSTROJE .....	71
9.2.1	Chemikálie .....	71
9.2.2	Přístroje .....	71
9.3	SLEDOVÁNÍ PRŮBĚHU DEGRADACE.....	71
9.4	POTVRZENÍ TOTOŽNOSTI FOTODEGRADANTU .....	75
	<b>ZÁVĚR .....</b>	<b>77</b>
	<b>SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....</b>	<b>79</b>
	<b>SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK .....</b>	<b>84</b>
	<b>SEZNAM OBRÁZKŮ .....</b>	<b>85</b>
	<b>SEZNAM TABULEK.....</b>	<b>88</b>

## ÚVOD

Tato diplomová práce se zabývá standardními látkami (referenčními materiály, standardy), které jsou určeny pro kontrolu kvality aktivních farmaceutických substancí (dále jen substancí) s využitím různých analytických metod. Tyto standardní látky jsou nedílnou součástí každé z použitých analytických metod, které potvrzují kvalitu a totožnost testovaných substancí. Standardní látky jsou zpravidla dodávány renomovanými výrobci (např. MERCK, Sigma-Aldrich) nebo jsou distribuovány přes lékopisné organizace v případě, že příslušná substance, ke které se standardní látka vztahuje, je uvedena v některé z lékopisných monografií. Pokud tyto látky nejsou komerčně dostupné, je zpravidla jedinou možností vlastní příprava těchto látek.

Ve farmaceutickém průmyslu se standardní látky používají jako referenční materiály při testování kvality substancí. Pro stanovení obsahu účinné látky v substanci se používají takzvané obsahové standardy. Jedná se zpravidla o látky chemicky identické s účinnou látkou, u kterých je znám přesný obsah. Vedle toho je také velmi důležité kontrolovat obsah nečistot z důvodu sledování bezpečnosti léčiva s ohledem na lidské zdraví a samozřejmě provádět jejich identifikaci. K tomuto účelu slouží standardy identifikační. Nečistotou označujeme jakoukoliv složku substance, která není po chemické stránce identická s účinnou látkou. Potenciální nečistoty jsou pak takové nečistoty, které se teoreticky mohou objevit v substanci během výroby (označujeme je jako doprovodné) nebo jejich obsah narůstá během skladování substance (označujeme je jako degradační).

Velmi důležitým parametrem kvality vyráběných substancí je právě jejich čistota. Pro bezpečnost pacienta a pro lepší prodejnost substancí je samozřejmě žádoucí vyrábět substance s maximálním obsahem účinné látky a tedy s minimálním obsahem nečistot. Kvalita těchto substancí je kontrolována státními autoritami (např. SÚKL, FDA), které provádějí pravidelné audity kontrolující dodržování správné výrobní praxe (GMP). Právě výroba podle pravidel GMP by měla zaručit, že každá šarže substance bude mít stejnou nebo velmi podobnou kvalitu. Finální produkt je testován celou řadou analytických metod, které mají za cíl prokázat, že kvalita substance je vyhovující. Kritéria přijatelnosti výsledků testů jsou definovány v takzvané specifikaci produktu. Specifikace je tedy soubor analytických testů s definovanými kritérii přijatelnosti, které musí daná substance splňovat, aby mohla být použita pro léčebné účely ať už humánní nebo veterinární medicíny. Tyto specifikace jsou schvalovány příslušnými registračními úřady v procesu tzv. registrace.

Registrace je velmi složitý proces, na jehož konci je povolení či zamítnutí příslušného registračního úřadu danou substancí používat pro léčebné účely v příslušném teritoriu (např. USA, Evropská Unie, Japonsko).

Jak už bylo uvedeno, pro bezpečnost pacienta je velmi důležité, aby byla zajištěna vyhovující kvalita substancí použitých pro léčebné účely. Vzhledem k tomu, že výroba těchto substancí probíhá v přísném režimu GMP, jedná se o validovaný proces, který by měl poskytovat prakticky stejný profil nečistot. Během vývoje tohoto procesu bývají všechny významné nečistoty vyskytující se v průběhu celého výrobního procesu a nakonec ve finálním produktu identifikovány. Ve finální specifikaci substance se objevují nakonec ale jen nečistoty, které jsou pro daný proces výroby kritické spolu s degradačními produkty.

Z výše uvedených důvodů je tedy jasný význam standardů nečistot pro potřebu kontroly kvality vyráběných substancí. Velký význam mají tyto standardy zejména při validaci analytických metod použitých pro kontrolu kvality substance, kdy je nutné prokázat specifitu, přesnost a správnost použité metody. Praktická část této diplomové práce je zaměřena na přípravu dvou degradačních produktů, z nichž jeden je připraven chemickou syntézou a druhý izolován z odpadního materiálu pocházejícího z výroby, a jedné specifikované nečistoty získané izolací z přírodního materiálu.

## **I. TEORETICKÁ ČÁST**

## 1 STANDARDNÍ LÁTKY

Standardem z obecného pohledu rozumíme obecně uznávané měřítko s jistou referenční hodnotou. Z pohledu využití ve vědách medicínských, chemických a biologických je pojem standard, standardní látka totožný s významem referenčního materiálu. Na základě rychlého vývoje chemických oborů byl v roce 2005 Komisí pro referenční materiály při Mezinárodní organizaci pro standardizaci ISO-REMCO referenční materiál definován jako materiál o jednoznačně specifikovaných vlastnostech a veličinách s dostatečnou homogenitou a stabilitou v závislosti na účelu jeho využití [1-6]. Tento pojem zahrnuje velmi širokou skupinu materiálů, které můžeme dále dělit např. podle účelu jejich použití na materiály pro kontrolu kvality, certifikované referenční materiály a kalibrátory.

Materiály pro kontrolu kvality jsou homogenní a dostatečně stabilní materiály s ohledem na jednu nebo více hodnocených vlastností, které jsou vhodné pro zamýšlený účel použití v procesu měření. Slouží pro kontrolu jak vnitřní kvality, tak i pro její externí hodnocení. Hodnocené vlastnosti můžeme rozdělit na kvalitativní a kvantitativní. Jsou obvykle necertifikované, bez uvedeného odhadu nejistoty hodnot veličin. Certifikovaný referenční materiál je materiál s certifikátem, osvědčením, vydaným příslušnou autoritou, charakterizován pro jednu nebo více uvedených vlastností platným validovaným postupem. Kalibranty jsou referenční materiály určené, jak už název napovídá, pro účely kalibrace měřicích postupů. Většinou se jedná o necertifikované materiály, ale použití certifikovaných referenčních materiálů je nejen možné, ale i maximálně vhodné. Hodnoty kalibrátorů musí mít určen odhad nejistoty výsledků měření, a to i v případě necertifikovaných materiálů.

Je zřejmé, že v řadě případů se tyto skupiny mohou překrývat (certifikovaný referenční materiál může být běžně používán jako materiál pro kontrolu kvality či kalibrant).

Toto překrývání je zcela účelové a lépe odráží skutečný stav. V české legislativě se pojmem referenční materiál zabývá Zákon o metrologii č. 505/1990 Sb.

Jako standardní látky nemusíme používat pouze chemicky čisté látky, ale také roztoky standardů a plynové směsi nebo matricové referenční materiály. Standardní látky můžeme rozdělit podle oblasti využití na několik základních skupin:

- standardní látky pro analýzu prvků v životním prostředí (analýza vody, půdy, ovzduší)
- standardní látky pro klinickou analýzu (analýzy tkání a tělesných tekutin)
- průmyslové standardní látky [7]
- standardní látky pro analýzu potravin (analýza potravin a nápojů, potvrzení identity přirozeně se vyskytujících látek i látek přídatných nebo látek toxických)
- standardní látky pro farmacii (opírají o lékopisné standardy. V České Republice se jedná o český lékopis z roku 2005)

S ohledem na rozsah se diplomové práce zabývá pouze standardními látkami určenými pro kontrolu kvality produktů (substancí) ve farmaceutického průmyslu.

Z pohledu klasifikace můžeme tyto standardní látky rozdělit na primární a sekundární. Primárním standardem je plně a jednoznačně charakterizovaná chemická látka. V případě, že není dostupný oficiální primární standard (renomovaný výrobce, lékopisná agentura), je nutné připravit vlastní (tzv. in-house) primární standard. Takováto látka musí být důkladně charakterizována různými analytickými technikami, které prokazují chemickou strukturu a způsobilost použití k zamýšlenému účelu. Jako sekundární standardy jsou označovány látky, u kterých je prokázána návaznost s příslušným primárním standardem. Takovéto standardy se používají pro běžné účely kontroly kvality.

Dále můžeme rozdělit standardy podle účelu použití na obsahové a identifikační. Obsahové standardy jsou používány pro prokázání chemické struktury a jako referenční pro stanovení čistoty cílové látky. Jsou to zpravidla chemické látky o maximálně možné čistotě s jednoznačně prokázanou chemickou strukturou a čistotou, kterou v případě obsahových standardů nazýváme potenci. Potenci standardu je nutno stanovit s dostatečnou přesností a správností na základě souboru měření získaného pomocí vhodných analytických technik. Identifikační standardy slouží pouze k prokázání chemické struktury. Mohou to být i látky o nižší čistotě, u kterých je ovšem jednoznačně prokázána chemická struktura.

Identifikační standardy jsou důležité zejména pro potvrzení identity nečistot. Nečistoty přítomné ve farmaceutických substancích mají mimořádný vliv na jakost, bezpečnost a účinnost léků, a proto je nutné je důsledně sledovat. Nečistoty můžeme klasifikovat podle typu na organické (výchozí materiály, vedlejší produkty, meziprodukty, degradační produkty a další), anorganické (anorganické soli, těžké kovy, katalyzátory a

další) a rozpouštědla. Pro nečistoty vyskytující se ve finálním produktu v obsahu vyšším než 0,05 % je nutné provést jejich identifikaci. Cílová nečistota se nejprve vyizoluje z produktu ve velmi malém množství (jednotky miligramů) a o dostatečné čistotě. Následně se provede její identifikace (určení chemické struktury) pomocí alespoň dvou nezávislých identifikačních technik, zpravidla MS a NMR. Pokud je možné nečistotu synteticky připravit, připraví se větší množství této nečistoty (řádově stovky miligramů až gramy) zejména pro účely validací analytických metod. Pokud se jedná o specifikovanou nečistotu (identifikovaná nečistota jejíž obsah je kontrolován ve finálním produktu), je nutné mít dostatečné množství standardu dané nečistoty pro účely identifikace při použití konkrétní analytické metody.

## 2 CHARAKTERIZACE IZOLOVANÝCH STANDARDŮ

Charakter izolovaných standardů z farmakologického hlediska. Jejich účinnost v lidském těle a způsoby využití.

### 2.1 Imunosupresiva

Imunosupresiva (immunosuppressants) jsou léky bránící nebo snižující imunitní odpověď organismu k transplantovanému orgánu [8]. Jsou-li orgány transplantovány z jiného dárce příjemci, může dojít k odmítnutí, rejekci. Imunitní systém může vyvolat sled reakcí, které mohou vést k poškození orgánu, tento proces se nazývá rejekce a může být buď

akutní-rychlá nebo chronická-dlouhodobá. K odmítnutí může dojít i přes úzké sladění dárce a příjemce. Imunosupresiva významně snižují riziko odmítnutí transplantovaného orgánu, chrání jej a zachovávají všechny jeho funkce. Tyto léky působí tak, že blokují imunitní systém pacienta.

Kromě toho se používají k léčbě závažných onemocnění kůže – psoriáza, Crohnova choroba či revmatoidní artritida. Jejich základní rozdělení je na léky inhibující aktivaci T-buněk (cyklosporiny), léky narušující syntézu DNA, RNA a tím buněčné dělení (azathioprin) a kortikosteroidy (prednisolon), léčiva k tlumení zánětu doprovázejícího rejekci transplantovaného orgánu [9].

#### 2.1.1 Mykofenolát mofetil

##### **Použití**

Mykofenolát mofetilu (mycophenolate mofetil) patří ke skupině imunosupresiv, ale nyní je doporučován i jako lék na některá autoimunitní onemocnění. Mykofenolát je používán k léčbě lidí s Lupus Erythematosus (zejména s ledvinovým onemocněním), revmatoidní artritidě, vaskulitidě, Crohnově chorobě a některým kožním nebo ledvinovým onemocněním.



### Účinek

Mykofenolát působí cíleně na enzym inosin monofosfát dehydrogenázu, který je důležitý pro tvorbu DNA v buňkách. Tím, že dochází k manipulaci s DNA, snižuje funkci buněk imunitního systému, které jsou hyperaktivní například u autoimunitních onemocnění [11].

## 2.1.2 Cyklosporin

### Použití

Také cyklosporin (Cyclosporine A, Ciclosporine) patří mezi imunosupresiva produkovaná plísněmi, používá se i k léčbě těžkých případů lupénky nebo revmatoidní artritidy. Hlavní využití je u pacientů s nefrotickým syndromem nebo po transplantaci kostní dřeně [12].

### Účinek

Účinnost cyklosporinu souvisí s jeho schopností inhibovat produkci cytokinů zejména interleukinu II-2 (vliv na B lymfocyty a APC) [13]. To je spjato s inhibicí přenosu signálů z receptorů T lymfocytů do jader, čímž dochází k zablokování aktivace genů pro syntézu lymfokinů už během transkripce [14].

## 2.2 Cytostatika

Cytostatika (cytostatics) jsou přírodní nebo syntetické látky inhibující buněčné dělení a tím pozastavující růst buněk. Primárně jsou používány k léčbě rakoviny, při chemoterapiích, a částečně také v léčbě autoimunitních onemocnění. Jejich mechanismus působení spočívá v narušení metabolických procesů probíhajících v buňce. Proto poškozují zejména rychle rostoucí buňky, například epiteliální. Vzhledem k tomu, že nádorové buňky rostou rychleji a mají sníženou schopnost opravy jsou také na cytostatika citlivější. Mají mnoho vedlejších účinků, protože ovlivňují i krevtvorbu a negativně působí na sliznici trávicího traktu. Některá cytostatika jsou kancerogenní (rakovinotvorné) a mutagenní [10].

### 2.2.1 Paclitaxel

#### **Použití**

Paclitaxel je předepisovaným lékem k léčbě rakoviny prsu, rakoviny vaječníků a rakoviny plic. Je součástí skupiny léků určených k chemoterapii zvané taxany. Kromě výše jmenovaných se může použít k léčbě AIDS – Kaposiho sarkomu, který nereagoval na jinou léčbu [15].

#### **Účinek**

Paclitaxel je antimikrotubulní agens, které zastavuje růst nádoru inhibicí buněčného dělení – mitózy [16]. Jedná se o látku, která interaguje (inhibice depolymerizace) s mikrotubuly (mitotickým vřeténkem) za tvorby nenormálních mikrotubulů [17].

### 3 CHROMATOGRAFICKÉ METODY

Chromatografické metody patří mezi základní metody používané při izolaci standardů. Mezi nejvíce využívané patří metody kapalinové a tenkovrstvé chromatografie. Je třeba také zmínit nezanedbatelný potenciál elektroforetických metod, které jsou v současnosti velmi intenzivně využívány v proteomice a genomice při izolaci a identifikaci proteinů a peptidů [18,19].

Chromatografické metody patří mezi separační metody, které využívají pro separaci látek jejich rozdílné afinity mezi dvěma fázemi, stacionární (pevnou nebo kapalnou) a mobilní (kapalnou nebo plynnou).

Kapalinová chromatografie zahrnuje ve svém nejširším pojetí všechny chromatografické metody s kapalnou mobilní fází. Podle svého uspořádání ji můžeme rozdělit na sloupcovou – kolonovou chromatografii a chromatografii v plošném uspořádání – planární chromatografii (papírová a tenkovrstvá)

Tato diplomová práce se zabývá zejména vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií (HPLC) a tenkovrstvou chromatografií (TLC), proto jim bude věnována větší pozornost.

#### HISTORIE KAPALINOVÉ CHROMATOGRAFIE

Počátky chromatografie se datují od přelomu 19. a 20. století [20]. Z pochopitelných důvodů je oficiálním dnem zrodu chromatografie označováno její první významné použití Rusem M. S. Cvetem (1872 – 1919) popsané v jeho článku o rostlinných pigmentech publikovaném roku 1903 [21]. Ovšem již v roce 1897 D.T. Dayle [22] rozdělil na sloupci některé frakce ropy. K dalšímu významnému rozvoji chromatografických metod došlo na konci druhé světové války základními studii plynové chromatografie (gas chromatography – GC). V polovině padesátých let ji následoval rozvoj chromatografie na tenké vrstvě (thin layer chromatography – TLC).

Roku 1952 dostali Nobelovu cenu Archer John Porter Martin a Richard Laurence Millington Syne za práci v oboru chromatografie [23].

Skutečně bouřlivý rozvoj chromatografických metod nastal až od druhé poloviny šedesátých let, kdy bylo možné díky dostupnosti vysokotlakých pump a detektorů a také díky využití malých porézních částic využít naplno potenciál vysokotlaké chromatografie.

Průlomem použití vysokoúčinné kapalinové chromatografie (high performance liquid chromatography – HPLC) jako rutinní analytické metody se stala polovina sedmdesátých let spolu s komerčně dostupnou silikagelovou reverzní fází s C18 a C8 skupinami.

Nárůst chromatografických separačních metod během minulého století je spojen se syntézami nových produktů a izolacemi a čištěním přírodních látek.

Vývoj nových stacionárních fází s chemicky vázanými fázemi povýšil HPLC na nejpopulárnější analytickou metodu [24].

## PRINCIP CHROMATOGRAFICKÉHO DĚLENÍ

Chromatografické metody pracují na principu ustavení dynamické rovnováhy analytu mezi dvěma nemísitelnými fázemi. Stacionární (nepohyblivá) fáze různě zadržuje jednotlivé součásti analyzované směsi, které pak mobilní (pohyblivá) fáze vymývá různou rychlostí, čímž dochází k dělení jednotlivých složek analytu. Samotné dělení je závislé na brzdící síle-retenci, která je různá a závislá na odlišných fyzikálních principech (rozpuštěnost, adsorpce, molekulová filtrace, iontová výměna). Dochází k ustavení rovnováhy mezi sorpcí na pevné fázi a desorpcí do mobilní fáze [25]. Čím pevněji je látka na sorbentu zadržena, tím pomaleji se vymývá [26].

## ROZDĚLENÍ CHROMATOGRAFICKÝCH METOD

Chromatografické metody můžeme dělit podle různých pohledů:

- skupenství mobilní fáze – plynová (GC) a kapalinová (LC)
- způsob uložení stacionární fáze – kolonová (sloupcová) a plošná (planární)
- princip separace – rozdělovací, adsorpční, iontově výměnná a gelová
- způsob provedení – eluční (analytická ch.), frontální a vytěšňovací
- účel použití – analytická a preparativní

Následující tabulka slouží jako přehled chromatografických metod.

## Přehled chromatografických metod

Mobilní fáze	Stacionární fáze	Mechanismus dělení	Chromatografie
plyn (GC)	kapalina	rozdělovací rovnováha	plynová rozdělovací (GLC)
	pevná látka	adsorpce	plynová adsorpční (GSC)
		sítový efekt	plynová na molekulových sítích (GSC)
kapalina (LC)	kapalina	rozdělovací rovnováha	kapalinová rozdělovací (LLC)
		sítový efekt	gelová permeační (GPC)
	pevná látka	adsorpce	kapalinová adsorpční (LSC)
			tenkovrstvá (TLC)
		iontová výměna	Iontoměničová (IEC)
		specifické interakce	afinitní

Adsorpční chromatografie

Adsorpční chromatografie je jeden z nejstarších typů chromatografie. Využívá různě adsorbované mobilní fáze na povrch stacionární fáze [27]. Míra adsorpce je závislá na jakosti povrchu adsorbentu, kde se nachází tzv. adsorpční centra. Závislost adsorbovaného množství látky na její koncentraci v okolním prostředí (mobilní fázi) udává adsorpční izoterma. V reálných systémech se uplatňují izotermy Langmuirova a Freundlichova.

Stacionární fázi bývá nejčastěji silikagel, modifikovaný silikagel (reverzní fáze) méně často oxid hlinitý (TLC). Jako mobilní fáze se používají organická rozpouštědla [28] ve směsi s vodou (reverzní fáze).

Jednou z forem adsorpční chromatografie je afinitní chromatografie, kde je na pevnou stacionární fázi imobilizován vhodný ligand, který specificky interaguje s molekulou analytu. Afinitní chromatografií může být izolována kterákoliv molekula, která reaguje specificky a reversibilně s jinou molekulou. Těmito dvěma molekulami mohou být např.: protilátka - antigen, inhibitor - substrát nebo případně hormon či léčivo a příslušný bílkovinný receptor nebo přenašeč. V současné době je možné vyrábět stacionární fázi přímo „na míru“ pro konkrétní molekulu, kdy se nechá polymerizovat vhodný monomer ve směsi s cílovou molekulou.

Po vytvoření polymerní prostorové struktury se vhodným eluentem vymyjí molekuly cílové látky. V prostoru polymeru tak zůstanou kavity, které jsou specifické právě pro cílovou molekulu.

### Rozdělovací chromatografie

Tento mechanismus převládá v plynové chromatografii, protože je typický pro případy, kdy stacionární fází je kapalina. K separaci látek dochází na základě rozdílných hodnot rozdělovacích koeficientů mezi dvěma nemísitelnými fázemi (obě kapalné, nebo kapalná a plynná). Hnací silou tohoto partičního procesu je rozdíl koncentrací složky v jedné a druhé fázi, protože systém má snahu dostat se do rovnováhy.

### Iontovyměnná chromatografie

Iontovyměnnou chromatografií umožňuje separaci analytů s elektrickým nábojem. Pevnou fází jsou iontoměniče. Iontoměniče (ionexy - "ion exchanger") jsou pevné látky, které jsou schopny vyměňovat ionty s kapalnými fázemi. Částice iontoměničů obsahují kovalentně vázané ionizovatelné skupiny. Katexy jsou iontoměniče s kyselou funkční skupinou (sulfo-kyselina, karboxylová kyselina) nesoucí záporný náboj, anex obsahuje bazickou funkční skupinu (aminoskupinu) a je nositelem kladného náboje. Ion obsažený v ionexu bývá vyměněn za ion obsažený v mobilní fázi nebo ve vzorku a na principu soutěžení ionexu o tyto ionty dochází k separaci. Eluci provádíme změnou pH nebo iontové síly.

### Gelová permeační chromatografie

Gelová permeační chromatografie je založena na principu síťového efektu. Jako stacionární fáze se používají neionogenní gely s definovanou velikostí pórů nejčastěji na bázi polysacharidů nebo polyakrylamidu. Realizuje se zpravidla v kolonovém uspořádání. Na separaci zde mají rozhodující vliv rozměry molekul. Molekuly větší než je velikost pórů v gelu kolonou protečou v mrtvém objemu. Menší molekuly pronikají do nitra pórů a zpožďují se. Čím je molekula menší, tím více se zpozdí.

V následujících dvou kapitolách bude podrobněji popsán princip dvou nejpoužívanějších technik v izolaci standardů v prostředí naší laboratoře, kterými jsou metody tenkovrstvé a kolonové chromatografie v nízkotlakém až vysokotlakém provedení.

### 3.1 Tenkovrstvá chromatografie

Chromatografie na tenké vrstvě (Thin-Layer Chromatography – TLC) je běžně používanou analytickou metodou umožňující rychlou a levnou analýzu různých směsí [29]. Jako stacionární fáze (adsorbent) jsou používány prakticky totožné sorbety jaké jsou používány v kolonové chromatografii se zrnitostí 5 – 40  $\mu\text{m}$ . Jsou to především silikagel ( $\text{SiO}_2$ ) a oxid hlinitý (alumina), které jsou v tenké vrstvě zakotvené na skleněné, kovové nebo plastové destičce [30]. Jako další speciální sorbenty se v menší míře používají modifikované silikagely (diol, amino, kyano, C18) celulóza, iontoměniče a polyamid.

Volba optimálního složení mobilní fáze závisí na typu interakcí (např. disperzní, polární, iontové) [31] a rozpustnosti analytu. Nejčastěji se používají směsi polárních a nepolárních rozpouštědel. Rozpouštědla volíme podle elutropní síly.

Vzorek se aplikuje na vrstvu adsorbentu (start) většinou pomocí hamiltonovy stříkačky. Po odpaření rozpouštědla je umístěn do utěsněné vyvíjecí komory s nasycenými parami mobilní fáze. Start musí být vždy nad hladinou mobilní fáze, aby nedošlo k rozmytí vzorku. Hnací silou pohybu mobilní fáze jsou kapilární síly [32]. Rychlost pohybu MF závisí na velikosti pórů stacionární fáze a s velikostí pórů vzrůstá.

Pro identifikaci oddělených složek směsi je nezbytné znát  $R_f$  – retenční faktor, což je poměr vzdálenosti komponenty od čela mobilní fáze [33].

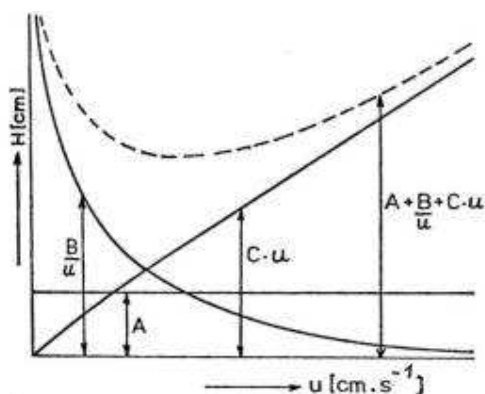
### 3.2 Vysoce účinná kapalinová chromatografie

Vysoce účinná kapalinová chromatografie je v podstatě vylepšenou formou sloupcové chromatografie. Tu můžeme rozdělit na nízkotlakou (LPC), středotlakou (MPC) a vysokotlakou (HPLC) či ultra účinnou (UPLC). Celý proces probíhá za vysokého tlaku až 400 MPa. Dále umožňuje použití mnohem menších částic v kolonách, které dávají větší povrch k interakcím mezi stacionární a mobilní fází. Tím dochází k lepšímu rozdělení složek analyzované směsi [34].

Souvislost mezi difúzními vlivy a lineární rychlostí mobilní fáze odvodil van Deemter. V nejjednodušším tvaru má van Deemterova rovnice následující tvar: a grafické vyjádření (viz obr. 1)

$$H = A + B/u + C * u$$

Obr. 1. Deemterova rovnice



kde:

A - faktor vlivu turbulentní difúze,

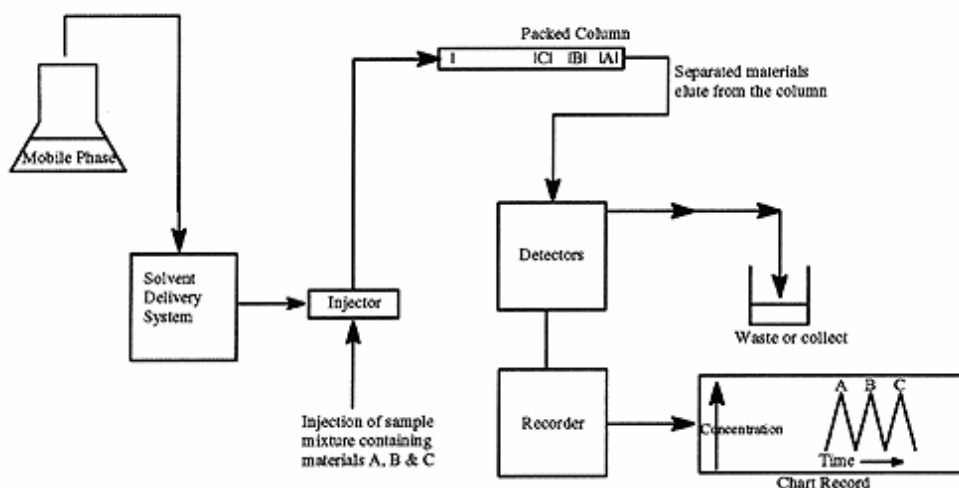
B - faktor vlivu molekulární difúze,

C - faktor vlivu odporu vůči převodu hmoty,

$u$  - střední lineární rychlost toku mobilní fáze.

Obr. 2. Blokové schéma kapalinového chromatografu [35].

Block diagram showing the components of an HPLC instrument



HPLC systém je vysoce sofistikovaný systém, jehož základními komponentami jsou vysokotlaká čerpadla (v současnosti schopná dosáhnout maximálního tlaku asi 1200 barů), směšovač mobilní fáze, dávkovač, detektor, sběrač frakcí, zapisovač a integrátor [36]. Analyzovaná směs je vstříknuta do proudící mobilní fáze dávkovačem, odkud je unášena na kolonu, kde na stacionární fázi dojde k rozdělení a posunu na detektor [37]. Dávkování vzorku se provádí speciální mikrostříkačkou nebo dávkovacím kohoutem [25]. HPLC kolony jsou ocelové trubice obvykle 10-30 cm dlouhé o vnitřním průměru 3 – 5 mm [38], kde je ukotvena stacionární fáze.

Na výběru náplně kolony, kvalitě sorbentu a jejich rozměrech závisí úspěšnost separace [39]. Kolony jsou nejčastěji plněny a dodávány komerčně. Dnes se jako základní adsorbent



používá silikagel, méně pak oxid hlinitý. Standardní velikost částic v koloně je 3, 5, 10  $\mu\text{m}$ . Nejmenší komerčně dodávané částice mají velikost 1,5  $\mu\text{m}$ . Důležitá je i porozita náplně, která má být co nejmenší.

Silikagel je tradiční a nejpoužívanější materiál používaný pro normální fázi a je základem pro mnoho chemicky modifikovaných reverzních fází.

Mobilní fáze používané v HPLC musí být odplyněné a co nejvyšší čistoty. Výběr je dán podle elučních schopností daného rozpouštědla, která jsou seřazena do elutropní řady:

Pentan<hexan<cyklohexan<toluen<etyleter<chloroform<tetrahydrofuran<aceton<

<etylacetát<dímetylsulfoxid<acetonitril<2-propanol<etanol<metanol<etylglykol [40].

Pro reverzní fáze platí elutropní řada obráceně.

Vyhodnocování může být jak kvalitativní – využití retenčních časů k identifikaci látek [41], tak kvantitativní, což je vztah mezi plochou či výškou píku a množstvím eluovaného materiálu [42].

## 4 PREPARATIVNÍ CHROMATOGRAFIE

Od počátků syntetické chemie se generování sloučenin skládalo ze dvou kroků: syntéza a její čištění. Kromě tradičních purifikačních technik jako je krystalizace, extrakce a destilace byly vyvinuty v 50. – 60. letech minulého století první nástroje pro sloupcovou preparativní chromatografii. Obvykle se skládaly z kolony a eluční nádrž se nastavovala nad sloupec. Vzorek se aplikoval ručně, a protože systém nezahrnoval čerpadlo, bylo využito hydrostatického tlaku eluentu. První HPLC preparativní systémy byly vyvinuty po roce 1970, za použití lepších materiálů kolon, menších částic a vysokotlakých čerpadel [43].

Preparativní chromatografie je pravděpodobně nejrozšířenější purifikační technikou používanou ve farmaceutickém a biotechnologickém průmyslu [44]. Jedná se vlastně o kapalinovou chromatografii ve velkém.

Účinnost vysokotlaké kapalinové chromatografie závisí na rychlosti a rozlišení. V preparativní tlakové chromatografii je dalším důležitým faktorem nástřik. Optimalizace jednoho z těchto tří parametrů má vliv na ostatní [45]. Množství látky, která má být separována za jednotku času je základním kritériem [46]. Rozlišení není prvotním faktorem pro preparativní chromatografii [47].

### Obecný postup vývoje preparativní metody

Aby byla izolace preparativní chromatografií efektivní je nutno dodržet následujících pět, po sobě jdoucích kroků:

- vymezení úkolu a sběr dat
- výběr výchozího materiálu
- vypracování strategie izolace; vývoj metod preparativní HPLC
- provedení izolace
- analýza izolované nečistoty

Přesné vymezení úkolu je předpokladem pro úspěšnou izolaci. Musí být vybrána vhodná analytická metoda pro detekci nečistot v průběhu izolace.

Nečistota má být jednoznačně označena. Je nutné znát fyzikálně-chemické vlastnosti separované látky: rozpustnost,  $pK_A$ , stabilita a informace o metodách TLC a HPLC.

Výběr vhodného materiálu je jedním z hlavních kritérií. Některé vstupní látky mohou obsahovat nepatrná % nečistoty. Pak je nutno zpracovávat vysoká množství hmoty, což zvyšuje jednak náklady a jednak nemusí být dostupné. Nejlepšími vstupními materiály mohou být matečné louhy, suroviny nebo frakce z chromatografického procesu čištění. Je-li nečistota degradačním produktem, pak musí být vystavena stresovým podmínkám (UV světlo, teplota). Další možností přípravy, pokud je to možné, je chemická syntéza. Před zahájením izolace je rozumné ověřit totožnost nečistoty, což může být provedeno spektrální shodou nebo srovnáním retenčního času.

Vypracování strategie začíná s analýzou. Na základě zjištěných informací (chemická struktura, nečistoty, stabilita, rozpustnost) se zvolí vhodná chromatografická technika. A vybere se zpracování vzorku například odpaření mobilní fáze (přímá fáze), extrakce kapalina-kapalina (reverzní fáze) nebo krystalizace. V případě krystalizace však dochází k výrazným ztrátám, zatímco u dobře provedené preparativní metody jsou ztráty minimální [48].

K vývoji preparativní metody se používá TLC pro vývoj na přímé fázi a HPLC pro vývoj na reverzní fázi. Tyto metody se také používají k monitoringu při samotné izolaci.

Finální částí je pak analýza produktu, nejprve analytickou metodou, potom následují charakterizační metody – infračervená spektrometrie, hmotnostní spektrometrie, NMR spektrometrie nebo jiné metody například RTG analýza.

## 5 CHARAKTERIZAČNÍ METODY

Pro jednoznačné prokázání chemické struktury standardu je nutné použít nejméně dvě nezávislé metody, zpravidla NMR a MS. Pro účely navazování sekundárních standardů na primární je vhodné použít jako další metodu IR. Dále je možné provést případně další doplňující zkoušky dokládající strukturu (sumární vzorec), jako je např. elementární analýza, UV spektroskopie, rentgenová difrakce aj. spektrální metody.

### 5.1 Infračervená spektrometrie

Je jednou z nejpoužívanějších spektrometrických metod v organické a anorganické analýze. Hlavním cílem je zjištění funkčních skupin v analyzovaném vzorku, který může být kapalný, pevný nebo plynný. Infračervená spektrometrie je metoda založená měření absorpce elektromagnetického záření, kdy se nemění elektronový stav, ale dochází ke změnám ve vibračních pohybech atomů v molekule [49]. Vibrace jsou formou intermolekulového pohybu, kdy se molekula chová jako pružné těleso a periodicky dochází ke změnám konfigurace atomů – mění se délky vazeb a vazebné úhly. Charakteristické vibrace jsou takové vibrace, kdy je pohyb situován jen v části molekuly či jediné vazbě nebo úhlu a jsou nesmírně důležité pro praktickou analýzu, protože ukazují na přítomnost daných funkčních skupin.

Vibrace můžeme rozdělit na valenční ( $\nu$ ), kdy jde o pohyb atomů ve směru vazeb a dochází ke změnám délky vazeb, mohou být symetrické a asymetrické. Při deformačních ( $\delta$ ) vibracích se atomy pohybují kolmo na vazby a mění se vazebné úhly. Deformační vibrace mohou být rovinné, mimorovinné, nebo kroutivé – torzní. Schopnost vibrace absorbovat záření závisí na aktivitě v infračerveném spektru.

Infračervenou oblast můžeme rozčlenit na tři části:

- Blízká IČ oblast –  $12500 - 4000 \text{ cm}^{-1}$  NIR
- Střední IČ oblast –  $4000 - 200 \text{ cm}^{-1}$  MIR
- Daleká IČ oblast –  $250 - 5 \text{ cm}^{-1}$  FIR

FIR oblast je oblastí rotačních spekter a má význam pro molekulovou fyziku. MIR oblast je analyticky nejdůležitější. NIR oblast důležitá pro kvantitativní analýzu.

V rozsahu  $4000 - 1500 \text{ cm}^{-1}$  leží charakteristické absorpční pásy. Oblast pod  $1500 \text{ cm}^{-1}$  se nazývá oblast otisku palce, která je individuální pro každou nečistotu [50].

## 5.2 Hmotnostní spektrometrie

Hmotnostní spektrometrie je fyzikálně-chemická metoda založená na přímém měření hodnoty poměru hmotnosti a náboje ( $m/z$ ) iontů v plynné fázi produkovaných v iontovém zdroji přístroje. Těmito ionty mohou být ionizované atomy, klastry, molekuly nebo jejich fragmenty a adukty. K separaci iontů dochází v dynamickém nebo statickém magnetickém nebo elektrickém poli (případně v kombinaci obou těchto polí).

Každý hmotnostní spektrometr je složen z iontového zdroje, hmotnostního analyzátoru a detektoru. Z pohledu praktického využití mají dnes největší význam ionizační techniky pracující za atmosférického tlaku (ESI, APCI, MALDI), které jsou využívány ve spojení s HPLC. Pro spojení s plynovou chromatografií jsou hojně využívány techniky EI a CI.

Hmotnostní analyzátoři umožňují rozdělit ionty na základě rozdílných hodnot  $m/z$ . Tohoto rozdělení je možné dosáhnout s využitím různých fyzikálních principů. V současnosti jsou hojně využívány tzv. hybridní analyzátoři. Jedná se o několik analyzátorů spojených sériově (např. QQQ, Q-TOF, TOF-TOF).

Detektory můžeme rozdělit do dvou základních skupin, na detektory pro přímá měření detekují el. proud vznikající přímým dopadem stanovovaných iontů (měření izotopového zastoupení prvků při zjišťování stáří hornin) a násobičové detektory využívají efekt násobení elektronů uvolněných z první konverzní dynody po dopadu iontů (nejčastěji používané detektory v MS, poskytují měřitelný signál pro jednotlivé ionty)

Výstupním signálem z hmotnostního detektoru je tzv. hmotnostní spektrum, což je dvojdimenzionální záznam intenzity signálu oproti poměru  $m/z$ . Poměr  $m/z$  je obvykle vyjadřován v atomových hmotnostních jednotkách ( $1 \text{ amu} = \text{jedna dvanáctina atomové hmotnosti izotopu uhlíku } ^{12}\text{C}$ ) nebo v daltonech ( $1 \text{ Da}$  je hmotnost vodíkového atomu).

Metoda hmotnostní spektrometrie se využívá pro kvalitativní i kvantitativní stanovení látek. Hmotnostní spektrometrie je vysoce citlivou metodou umožňující v současnosti stanovovat látky na úrovni kolem  $10^{-9} \text{ g}$ . Patří mezi ně identifikace neznámých látek, určování izotopového složení prvků v molekule a zjištění struktury sloučenin. Hmotnostní spektrometrie poskytuje pouze informace o primární struktuře látek a zjištění struktury

látek pouze z MS dat bývá někdy velmi obtížné, v řadě případů i nemožné [51-54]. Pro potvrzení struktury látky je vždy nutné použít alespoň jednu další nezávislou metodu (zpravidla NMR).

### **5.3 Nukleární magnetická rezonance**

NMR spektroskopie podává komplexní informaci o vnitřní struktuře a uspořádání hmoty.

Princip NMR je založen na interakci magneticky aktivních jader s nenulovým spinem v magnetickém poli se silným elektromagnetickým zářením v oblasti radiových vln. Vlivem interakcí dochází k charakteristickým posunům a štěpením signálů.

Nenulový spin mají pouze látky s lichým počtem protonů nebo neutronů.

## **II. PRAKTICKÁ ČÁST**

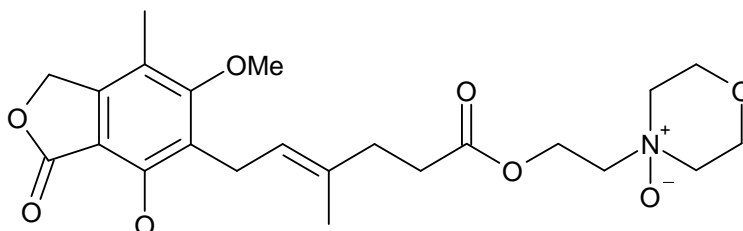
## 6 PŘÍPRAVA NEČISTOT K MOFETILU

Mofetil N-oxid je degradačním produktem, který vzniká samovolnou oxidací substance mykofenolátu mofetilu. Jedná se o specifikovanou nečistotu, pro kterou je definován obsahový limit v lékopisných monografiích (USP, PhEur). V těchto monografiích je tato nečistota označena jako impurity G. Z tohoto důvodu je velmi důležité mít k dispozici identifikační standard této nečistoty, jehož přípravou jsem se zabývala v následující části diplomové práce.

### 6.1 Chemická a fyzikální charakteristika

#### mofetil N-oxid

Vzorec:



Systematický název: 2-( morpholine-4-yl ) ethyl (4E)-6-(4-hydroxy-6-methoxy-7-methyl-3-oxo-1,3-dihydroisobenzofuran-5-yl)-4-methylhex-4-enoate-N-oxide

Sumární vzorec:  $C_{23}H_{31}NO_8$

$M_R = 449.49$

Triviální název: mofetil N – oxid, impurity G

### 6.2 Použité chemikálie a přístroje

#### 6.2.1 Chemikálie

3-chloroperbenzoová kyselina

acetonitril

dichloromethan

etylacetát

fosforečná kyselina

hexan



metanol

voda

silikagelové TLC desky

### 6.2.2 Přístroje

Vakuová odparka

HPLC systém Waters s PDA detektorem

Hmotnostní spektrometr Thermo LTQ-XL (iontová past) s ionizací elektrosprejem

## 6.3 Příprava mofetilu *N*-oxidu

*N*-oxid byl připraven reakcí 10 g mykofenolátu mofetilu, rozpuštěném ve 100 ml dichloromethanu, s 3-chloroperbenzoovou kyselinou (70% vodný roztok) za laboratorní teploty. Reakční směs byla po celou dobu průběhu reakce míchána. Reakce byla monitorována pomocí HPLC, kdy byly průběžně odebírány vzorky reakční směsi.

Výpočet množství kyseliny, za předpokladu, že reakce proběhne 1:1.

$$\text{Vzorec: } n = \frac{m}{M}$$

Mofetil:  $m=10\text{g}$ ,  $M=433,5$ ,  $n=0,023$  mol

Kyselina 3-chloroperbenzoová:  $m=?$ ,  $M=172,6$ ,  $n=0,023$  mol

Výpočet:  $m = 172,6 \times 0,023 = 3,97$  g 100% kyseliny, což je 5,67 g 70% kyseliny

## 6.4 Vývoj preparativní chromatografie

V prvním kroku byla vyvinuta TLC metoda s cílem zvolit vhodný systém solventů pro následnou preparativní chromatografii na silikagelu. Metoda by měla být vhodná pro separaci mykofenolátu mofetilu (reaktant) a mofetilu *N*-oxidu (produkt).

### 6.4.1 Vývoj TLC metody

Pro vývoj TLC metody byly použity skleněné TLC desky 5x10 cm Silikagel 60 F254 (Merck). Desky byly vyvíjeny v uzavřené skleněné komoře nasycené parami mobilní fáze.

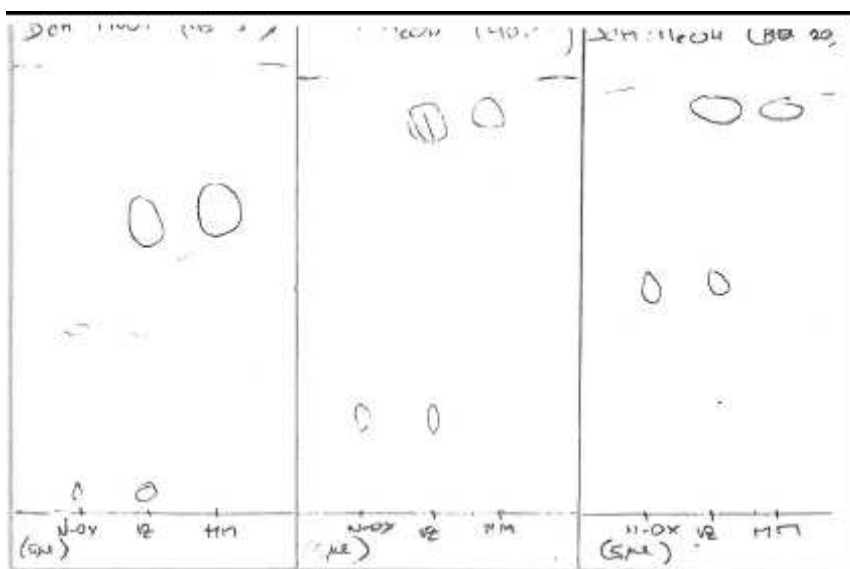
Byla vyzkoušena celá řada binárních systémů organických solventů v různých poměrech (hexan:etylacetát, hexan:aceton, dichlormetan:etylacetát, dichlormetan:metanol). Nejlepších výsledků bylo dosaženo v binární směsi dichlormetan:metanol, kdy došlo k velmi dobré separaci výchozí látky reakce – mykofenolátu mofetilu a cílové látky N-oxidu mofetilu. Na Obr. 3 jsou prezentovány dosažené výsledky v tomto systému při různém poměru solventů. Jako optimální pro preparativní chromatografii by bylo použít solvent 5 % MeOH v dichlormetanu a po eluci mykofenolátu z kolony vymýt N-oxid mofetilu dalším polarizováním mobilní fáze (zvýšení obsahu MeOH).

**Obr. 3.** Výsledky TLC experimentů v binární směsi dichlormetan-metanol

5% MeOH

10% MeOH

20% MeOH



#### 6.4.2 Sledování průběhu reakce HPLC metodou

Pro monitoring reakce byla použita následující HPLC metoda:

Kolona: Symmetry C8 5  $\mu$ m, 250 x 4,6 mm (Waters)

Teplota kolony: 45°C

Detekce: UV – 222 nm

Průtok mobilní fáze: 2 ml/min

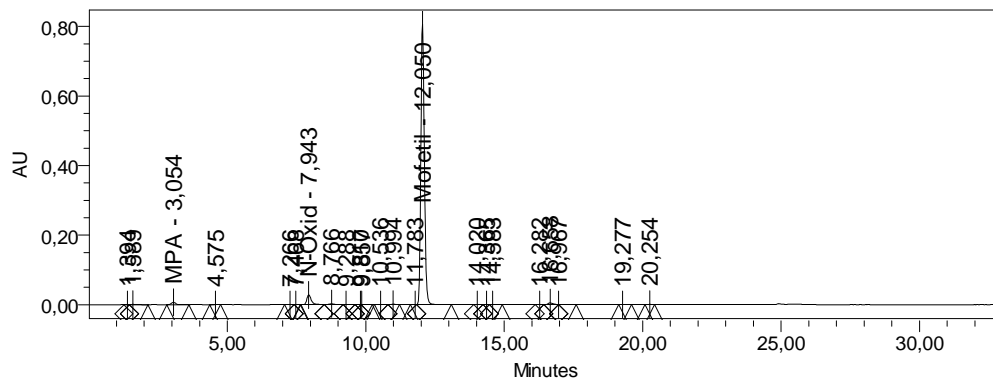
MF A: 10mM H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>

MF B: acetonitril

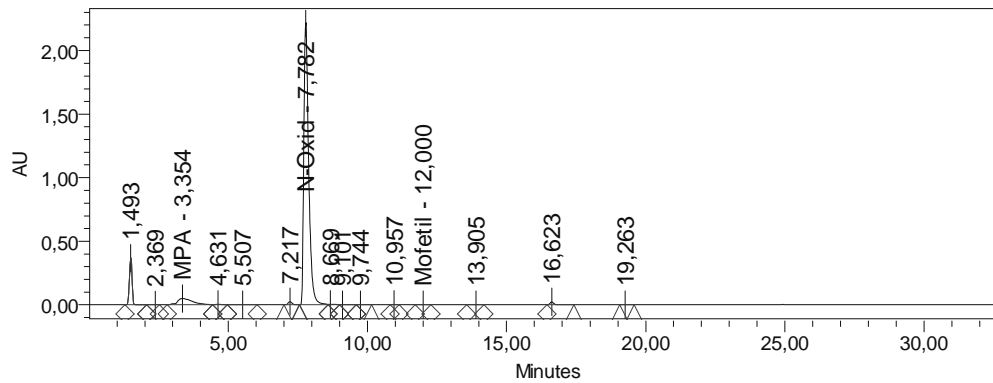
Gradient:

	Time	Flow	%A	%B	%C	%D	Curve
1	0,01	2,00	70,0	0,0	30,0	0,0	6
2	3,80	2,00	70,0	0,0	30,0	0,0	6
3	15,00	2,00	40,0	0,0	60,0	0,0	6
4	15,10	2,00	0,0	40,0	60,0	0,0	6
5	20,00	2,00	0,0	10,0	90,0	0,0	6
6	23,00	2,00	0,0	10,0	90,0	0,0	6
7	23,50	2,00	0,0	70,0	30,0	0,0	6
8	25,00	2,00	0,0	70,0	30,0	0,0	6
9	25,10	2,00	70,0	0,0	30,0	0,0	6
10	33,00	2,00	70,0	0,0	30,0	0,0	6

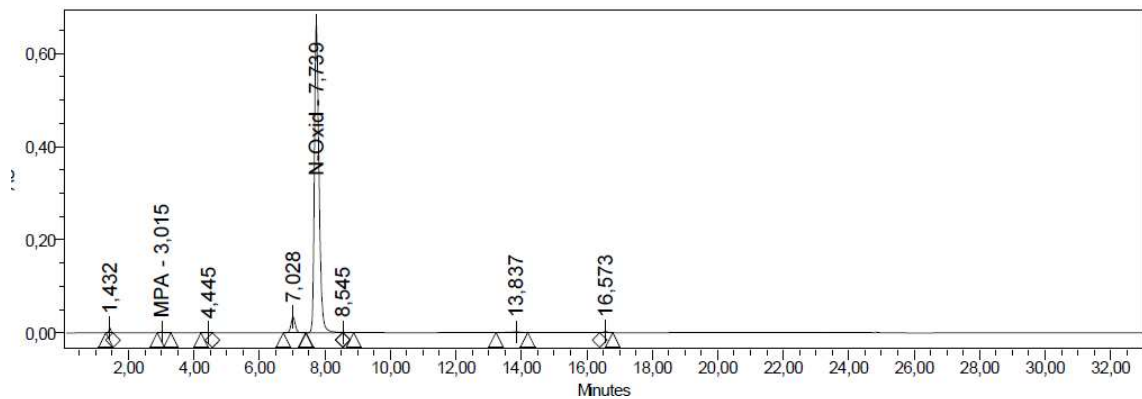
Obr. 4. HPLC analýza vstupního materiálu mykofenolátu mofetilu



Obr.5. HPLC analýza reakční směsi po 1 hodině



Z výše uvedených chromatogramů vyplývá, že reakce proběhla prakticky kvantitativně již za 1 hodinu. Proto byla ukončena naředěním reakční směsi 10 ml vody. V dělicí nálevce byla oddělena organická fáze, která byla odpařena. Byly získány 3,46 g odparku, který byl analyzován na HPLC (viz Obr. 6)

*Obr. 6. Analýza finálního produktu mofetil N-oxidu*

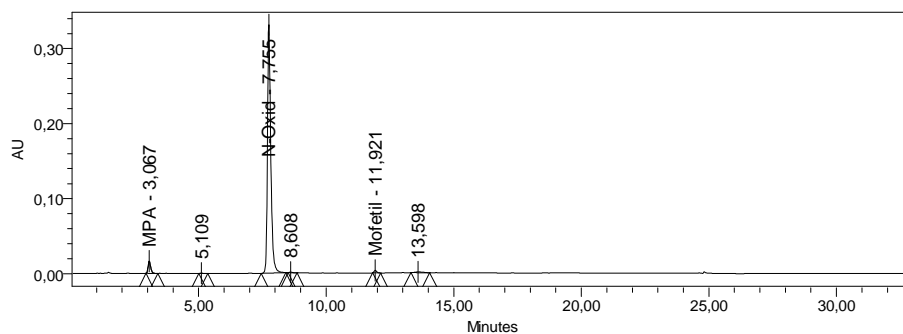
Čistota je natolik postačující, že není třeba látku dále purifikovat. Mofetil N-oxid zaujímá 94 plošných %.

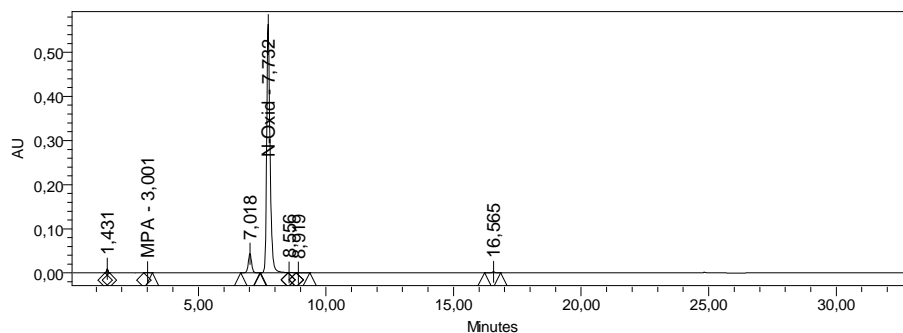
## 6.5 Potvrzení totožnosti

Pro potvrzení totožnosti připraveného standardu N-oxidu mofetilu bylo použito dvou nezávislých metod, HPLC a MS.

### 6.5.1 Kapalinová chromatografie

Pomocí HPLC byly porovnány retenční časy standardu N-oxid mofetilu a nově připraveného standardu N-oxid mofetilu. Retenční časy obou píků byly shodné. Příslušné chromatogramy jsou prezentovány na Obr. 7 a 8.

*Obr. 7. Chromatogram původního standardu*

*Obr. 8. Chromatogram N-oxidu mofetilu*

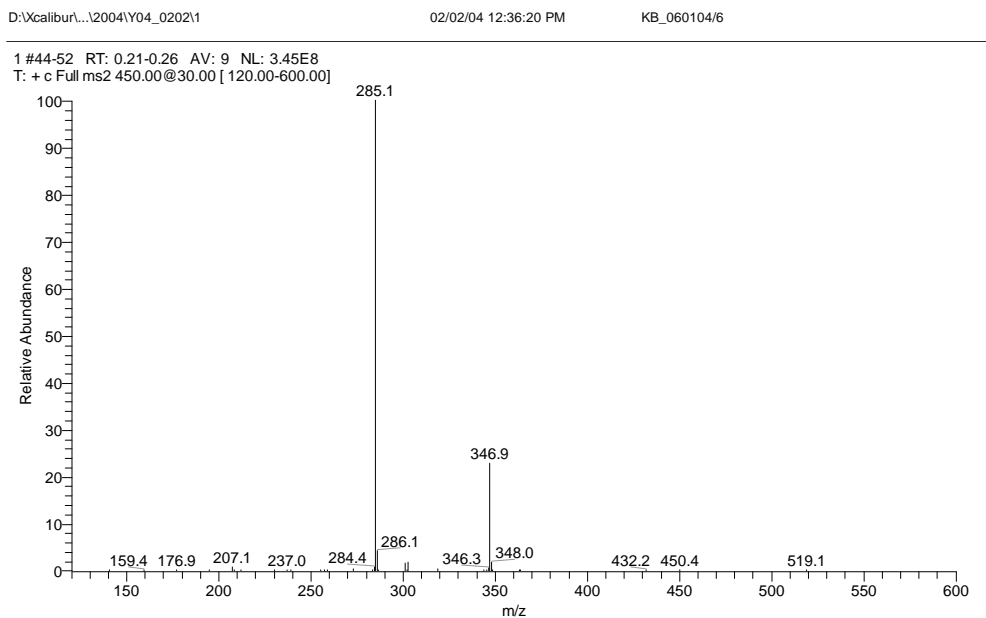
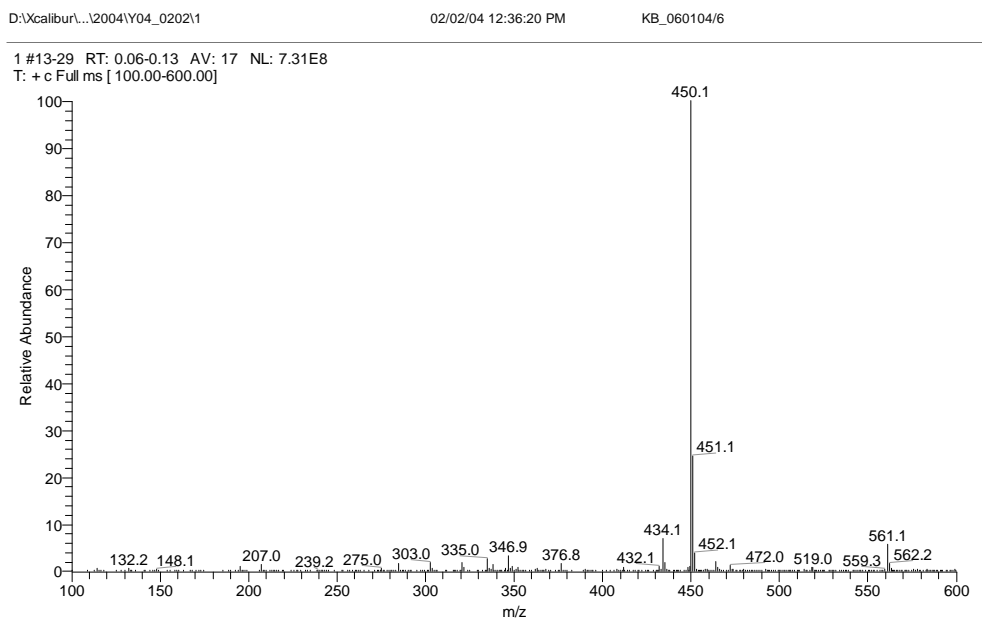
Retenční časy původního standardu N-Oxidů a nově připraveného standardu N-Oxidů byly srovnány, a identita byla potvrzena.

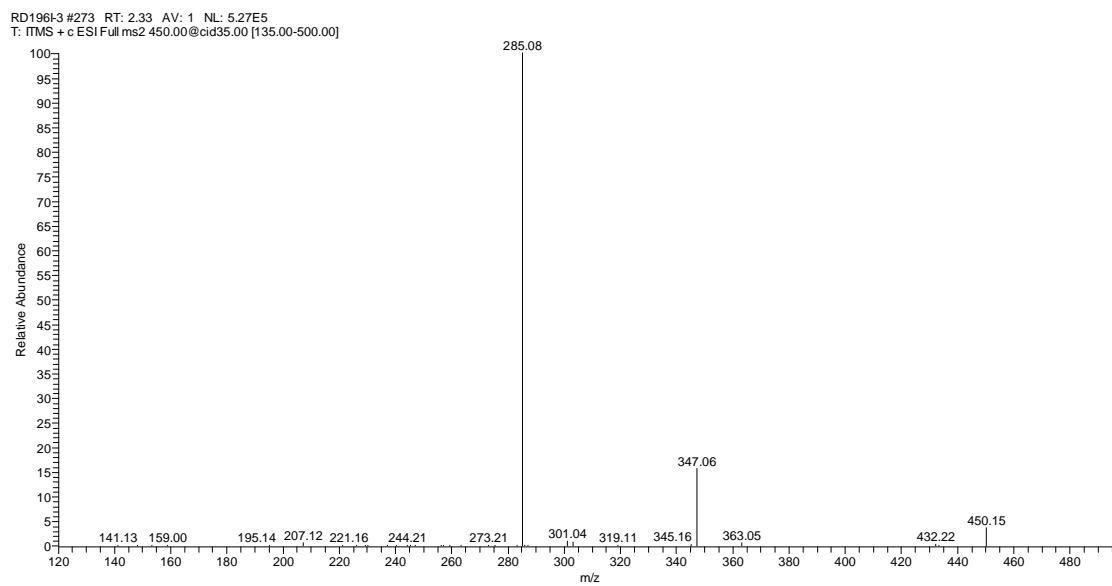
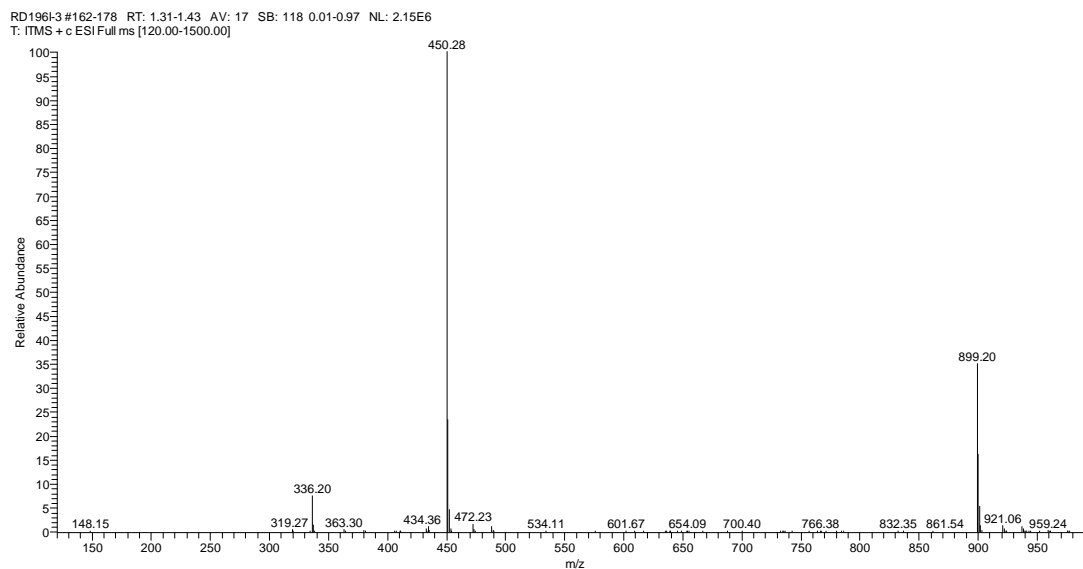
### 6.5.2 Hmotnostní spektrometrie

Analýza byla provedena na hmotnostním spektrometru LTQ-XL (Thermo Separation Scientific), což je iontová past s ionizací elektrosprejem v pozitivním módu (detekce kationtů).

Připravený produkt Mofetil N-oxid poskytuje molekulární iont  $[M + H]^+$   $m/z$  450. V MS-MS experimentu fragmentací iontu  $m/z$  450 získáváme iont  $m/z$  347, který odpovídá štěpení vazby N-oxid – alkyl. Spektra jsou uvedena na obr. 9.

Toto spektrum bylo srovnáno s MS spektrem dříve připraveného a identifikovaného standardu Mofetil N-oxidu (viz Obr.10). Získaná MS a MS-MS spektra jsou identická se spektry připraveného produktu. Identita připraveného produktu tedy byla potvrzena.

*Obr. 9. ESI MS spektra připraveného produktu mofetil N-oxidu*

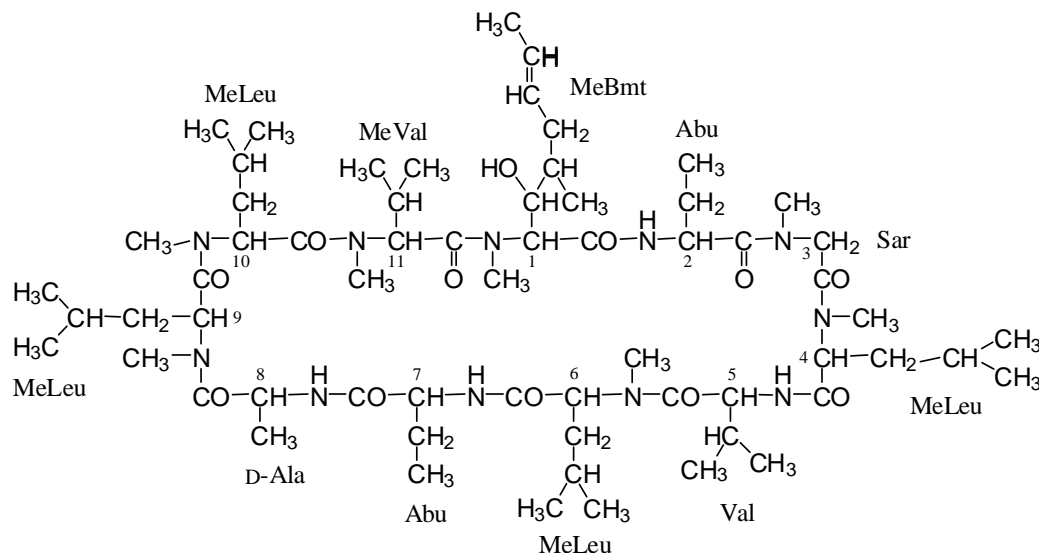
*Obr. 10. ESI MS spektra dříve připraveného standardu mofetil N-oxidu*

## 7 IZOLACE CYCLOSPORINU V

Cyklosporine V je lékopisná specifikovaná nečistota, která je uváděna jak v evropském, tak americkém lékopise. Jedná se o vedlejší produkt vznikající při fermentační výrobě cyklosporinu. Vzhledem ke složitosti molekuly je příprava standardu syntetickou cestou prakticky vyloučena. Proto bylo nutné standard naizolovat z odpadního materiálu získaného po extrakci cyklosporinu z mycelia.

### 7.1 Chemická a fyzikální charakteristika

Vzorec:



Systematický název: Cyclo[[*(2S,3R,4S,6E)*-3-hydroxy-4-methyl-2-(methylamino)-oct-6-enoyl]-L-2-aminobutanoyl-N-methylglycyl-N-methyl-L-leucyl-L-valyl-N-methyl-L-leucyl-L-alanyl-D-alanyl-N-methyl-L-leucyl-N-methyl-L-leucyl-N-methyl-L-valyl] 1-L-Abu.

Sumární vzorec:  $C_{63}H_{114}N_{11}O_{12}$

$M_R = 1216$

Triviální název: Cyklosporine V



## 7.2 Použité chemikálie

Acetonitril

Etanol

Metanol

*Tert*-butyl metyl éter

voda

## 7.3 Použité přístroje

HPLC systém Waters s PDA detektorem

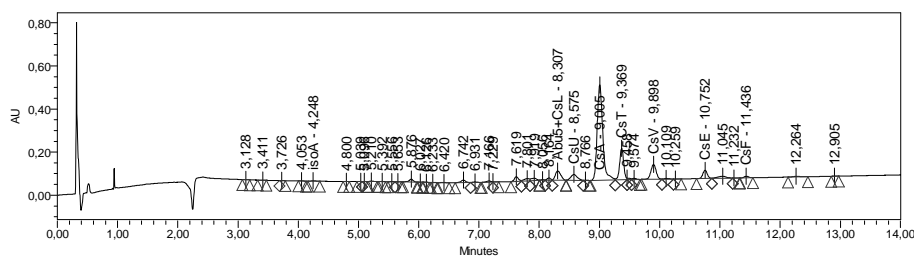
Preparativní systém Knauer

## 7.4 Výběr vhodného materiálu

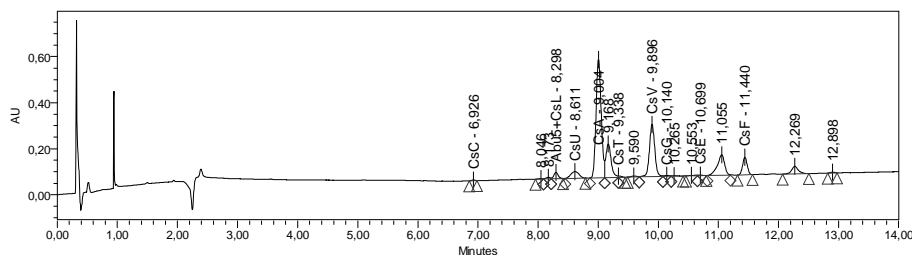
K dispozici bylo 6 různých materiálů, které se zanalyzovaly HPLC metodou a z nich byl vybrán ten nejvhodnější pro izolaci cyklosporinu V. Hlavním kritériem byl obsah cílové látky s pokud možno co nejjednodušším profilem nečistot. Na následujících obrázcích

11 – 16 jsou prezentovány výsledky HPLC analýzy testovaných materiálů. Výsledky jsou následně sumarizovány v Tab.1.

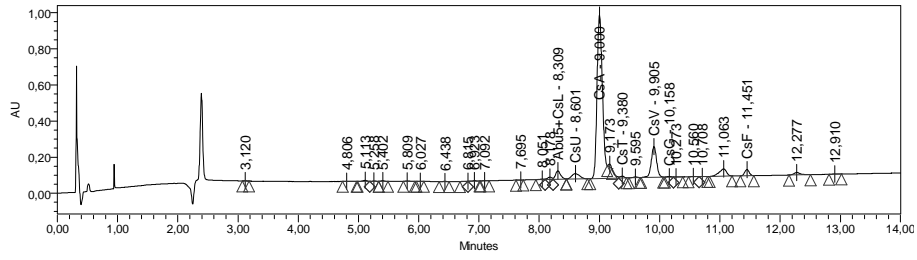
**Obr. 11.** Chromatogram 1. materiálu



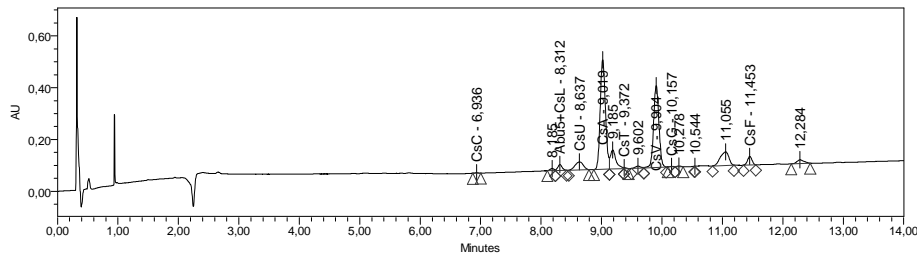
**Obr. 12.** Chromatogram 2. materiálu



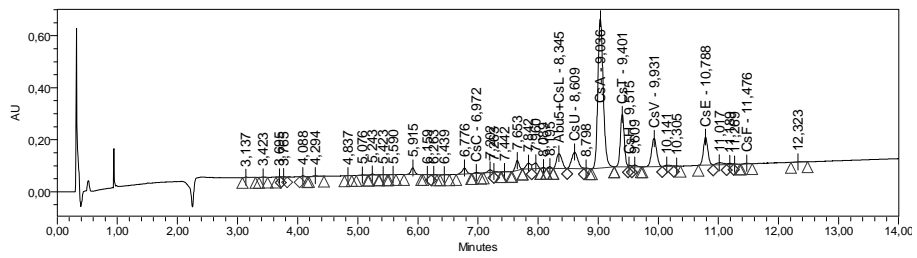
Obr. 13. Chromatogram 3.materiálu



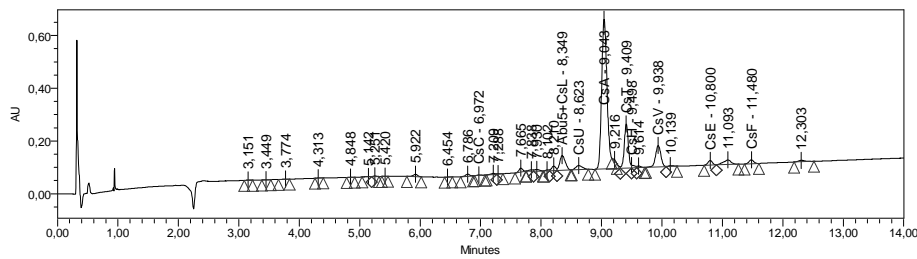
Obr. 14. Chromatogram 4.materiálu



Obr. 15. Chromatogram 5.materiálu



Obr. 16. Chromatogram 6.materiálu



**Tab. 1.** Tabulka výsledků obsahu cyklosporinu V

šarže	Plošná %
Materiál č.1	7.80
Materiál č.2	19.08
Materiál č.3	12.01
Materiál č.4	30.52
Materiál č.5	8.57
Materiál č.6	7.86

Z výsledků analýzy vyplývá, že nejlepším materiálem k izolaci byl materiál číslo 4 s obsahem asi 30 % cílové látky cyklosporinu V.

## 7.5 Optimalizace preparativní metody

Optimalizací HPLC metody získáme metodu, kterou půjdou odseparovat od sebe jednotlivé nečistoty. Měla by být relativně krátká s co nejlepším dělením píků. Vycházelo se z toho jaké máme k dispozici preparativní kolony a jim odpovídající analytické. Jako první zkušební mobilní fáze byl připraven 50% acetonitril (MeCN). Optimalizace byla prováděna na vybraném materiálu číslo 4. Detekce byla měřena při 210 nm.

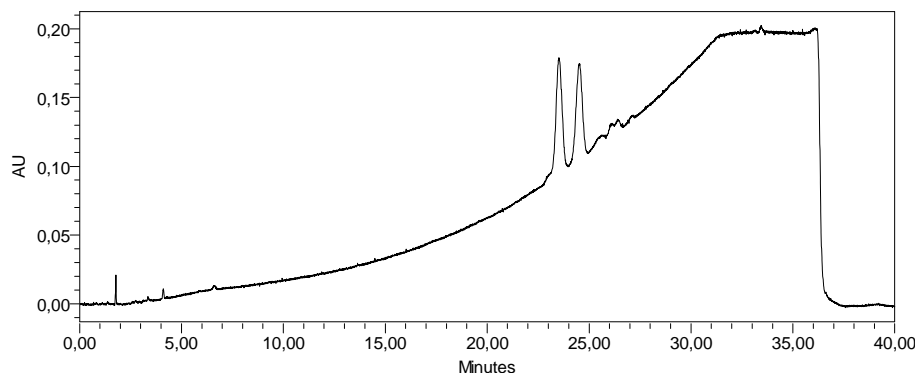
MF A: 50% MeCN

MF B: MeCN

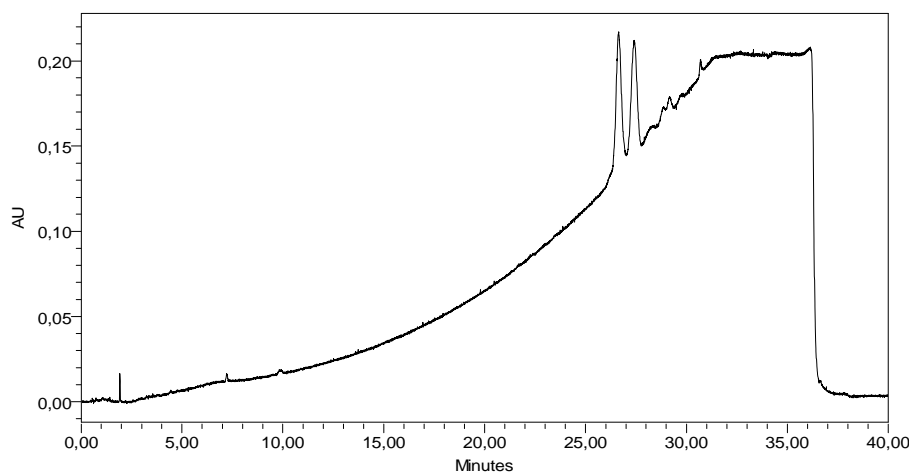
**Tab. 2.** Gradient

	Time	Flow	%A	%B	%C	%D	Curve
1	0,01	2,00	100,0	0,0	0,0	0,0	6
2	1,00	2,00	100,0	0,0	0,0	0,0	6
3	30,00	2,00	10,0	90,0	0,0	0,0	6
4	35,00	2,00	10,0	90,0	0,0	0,0	6
5	40,00	2,00	100,0	0,0	0,0	0,0	1

*Obr. 17. 1. analytická kolona: Zorbax SB – C8, 5 $\mu$ m, 4,6 x 250 mm*



*Obr. 18. 2. analytická kolona: Synergi Hydro – RP 80A, 4 $\mu$ m, 4,6 x 250 mm*

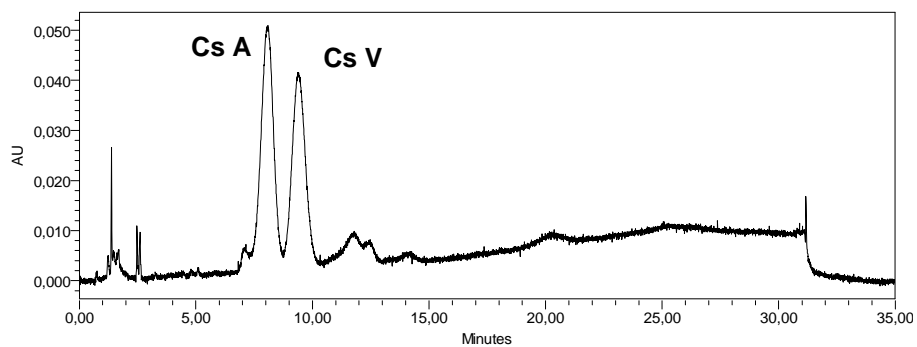


Na koloně Zorbax SB – C8 byly sledované dva píky – cyklosporin A a cyklosporin V od sebe lépe odděleny. Další testování bylo prováděno na této koloně.

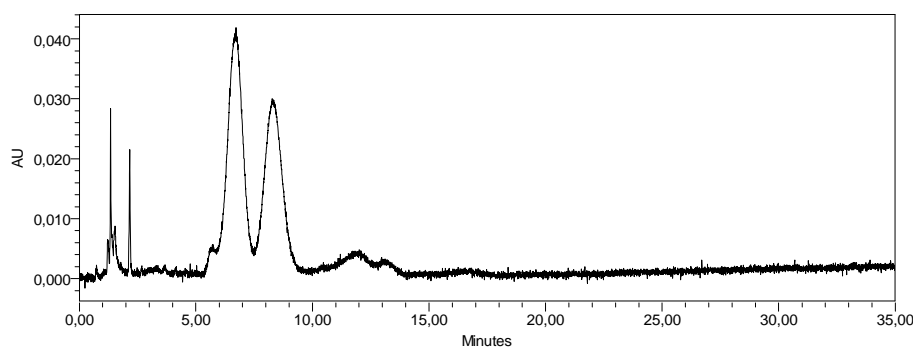
### 7.5.1 Optimalizace složení mobilní fáze

V této části byly testovány mobilní fáze složené z vody-metanolu a vody-acetonitrilu. Cílem bylo dosáhnout maximálně možného rozlišení mezi píky cyklosporinu A (CsA) a cyklosporinu V (CsV) v přijatelném čase. Jednotlivé píky jsou označeny v Obr. 19. V následujících jsou testovány různé mobilní fáze (Obr. 20 – 37), přičemž eluční pořadí obou píku je totožné s Obr. 19.

*Obr. 19. 70% MeCN*

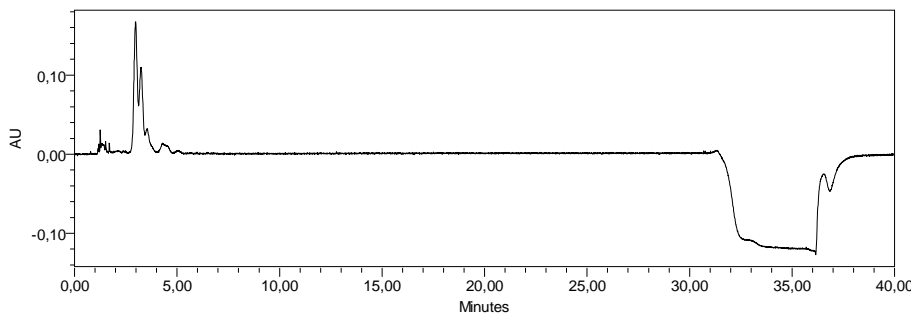


*Obr. 20. 75% MeCN*

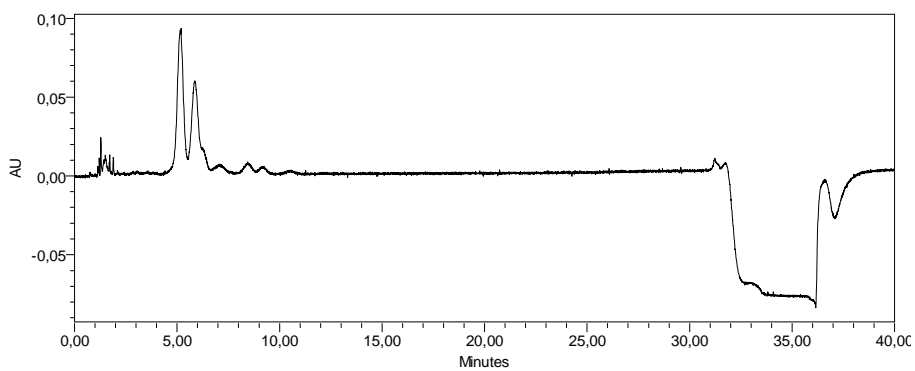


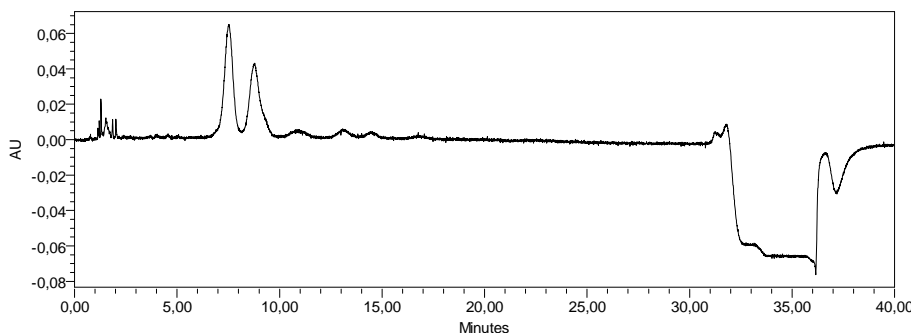
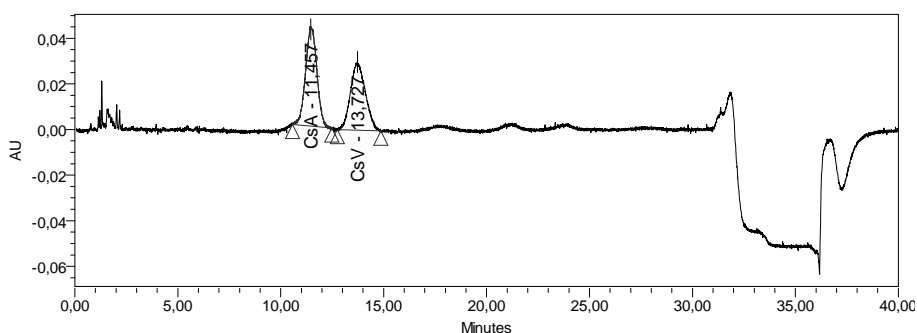
Metanol – MeOH

*Obr. 21. 90% MeOH*



*Obr. 22. 85% MeOH*

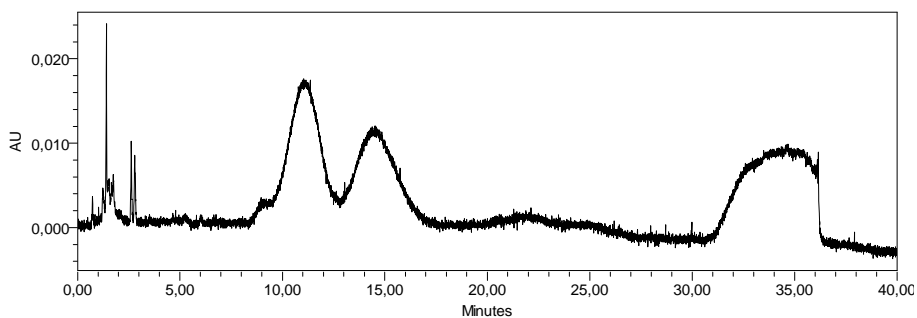


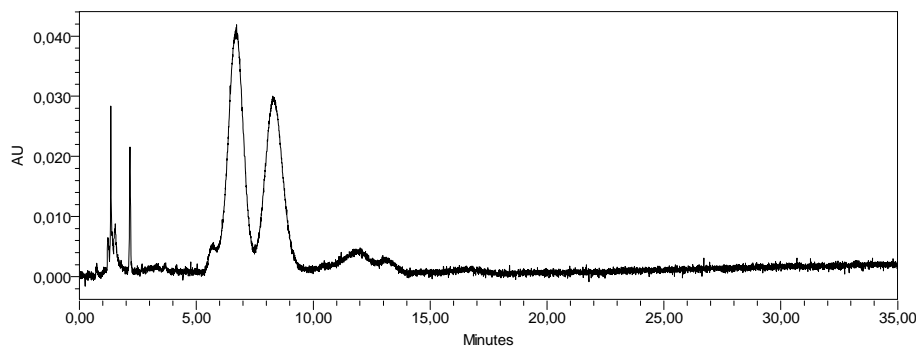
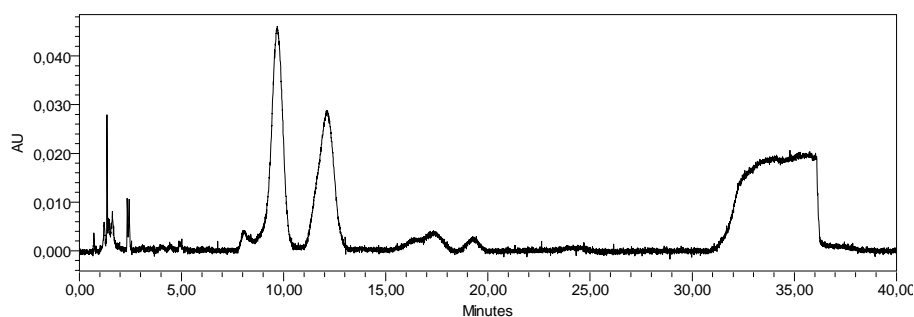
*Obr. 23. 82,5% MeOH**Obr. 24. 80% MeOH*

Jako optimální se jevílo použití 80 % MeOH. Ovšem při použití MeOH v mobilní fázi dochází k neúměrnému zvyšování tlaku v systému vlivem vyšší viskozity mobilní fáze. Separace v MeCN byla srovnatelná, proto byl v další optimalizaci používán systém 70 % MeCN.

### 7.5.2 Vliv teploty na separaci

V některých případech můžeme změnou teploty při které probíhá separace dosáhnout významných změn v selektivitě systému. Proto byla provedena separace při teplotách 40, 50 a 60°C. Výsledky separací jsou prezentovány na Obr. 25-27.

*Obr. 25. 40°C*

*Obr. 26. 50°C**Obr. 27. 60°C*

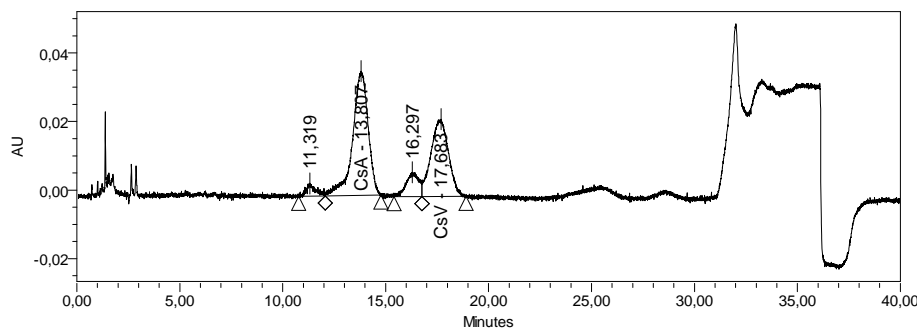
Bylo prokázáno, že se vrůstající teplotou dochází ke zvýšení rozlišení mezi píky CsA a CsV. Jako optimální byla vybrána teplota 60°C. Výhodou vyšší teploty je také výrazné snížení tlaku v systému. Z tohoto důvodu byla v další části optimalizace testována mobilní fáze složená z vody a metanolu.

### 7.5.3 Vliv obsahu *tert*-butyl metyl éteru

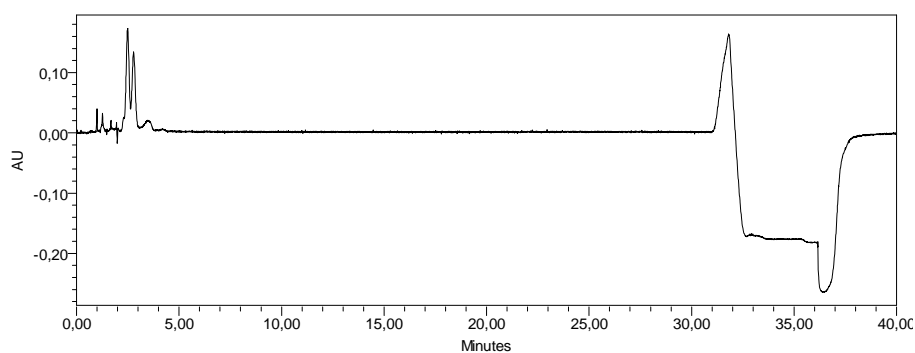
*Tert*-butyl metyl éter (TBME) je používán jako složka mobilní fáze v analytické metodě určené pro kontrolu obsahu doprovodných látek ve finálním produktu CsA. Ukázalo se, že TBME má významný vliv na selektivitu separace, a proto bude jeho vliv testován i pro preparativní metodu.

Optimalizace byla provedena v systému voda-acetonitril a voda-metanol v různém poměru s přídatkem TBME při teplotě 60°C. Výsledky separací jsou prezentovány na Obr. 28 – 37.

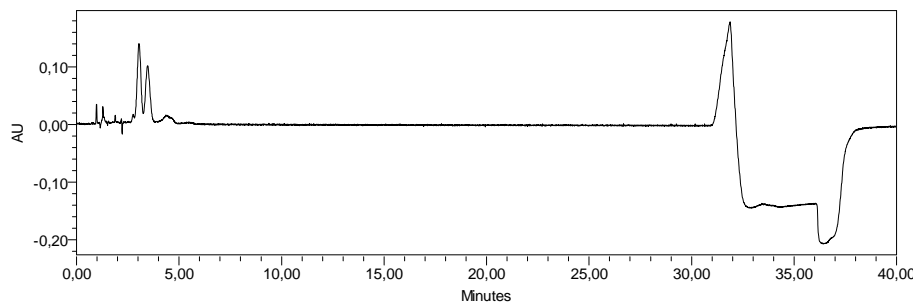
**Obr. 28.** 5% TBME/65% MeCN



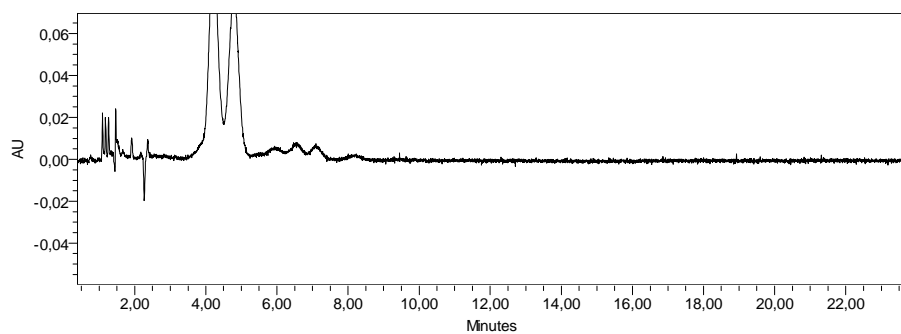
**Obr. 29.** 10% TBME/65% MeCN



**Obr. 30.** 10% TBME/60% MeCN

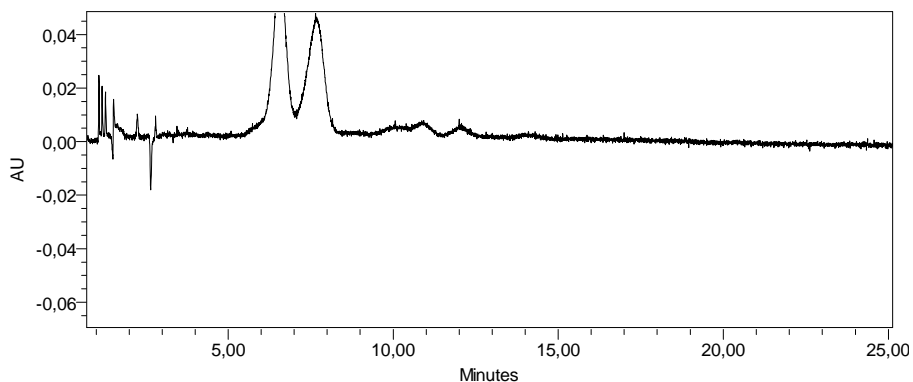


**Obr. 31.** 10% TBME/60% MeOH

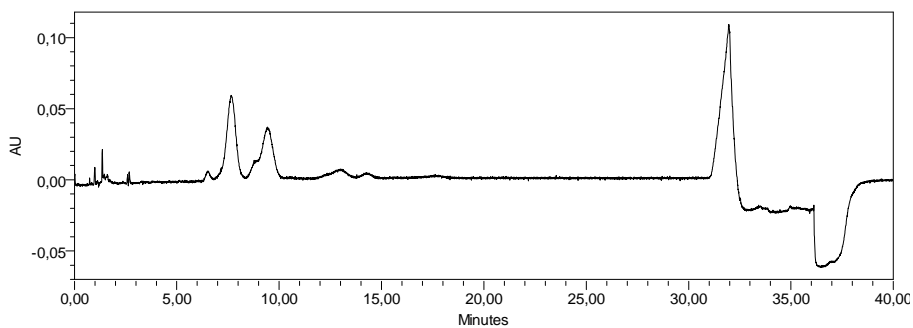




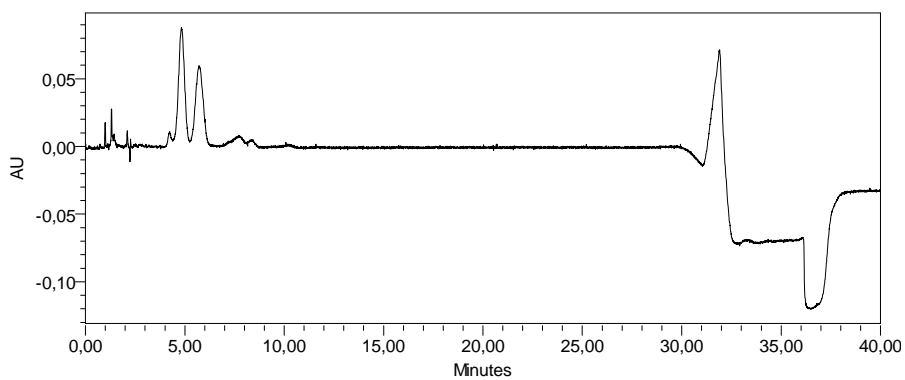
**Obr. 32.** 10%TBME/60% MeOH



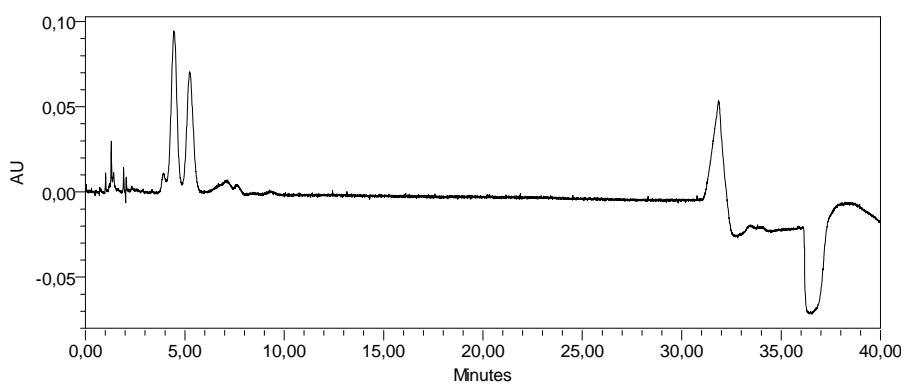
**Obr. 33.** 5% TBME/60% MeCN

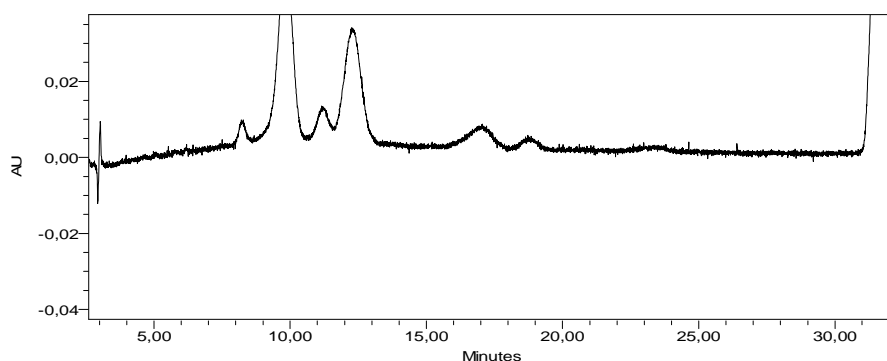
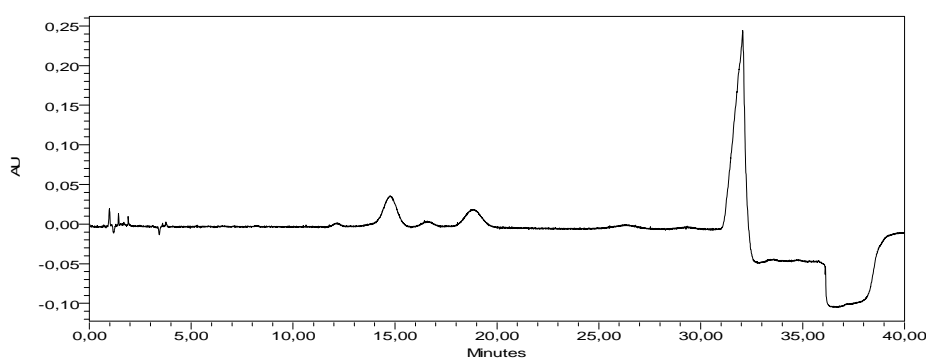


**Obr. 34.** 5%TBME/65% MeCN



**Obr. 35.** 3%TBME/70% MeCN



*Obr. 36. 5%TBME/55% MeCN**Obr. 37. 5%TBME/50% MeCN*

Nelepší separace CsA a CsV bylo dosaženo při použití mobilní fáze s obsahem 5 % TBME v 50 % MeCN. Navíc se podařilo odseparovat další nečistotu, která v předchozích analýzách koeluovala s jednou z hlavních složek.

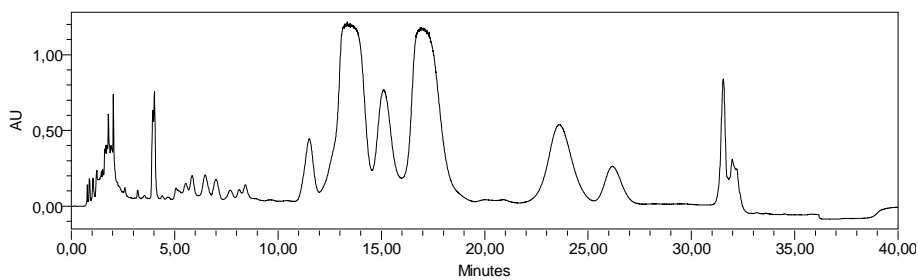
## 7.6 Optimalizace podmínek dávkování

Při optimalizaci podmínek dávkování byla snaha získat vysoké a úzké píky, čehož se dosáhne nižším nástřikem koncentrovaného vzorku. V tomto případě se podařilo rozpustit 100 mg v 0,5 ml metanolu, nejprve bylo vyzkoušeno rozpustit 100 mg v co nejmenším množství MeOH, což se rozpustilo už v 0,5 ml bezvodého metanolu. Takto připravený vzorek byl zanalyzován a postupně byl zvyšován i nástřik. Opět byly vyzkoušeny další kolony.

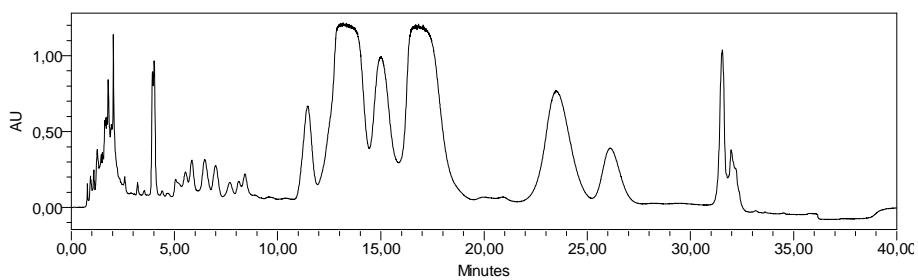
Následující obrázky ukazují analýzu vstupního materiálu v hmotnostní koncentraci 100mg/0,5 ml MeOH s různými kolonami a s různými nástřiky.

Kolona : Biospher PSI – C18,5um, 250 x 4,6 mm

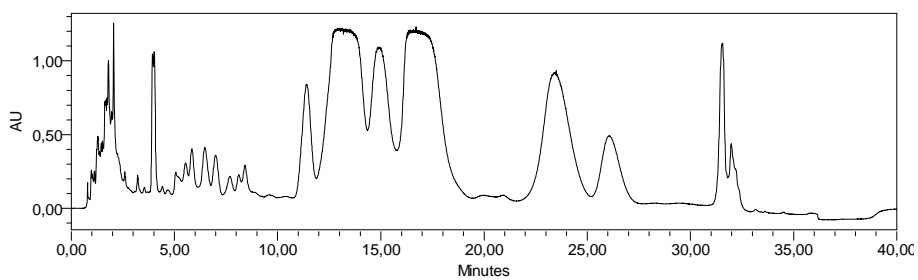
**Obr. 38.** 4μl nástřik



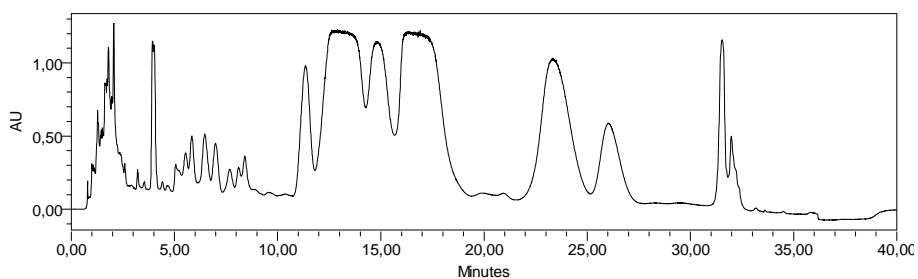
**Obr. 39.** 6μl nástřik



**Obr. 40.** 8μl nástřik

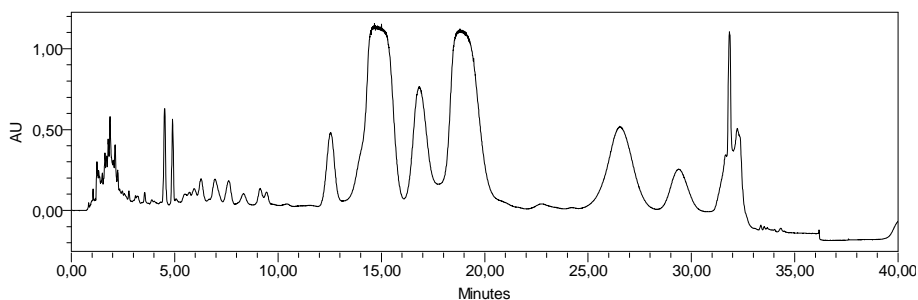


**Obr. 41.** 10μl nástřik

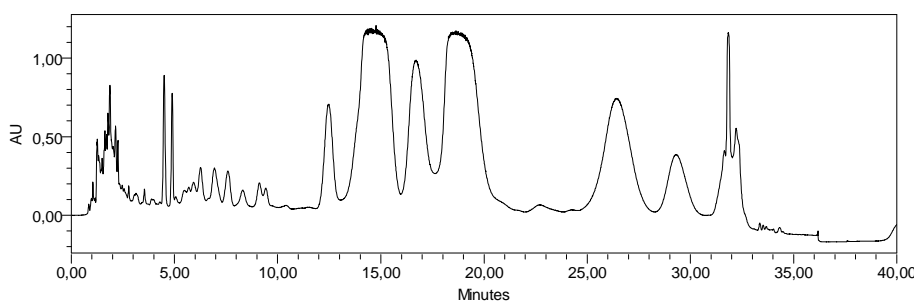


Kolona: Synergi Hydro – RP, 4 $\mu$ m, 250 x 4,6 mm

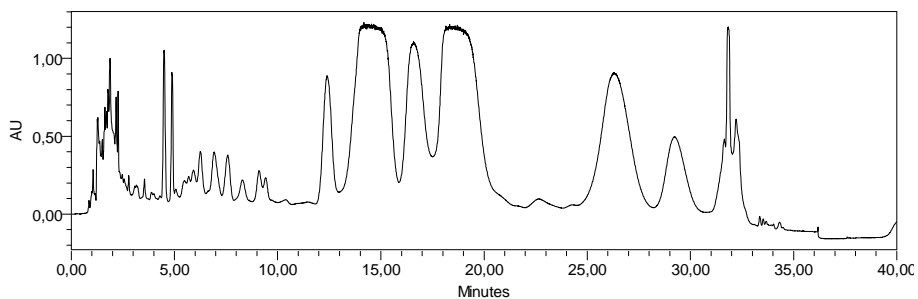
*Obr. 42. 4 $\mu$ l nástřik*



*Obr. 43. 6 $\mu$ l nástřik*



*Obr. 44. 8 $\mu$ l nástřik*



Tímto testováním byla vybrána vhodnější kolona na samotnou izolaci. Lepší dělení poskytla kolona Synergi Hydro – RP

## 7.7 Izolace nečistoty

### HPLC

Kolona: Synergi Hydro-RP, 4 $\mu$ m, 250 x 4,6 mm, S/N: 450155-12

Průtok MF: 2 ml/min

Nástřik: 6  $\mu$ l (200 mg/ml)

Přepočítání:  $200 \text{ mg}/1000\mu\text{l} = 0,2 * 6 = 1,2 \text{ mg}$  na nástřik

$$1,2 * 20 = 24 \text{ mg}$$

### Preparativní chromatografie

kolona :Synergi Hydro-RP 80A, 4 $\mu$ m, 250 x 21,2 mm, S/N 441650-1

Průtok: MF: 41 ml/min

Nástřik: 125  $\mu$ l

Přepočít: 500 mg/ 1000  $\mu$ l = 0,5

$$24/0,5 = 48 \text{ } \mu\text{l}$$

Podmínky

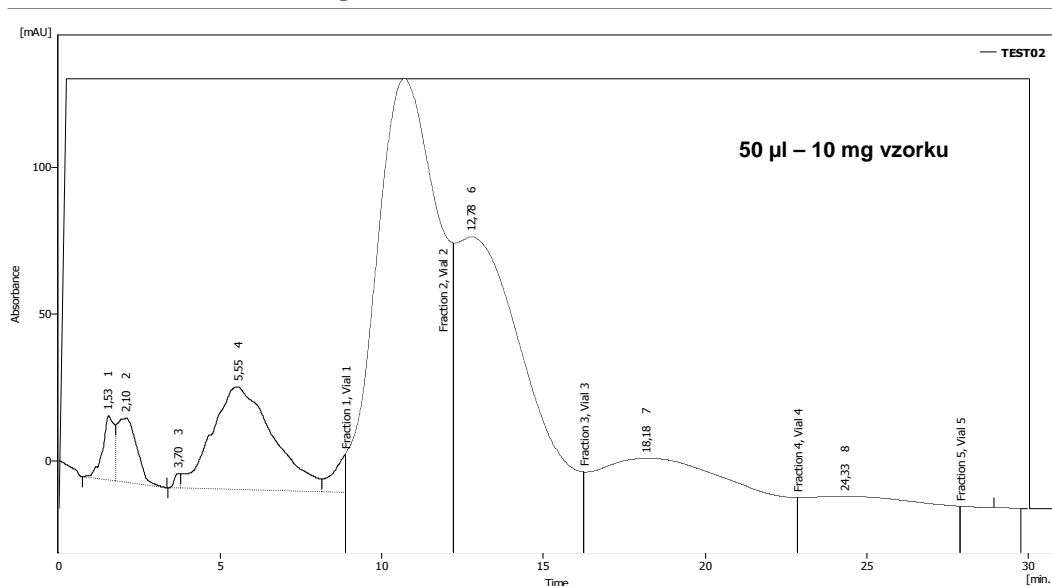
UV 210 nm

### Preparativní kolona

Synergi Hydro-RP 80A, 4 $\mu$ m, 250 x 21 mm, S/N 441650-1

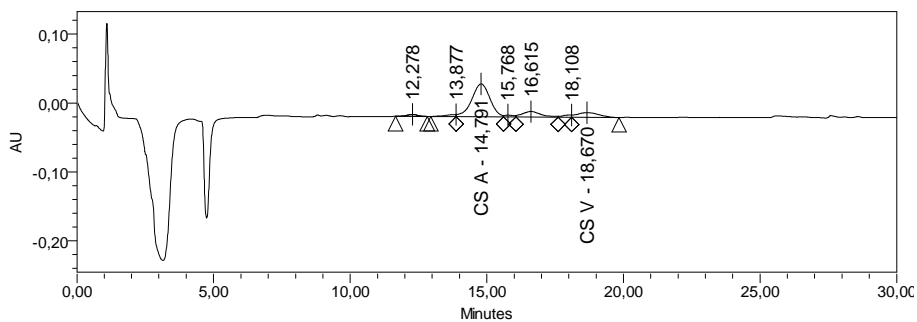
Průtok: MF: 41 ml/min

**Obr. 45.** Preparativní HPLC – MF: 6% TBME / 50% MeCN

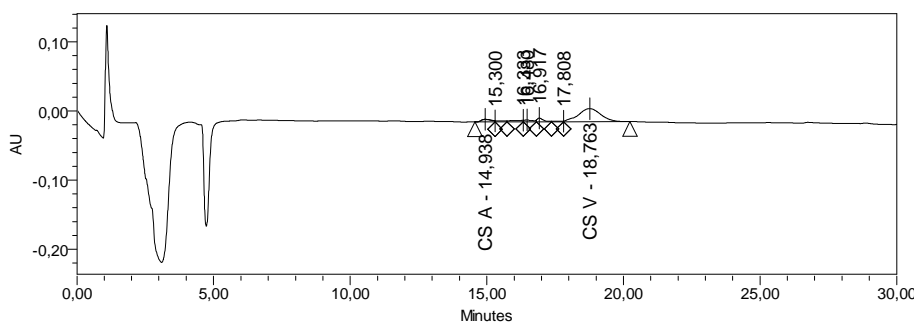


Byly sesbírány jednotlivé frakce následovně pík1 frakce 1 - 7 a pík 2 frakce 1 - 5 a zanalyzovány.

**Obr. 46. Chromatogram frakcí 1.pík/1-7**

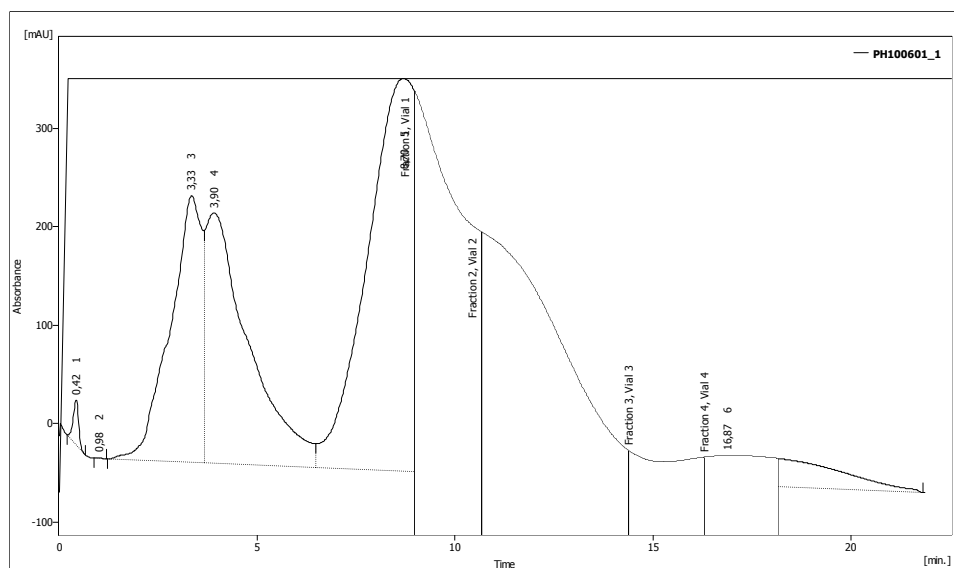


**Obr. 47. Chromatogram frakcí 2.pík/ 1-5**



Další izolace byly provedeny se 400 mg vzorkem rozpuštěným v 1 ml MeOH a nástřik byl 250  $\mu$ l, což je 100 mg na kolonu.

**Obr. 48 Chromatogram preparativní chromatografie**

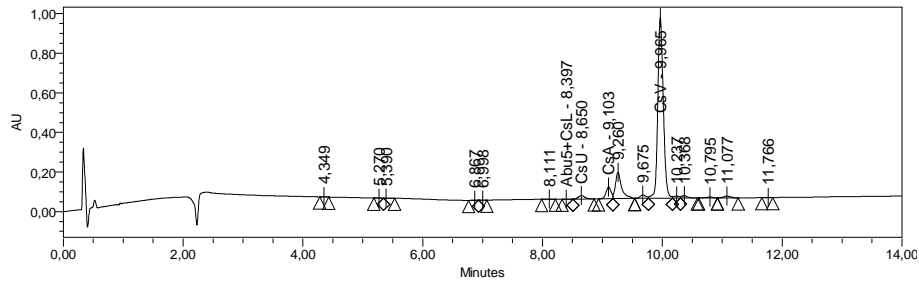


Frakce byly odebírány tři. 1. jako recykl 1, 2. jako hlavní frakce a 3. jako recykl 2.

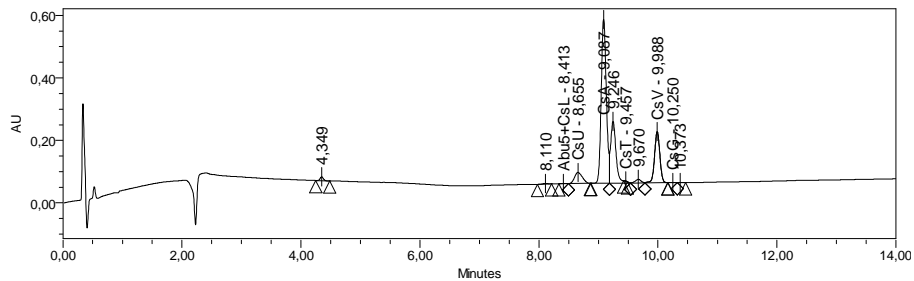
Tyto izolace byly provedeny čtyři. Podle příslušnosti byly spojeny a zahuštěny na vakuové odparce. Zahuštěním jsme se zbavili acetonitrilu, díky jeho nižšímu bodu varu.

Vodný zbytek se vzorkem byl 3 x protřepán dichlorometanem a po oddělení vodné fáze odpařen na odparek. Ty byly dále zanalyzovány s následujícími výsledky:

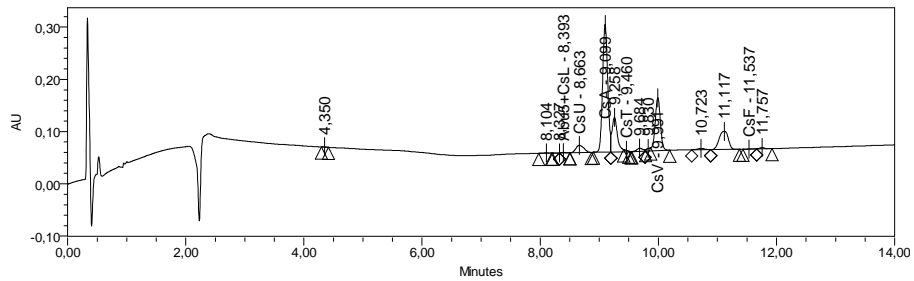
**Obr. 49. Chromatogram hlavní frakce**



**Obr. 50. Chromatogram recyklu 1**

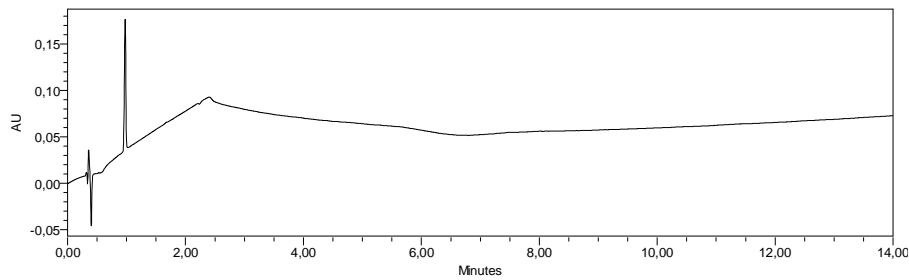


**Obr. 51. Chromatogram recyklu 2**



Pro kontrolu správného postupu při třepání byla zanalyzována také vodná fáze

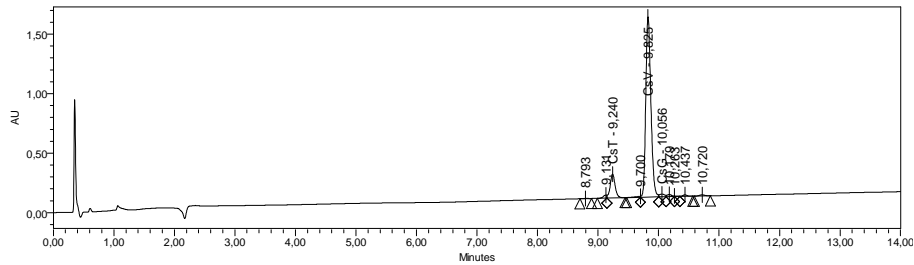
**Obr. 52. Chromatogram vodné fáze po hlavní frakci**



Analýza vodné fáze potvrdila, že všechen materiál přešel do organické fáze.

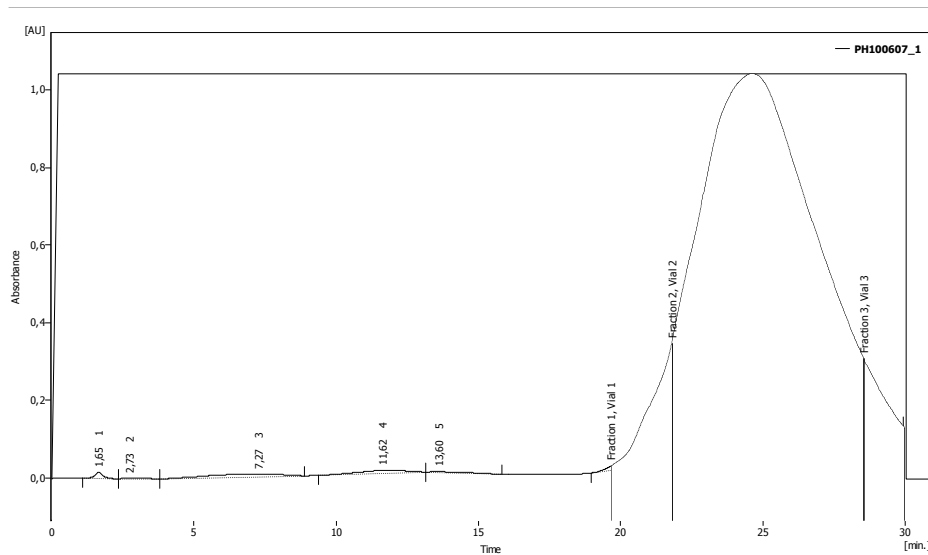
Všechny izolace byly provedeny několikrát, čímž bylo získáno 850 mg odparku, který byl znovu odizolován za stejných podmínek separace. HPLC čistoty byla 84,26 plošných %.

**Obr. 53.** Chromatogram odparku



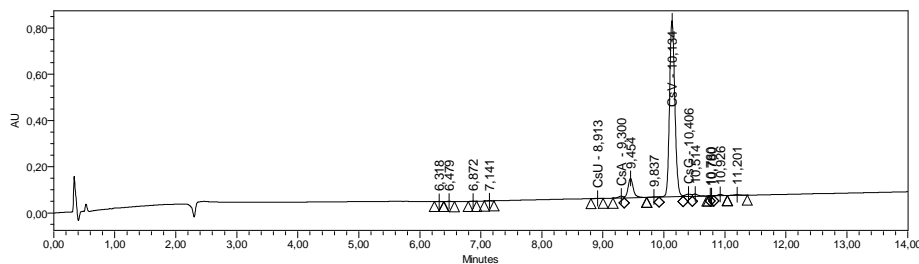
Navážilo se asi 200 mg vzorku /500  $\mu$ l MeOH a nastříklo se na kolonu 100 mg.

**Obr. 54.** Chromatogram prep. chromatografie odparku



První a poslední části jsou odebírány jako odpad. Hlavní frakce byla 3 x protřepána s dichlorometanem a po oddělení vodné fáze odpařena dosucha na odparek. I těchto preparací bylo provedeno několik, čímž jsme získali 990 mg látky, která byla analyzována HPLC metodou a následně byla na ní provedena úplná charakterizace.

**Obr. 55.** Chromatogram finálního standardu





## 8 CHARAKTERIZACE A POTVRZENÍ TOTOŽNOSTI

Charakterizace standardu cyclosporinu V byla provedena A. Jegorovem a potvrdila nám, že se skutečně jedná o cyclosporine V.

### 8.1.1 Infračervená spektrometrie

**Přístroj:** FTIR spektrometr NICOLET 740 s datastanicí DSP 680

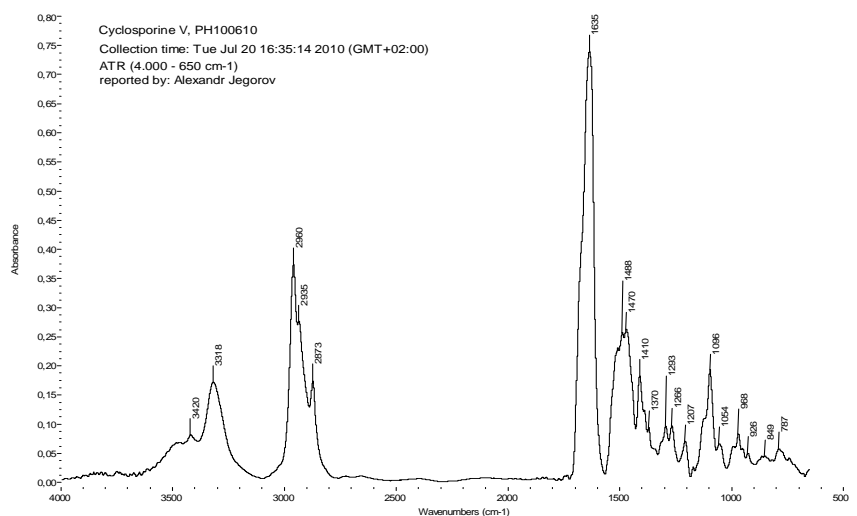
**Použitá metoda:** ATR (4.000 - 650  $\text{cm}^{-1}$ )

Popis spektra: Cyclosporin V, vykazuje dominantní vibraci  $\nu(\text{C}=\text{O})$  při  $1635 \text{ cm}^{-1}$ , která je tvořena překryvem valenčních vibrací  $\nu(\text{C}=\text{O})$  všech přítomných amidických skupin. Rovněž valenční vibrace  $\nu(\text{C}-\text{H})$ ,  $\nu(\text{N}-\text{H})$ , a  $\nu(\text{O}-\text{H})$  jsou typické pro skupinu cyclosporinů. Ostatní části spektra mohou být použity jako “otisk prstů” bez podrobnější interpretace.

*Tab. 3. IR vibrace*

Vibrace	Vlnová délka [ $\text{cm}^{-1}$ ]
$\nu(\text{O}-\text{H}), \nu(\text{N}-\text{H})$	3420, 3318
$\nu(\text{C}-\text{H})$	2960, 2935, 2873
$\nu(\text{C}=\text{O})$	1635
$\delta(\text{C}-\text{H})$	1488, 1470

*Obr. 56. Infračervené spektrum standardu*



### 8.1.2 Hmotnostní spektrometrie

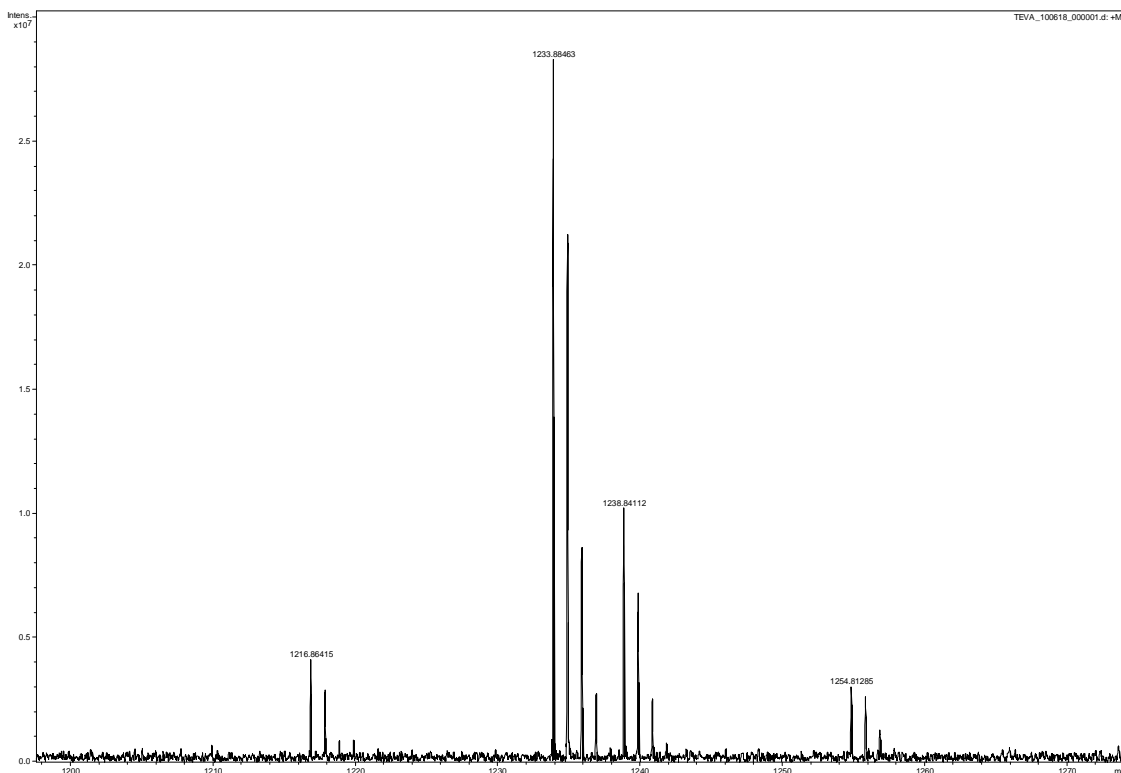
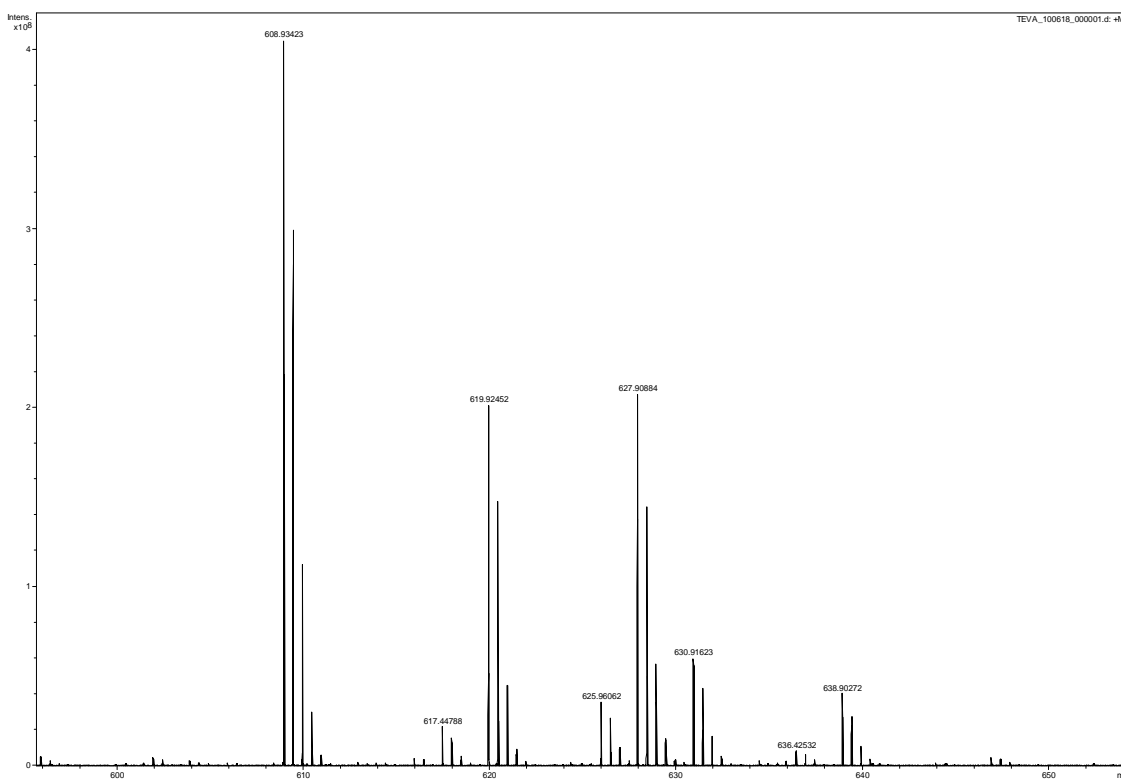
Hmotnostní spektrometrie

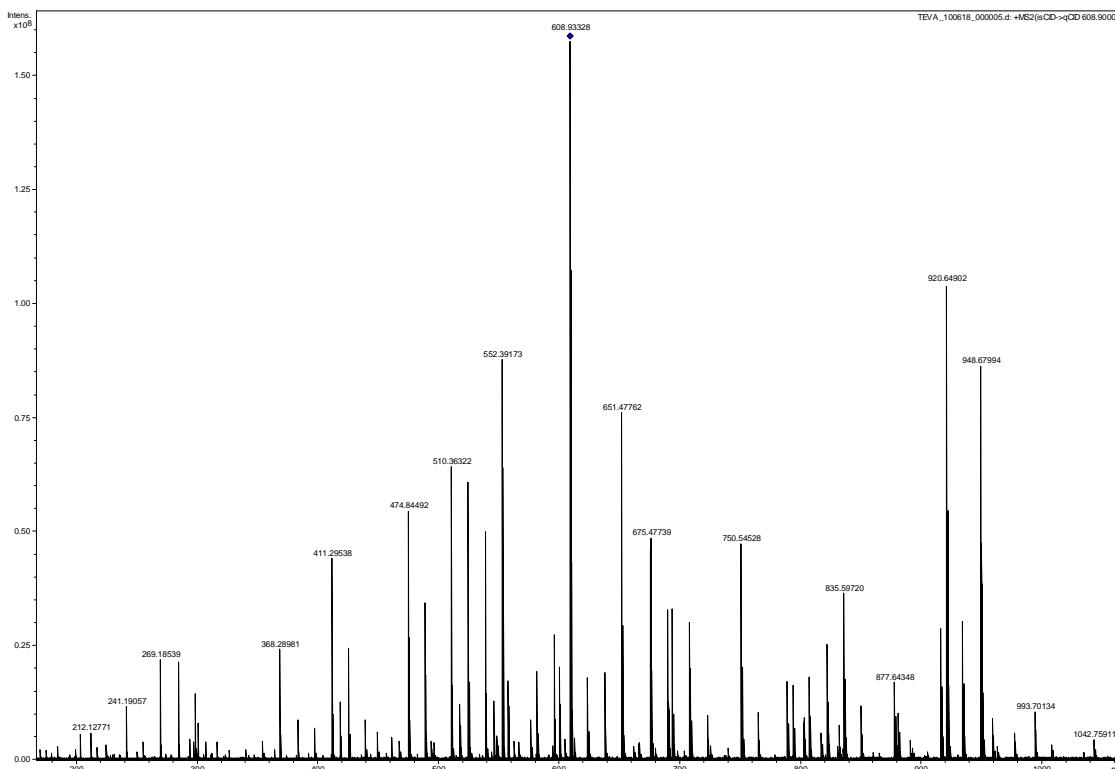
Přístroj: Bruker APEX-Q (9.4T)

Použitá metoda: ionizace v elektrospreji (ESI), měření pozitivních iontů

Interpretace spektra

Pozitivní ESI spektrum poskytlo ion protonizované molekuly při  $m/z$  1216.86415 (1216.86429 je vypočtená hmotnost pro složení  $C_{63}H_{114}N_{11}O_{12}$ ). Správné přiřazení iontu  $[M+H]^+$  potvrzuje i přítomnost iontů  $[M+Na]^+$   $m/z$  1233.88463 a  $[M+K]^+$   $m/z$  1254.81285, obrázek 57. Přítomnost sodíku a draslíku je vidět i při středních hmotách, kde jsou přítomny dvojnásob nabitě ionty, obrázek 58. Sekvence cyklopeptidu byla změřena s použitím iontu  $[M+2H]^{2+}$   $m/z$  608.93423 (608.93579 vypočteno pro složení  $C_{63}H_{115}N_{11}O_{12}$ ). Obrázek 59 dokumentuje, že cyklosporin má Abu v pozici 7. Hlavními  $b_i$ -fragmentovými ionty v kolizním spektru  $[M+2H]^{2+}$   $m/z$  608.93423 jsou:  $[m/z$  (přiřazení)]: 948.4 ( $b_9^{3-2}$ ), 835.6 ( $b_8^{3-2}$ ), 708.5 ( $b_7^{3-2}$ ), 651.5 ( $b_6^{6-5}$ ), 581.4 ( $b_6^{3-2}$ ), 538.2 ( $b_5^{6-5}$ ), 425.3 ( $b_4^{3-2}$ ), 411.3 ( $b_4^{6-5}$ ). Použitá nomenklatura fragmentových iontů a sekvenační metoda jsou podrobně popsány v práci [55].

*Obr. 57. ESI hmotnostní spektrum cyklosporinu [Abu7]– oblast vyšších hmot**Obr. 58. ESI hmotnostní spektrum cyklosporinu [Abu7]– oblast dvojnásob nabitých iontů*

Obr. 59. Fragmenty  $[M+2H]^{2+}$  iontu

### 8.1.3 Nukleární magnetická rezonance

#### NMR spektroskopie

Přístroj: Bruker Avance III 600 MHz (600.23 MHz pro  $^1\text{H}$ , 150.94 MHz pro  $^{13}\text{C}$ , 60.82 MHz pro  $^{15}\text{N}$ ,  $\text{CDCl}_3$ , 30°C)

Použité experimenty:  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ , gCOSY,  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  gHSQC,  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  gHSQC,  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  gHMBC,  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  gHMBC, 1D-TOCSY, ROESY.

#### Popis spektra

63 signálů nalezených v  $^{13}\text{C}$  NMR spektru (dva v překryvu) poskytlo uvedenou distribuci: 11 C=O, 20 CH, 8 CH<sub>2</sub> a 24 CH<sub>3</sub>. Dále bylo nalezeno 108 vodíků navázaných na uhlíky a čtyři amidické NH.  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  gHMBC spektrum poskytlo 11 dusíků, z toho čtyři NH (poskytující korelace v  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  gHSQC). Počet karbonylů (11) dusíků (11), N-Methylů (7) a NH (4) identifikuje látku jako undekapeptid. Pomocí COSY selektivních 1D TOCSY experimentů byly identifikovány následující aminokyseliny: 4x MeLeu, Val, Ala, MeVal, Sar, two Abu, a MeBmt.

Jejich pořadí v sekvenci bylo určeno pomocí HMBC kontaktů mezi CO, H- $\alpha$ , a NH. Přiřazení bylo potvrzeno pomocí  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  gHMBC a ROESY spekter.  $^{13}\text{C}$  spektrum je shodné s daty publikovanými v literatuře [51].

**Tab. 4**  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ , and  $^{15}\text{N}$  NMR data pro cyclosporin V

(600.23 MHz pro  $^1\text{H}$ , 150.94 MHz pro  $^{13}\text{C}$ , 60.82 MHz pro  $^{15}\text{N}$ ,  $\text{CDCl}_3$ , 30°C)

Atom	$\delta_{\text{C}}$	m	$\delta_{\text{N}}$	$\delta_{\text{H}}$	n H	m.	J[Hz]	select. HMBC (C to H)	HMBC (N to H)
1N	-	-	116.5	-	0				1 $\alpha$ , 1-Me
1-NMe	34.56	Q	-	3.531	3	s			
1-CO	170.61	S	-	-	0			1 $\alpha$ , 2 $\alpha$ , 2-NH	
1 $\alpha$	58.82	D	-	5.602	1	d	5.8		
1 $\beta$	75.27	D	-	3.738	1	dd	7.6, 5.8		
1 $\gamma$	36.33	D	-	1.58 <sup>a</sup>	1	m			
1 $\gamma$ -Me	16.83	Q	-	0.671	3	d	6.5		
1 $\delta$	35.89	T	-	2.441	2	m			
1 $\epsilon$	129.64	D	-	5.31 <sup>a</sup>	1	m			
1 $\eta$	126.20	D	-	5.36 <sup>a</sup>	1	m			
1 $\omega$	17.95	Q	-	1.619	3	m			
2-NH	-	-	119.3	7.786	1	d	9.9		2 $\alpha$
2-CO	174.01	S	-	-	0			2 $\alpha$ , 2 $\beta$ -u, 3 $\alpha$ , 2-NH, 3-Me	
2 $\alpha$	48.85	D	-	5.037	1	ddd	9.9, $\Sigma J=14.7$		
2 $\beta$	25.05	T	-	1.708	1	ddd	13.5, $\Sigma J=15.0$		
				1.567	1	ddd	13.5, $\Sigma J=14.2$		
2 $\gamma$	10.21	Q	-	0.852	3	dd	$\Sigma J=14.6$		
3N	-	-	112.6	-	0				3 $\alpha$ -u, 3 $\alpha$ -d, 3-Me
3-NMe	39.53	Q	-	3.384	3	s			
3-CO	171.36	S	-	-	0			3 $\alpha$ , 4 $\alpha$ , 4-Me	
3 $\alpha$	50.40	T	-	4.734	1	d	14.0		
				3.202	1	d	14.0		

<b>4N</b>	-	-	115.6	-	0				4 $\alpha$ , 4 $\beta$ -d, 4-Me
<b>4-NMe</b>	31.32	Q	-	3.105	3	s			
<b>4-CO</b>	169.96	S	-	-	0			4 $\alpha$ , 4 $\beta$ -u, 4 $\beta$ -d, 5 $\alpha$ , 5-NH	
<b>4<math>\alpha</math></b>	55.50 <sup>b</sup>	D	-	5.321	1	dd	11.7, 3.9		
<b>4<math>\beta</math></b>	35.89	T	-	1.997	1	ddd	14.7, 10.6, 3.9		
				1.616	1	ddd	14.7, 11.7, 3.8		
<b>4<math>\gamma</math></b>	24.82	D	-	1.417	1	m			
<b>4<math>\delta_u</math></b>	20.99	Q	-	0.864	3	d	6.6		
<b>4<math>\delta_d</math></b>	23.42	Q	-	0.937	3	d	6.7		
<b>5-NH</b>	-	-	118.7	7.530	1	d	8.1		5 $\alpha$ , 5 $\beta$
<b>5-CO</b>	173.89	S	-	-	0			5 $\alpha$ , 5 $\beta$ -w, 6 $\alpha$ , 6-Me	
<b>5<math>\alpha</math></b>	55.63	D	-	4.606	1	dd	10.3, 8.1		
<b>5<math>\beta</math></b>	30.92	D	-	2.400	1	m			
<b>5<math>\gamma_u</math></b>	18.55	Q	-	0.887	3	d	7.0		
<b>5<math>\gamma_d</math></b>	19.96	Q	-	1.070	3	d	8.6		
<b>6N</b>	-	-	119.9	-	0				
<b>6-NMe</b>	31.68	Q	-	3.296	3	s			6 $\alpha$ , 6 $\beta$ -d, 6-Me
<b>6-CO</b>	172.53	S	-	-	0			6 $\alpha$ , 6 $\beta$ -u, 7 $\alpha$ , 7-NH	
<b>6<math>\alpha</math></b>	55.53 <sup>b</sup>	D	-	4.958	1	dd	9.7, 6.2		
<b>6<math>\beta</math></b>	37.93	T	-	2.058	1	ddd	13.4, 9.7, 4.8		
				1.445	1	ddd	13.4, 9.0, 6.2		
<b>6<math>\gamma</math></b>	25.61	D	-	1.74 <sup>a</sup>	1	m			
<b>6<math>\delta_u</math></b>	22.02	Q	-	0.864	3	d	6.6		
<b>6<math>\delta_d</math></b>	23.77	Q	-	0.939	3	d	6.6		
<b>7-NH</b>	-	-	122.1	7.470	1	d	7.7		7 $\alpha$ , 7 $\beta$ -d
<b>7-CO</b>	170.86	S	-	-	0			7 $\alpha$ , 7 $\beta$ -u, 7 $\beta$ -d, 8 $\alpha$ , 8-NH	
<b>7<math>\alpha</math></b>	54.96	D	-	4.340	1	ddd	11.6, 7.7, 3.8		

<b>7<math>\beta</math></b>	23.10	T	-	2.08 <sup>a</sup>	1	ddd	14.1, 7.5, 3.8		
				1.695	1	ddd	14.1, 11.6, 7.2		
<b>7<math>\gamma</math></b>	10.80	Q	-	0.863	3	dd	7.5, 7.2		
<b>8-NH</b>	-	-	118.0	7.096	1	d	7.8		8 $\alpha$ -w
<b>8-CO</b>	173.32	S	-	-	0			8 $\alpha$ , 8 $\beta$ , 9 $\alpha$ , 8-NH	
<b>8<math>\alpha</math></b>	45.21	D	-	4.809	1	dq	7.8, 6.7		
<b>8<math>\beta</math></b>	18.31	Q	-	1.247	3	d	6.7		
<b>9N</b>	-	-	111.2	-	0				9 $\alpha$ , 9 $\beta$ -d, 9-Me
<b>9-NMe</b>	29.52	Q	-	3.075	3	s			
<b>9-CO</b>	170.17	S	-	-	0			9 $\alpha$ ,9 $\beta$ -u,9 $\beta$ -d,10 $\alpha$ ,10-Me	
<b>9<math>\alpha</math></b>	48.24	D	-	5.698	1	dd	10.9, 4.5		
<b>9<math>\beta</math></b>	38.84	T	-	2.104	1	dm	10.9		
				1.258	1	dm	4.5		
<b>9<math>\gamma</math></b>	24.60	D	-	1.323	1	m			
<b>9<math>\delta_u</math></b>	21.78	Q	-	0.879	3	d	6.4		
<b>9<math>\delta_d</math></b>	24.04	Q	-	0.955	3	d	6.2		
<b>10N</b>	-	-	116.6	-	0				10 $\alpha$ ,10 $\beta$ -d,10-Me
<b>10-NMe</b>	29.73	Q	-	2.688	3	s			
<b>10-CO</b>	169.90	S	-	-	0			10 $\alpha$ ,10 $\beta$ -u,10 $\beta$ -d,11 $\alpha$ ,11-Me	
<b>10<math>\alpha</math></b>	57.57	D	-	5.067	1	dd	8.3, 5.8		
<b>10<math>\beta</math></b>	40.85	T	-	2.134	1	ddd	13.9, 8.3, 5.6		
				1.185	1	ddd	13.9, 7.1, 5.8		
<b>10<math>\gamma</math></b>	24.56	D	-	1.490	1	m			
<b>10<math>\delta_u</math></b>	23.64	Q	-	1.015	3	d	6.7		
<b>10<math>\delta_d</math></b>	23.22	Q	-	1.009	3	d	6.6		
<b>11N</b>	-	-	118.0	-	0				11 $\alpha$ , 11-Me
<b>11-NMe</b>	29.59	Q	-	2.698	3	s			

<b>11-CO</b>	173.51	S	-	-	0			11 $\alpha$ , 11 $\beta$ -w, 1 $\alpha$ , 1-Me	
<b>11<math>\alpha</math></b>	57.73	D	-	5.126	1	d	11.0		
<b>11<math>\beta</math></b>	29.04	D	-	2.07 <sup>a</sup>	1	m			
<b>11<math>\gamma_u</math></b>	20.29	Q	-	0.834	3	d	6.4		
<b>11<math>\gamma_d</math></b>	18.69	Q	-	1.009	3	d	6.6		

<sup>a</sup> HSQC

<sup>b</sup> mohou být přehozeny,

u k vyššímu poli, d k nižšímu poli,

w slabý signál

**Tab. 5.** Srovnání <sup>13</sup>C NMR dat pro cyclosporin V s daty publikovanými v literatuře [56].

Atom	$\delta_c$	$\delta_c^a$	rozdíl
<b>1-NMe</b>	34.56	34.57	0.01
<b>1<math>\alpha</math></b>	58.82	58.84	0.02
<b>1<math>\beta</math></b>	75.27	75.27	0.00
<b>1<math>\gamma</math></b>	36.33	36.33	0.00
<b>1<math>\gamma</math>-Me</b>	16.83	16.85	0.02
<b>1<math>\delta</math></b>	35.89	35.91	0.02
<b>1<math>\epsilon</math></b>	129.64	129.67	0.03
<b>1<math>\eta</math></b>	126.20	126.21	0.01
<b>1<math>\omega</math></b>	17.95	17.97	0.02
<b>2<math>\alpha</math></b>	48.85	48.87	0.02

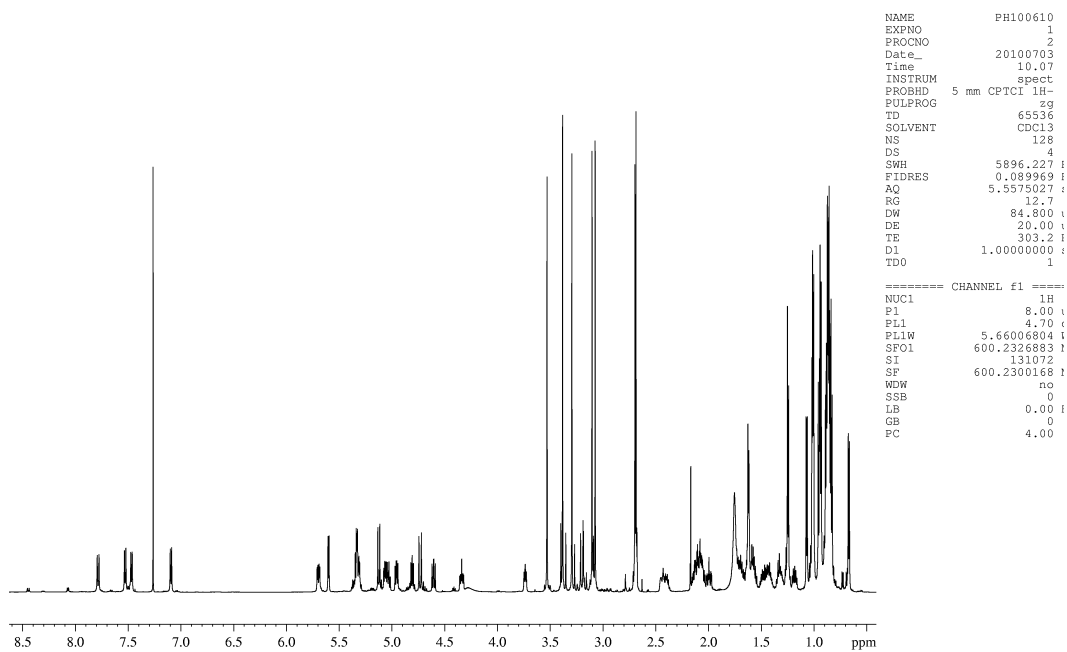


<b>2<math>\beta</math></b>	25.05	25.07	0.02
<b>2<math>\gamma</math></b>	10.21	10.23	0.02
<b>3-NMe</b>	39.53	39.54	0.02
<b>3<math>\alpha</math></b>	50.40	50.42	0.02
<b>4-NMe</b>	31.32	31.34	0.02
<b>4<math>\alpha</math></b>	55.50	55.53	0.03
<b>4<math>\beta</math></b>	35.89	35.91	0.02
<b>4<math>\gamma</math></b>	24.82	24.83	0.01
<b>4<math>\delta_u</math></b>	20.99	21.02	0.03
<b>4<math>\delta_d</math></b>	23.42	23.44	0.02
<b>5<math>\alpha</math></b>	55.63	55.65	0.02
<b>5<math>\beta</math></b>	30.92	30.93	0.01
<b>5<math>\gamma_u</math></b>	18.55	18.57	0.02
<b>5<math>\gamma_d</math></b>	19.96	19.98	0.02
<b>6-NMe</b>	31.68	31.69	0.01
<b>6<math>\alpha</math></b>	55.53	55.53	0.00
<b>6<math>\beta</math></b>	37.93	37.95	0.02
<b>6<math>\gamma</math></b>	25.61	25.63	0.02
<b>6<math>\delta_u</math></b>	22.02	22.04	0.02
<b>6<math>\delta_d</math></b>	23.77	23.79	0.02
<b>7<math>\alpha</math></b>	54.96	54.98	0.02
<b>7<math>\beta</math></b>	23.10	23.12	0.02
<b>7<math>\gamma</math></b>	10.80	10.82	0.02
<b>8<math>\alpha</math></b>	45.21	45.23	0.02
<b>8<math>\beta</math></b>	18.31	18.32	0.01
<b>9-NMe</b>	29.52	29.54	0.02

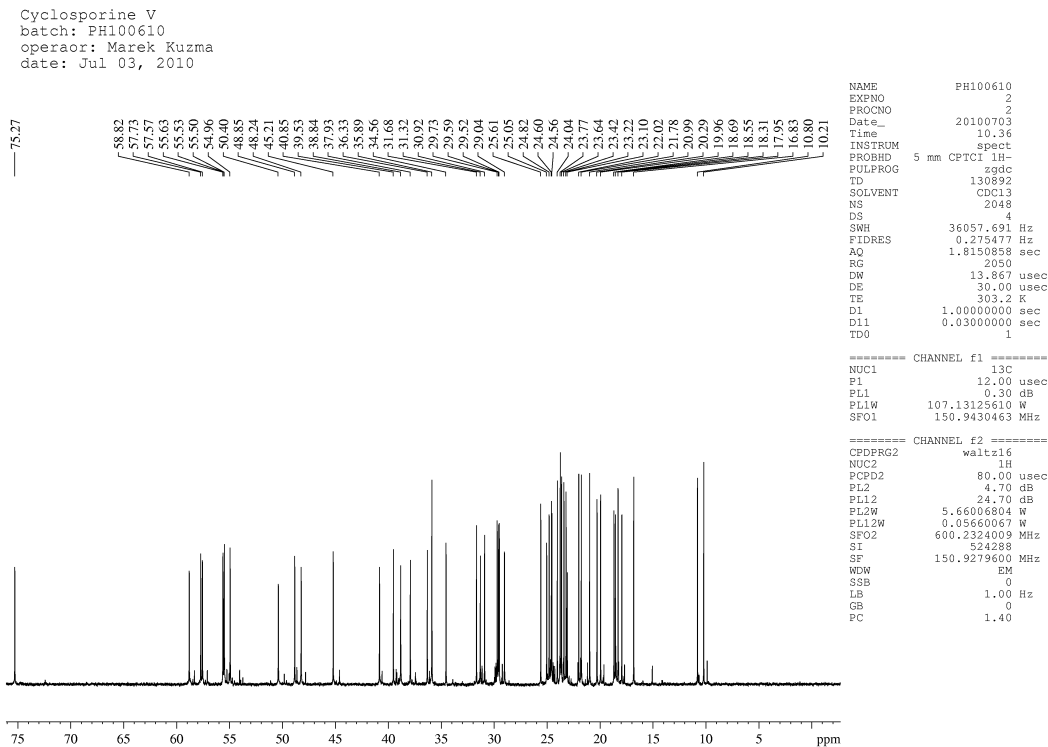
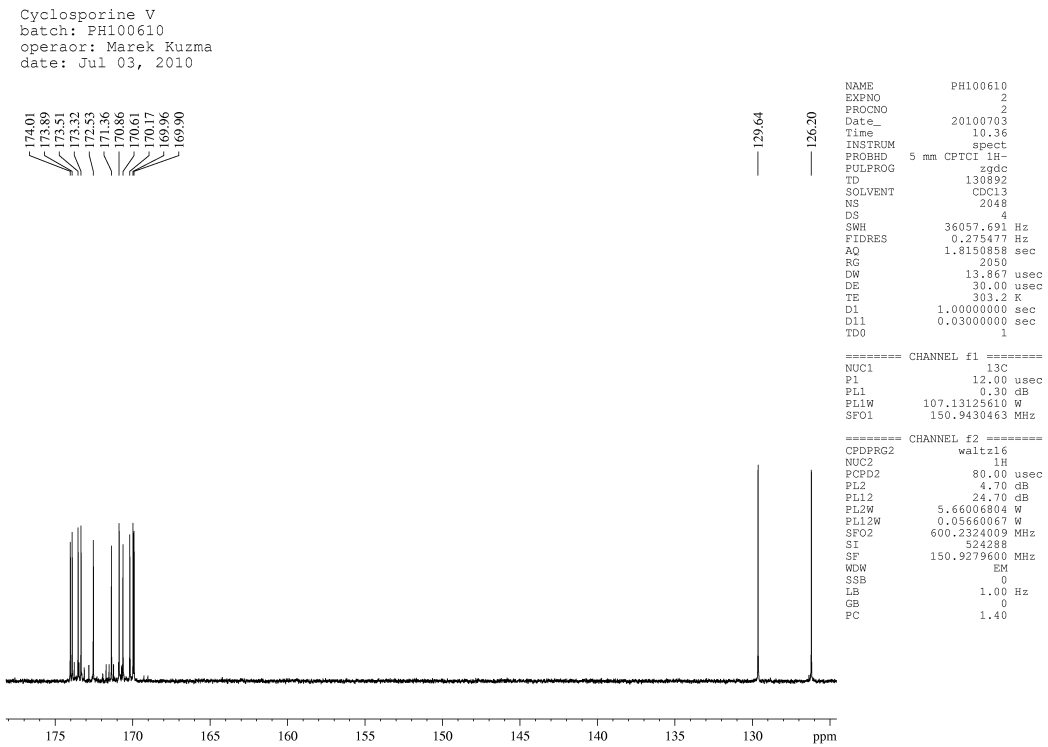
<b>9<math>\alpha</math></b>	48.24	48.26	0.02
<b>9<math>\beta</math></b>	38.84	38.87	0.03
<b>9<math>\gamma</math></b>	24.60	24.62	0.02
<b>9<math>\delta_u</math></b>	21.78	21.80	0.02
<b>9<math>\delta_d</math></b>	24.04	24.07	0.03
<b>10-NMe</b>	29.73	29.74	0.01
<b>10<math>\alpha</math></b>	57.57	57.59	0.02
<b>10<math>\beta</math></b>	40.85	40.87	0.02
<b>10<math>\gamma</math></b>	24.56	24.59	0.03
<b>10<math>\delta_u</math></b>	23.64	23.67	0.03
<b>10<math>\delta_d</math></b>	23.22	23.24	0.02
<b>11-NMe</b>	29.59	29.61	0.02
<b>11<math>\alpha</math></b>	57.73	57.75	0.02
<b>11<math>\beta</math></b>	29.04	29.05	0.01
<b>11<math>\gamma_u</math></b>	20.29	20.31	0.02
<b>11<math>\gamma_d</math></b>	18.69	18.71	0.02

Obr. 60.  $^1\text{H}$  NMR spektrum cyclosporinu V

Cyclosporine V  
batch: PH100610  
operator: Marek Kuzma  
date: Jul 03, 2010



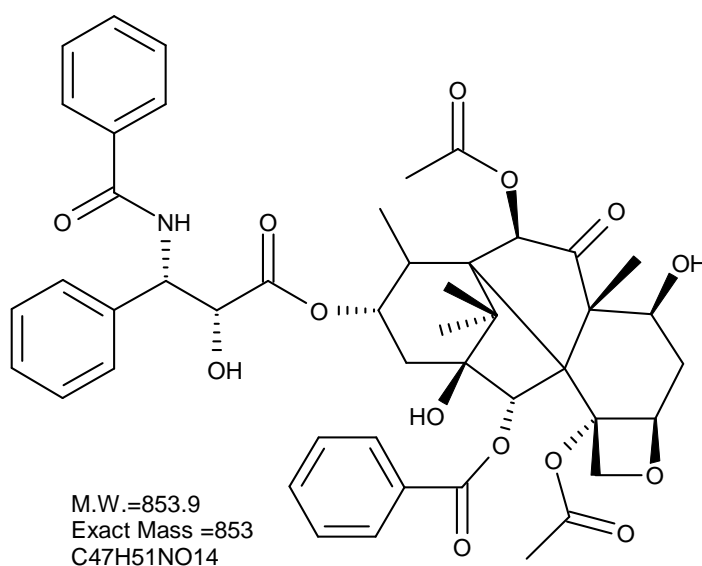
Obr. 61. <sup>13</sup>C NMR spektrum cyclosporinu V



## 9 FOTODEGRADANT PACLITAXELU

Fotodegradant paclitaxelu vzniká působením světelného záření na substanci paclitaxelu. Tato degradace je velmi pozvolná a pro dosažení signifikantního obsahu fotodegradantu v substanci je zapotřebí velmi dlouhá doba expozice slunečního záření. Vzhledem k tomu, že se jedná o specifikovanou nečistotu (specifikována v PhEur a USP), je nutné mít k dispozici standard této nečistoty.

Vzorec:



Sumární vzorec: C<sub>47</sub>H<sub>51</sub>NO<sub>14</sub>

M<sub>r</sub>= 853

### 9.1 Postup přípravy fotodegradantu paclitaxelu

Substance paclitaxelu byla stresována v prostředí ultrafialového záření. Substance byla rozvážena do křemenné kyvety v množství 4 g a označena jako vzorek 1 a do křemenné váženky v množství 10 g s označením vzorek 2. Oba vzorky byly vloženy do přístroje určeného pro provádění stresových testů substancí (Suntest)., Na substanci bylo působeno zářením 765 W/m<sup>2</sup> při teplotě 35°C (podložka na kterou byl vzorek umístěn byla chlazená vodou). Průběh degradace byl sledován pomocí HPLC analýzy.

## 9.2 Použité chemikálie a přístroje

### 9.2.1 Chemikálie

Acetonitril

Dichlorometan

Voda

### 9.2.2 Přístroje

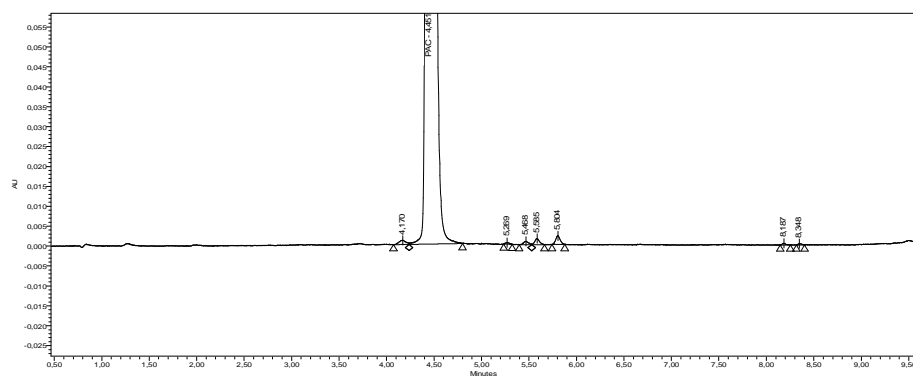
Suntest CPS+

HPLC systém Waters s PDA detektorem

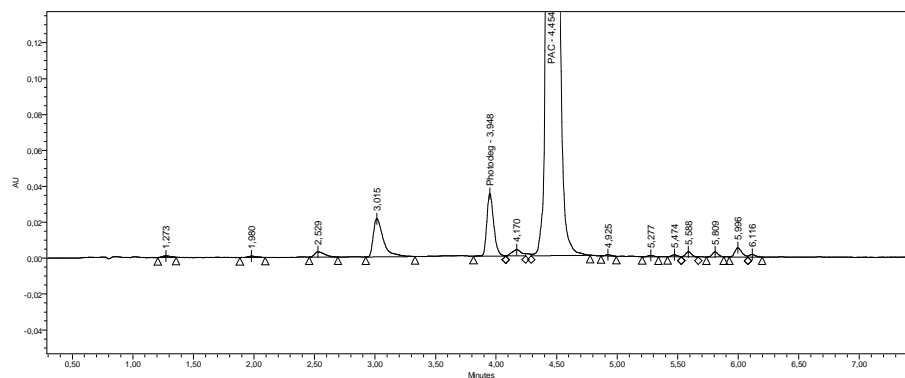
## 9.3 Sledování průběhu degradace

Stresování probíhalo po dobu asi 3 měsíců, přičemž celková doba expozice byla 5 týdnů. Stres neprobíhal kontinuálně, ale byly aplikovány jednotlivé časové cykly o délce 8 hodin. Vzorek pro analýzu byl odebírán mezi jednotlivými cykly po 1, 5, 10, 30 a 35 dnech. Pro sledování průběhu stresování substance paclitaxelu byla použita HPLC. Výsledky analýz jsou prezentovány na následujících obrázcích.

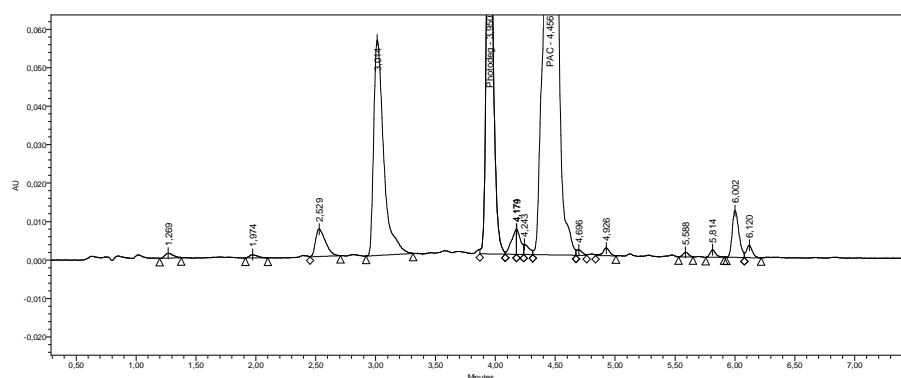
*Obr. 62. HPLC analýza substance paclitaxelu použité pro stresování (výchozí materiál)*



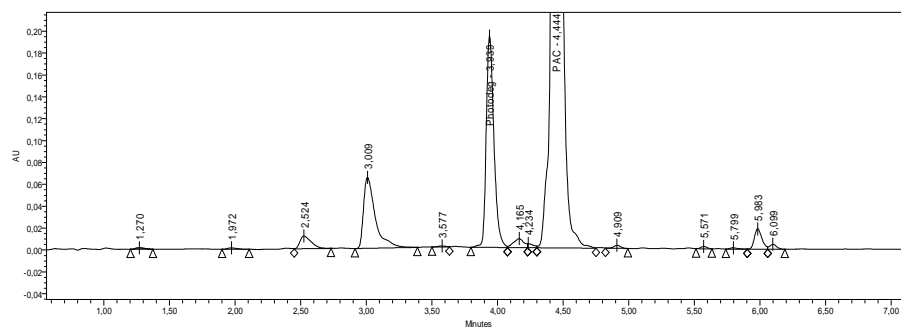
*Obr. 63. HPLC analýza vzorku 1 po 24 hodinách*



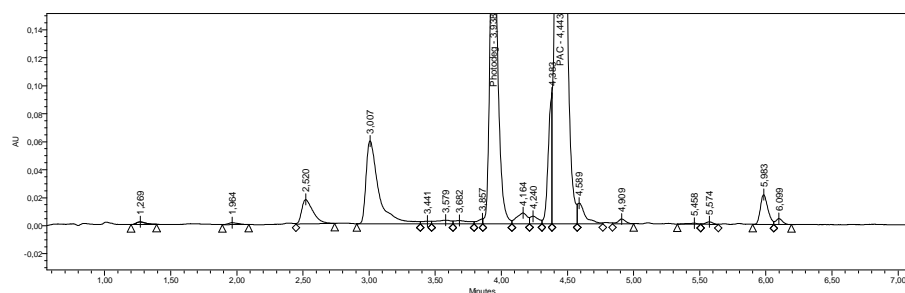
*Obr. 64. HPLC analýza vzorku 2 po 24 hodinách*



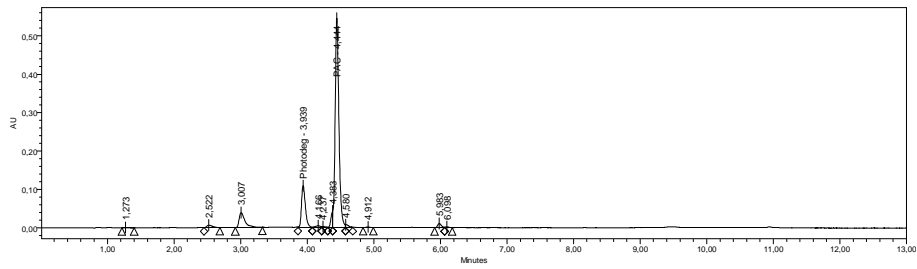
*Obr. 67. HPLC analýza vzorku 1 po 48 hodinách*



*Obr. 66. HPLC analýza vzorku 2 po 48 hodinách*

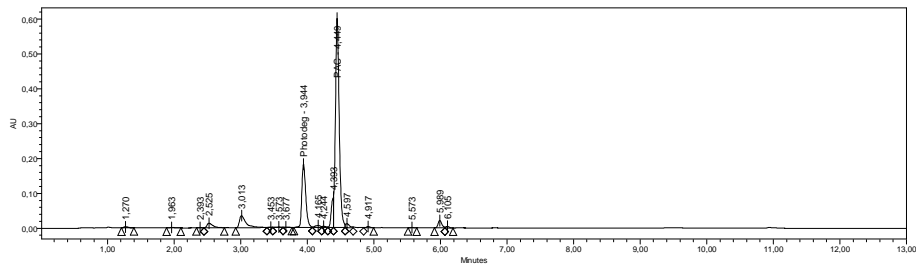


**Obr. 67.** HPLC analýza vzorku 1 po 72 hodinách

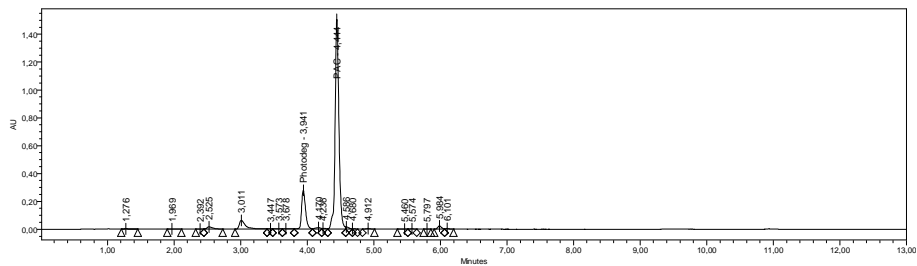


U vzorků došlo k rozdělení vrstev na světle a jasně žlutou a proto byly tyto části odděleně zanalyzovány. Bylo zjištěno, že vzorky nejsou homogenní.

**Obr. 68.** HPLC analýza vzorku 2\_horní vrstva

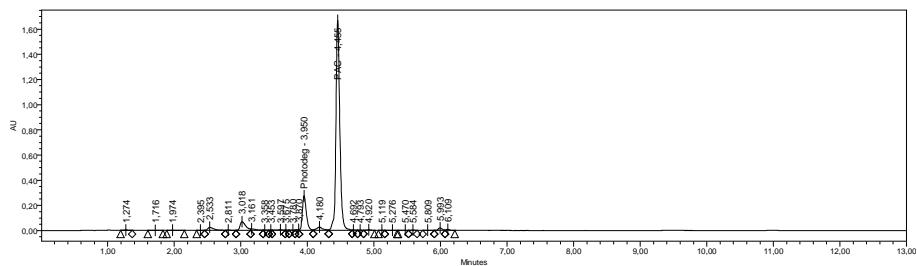


**Obr. 69.** HPLC analýza vzorku 2\_homogenizát



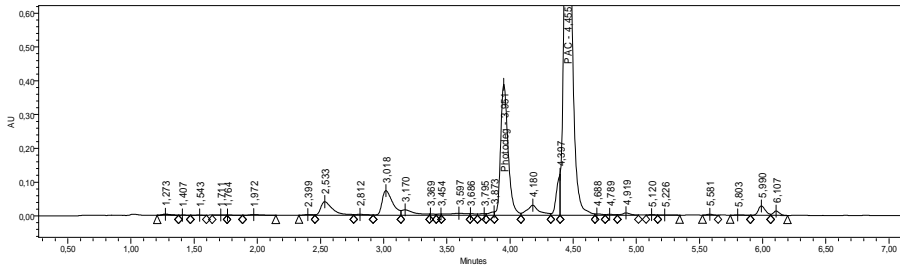
Oba vzorky byly spojeny přesypány na petriho misku a pokropeny dichlorometanem. Po jednodenním záření byl sledován nárůst fotodegradantu .

**Obr. 70.** Vzorek\_HPLC analýza po 24 hodinách

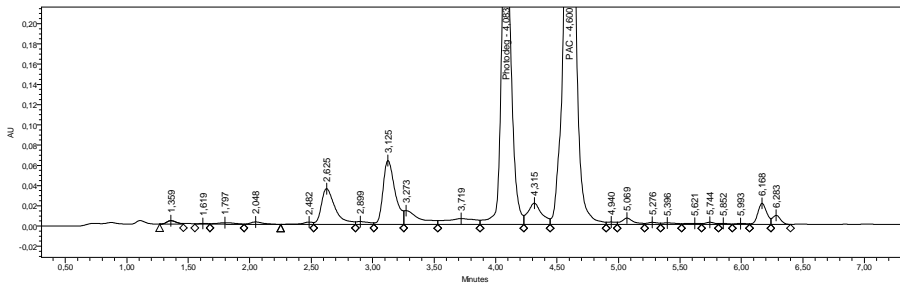




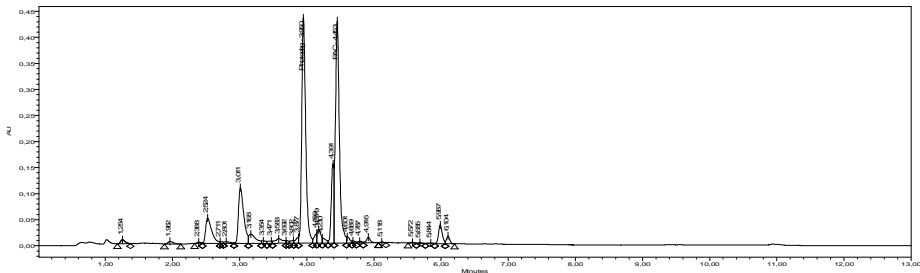
Obr. 71. Vzorek\_HPLC analýza po týdnu



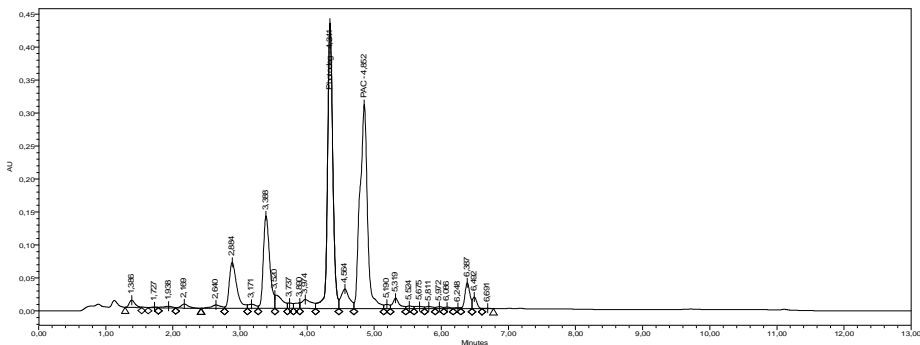
Obr. 72. Vzorek\_HPLC analýza po 10 dnech



Obr. 73. Vzorek\_HPLC analýza po 1 měsíci



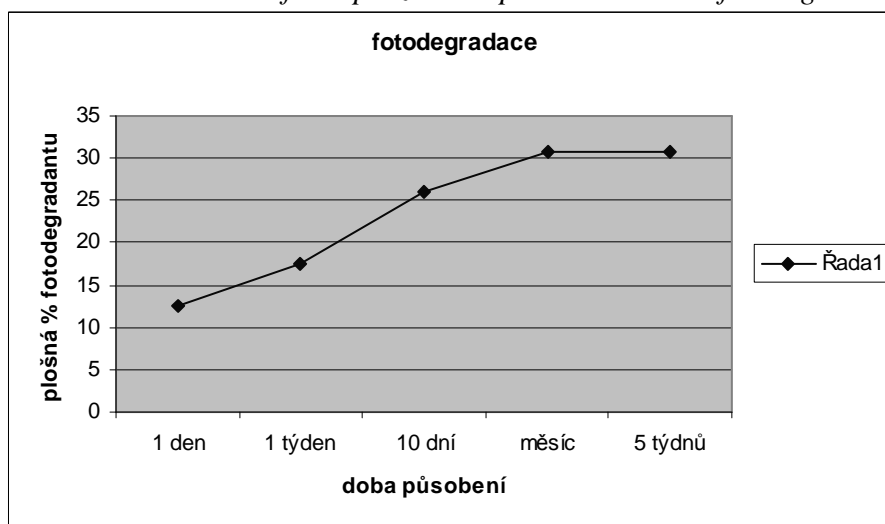
Obr. 74. Vzorek\_HPLC analýza po 5. týdnu



Tab. 6. Sumarizace výsledků obsahu fotodegradantu v závislosti na délce stresu

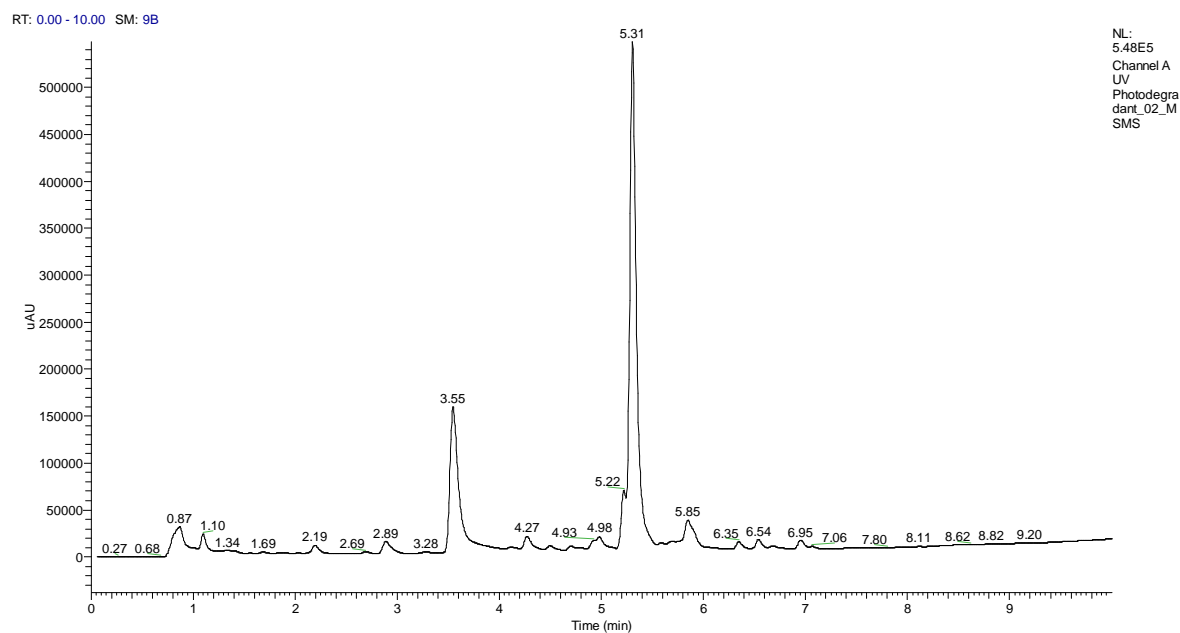
doba stresování	Obsah Area%
1 den	12,56
1 týden	17,56
10 dní	25,97
měsíc	30,64
5 týdnů	30,81

Obr. 75. Grafická prezentace průběhu nárůstu fotodegradantu v čase



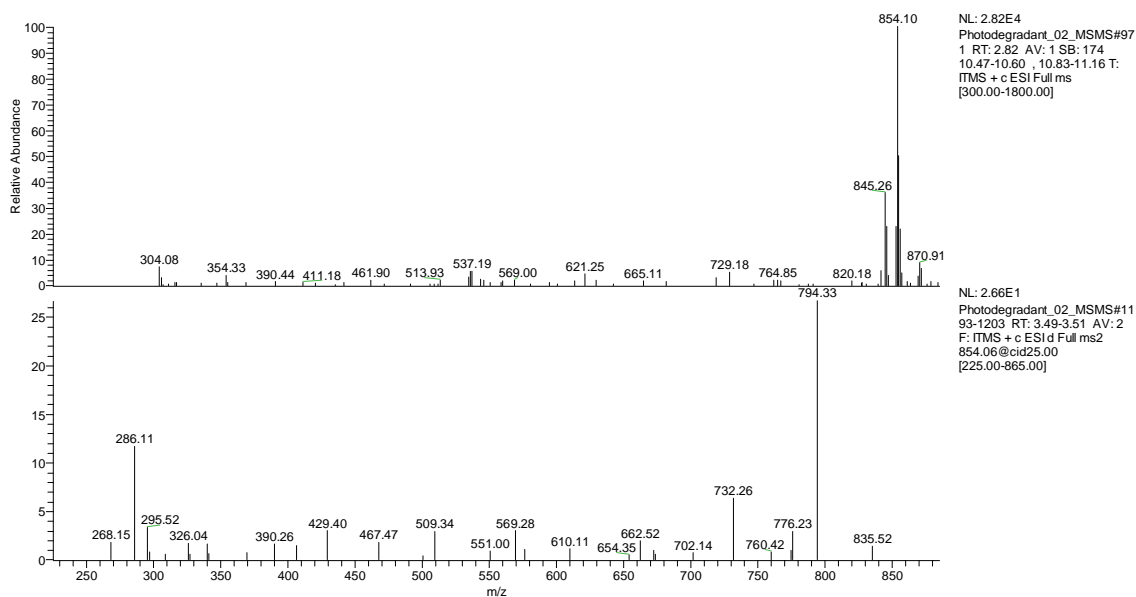
## 9.4 Potvrzení totožnosti fotodegradantu

Obr. 76. LC-MS analýza stresovaného paclitaxelu po 35 dnech



Pík fotodegradantu identifikován v RT 3.55 min

Obr. 77. MS a MS-MS spektrum píku RT 3.55 min



V MS spektru identifikován molekulový iont  $[M+H]^+$   $m/z$  854 a dále ionty  $[M+NH_4]^+$   $m/z$  871 a  $[M+H-HAc]^+$   $m/z$  794, které potvrzují molekulovou hmotnost látky MH 853. Fragmentaci molekulového iontu  $[M+H]^+$   $m/z$  854 získáváme celou řadu fragmentů. Důležitými diagnostickými fragmenty jsou  $m/z$  268 a  $m/z$  286, které odpovídají odštěpení bočního fenyl isoserinového řetězce. Dále fragmenty  $m/z$  509,  $m/z$  776 a  $m/z$  794 odpovídají fragmentům taxanové části molekuly. Fragmentace je v souladu s uvedenou strukturou fotodegradantu paclitaxelu.

## ZÁVĚR

Ve své diplomové práci jsem se zabývala problematikou využití standardních látek v prostředí farmaceutického průmyslu. V teoretické části jsem se snažila popsat jakým způsobem jsou standardní látky připravovány a klasifikovány a jakým způsobem jsou dále používány. Důraz byl kladen především na přípravu těchto standardů, při které jsou používány především chromatografické metody v čele s HPLC. I přes vysoký pokrok instrumentálních technik je stále hojně využívána metoda tenkovrstvé chromatografie, která pro svoji jednoduchost a rychlost je mocným nástrojem. V druhé části jsou popsány základní charakterizační metody, které jsou využívány pro identifikaci standardů, především určení jejich struktury.

V praktické části pak popisují přípravu třech standardů různých látek. Snažila jsem se přiblížit, jakým způsobem jsou tyto standardy získávány. V závislosti na složitosti problému může proces vývoje a vlastní izolace standardu trvat 2-3 týdny nebo naopak i více než půl roku.

V prvním oddílu praktické části jsem se zabývala přípravou standardu degradačního produktu mofetilu N-oxidu. Pomocí TLC metody byla navrhována metodika pro provádění preparativní chromatografie na silikagelu ve sloupcovém uspořádání. K jejímu použití ale nakonec nedošlo, protože oxidace mykofenolátu mofetilu kyselinou 3-chloperbenzoovou za proběhla bez vedlejších produktů. Mofetil N-oxid byl identifikován a totožnost byla prokázána oproti dříve připravenému a identifikovanému standardu mofetil N-oxidu hmotnostní spektrometrií a srovnáním retenčního času HPLC metodou.

V druhé části je popsána izolace Cyklosporinu V jakožto doprovodné látky vznikající při výrobě cyklosporinu fermentační cestou. Nejprve jsem provedla optimalizaci preparační HPLC metody na různých kolonách s různými mobilními fázemi. V průběhu optimalizace byl sledován vliv teploty a obsahu tert-butyl methyl éteru na separaci píků, což se ukázalo jako rozhodující. Pomocí následně aplikované preparativní chromatografie byla získána velmi čistá frakce obsahující cílovou látku, která byla následně úspěšně identifikována a charakterizována.

V poslední části jsem se zabývala přípravou degradačního produktu paclitaxelu označeného jako fotodegradant, který vzniká působením UV záření na substanci

paclitaxelu. Působením UV záření byl v průběhu 5 týdnů získán materiál obsahující přibližně 30% fotodegradantu. Tento byl následně úspěšně identifikován metodou LC-MS

**SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY**

- [1] ISO Guide 34. Reference materials – General requirements of the competence of reference materials producers. (2004)
- [2] ISO Guide 30. Reference Materials. Terms and definitions used in connection with reference materials (1992)
- [3] Emons. H. The „RM family“ – Identification of all of its members. *Accred. Qual. Assur.*, 10, p. 690–691 (2006)
- [4] Guide 35. Reference Materials – General and statistical principles for certification (2005)
- [5] ISO Guide 31. Reference Materials – Contents of certificates and labels (2003)
- [6] Mezinárodní slovník základních a všeobecných termínů v metrologii (ČSNI 1996)
- [7] CARASOVÁ, P.: *CHEMagazín č.2, XIX, 2009, str. 29*
- [8] Farlex Inc. *thefreedictionary.com* [online]. c 2011, [cit. 2011-04-04]. Dostupné z <<http://medical-dictionary.thefreedictionary.com/immunosuppressants>>
- [9] Healthline Network. *Healthline.com* [online]. c2005-2011, poslední revize 5.3.2011 [cit.2011-04-04].  
Dostupné z <<http://www.healthline.com/galecontent/immunosuppressant-drugs>>
- [10] Health blog. *Healthc.net* [online]. c2009, [cit.2011-04-04]. Dostupné z <<http://www.healthc.net/cytostatics-cytostatika>>
- [11] Cannon, Michael. *Reumatology.org* [online]. c2009, poslední revize 22.7.2010 [cit. 2011-04-04]. Dostupné z <<http://www.rheumatology.org/practice/clinical/patients/medications/mycophenolate.pdf>>
- [12] Thomson Healthcare Inc. *Mayoclinic.org* [online]. c1998, poslední revize 1.2.2011 [cit.2011-04-04]  
.Dostupné z<<http://www.mayoclinic.com/health/druginformation/DR601591>>

- [13] Global Shiksha. *Globalshiksha.com* [online]. c2010, [cit. 2011-04-04]. Dostupné z < <http://www.globalshiksha.com/The-primary-mechanism-of-action-of-cyclosporine/forum/73315> >
- [14] MAŤHA, V a kol.: Cyklosporin A, Grada Publishing, Praha, 1994, str.149, ISBN 80-7169-134-8
- [15] Clinaero Inc. *eMedTV.com* [online]. c2009, poslední revize 19.6.2007 [cit. 2011-04-04]. Dostupné z < <http://lung-cancer.emedtv.com/paclitaxel/what-is-paclitaxel-used-for.html> >
- [16] Paclitaxel.org [online]. c2009/2010, poslední revize 10.4.2011 [cit. 2011-04-15]. Dostupné z < <http://www.paclitaxel.org/> >
- [17] LULLMANN, H., MOHR, K., WEHLING, M.: Farmakologie a toxikologie, Grada, Praha, 2002, str.696, ISBN 80-7169-976-4
- [18] KAŠIČKA, V.: Recent advances in CE and CEC of peptides (2007-2009). *Electrophoresis* 31 (1): 122-146, 2010.
- [19] SCRIBA, G.K.E., PSUREK, A.: Separation of Peptides by Capillary Electrophoresis, *Capillary Electrophoresis Methods in Molecular Biology*, Vol. 384, I, Human Press, 2008, str. 483-506, ISBN 978-1-58829-539-2
- [20] WEIL, H., WILLIAMS, T.I., *Nature* 166, 1000 - 1001 (1950)
- [21] CVET, M.: *Proc. Warsaw Soc. Nat. Sci., Biol. Sec.* 14 (1903)
- [22] DAY, D. T. , *Proc. Amer. Phil. Soc.*, 36, 112 (1897)
- [23] Nobel Media. *Nobelprize.org* [online]. c2011, poslední revize 10.4.2011 [cit. 2011-04-15]. Dostupné z < [http://nobelprize.org/nobel\\_prizes/chemistry/laureates/1952/](http://nobelprize.org/nobel_prizes/chemistry/laureates/1952/) >
- [24] *ceskachromatografickaskola.cz* [online]. c1997, poslední revize 12.4.2011 [cit. 2011-04-15]. Dostupné z < <http://www.ceskachromatografickaskola.cz/teorie.html> >
- [25] KARLÍČEK, R.A KOL.: Analytická chemie pro farmaceuty, Karolinum, Praha, 2005, str.281, ISBN-80-246-0348-9
- [26] SCOTT, R.P.W.: Principles and practice of chromatography, Chrom-Ed Book Series, Libraryforscience, 2003, e-book

[27] Yip, Kevin. *rpi.edu*[online]. c1996, poslední revize 5.4.2011 [cit. 2011-04-15].  
Dostupné z

<[http://www.rpi.edu/dept/chem-eng/Biotech Environ/CHROMO/be\\_types.htm](http://www.rpi.edu/dept/chem-eng/Biotech Environ/CHROMO/be_types.htm)>

[28] PRYDE, A., GILBERT, M.T.: Applications of high performance liquid chromatography, Springer, London, 1979, str. 255, ISBN 0-412-142201

[29] Reach Device. *reachdevices.com* [online]. c2010, poslední revize 04.2011

[cit. 2011-04-16]. Dostupné z <<http://www.reachdevices.com/TLC.html> >

[30] University of Colorado. *orgchem.colorado.edu*. [online]. c2010, poslední revize 12.1.2011 [cit.2011-04-16].

Dostupné<<http://orgchem.colorado.edu/hndbksupport/TLC/TLC.html>>

[31] Raymond P.W. Scott. *chromatography-online.org*. [online]. c2000-2009,

[cit. 2011-04-16]. Dostupné z <<http://www.chromatography-online.org/TLC/Phase-Selection-in-TLC/Mobile-Phase.html>>

[32] University of Wisconsin. *chem.wisc.edu*. [online]. c2010,

[cit.2011-04-16]. Dostupné z

<<http://www.chem.wisc.edu/courses/342/Fall2004/TLC.pdf>>

[33] Buzzle.com [online]. c2000-2010, poslední revize 2011

[cit.2011-04-16]. Dostupné z

<<http://www.buzzle.com/articles/thin-layer-chromatography.html>>

[34] Jim Clark. *chemguide.co.uk*. [online]. c2009, poslední revize 07.2010

[cit. 2011-04-16]. Dostupné z

<<http://www.chemguide.co.uk/analysis/chromatography/hplc.html>>

[35] Iowa State University. *protein.iastate.edu*. [online]. c2008-2011, [cit. 2011-04-16].

Dostupné z <<http://www.protein.iastate.edu/hplc.html>>

[36] HubPages Inc. *Hubpages.com* [online]. c2011, poslední revize 24.2.2011, [cit. 2011-04-16]. Dostupné z <<http://hubpages.com/hub/HPLC-instrumentation>>



- [37] studyhplc.com [online]. c2010, [cit. 2011-04-16]. Dostupné z <<http://www.studyhplc.com/hplcinstrument.php>>
- [38] The University of Adelaide. *chemistry.adelaide.edu* [online]. c 2011, poslední revize 12.5.2011 [cit. 2011-05-12]. Dostupné z <<http://www.chemistry.adelaide.edu.au/external/soc-rel/content/lc-col.htm>>
- [39] Biochemie.sweb.cz [online]. c 2004, poslední revize 29.1.2004 [cit. 2011-04-16]. Dostupné z <<http://biochemie.sweb.cz/x/metody/chromatografie.htm#instrumentace>>
- [40] SHEENAN, D.: Physical Biochemistry, , Wiley , Chichester, 2009, str.387 , ISBN 978-0-470-85602-4
- [41] KOVÁTS, E., *Helvetica Chimica Acta* 41, (1958), 1915
- [42] Michal Douša. *Hplc.cz* [online]. c 1999-2011, poslední revize 24.1.2011 [cit. 2011-04-16]. Dostupné z <<http://www.hplc.cz/>>
- [43] HUBER,U., MAJORS, D.E.: *Principles in preparative, Volume 3*, Agilent Technologies Inc.2007, str. 1072
- [44] RATHORE, A.S., VELAYUDHAN, A.:Scale-up and Optimization in Preparative Chromatography, Marcel Dekker Inc., New York, 2003,str. 368, ISBN 0-8247-0826-1
- [45] HOSTETTMANN, M.,MARSTON, A.:Preparative chromatography techniques Application in natural product isolation, 2. vydání Sprinter-Verlag, Berlin,1998, str.244, ISBN 3-540-62459-7
- [46] UNGER, K.K., JILGE, G., JANZEN, R., H. GIESCHE, H., KINKEL, J.N., Non-porous Microparticulate Supports in HPLC of Biopolymers - Concepts, Realization and Prospects, *Chromatographia* 22, str.379-380 (1986)
- [47] GUIOCHON, G., KATTY, A, *Chromatographia* 24, str. 165, 1978
- [48] WEILLINGS, D.A.: A Practical Handbook of preparative chromatography, Elsevier, Italy, 2006, str. 167, ISBN13 978-1-8-56-17466-4
- [49] STUART, B.H.: Infrared spectroscopy: fundamentals and applications, WILEY, New York, 2004, str.224 , ISBN 0-470-85427-8

- [50] HILGARD, S.: Základní pojmy. Přednáška pro kurzy měření IČ spekter  
Spektroskopické společnosti JMM., Praha, 2011
- [51] TUREČEK, F., MCLAFFERTY, F.W.: Interpretation of mass spectra, University  
science book, 1993, USA, str.371, ISBN 0-935702-25-3
- [52] WATSON, J.T., SPARKMAN, O.D.: Introduction to Mass Spektrometry, Wiley,  
Chichestr, 2007, str.819, ISBN 978-0-470-51634-8
- [53] NIESSEN, W.M.A.: Liquid chromatography – Mass Spektrometry, Marcel  
Dekker, Inc, New York, 1999, str.633, ISBN 0-8247-1936-0
- [54] GROSS, J.H.: Mass Spektrometry, Springer, Leipzig, 2004, str.518,  
ISBN 3-540-40739-1
- [55] JEGOROV, A., HAVLÍČEK, V., *Mass Spektrometry* 36, 2001; 633.
- [56] TRABER, R., HOFMANN H., LOOSLI, H.R., OSCHKINAT, H., PONELLE, M., von  
WARTBURG, A., *Helvetica Chimica Acta* 70 (1987), 13-36

**SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK**

TLC Thin – layer chromatography, chromatografie na tenké vrstvě

HPLC High performance liquid chromatography, vysoko účinná  
kapalinová chromatografie

IR Infrared spectroscopy, infračervená spektrometrie.

MS Mass spektrometry, hmotnostní spektrometrie

NMR Nuclear magnetic resonance, nukleární magnetická rezonance

Cs V Cyklosporin V

Cs A Cyklosporin A

LC-MS vysoko účinná kapalinová chromatografie ve spojení s hmotnostní spektrometrií

**SEZNAM OBRÁZKŮ**

<i>Obr. 1. Deemterova rovnice</i> .....	25
<i>Obr. 2. Blokové schéma kapalinového chromatografu [35]</i> .....	25
<i>Obr. 3. Výsledky TLC experimentů v binární směsi dichlormetan-metanol</i> .....	35
<i>Obr. 4. HPLC analýza vstupního materiálu mykofenolátu mofetilu</i> .....	36
<i>Obr.5. HPLC analýza reakční směsi po 1 hodině</i> .....	36
<i>Obr. 6. Analýza finálního produktu mofetil N-oxidu</i> .....	37
<i>Obr. 7. Chromatogram původního standardu</i> .....	37
<i>Obr. 8. Chromatogram N-oxidu mofetilu</i> .....	38
<i>Obr. 9. ESI MS spektra připraveného produktu mofetil N-oxidu</i> .....	39
<i>Obr. 10. ESI MS spektra dříve připraveného standardu mofetil N-oxidu</i> .....	40
<i>Obr. 11. Chromatogram 1. materiálu</i> .....	42
<i>Obr. 12. Chromatogram 2.materiálu</i> .....	42
<i>Obr. 13. Chromatogram 3.materiálu</i> .....	43
<i>Obr. 14. Chromatogram 4.materiálu</i> .....	43
<i>Obr. 15. Chromatogram 5.materiálu</i> .....	43
<i>Obr. 16. Chromatogram 6.materiálu</i> .....	43
<i>Obr. 17. 1. analytická kolona: Zorbax SB – C8, 5<math>\mu</math>m, 4,6 x 250 mm</i> .....	45
<i>Obr. 18. 2. analytická kolona: Synergi Hydro – RP 80A, 4<math>\mu</math>m, 4,6 x 250 mm</i> .....	45
<i>Obr. 19. 70% MeCN</i> .....	46
<i>Obr. 20. 75% MeCN</i> .....	46
<i>Obr. 21. 90% MeOH</i> .....	46
<i>Obr. 22. 85% MeOH</i> .....	46
<i>Obr. 23. 82,5% MeOH</i> .....	47
<i>Obr. 24. 80% MeOH</i> .....	47
<i>Obr. 25. 40°C</i> .....	47
<i>Obr. 26. 50°C</i> .....	48
<i>Obr. 27. 60°C</i> .....	48
<i>Obr. 28. 5% TBME/65% MeCN</i> .....	49
<i>Obr. 29. 10% TBME/65% MeCN</i> .....	49
<i>Obr. 30. 10% TBME/60% MeCN</i> .....	49
<i>Obr. 31. 10% TBME/60% MeOH</i> .....	49

<i>Obr. 32. 10%TBME/60% MeOH</i> .....	50
<i>Obr. 33. 5% TBME/60% MeCN</i> .....	50
<i>Obr. 34. 5%TBME/65% MeCN</i> .....	50
<i>Obr. 35. 3%TBME/70% MeCN</i> .....	50
<i>Obr. 36. 5%TBME/55% MeCN</i> .....	51
<i>Obr. 37. 5%TBME/50% MeCN</i> .....	51
<i>Obr. 38. 4μl nástřik</i> .....	52
<i>Obr. 39. 6μl nástřik</i> .....	52
<i>Obr. 40. 8μl nástřik</i> .....	52
<i>Obr. 41. 10μl nástřik</i> .....	52
<i>Obr. 42. 4μl nástřik</i> .....	53
<i>Obr. 43. 6μl nástřik</i> .....	53
<i>Obr. 44. 8μl nástřik</i> .....	53
<i>Obr. 45. Preparativní HPLC – MF: 6% TBME / 50% MeCN</i> .....	54
<i>Obr. 46. Chromatogram frakcí 1.pík/1-7</i> .....	55
<i>Obr. 47. Chromatogram frakcí2.pík/ 1-5</i> .....	55
<i>Obr. 48 Chromatogram preparativní chromatografie</i> .....	55
<i>Obr. 49. Chromatogram hlavní frakce</i> .....	56
<i>Obr. 50. Chromatogram recyklu 1</i> .....	56
<i>Obr. 51. Chromatogram recyklu 2</i> .....	56
<i>Obr. 52. Chromatogram vodné fáze po hlavní frakci</i> .....	56
<i>Obr. 53. Chromatogram odparku</i> .....	57
<i>Obr. 54. Chromatogram prep. chromatografie odparku</i> .....	57
<i>Obr. 55. Chromatogram finálního standardu</i> .....	57
<i>Obr. 56. Infračervené spektrum standardu</i> .....	58
<i>Obr. 57. ESI hmotnostní spektrum cyklosporinu [Abu7]– oblast vyšších hmot</i> .....	60
<i>Obr. 58. ESI hmotnostní spektrum cyklosporinu [Abu7]– oblast dvojnásob nabitých iontů</i> .....	60
<i>Obr. 59. Fragmenty [M+2H]<sup>2+</sup> iontu</i> .....	61
<i>Obr. 60. <sup>1</sup>H NMR spektrum cyclosporinu V</i> .....	68
<i>Obr. 61. <sup>13</sup>C NMR spektrum cyclosporinu V</i> .....	69
<i>Obr. 62. HPLC analýza substance paclitaxelu použité pro stresování (výchozí materiál)</i> .....	71

<i>Obr. 63. HPLC analýza vzorku 1 po 24 hodinách</i> .....	72
<i>Obr. 64. HPLC analýza vzorku 2 po 24 hodinách</i> .....	72
<i>Obr. 67. HPLC analýza vzorku 1 po 48 hodinách</i> .....	72
<i>Obr. 66. HPLC analýza vzorku 2 po 48 hodinách</i> .....	72
<i>Obr. 67. HPLC analýza vzorku 1 po 72 hodinách</i> .....	73
<i>Obr. 68. HPLC analýza vzorku 2_horní vrstva</i> .....	73
<i>Obr. 69. HPLC analýza vzorku 2_homogenizát</i> .....	73
<i>Obr. 70. Vzorek_HPLC analýza po 24 hodinách</i> .....	73
<i>Obr. 71. Vzorek_HPLC analýza po týdnu</i> .....	74
<i>Obr. 72. Vzorek_HPLC analýza po 10 dnech</i> .....	74
<i>Obr. 73. Vzorek_HPLC analýza po 1 měsíci</i> .....	74
<i>Obr. 74. Vzorek_HPLC analýza po 5. týdnu</i> .....	74
<i>Obr. 75. Grafická prezentace průběhu nárůstu fotodegradantu v čase</i> .....	75
<i>Obr. 76. LC-MS analýza stresovaného paclitaxelu po 35 dnech</i> .....	75
<i>Obr. 77. MS a MS-MS spektrum píku RT 3.55 min</i> .....	76

**SEZNAM TABULEK**

<i>Tab. 1. Tabulka výsledků obsahu cyklosporinu V.....</i>	44
<i>Tab. 2. Gradient.....</i>	44
<i>Tab. 3. IR vibrace .....</i>	58
<i>Tab. 4 <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C, and <sup>15</sup>N NMR data pro cyclosporin V.....</i>	62
<i>(600.23 MHz pro <sup>1</sup>H, 150.94 MHz pro <sup>13</sup>C, 60.82 MHz pro <sup>15</sup>N, CDCl<sub>3</sub>, 30°C) .....</i>	62
<i>Tab. 5. Srovnání <sup>13</sup>C NMR dat pro cyclosporin V s daty publikovanými v literatuře .....</i>	65
<i>Tab. 6. Sumarizace výsledků obsahu fotodegradantu v závislosti na délce stresu.....</i>	75