

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

Katedra farmaceutické chemie a kontroly léčiv

Hodnocení lipofily pyrazinových analogů chalkonů

Diplomová práce

Hradec Králové 2007

Svatava Balíková

Chtěla bych poděkovat svému školiteli PharmDr. Petru Kastnerovi, Ph.D. a Mgr. Zlatě Mrkvičkové za odborné vedení, cenné rady a připomínky při sestavování této diplomové práce. Zároveň chci poděkovat i všem ostatním pracovníkům katedry farmaceutické chemie a kontroly léčiv.

OBSAH

1.	ÚVOD	4
2.	TEORETICKÁ ČÁST	6
2.1	OSUD LÉČIVA V ORGANISMU.....	7
2.2	LIPOFILITA	8
2.2.1	<i>Rozdělovací koeficient</i>	<i>8</i>
2.3	CHROMATOGRAFICKÉ METODY.....	12
2.3.1	<i>Rozdělení chromatografických metod.....</i>	<i>12</i>
2.4	CHROMATOGRAFIE NA TENKÉ VRSTVĚ.....	16
2.4.1	<i>Chromatografický systém</i>	<i>17</i>
2.4.2	<i>Postup při TLC.....</i>	<i>22</i>
2.5	POČÍTAČOVÉ PROGRAMY PRO VÝPOČET LOG P	25
2.6	ÚDAJE Z LITERÁRNÍCH ZDROJŮ	27
3.	CÍL PRÁCE	30
4.	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	32
4.1	ÚDAJE O TESTOVANÝCH LÁTKÁCH.....	33
4.2	POUŽITÉ CHEMIKÁLIE, CHROMATOGRAFICKÝ MATERIÁL, PŘÍSTROJE, PROGRAMOVÉ VYBAVENÍ, POMŮCKY	36
4.3	PŘÍPRAVA VZORKŮ, CHROMATOGRAFICKÉ PODMÍNKY, DETEKCE, ZPRACOVÁNÍ DAT U TLC	38
5.	VÝSLEDKY A DISKUSE	40
5.1	HODNOTY R_M A R_{MW}	42
5.2	HODNOCENÍ Vlivu SUBSTITUENTŮ NA LIPOFILITU.....	44
5.3	HODNOTY LOG P.....	46
5.4	VZÁJEMNÁ KORELACE R_{MW} A LOG P	50
6.	ZÁVĚR	52
7.	LITERATURA	54

1. ÚVOD

Lipofilita je důležitým parametrem v medicínské, farmaceutické a environmentální chemii. Patří k důležitým fyzikálně–chemickým vlastnostem léčiva a je velice často užívaná v QSAR analýzách (z anglického „Quantitative structure-activity relationship“).^{1,2} Její znalost nám pomáhá vytvořit si představu o osudu léčiva v organismu a jeho působení v něm.

Ke zjišťování lipofility se používá řada různých metod. Mezi nejčastější patří metody chromatografické. Vzhledem k slabě polárnímu charakteru většiny léčiv se při jejich hodnocení užívá chromatografie na obrácených (reverzních) fázích. Jinou možností hodnocení lipofility je využití počítačových programů.

Tato práce se zabývá studiem lipofilitních charakteristik série různě substituovaných pyrazinových analogů chalkonů metodou tenkovrstvé chromatografie na obrácených fázích. Lipofilitní charakteristiky byly konfrontovány s teoretickými hodnotami získanými prostřednictvím počítačových programů.

2. TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Osud léčiva v organismu

Působení léčiva na organismus je výsledkem vzájemné interakce mezi léčivem a organismem. K vyvolání účinků je nutné, aby léčivo dosáhlo v místě působení určité koncentrace. To závisí na dějích, jako je absorpce, distribuce, metabolismus a exkrece.

Z mnoha hledisek můžeme organismus považovat za sérii vzájemně propojených oddílů, kompartmentů; uvnitř každého z těchto oddílů je jednotná koncentrace látky. Kde a na jak dlouho bude léčivo po aplikaci v těle přítomné, závisí především na pohybu látky mezi kompartmenty, tj. na jejím přestupu přes hydrofobní difúzní bariéry. Bariéry mezi vodnými kompartmenty v těle jsou tvořeny buněčnými membránami.

Existuje několik způsobů přechodu látek přes buněčné membrány. Ve vztahu k farmakokinetickým mechanismům má velký význam difúze přes lipidovou vrstvu. Ta je silně závislá na rozpustnosti látky v lipidech, tedy na její lipofilitě.³

2.2 Lipofilita

Lipofilita je jednou ze základních fyzikálně-chemických vlastností léčiv. Charakterizuje distribuci látky ve dvoufázovém systému. Vyjadřuje, do jaké míry daná molekula upřednostňuje hydrofobní nepolární prostředí před vodným.⁴

Prakticky všechna léčiva, kromě lokálně aplikovaných, jsou v organismu transportována vodní cestou. Většina organických léčiv se také více či méně rozpouští v lipidech. Transport léčiva tedy zahrnuje rozdělování mezi vodnou a lipoidní fází. Afinita látky k lipoidní fázi je reprezentována její lipofilitou.^{5, 6}

2.2.1 Rozdělovací koeficient

K vyjádření lipofility se používá rozdělovací koeficient P , který vyjadřuje rozdělení látky mezi organickou a vodnou fází soustavy.^{5, 7, 8} Rozdělovací koeficient je poměrem aktivit látky ve dvou fázích v rovnovážném stavu. Při nízkých koncentracích se však dají aktivity rovnocenně nahradit koncentracemi. Rozdělovací koeficient se pak vypočítá z koncentrací látek podle následujícího vzorce, kde c_o udává koncentraci látky v organické fázi, c_v koncentraci látky ve fázi vodné:⁹

$$P = \frac{c_o}{c_v} \quad (1)$$

V kvantitativních vztazích se používá jako lipofilitní parametr logaritmus rozdělovacího koeficientu $\log P$.¹⁰

Rozdělovací koeficient P se také nazývá rozdělovací koeficient systému n -oktanol – voda. Organické rozpouštědlo n -oktanol se zde užívá jako model biologické membrány, přestože je tento model velmi zjednodušený a nenahrazuje plně skutečnost.¹¹ Principiálně mohou být užita různá rozpouštědla, ale na základě poznatků byl upřednostněn n -oktanol.^{1, 11}

Hodnota $\log P$ je konstanta, avšak její hodnota závisí na podmínkách při měření.¹¹ Vzhledem k tomu, že většina léčiv podléhá ionizaci, přidává se do vodné fáze pufr, aby bylo zaručeno stabilní pH.

Rozdělovací koeficient $\log P$ je užívaný v mnoha odvětvích. Jako kvantifikátor lipofility je jednou z klíčových determinant fyzikálně-chemických vlastností léčiv a průmyslových chemikálií. Stal se jedním z hlavních parametrů při studiu kvantitativních vztahů mezi chemickou strukturou látky a její biologickou aktivitou, tzv. QSAR.^{7, 12} Z údajů v literatuře je možné získat obecné informace o optimálních hodnotách $\log P$ pro určité skupiny léčiv, jako např. pro látky prostupující do CNS, transdermálně nebo perorálně aplikovaná léčiva.¹¹

Znalost rozdělovacího koeficientu se však nevyužívá pouze při hledání žádaného účinku léčiv a látek s možnou biologickou aktivitou, ale také při posuzování jejich bezpečnosti. U látek s vysokou lipofilitou může docházet k vychytávání tukovými tkáněmi, což zpomaluje vylučování a zároveň zvyšuje toxicitu dané látky. Obecně platí, že bezpečnější jsou léčiva s dostatečným účinkem při co nejnižší lipofilitě.^{6, 11} V ekologických studiích $\log P$ pomáhá určit osud látek v prostředí - absorpci do půdy, koncentraci v rybách apod.^{6, 13}

Rozdělovací koeficient látek může být experimentálně stanoven pomocí různých metod. Obecně bychom je mohli rozdělit na přímé a nepřímé.⁹

Charakteristikou přímých metod je rozdělování v systému *n*-oktanol – voda. Řadí se mezi ně například metoda třepací a metoda „stir-flask“.⁹

Nejužívanější přímou metodou je metoda třepací (z anglického „Shake-flask“). Její podstatou je vytřepávání látek v systému *n*-oktanol – voda. UV absorpce vodného roztoku látky je měřena před a po vytřepání se známým objemem *n*-oktanolu. Výsledkem je přímo hodnota $\log P$. Tato metoda je velmi časově náročná, vyžaduje relativně velké množství čisté sloučeniny a je limitována hodnotami $\log P$ (cca $-3 < \log P < 4$). Mimo toto rozmezí jsou získané hodnoty nespolehlivé.^{1, 7, 12} Metoda „stir-flask“ se vyvinula z metody třepací. Vodná fáze je převrstvena organickou fází s testovanou látkou a systém se míchá potřebnou dobu (minimálně 36 hodin) do ustavení rovnováhy. U této metody je nižší riziko vzniku emulze než u metody třepací.

Nepřímé metody jsou založené na korelaci mezi rozdělovacím koeficientem a retenčními parametry. Předpokládá se, že stejné základní intermolekulární děje určují chování látek v biologické i chromatografické soustavě, a že základní vlastnosti tohoto

systemu ovlivňující retenci vysoce korelují s těmi samými vlastnostmi zodpovědnými za rozdělování v systému *n*-oktanol – voda.^{12, 13} Využívají se chromatografické metody, které vyžadují velmi malé množství vzorku, jsou relativně rychlé a automatizovatelné. Také nejsou tak náročné na čistotu vzorku; nečistoty jsou separovány v průběhu chromatografického procesu.^{12, 14}

Chromatografické metody úspěšně nahrazují klasické metody, jako je metoda třepací apod. Z chromatografických metod se k měření lipofily nejčastěji využívá chromatografie na obrácených (reverzních) fázích. Prakticky se používá jak tenkovrstvá (RP-TLC) tak vysokoúčinná kapalinová chromatografie (RP-HPLC).¹⁴

Metoda RP-TLC je rychlá, relativně jednoduchá, levná a umožňuje analýzu více vzorků najednou.^{8, 14} K hodnocení lipofily látek používá naměřené hodnoty R_F a z nich vypočtené hodnoty R_M . R_F je retenční faktor látky charakterizovaný jako poměr vzdálenosti start - střed skvrny a vzdálenosti start - čelo mobilní fáze.^{15, 16, 17} Hodnota R_M je nepřímo úměrná R_F :

$$R_M = \log\left(\frac{1}{R_F} - 1\right) \quad (2)$$

Čím méně polární je testovaná látka, tím silnější jsou interakce se stacionární fází. To se projeví snížením R_F a zvýšením R_M . Parametr R_M je dlouho užívaný lipofilitní parametr v přímém vztahu s $\log P$.^{2, 18}

Hodnota R_M je ovlivňována podmínkami chromatografického procesu, jako je pH mobilní fáze nebo zastoupení organické složky jako kosolventu v ní. Tyto podmínky je potřeba vždy standardizovat, aby byly získány reprodukovatelné výsledky.¹² Kosolvent usnadňuje vysoce lipofilním látkám jejich posun ze startu. Závislost mezi koncentrací organické složky v mobilní fázi a hodnotou R_M je lineární podle vztahu

$$R_M = R_{MW} + a \cdot C \quad (3)$$

kde C je koncentrace organické složky v %(v/v) a a je parametr lineární rovnice. R_{MW} je hodnota R_M extrapolovaná do 0% koncentrace organické složky v mobilní fázi. Hodnoty R_{MW} pak lépe korelují s rozdělovacím koeficientem $\log P$, neboť se eliminuje vliv kosolventu.^{2, 11, 14, 19}

Hodnocení lipofility metodou RP-HPLC je založeno na měření retenčních časů látek. Retenční čas přímo závisí na distribuci látky mezi stacionární a mobilní fází, nezávislý je na koncentraci a množství nastříknutého vzorku. Retenční faktor k se dá vypočítat z retenčních časů nebo jako poměr průměrného počtu molekul látky ve stacionární fázi (n_s) a mobilní fázi (n) v průběhu měření:

$$k = \frac{n_s}{n} = \frac{(t_R - t_0)}{t_0} \quad (4)$$

kde t_R je naměřený retenční čas látky, a t_0 je mrtvý retenční čas.^{5, 13} K hodnocení lipofility se retenční faktor používá ve formě logaritmu $\log k$, a tato hodnota se extrapoluje do 0% organické fáze, resp. 100% vodné, aby se eliminoval vliv organické složky v mobilní fázi. Získaný parametr k hodnocení lipofility je $\log k_w$.^{5, 7, 13}

Další možnou chromatografickou metodou je micelární elektrokinetická chromatografie. Tato metoda dělí molekuly na základě jejich rozdílných rozdělovacích koeficientů mezi vodní a micelární fázi. Povrchově nabitě micely migrují uvnitř mobilní fáze vlastní elektroforetickou rychlostí a unášejí molekuly a ionty separovaných látek, které jsou více či méně přítomny uvnitř hydrofobních dutin micel. Všechny micely migrují stejnou rychlostí, ale stupeň solvatace molekul micelami udává rychlost unášení těchto molekul micelami. Stejně jako u RP-HPLC se k hodnocení lipofility používá parametr $\log k$. Tato metoda je stabilní, jednoduchá na přípravu a hlavně získané výsledky u neutrálních látek vykazují mnohem vyšší korelaci s $\log P$ systémem n -oktanol – voda než u RP-TLC nebo RP-HPLC.¹²

Alternativní metodou k experimentálnímu stanovení rozdělovacího koeficientu je jeho predikce. Byly vyvinuty počítačové programy, které dokáží na základě aditivních vlastností lipofility vypočítat teoretickou hodnotu rozdělovacího koeficientu. Při výpočtech využívají jednotlivé programy svých databází, ve kterých jsou hodnoty lipofilitních parametrů získané z experimentálních analýz. Při stanovení rozdělovacího koeficientu nových molekul se vychází ze známých hodnot lipofilitních parametrů.^{15, 21}

Využití predikce $\log P$ bez existence vzorku, dokonce i před samotnou syntézou látky, umožňuje vědcům zvýšit efektivitu výzkumu a vývoje nových léčiv a zároveň snížit finanční náklady.²⁰

2.3 Chromatografické metody

Chromatografické metody jsou vysoce účinné separační metody, sloužící k oddělení analyzovaných složek ze směsi a zároveň k jejich kvalitativní a kvantitativní analýze. Proto jsou velmi široce využívány v analýze léčiv.^{16,17}

Pod názvem chromatografické metody jsou zahrnuty všechny operace, které jsou založené na různých fyzikálně-chemických principech, ale mají společný obecný princip. Tím je nestejněměrné rozdělování složek směsi mezi pohyblivou a nepohyblivou fází na základě jejich různé afinity k daným fázím.^{22,23} V průběhu chromatografického procesu dochází k postupnému, mnohokrát opakovanému vytváření rovnovážných stavů dělených látek mezi fázemi.¹⁶

Hybnou silou v chromatografickém systému je tok mobilní fáze, která vymývá a unáší jednotlivé součásti analyzované směsi. Vlastní dělení látek v systému však závisí na selektivně působící brzdící síle (retenci). Čím větší má látka afinitu ke stacionární fázi, tím pomaleji v chromatografickém systému postupuje.¹⁷

Stacionární fázi v koloně nebo v ploché vrstvě může být tuhá látka (sorbent), nebo kapalina umístěná na povrchu inertního nosiče. Mobilní fáze může být kapalná (eluční činidlo) nebo plynná (nosný plyn).¹⁷

2.3.1 Rozdělení chromatografických metod

Chromatografické metody můžeme rozčlenit podle různých hledisek.

Podle podstaty separačního procesu dělíme metody podle vzájemných interakcí podílejících se na rozdělování látek v systému. Na chromatografickém procesu se však většinou podílí více mechanismů najednou a toto rozdělení je podle převládajícího mechanismu.²²

Adsorpční chromatografie – v důsledku rozdílné adsorpční afinity jednotlivých složek směsi se mění jejich koncentrace na rozhraní dvou fází. Dochází k jejich distribuci mezi stacionární a mobilní fází, a tím k jejich chromatografické separaci.²³ Podstatou separace je tedy rozdílná adsorbovatelnost dělených látek na aktivní povrch sorbentu.¹⁶

U *rozdělovací chromatografie* je podstatou separace rozdílná rozpustnost dělených látek ve dvou vzájemně nemísitelných kapalinách. K separaci dochází na základě odlišných rozdělovacích koeficientů jednotlivých složek směsi.^{22, 23}

Iontově výměnná chromatografie se používá u elektrolytů, které v roztoku tvoří ionty. Stacionární fázi představují iontoměniče – tzv. katexy a anexy. Podstatou dělení je elektrostatická interakce iontů separované látky s ionogenními skupinami stacionární fáze. Separace probíhá na základě rozdílné velikosti průměrného náboje jednotlivých složek dělené směsi.^{22, 23}

Při *gelové chromatografii* se látky dělí podle velikosti svých molekul. Molekuly látky jsou nesené protékající mobilní fází kolonou naplněnou porézním materiálem (gelem) o určité velikosti pórů, přičemž pronikají do rozpouštědlem naplněných pórů gelu. Látky s menšími molekulami mohou pronikat do všech velikostí pórů, zatímco větší molekuly pronikají pouze do velkých pórů, nebo nepronikají vůbec. Rychlost pohybu soustavou je nejnižší u látky s největší molekulou a separace molekul je závislá na rozmezí velikosti pórů zvoleného gelu.^{16, 22, 23}

Afinní chromatografie je založena na specifických interakcích charakteristických pro některé biologické a biochemické procesy. Interakce probíhá mezi dvojicemi látek s vysokou selektivitou. Jedná se spíše o selektivní sorpci a desorpci, než o chromatografický proces v pravém slova smyslu.^{22, 23}

Podle způsobu vyvíjení chromatogramu se chromatografie rozděluje na frontální, vytěšňovací a eluční.

Frontální chromatografie spočívá ve stálém přivádění roztoku dělené směsi na stacionární fázi až do konce chromatografického procesu. Dělené složky vychází podle rostoucí afinity ke stacionární fázi.²³

Při *vytěšňovací chromatografii* se na stacionární fázi jednorázově vnese část chromatografované směsi. Pak se kontinuálně přivádí poslední složka s nejvyšší afinitou, tzv. vytěšňovadlo, která vymývá ze stacionární fáze všechny dříve vnesené složky, které „tlačí“ před sebou. Složky při postupu mezi sebou soutěží o vazbu ke stacionární fázi a vycházejí za sebou podle rostoucí afinity.²³

U *eluční chromatografie* se chromatografovaná směs nanese najednou. Pak se kontinuálně přivádí látka s nejnižší afinitou ke stacionární fázi (rozpouštědlo), která postupně s sebou unáší jednotlivé složky směsi, opět podle rostoucí afinity ke stacionární fázi. Každá ze složek se ale vymývá nezávisle na ostatních.^{23, 24} Tato metoda se v praxi používá nejvíce, neboť je jí možno dosáhnout nejlepšího rozdělení složek směsi.²²

Podle způsobu experimentálního provedení rozeznáváme chromatografii sloupcovou (kolonovou) a v plošném uspořádání. Při *sloupcové chromatografii* putují látky sloupcem v podobě zón. Pro jednotlivé složky je pak charakteristická poloha jejich píku daná elučním časem nebo objemem. Při *plošném uspořádání* chromatogramu putují látky na analytickém chromatogramu v podobě skvrn, které se pak detekují. Chromatografii v plošném uspořádání můžeme rozdělit na papírovou a tenkovrstvou chromatografii.²⁴

Podle charakteru mobilní fáze dělíme chromatografické metody na *plynovou chromatografii*, kde je mobilní fází inertní plyn, a *kapalinovou chromatografii*, kde je mobilní fází kapalina.¹⁶

V následující tabulce je uvedeno přehledné rozdělení chromatografických metod podle fází, mezi kterými dochází k separaci, a podle separačního mechanismu.²²

Tabulka 1 Rozdělení chromatografických metod podle fází²²

Mobilní fáze	Stacionární fáze	Separační mechanismus a funkce	Chromatografická technika
Plyn	Kapalina	Rozdělování, rozdělovací rovnováha	Plynová rozdělovací chromatografie
	Tuhá látka	Adsorpce, adsorpční isoterma	Plynová adsorpční chromatografie
		Sítový efekt	Plynová chromatografie na molekulových sítích
Kapalina	Kapalina	Rozdělování, rozdělovací rovnováha	Kapalinová rozdělovací chromatografie
			Papírová a tenkovrstvá chromatografie
		Sítový efekt	Gelová permeační chromatografie
	Tuhá látka	Adsorpce, adsorpční isoterma	Kapalinová chromatografie adsorpční
		Iontová výměna, výměnná rovnováha	Iontově výměnná chromatografie
		Biospecifická chemická reakce	Afinitní chromatografie

2.4 Chromatografie na tenké vrstvě

Tenkovrstvá chromatografie, označovaná zkratkou TLC (z anglického „Thin-Layer Chromatography“), je založena na dělení látek v tenké vrstvě stacionární fáze (sorbentu), zakotvené na skleněné desce nebo hliníkové či plastové fólii, za použití mobilní fáze. K chromatografickému procesu dochází při průtoku mobilní fáze tenkou vrstvou sorbentu. Podle povahy sorbentu se mohou uplatňovat všechny principy separačního procesu (viz kapitola 2.3.1), a to každý zvlášť nebo v kombinaci. Volbě sorbentu musí odpovídat také volba mobilní fáze.^{23, 24}

Chromatografie na tenké vrstvě je jedna z nejvšestrannějších metod chromatografické analýzy užívaná pro separaci a identifikaci látek. Umožňuje levnou a rychlou analýzu jak kvalitativní, tak kvantitativní. Výhody využití TLC jsou následující: minimální požadavky na vybavení laboratoře, zjednodušená příprava vzorků neboť chromatografické desky jsou na jedno použití, minimální požadavky na čistotu vzorku, detekce výsledků *in situ* prostřednictvím UV záření nebo derivatizace bez časového omezení, simultánní analýza mnoha vzorků najednou za identických podmínek.^{25, 26, 27}

Tenkovrstvá chromatografie má mnoho využití v různých odvětvích. Uplatňuje se například ve screeningu, identifikaci syntetizovaných látek, jako pilotní metoda pro HPLC nebo pro kvantitativní analýzu. Také je využívána jako nepřímá metoda pro určování distribučních vlastností látek.^{25, 26, 27}

2.4.1 Chromatografický systém

U všech chromatografických metod zvolení optimálních podmínek a optimálního systému obnáší harmonizaci stacionární a mobilní fáze.²⁸

Stacionární fáze

Stacionární fáze pro tenkovrstvou chromatografii jsou jemnozrné adsorbenty nebo nosiče zakotvené fáze v tenké vrstvě nasypané nebo fixované na podložku. Podložkou může být skleněná deska nebo hliníková či plastová fólie. V dnešní době se využívají komerčně vyráběné tenké vrstvy, u nichž jsou lépe zajištěny standardní vlastnosti vrstvy.²⁴

Adsorbenty jsou tuhé látky schopné vázat na svém povrchu jiné chemické sloučeniny v kapalně nebo plynné fázi, a to působením disperzních sil (van der Waalovy) nebo chemickými interakcemi (vodíkové můstky, chemisorpce). Velikost adsorpce (aktivita sorbentu) závisí na chemické povaze sorbentu a na povaze a velikosti jeho povrchu, tj. na velikosti částic a na jejich pórovitosti. Stupeň aktivity je nutno přizpůsobit polaritě chromatografovaných látek – čím polárnější látky, tím méně aktivní sorbent.²⁴

Nosičem kapalně fáze může být jakýkoli materiál, který svou velikostí částic umožňuje pravidelný a přiměřeně rychlý průtok mobilní fáze a je schopen pojmout zakotvenou fázi. Zakotvená fáze může být buď polární (voda) nebo nepolární kapalina. Jako nosič se nejčastěji používá silikagel nebo prášková celulóza. Zakotvené kapalně fáze se využívají v rozdělovací chromatografii.²⁴

U tenkých vrstev fixovaných na podložku se k příslušným materiálům přidávají anorganická nebo organická pojiva, jako například sádra, škrob nebo různé polymery. Také se přidává fluorescenční indikátor usnadňující následnou detekci chromatogramu. Nejčastěji se používají indikátory o excitační vlnové délce 254 nebo 366 nm. Jejich přídavek, stejně jako přídavek pojiva, bývá vyznačen v obchodním názvu preparátu.^{24, 25}

Stacionární fáze můžeme rozdělit podle fyzikálně-chemické povahy na polární, nepolární a středně polární. Při použití polárních sorbentů záleží hlavně na počtu a charakteru polárních funkčních skupin v molekule adsorbované látky, u nepolárních

sorbentů se uplatňují disperzní síly působící mezi sorbentem a nedisociovanými molekulami látky. Proto se také při volbě správného sorbentu řídíme vlastnostmi chromatografovaných látek. Jsou-li dělené látky nepolárního charakteru, volíme chromatografii adsorpční nebo rozdělovací chromatografii na obrácených fázích, pro středně polární a polární látky volíme adsorpční chromatografii na polárních sorbentech nebo rozdělovací chromatografii se zakotvenou polární organickou fází. U ionogenních látek je výhodné využití výměny iontů.^{23, 24}

Při TLC jsou nejčastěji používané následující stacionární fáze:

Silikagel je v tenkovrstvé chromatografii nejpoužívanějším adsorbentem. Pro adsorpční chromatografii se používá v aktivované nebo částečně deaktivované formě jako selektivní adsorbent polárních látek, pro rozdělovací chromatografii se používá jako nosič vody nebo organické fáze. Aktivace silikagelu se provádí zahřátím na 100 až 120°C, deaktivace působením vzdušné vlhkosti.²⁴

Silikagel je polární adsorbent amorfní struktury, jejíž základní stavební jednotku tvoří čtyřstěn $(\text{SiO}_4)_x$. Stavební jednotky pak dohromady vytváří síť, na jejímž povrchu jsou umístěny volné hydroxylové skupiny. Prostřednictvím těchto hydroxylových skupin dochází k adsorpci látek na jeho pórovitý povrch. Rozměry pórů silikagelu se pohybují v rozmezí 2 až 15 nm; měrný povrch od 300 do 600 m^2g^{-1} . Velikost zrn ovlivňuje rychlost vyvíjení a kvalitu dělení – čím hrubší zrnění, tím rychlejší vyvíjení, ale nižší účinnost dělení; pro TLC se používá silikagel se zrněním 2 až 40 μm .^{23, 24}

Silikagel je vhodný pro dělení většiny látek, popř. pro skupinové dělení složitých směsí, avšak vzhledem ke slabě kyselému charakteru povrchu (pH 4-5) se nehodí pro dělení silně bazických látek, které se na jeho povrch adsorbují příliš pevně. Také není vhodný pro silně polární nebo silně nepolární látky. Silně polární látky jsou příliš pevně zadrženy na povrchu silikagelu, příliš nepolární látky jsou naopak zadrženy málo.^{23, 29}

Oxid hlinitý je druhým nejčastějším adsorbentem pro tenké vrstvy. Má velkou adsorpční kapacitu a snadno z něho lze připravit preparáty o definované aktivitě. Základní forma má zásaditý charakter (pH \approx 9), obchodně je však dodáván i jako neutrální nebo kyselý (pH \approx 4). Jeho pH a stupeň hydratace výrazně ovlivňuje jeho dělicí vlastnosti.

Ve struktuře oxidu hlinitého je každý atom hliníku obklopen šesti atomy kyslíku, z nichž je každý obklopen třemi atomy hliníku a jedním atomem vodíku tvořícím vnitřní

vodíkovou vazbu. Preparát má pórovitou strukturu o rozměru pórů 2 až 15 nm s měrným povrchem 100 až 350 m²g⁻¹. Pro TLC se používá v zrnění od 5 do 40 μm.^{23, 24}

Povrch oxidu hlinitého je více komplexní než u silikagelu. Na svém povrchu vystavuje hydroxylové skupiny, hliníkové kationty a oxidové anionty. Podle Poola vyšší variabilita vlastností sorbentu a nižší reprodukovatelnost výsledků snižuje využitelnost oxidu hlinitého oproti silikagelu. Používá se tam, kde není možné použít silikagel.²⁹

Ostatní anorganické materiály se používají v menší míře a slouží ke speciálním účelům. Využívá se jejich selektivního působení a u některých i jejich neutrální reakce a slabší aktivity, která je výhodná pro dělení labilních sloučenin. Patří sem křemelina, křemičitan hořečnatý, oxid hořečnatý, aktivní uhlí a další.²⁴

Celulóza je nejrozšířenějším sorbentem organického původu. Používá se pro rozdělovací chromatografii jako nosič pro vodu nebo organickou zakotvenou fázi. Pro TLC se používá mikrokrytalická celulóza o velikosti částic 20 až 40 μm a průměrným polymeračním stupněm od 40 do 200 nebo prášková celulóza s velmi krátkými vlákny. Většina obchodních preparátů celulózy je bez pojidla, jelikož přilnavost celulóзовých vrstev je mnohem lepší než u anorganických sorbentů.^{23, 24}

Ve speciálních případech se využívá také chemicky modifikovaná celulóza jako měnič iontů. Příkladem je PEI-celulóza, polyethyleniminem modifikovaná celulóza, která se chová jako silně bazický měnič aniontů. Toho se využívá při dělení aminokyselin, peptidů, nukleotidů apod.²⁵

Polyamidy jsou dalším organickým sorbentem užívaným v tenkovrstvé chromatografii. Tento materiál je vhodný pro některé skupiny látek, např. fenolického charakteru nebo nitrolátky. Výsledky dělení jsou závislé na způsobu přípravy polyamidové vrstvy a na způsobu standardizace polyamidu.²⁴

Reverzní stacionární fáze

Při chromatografii na obrácených fázích, tzv. RP-TLC (z anglického „Reversed-phase thin-layer chromatography“), se jako stacionární fáze užívají nepolární sorbenty. Nepolárního charakteru sorbentu se dosahuje mechanickou nebo chemickou modifikací jeho polárního povrchu.²²

Při mechanické modifikaci se sorbent impregnuje nepolárním organickým rozpouštědlem, které tak tvoří zakotvenou fázi. Zakotvenou fázi je tenká vrstva nepolární kapaliny. Nejčastěji se jako zakotvená kapalina užívá parafinový nebo silikonový olej nebo vyšší alkoholy. Při volbě mobilní fáze je pak potřeba přihlédnout k mísitelnosti obou fází. Pokud je zakotvená kapalina a mobilní fáze mísitelná, pak je potřeba mobilní fázi předem nasytit zakotvenou fází, jinak by v průběhu vyvíjení docházelo k vymývání zakotvené fáze ze sorbentu. Impregnace sorbentu se provádí ponořením desky do roztoku zakotvené fáze nebo v chromatografické komoře vztlínáním. Sorbenty užívané k impregnaci jsou silikagel, oxid hlinitý nebo celulóza.²⁴

Při chemické modifikaci jsou na aktivní povrch sorbentu kovalentně navázány takové substituenty, které jsou pro dělení látek požadovány. Takto modifikované fáze vykazují značnou stabilitu a také jejich využití nevyžaduje sycení mobilní fáze stacionární fází. Jako nosič se většinou používá silikagel s vhodnou velikostí povrchu a s požadovanou pórovitostí. Volné hydroxylové skupiny na povrchu silikagelu poskytují reakční centra pro tvorbu relativně pevných siloxanových vazeb. Vhodnými nepolárními substituenty jsou nízké alkyly nebo dlouhé alkylové řetězce hydrofobního charakteru. V praxi se používají nejvíce silikagely s navázanými ethylovými, oktylovými nebo oktadecylovými řetězci.²²

Při RP-TLC nemůže docházet k sorpci na aktivních centrech schopných polárních interakcí a nepolární povrch sorbentu poutá molekuly analyzovaných látek pouze slabými disperzními silami. Selektivita na nepolárních stacionárních fázích je tedy ovlivňována pouze vlastnostmi mobilní fáze. Jako mobilní fáze se používá voda nebo pufr s přísávkem polárních organických rozpouštědel, jako jsou různé alkoholy, acetonitril, aceton, dioxan, tetrahydrofuran atd. Čím více organického rozpouštědla mobilní fáze obsahuje, tím vyšší je hodnota R_F .^{22, 24}

Mobilní fáze

Mobilní fáze je u TLC nositelem transportních dějů na vrstvě. Jejím prostřednictvím jsou ovlivňovány výsledné hodnoty retenčních faktorů dělených látek. Při výběru mobilní fáze přihlížíme k její síle, polaritě a selektivitě. Zároveň je ale důležité přihlédnout i ke zvolené fázi stacionární, neboť výsledné vlastnosti mobilní fáze jsou dány kombinací jejích vlastních vlastností a vlastností stacionární fáze.²³

Síla mobilní fáze udává schopnost rozpouštědla unášet chromatografované látky po chromatogramu, selektivitou se rozumí její schopnost selektivně rozpustit látky dané směsi. To znamená, že síla mobilní fáze udává jak daleko dělené látky migrují a selektivita jaké budou vzájemné rozdíly v délce migrace jednotlivých látek.^{23, 29}

Síla mobilní fáze souvisí s její polaritou. Na polární sorbenty jsou větší silou adsorbovány molekuly polárního rozpouštědla než rozpouštědla méně polárního a naopak. Z toho vyplývá, že čím jsou rozpouštědla silněji adsorbována, tím silnější mobilní fázi tvoří. Podle rostoucí eluční schopnosti byla rozpouštědla seřazena do tzv. eluotropní řady. Nejvýše v řadě jsou polární rozpouštědla mající silné eluční schopnosti, jako je voda, kyselina octová (pro vytěšňování kyselin) nebo methanol. U nepolárních sorbentů se užívá eluotropní řada v obráceném pořadí.^{23, 24}

Pro rozdělovací chromatografii platí stejný princip výběru mobilní fáze jako pro chromatografii adsorpční, s tím, že u rozdělovací chromatografie je důležité, aby látky dělené směsi byly dobře rozpustné v zakotvené fázi a přiměřeně méně rozpustné v rozpouštědle. Zároveň musí být obě fáze jen omezeně mísitelné nebo nemísitelné.²⁴

Pro výběr stacionární a mobilní fáze platí následující obecná pravidla:²⁴

1. V použité mobilní fázi se mají všechny chromatografované látky poměrně dobře rozpouštět. Rozpouštějí-li se příliš snadno, mohlo by to způsobit nedostatečnou retenci na stacionární fázi.
2. Totéž platí i pro stacionární fázi. Budou-li látky poutány na stacionární fázi příliš pevně, zůstanou na startu. Budou-li naopak poutány málo, nedojde k jejich rozdělení a veškerá směs projde vrstvou až k čelu.
3. Chromatografované látky a rozpouštědla spolu nemají reagovat. Nemá docházet ani k jejich reakci se stacionární fází.
4. Chceme-li pozměnit eluční účinek některého z rozpouštědel eluční řady, použijeme jeho směs s některým ze sousedních rozpouštědel v různém poměru. Chceme-li snížit zadržení látek, zvolíme při chromatografii na polárním sorbentu polárnější rozpouštědlo, resp. zvýšíme jeho podíl ve směsi s méně polárním rozpouštědlem. I při malém procentovém obsahu polárního rozpouštědla v méně polárním nabývá směs poměrně rychle vlastností podobných vlastnostem polárnějšího rozpouštědla.

2.4.2 Postup při TLC

Před vlastní prací je nutná volba vhodného sorbentu a mobilní fáze (viz kapitola 2.4.1).²³

Analyzované vzorky se nanášejí na chromatografickou desku ve formě roztoku. Na desce se vyznačí ve vhodné vzdálenosti od spodního okraje tzv. start, tj. počátek chromatogramu, a body pro nanesení vzorků. Start bývá ve vzdálenosti 1,5 až 2 cm od spodního okraje desky.

Vzorky se nanášejí na označená místa rozpuštěné ve vhodném těkavém rozpouštědle. Roztoky se nanášejí pomocí mikropipety bodově nebo v podobě krátkého proužku. Množství nanášeného vzorku se řídí podle citlivosti detekce. Doporučuje se nanášet co nejméně vzorku, neboť to zvyšuje ostrost dělení. Obvykle se nanáší 1 - 10 μ l vzorku o koncentraci 0,1 – 1%. Po odpaření rozpouštědla je deska připravená k vyvíjení.^{22, 23}

Vyvíjení chromatogramu

Před vložením chromatografické desky do komory je třeba nechat komoru nasytit parami mobilní fáze, aby nedocházelo k tzv. okrajovému efektu (mobilní fáze na okrajích desky postupuje pomaleji než v jejím středu).²⁴

Po nasycení komory se vloží deska s nanesenými vzorky a nechá se vyvíjet. Vyvíjení je potřeba provádět za konstantní teploty, abychom dosáhli reprodukovatelných výsledků. Teplota ovlivňuje rychlost průtoku mobilní fáze a rozdělovací koeficient chromatografované látky.²⁴

Existuje mnoho různých způsobů vyvíjení chromatogramu.

Vzestupné vyvíjení je nejčastější způsob vyvíjení při TLC. Spočívá v ponoření spodního okraje vrstvy do vyvíjecí soustavy tak, aby start s nanesenými vzorky nebyl ponořený do mobilní fáze.²³ Postup mobilní fáze sorbentem je zprostředkován kapilárními silami. Tyto slabé síly se vytváří poklesem vnitřní energie rozpouštědla při jeho pronikání do pórovité struktury sorbentu. Rychlost postupu mobilní fáze sorbentem se postupně snižuje.²⁷ V okamžiku, kdy čelo mobilní fáze dosáhne požadované

vzdálenosti, se chromatogram vyjme z komory a poloha čela se označí. Detekce se provede po odpaření mobilní fáze z chromatogramu.²²

Sestupné vyvíjení se užívá pro vrstvy nenasávající rozpouštědlo kapilárními silami. V horní části komory se umístí žlábek s rozpouštědlem a z něj se nasává rozpouštědlo na tenkou vrstvu.²³

Vyvíjení na přetečení se používá převážně v případech, kdy analyzované látky zůstávají při vyvíjení poblíž startu. Rozpouštědlo se po dosažení konce desky nechá volně odkapávat a chromatogram se dál vyvíjí.²⁴

Při *opakovaném vyvíjení* se dosahuje lepšího rozdělení látek tím, že vyvíjíme chromatogram stejnou mobilní fází několikrát za sebou ve stejném směru. Po každém chromatogram vyjmeme a vysušíme před opětovným vložením do komory.²⁴

Frakcionované vyvíjení je založeno na stejném principu jako opakované vyvíjení, pouze se užívají rozpouštědla s postupně se zvyšující polaritou. Tento postup je vhodný při analýze látek podle jejich polarity.²⁴

Při *dvourozměrném vyvíjení* je analyzovaný vzorek umístěn do jednoho rohu desky. V první fázi se chromatogram nechá vyvíjet v normálním směru. Ve druhé fázi se chromatogram nechá vyvíjet v jiné soustavě otočený o 90°.

Po ukončení vyvíjení se chromatogram vyndá z komory a po odpaření mobilní fáze je možné detekovat skvrny.

Detekce

Většina chromatografovaných látek je bezbarvá, a proto se po vyvinutí musejí určitým způsobem detekovat. Detekce se provádí různými fyzikálními či chemickými postupy.

Mezi fyzikální metody řadíme detekční postupy založené na fluorescenci látek po ozáření vhodným zdrojem záření nebo na zhášení fluorescence indikátoru. Indikátor je součástí sorbentu, a proto chromatogram po ozáření svítí po celé ploše kromě míst, kde se vyskytují chromatografované látky. V praxi se užívají fluorescenční indikátory s excitační vlnovou délkou 254 nebo 366 nm. K fyzikálním metodám také patří detekce radioaktivních látek autoradiograficky nebo scintilačními postupy.²³

Chemické detekční metody spočívají ve vystavení vyvinutého chromatogramu parám některých látek, např. amoniaku, jodu, bromu, nebo v postřiku chromatogramu detekčním roztokem. Detekční činidla tvoří s chromatografovanými látkami ihned nebo po zahřátí barevné deriváty. Chromatogram je pak možno detekovat přímo nebo pod UV zářením.²³

Kvalitativní a kvantitativní vyhodnocení

Existují různé metody vyhodnocování chromatogramu podle toho, co je naším cílem zjistit. Nejdůležitější z těchto metod jsou popsány níže.

Při *kvalitativním vyhodnocování* chromatogramu využíváme retenční faktor R_F . Jeho hodnota nám udává pozici, ve které se látka nachází na chromatogramu. Pro identifikaci látek je nezbytné získat hodnotu R_F jak testované látky, tak i standardu. Hodnota retenčního faktoru je totiž ovlivňována podmínkami chromatografického procesu a je obtížné získat reprodukovatelné výsledky. Hodnota R_F se vypočítá podle následujícího vzorce jako poměr středu skvrny od startu (a) a čela mobilní fáze od startu (b):

$$R_F = \frac{a}{b} \quad (5)$$

Kvantitativní vyhodnocování probíhá prostřednictvím přímých a nepřímých metod. Při nepřímé analýze se analyzovaná skvrna seškrabe z chromatogramu a poté extrahuje do vhodného rozpouštědla, ve kterém pak proběhne zakoncentrování a vlastní analýza. Pomocí vhodných přístrojů je tuto metodu možné také částečně automatizovat.

Přímé metody probíhají přímo na chromatografické desce (*in situ*). Je velice důležité, aby na desku byl nanesen standard i analyzovaná látka ve stejném množství. Skvrny jsou analyzovány spektrofotometricky, denzitometricky, radiometricky nebo scintilačními metodami.³⁰

2.5 Počítačové programy pro výpočet $\log P$

Experimentální hodnoty rozdělovacího koeficientu jsou známy asi pro 30000 organických sloučenin, což je nepatrný počet vzhledem k počtu molekul, u kterých by bylo potřeba $\log P$ znát. S tím souvisí i stálý zájem v medicínské a farmaceutické chemii o vytvoření metod, které by dokázaly odvodit rozdělovací koeficient ze struktury molekuly.³¹

Metody výpočtu $\log P$ se dají rozdělit do dvou hlavních skupin.^{31, 32}

1. Metody založené na substrukturním přístupu
2. Metody využívající celomolekulový přístup

U substrukturního přístupu je molekula rozdělena na jednotlivé atomy (anglicky „Atom contribution methods“) nebo skupiny atomů, tzv. molekulové fragmenty (fragmentální metody). Hodnota $\log P$ je pak výsledkem součtu příspěvků jednotlivých atomů, resp. fragmentů. Molekuly však nejsou pouze soubory fragmentů nebo atomů. Proto se u fragmentální metody aplikují korekční pravidla související s vazností v molekule, pomocí kterých se upravuje konečná hodnota $\log P$. Většina algoritmů založených na příspěvku jednotlivých atomů pracuje bez korekčních faktorů.^{31, 32}

Rozdělení molekuly může být do jisté míry libovolné a každý přístup má své výhody a nevýhody. Fragmenty větší než jeden atom vykazují elektronové interakce, které mohou být zahrnuty do příspěvku fragmentu k lipofilitě, což představuje hlavní výhodu užívání fragmentální metody. Výhodou atomových příspěvků je jejich jednoznačnost; nevýhodou je však obrovský počet typů atomů potřebný k popisu molekul (každý atom v molekule je blíže určen sousedními atomy a typem vazeb). Substrukturní přístup selhává při počítání $\log P$ strukturních izomerů a neuvažuje konformace molekuly.³¹

Pro jednotlivé metody byly vyvinuty různé algoritmy výpočtu $\log P$, které jsou využívány v různých softwarech. Mezi algoritmy využívající fragmentální metodu patří CLOGP (software ChemDraw), ACD/Log P , KLOGP, IALOGP, COSMOFRAG, Ghose/Crippen (software HyperChem), CHEMICALC, HLOGP a miLOGP. Metodu příspěvků jednotlivých atomů využívá SMILOGP, ALOGP, ChemAxon a XLOGP.

LOGKOW (software KOWWIN) a AB/logP kombinuje atomový a fragmentální přístup.³¹

Celomolekulový přístup využívá při hodnocení lipofility vlastnosti molekuly jako celku. Ke kvantifikaci $\log P$ využívá molekulární lipofilní parametry, topologické indexy nebo vlastnosti molekuly, jako jsou hustota náboje, plocha povrchu, elektrostatický a objemový potenciál. Některé programy dokonce započítávají i vliv 3D struktury molekuly.^{31, 32}

Celomolekulový přístup využívají algoritmy CLIP, HINT, MOLFESD, MLOGP, VLOGP, T-LOGP, BLOGP, QLOGP a WHIM/logP.³¹

2.6 Údaje z literárních zdrojů

Tato literární rešerše byla zaměřena na vyhledávání jednotlivých článků týkajících se studií lipofility s využitím tenkovrstvé chromatografie na obrácených fázích (RP-TLC). Hlavní cílem bylo zjistit experimentální podmínky RP-TLC a získat přehled o nejčastěji užívaných stacionárních a mobilních fázích a používaných způsobech detekce.

Z provedené rešerše vyplynulo, že nejčastěji užívanou stacionární fází je silikagel chemicky modifikovaný alifatickými uhlovodíkovými řetězci s 18 atomy uhlíku; stacionární fáze navíc obsahuje fluorescenční indikátor. Jako mobilní fáze se používají převážně směsi vody s methanolem, acetonem nebo acetonitrilem o různém poměrném zastoupení. Nejběžnější způsob detekce u RP-TLC je zhášení fluorescence sledované pod UV lampou.

V následující tabulce je uveden přehled údajů získaných z jednotlivých rešerší.

Tabulka 2 Studie lipofility využívající RP-TLC - údaje z literárních zdrojů

Číslo citace	Zkoumané látky	Stacionární fáze	Impregnace	Mobilní fáze	Detekce
8	eburnanové alkaloidy	silanizovaný silikagel 60 F ₂₅₄	-	aceton - voda	densitometricky, vlnová délka 279 nm
18	deriváty 16,17-secoestronu	HPTLC silikagel 60 RP-18 F _{254s}	-	methanol - voda acetonitril - voda	UV 254 nm
19	1,2-benzisothiazol-3(2H)-ony	silikagel RP-18 F _{254s}	-	aceton - pufr methanol - pufr acetonitril - pufr	UV 254 nm
33	deriváty thiazolidinu	silikagel RP-18 F _{254s}	-	aceton - voda	UV 254 nm
34	neionogenní surfaktanty	Nano-Sil-C ₁₈ -100 UV ₂₅₄	-	aceton - voda tetrahydrofuran - voda	UV 254 nm
35	monoazobarviva	silikagel	hexan - parafinový olej 90:10 (v/v)	methanol - 0,5M HCl	neuvedeno
36	procainamid, lidokain, atenolol, disopyramid, oxprenolol, propranolol, alizaprid, alpiroprid, sulpirid	silikagel RP-18 F _{254s}	-	methanol - Tris pufr pH 7,4	densitometricky
37	deriváty fenoxycetové kyseliny	RP-18 W/UV ₂₅₄	-	vodný roztok albuminů	UV
38	deriváty furanu	silikagel 60 RP-18 F _{254s}	-	methanol - voda	UV 254 nm
39	8-substituované deriváty 2'-deoxyadenosinu, 5-substituované deriváty 2'-deoxyuridinu	RP-18 W/UV ₂₅₄	-	methanol - voda	UV
40	deriváty chinolonu	silikagel GF ₂₅₄	silikonový olej DC 200 (350 cSt)	aceton - glycinový pufr pH 1,2 a 9,0 methanol - glycinový pufr pH 1,2 a 9,0 acetonitril - glycinový pufr pH 1,2 a 9,0	zásaditý roztok manganistanu draselného
41	nehomologická série neionogenních surfaktantů	Silcoflat (Labor MIM, Maďarsko)	n-hexan - parafinový olej 95:5 (v/v)	methanol - voda	modifikované Burgerovo činidlo
42	deriváty piperazinu	silanizovaný silikagel Kieselgel 60	silikonový olej DC 200	aceton - 5% NH ₄ OH pH 11,3	UV 366 nm jodové páry

Číslo citace	Zkoumané látky	Stacionární fáze	Impregnace	Mobilní fáze	Detekce
43	deriváty naftalenu, chinolinu, 4-nitropyrazolonu, 1,4-dihydropyridinu	silikagel GF ₂₅₄	silikonový olej DC 200 (350 cSt)	aceton - voda methanol - voda acetonitril - voda aceton - pufr methanol - pufr acetonitril - pufr	zásaditý roztok manganistanu draselného
44	inhibitory monoaminooxidázy	Silufol UV 254	n-hexan - parafinový olej 95:5 (v/v)	methanol - dichlorethan acetonitril - aceton methanol - voda	jodové páry
		aluminiumoxid 60 F ₂₅₄	n-hexan - parafinový olej 95:5 (v/v)	acetonitril - tetrachlormethan 2-propanol – n-hexan methanol - voda	
		celuloza F ₂₅₄	n-hexan - parafinový olej 95:5 (v/v)	hexan voda	
45	amidoestery ethanolaminu	HPTLC silikagel RP-18 F _{254s}	-	methanol - voda	UV 254 nm
46	substituované anilidy pyrazin-2-karboxylové kyseliny	silanizovaný silikagel 60 F ₂₅₄	diethylether - silikonový olej 95:5 (v/v)	methanol - 0,05M fosforečnanový pufr pH 3,0 a 7,4	UV 254 nm

Vysvětlivky ke zkratkám v tabulce:

- cSt centistokes, jednotka viskozity ($1 \text{ m}^2\text{s}^{-1} = 10000 \text{ St}$)
- F₂₅₄ fluorescenční indikátor s excitační vlnovou délkou 254 nm
- F_{254s} fluorescenční indikátor s excitační vlnovou délkou 254 nm stabilní v kyselém prostředí
- G sádra jako pojivo
- RP-18 stacionární fáze s kovalentně vázanými radikály s délkou 18 uhlíků
- W plně smáčitelný vodou
- 60 velikost pórů v Å ($1 \text{ nm} = 10 \text{ Å}$)

3. CÍL PRÁCE

Cílem této diplomové práce bylo posouzení lipofilitních charakteristik šesti sérií na jádře substituovaných pyrazinových analogů chalkonů a jedné série na jádře substituovaných chalkonů s využitím tenkovrstvé chromatografie na reverzních fázích. Jako lipofilitní parametr byla dále zpracovávána hodnota R_{MW} .

Hodnoty R_{MW} byly využity k porovnání vlivu jednotlivých na jádře navázaných substituentů na lipofilitu. Zvlášť byly hodnoceny chalkony, zvlášť pyrazinové analogy chalkonů.

Dále bylo porovnáno, zda hodnoty R_{MW} získané z měření korelují s teoretickými hodnotami $\log P$ vypočítanými pomocí počítačových programů. Také bylo posouzeno, zda se významně liší korelace u komerčních počítačových programů a on-line volně dostupných programů.

4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 Údaje o testovaných látkách

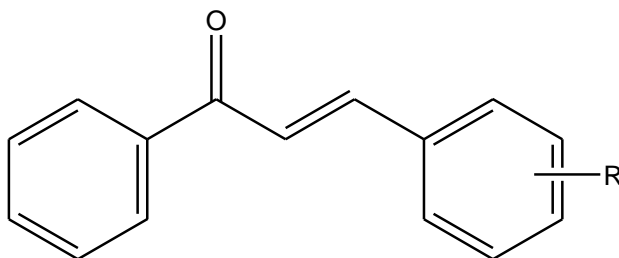
V této diplomové práci byly analyzovány série vzorků látek nasyntetizovaných na katedře farmaceutické chemie a kontroly léčiv Farmaceutické fakulty Univerzity Karlovy v Hradci Králové.

Byla testována jedna série na jádře substituovaných derivátů 1,3-difenyprop-2-en-1-onu (chalkonu) a šest sérií na jádře substituovaných derivátů 3-fenyl-1-pyrazin-2-ylprop-2-en-1-onu. Celkem bylo analyzováno 62 látek.

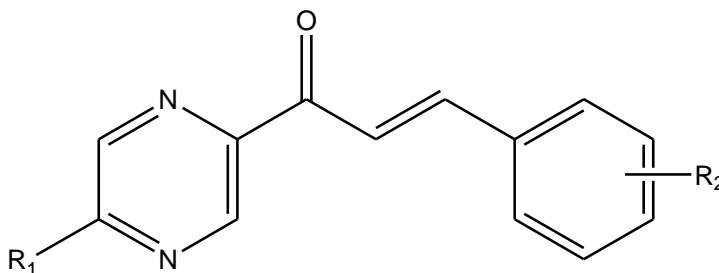
Testované vzorky jsou krystalické struktury, barva přechází od bílé přes žlutou až k sytě oranžové. Jedná se o mírně polární látky s potenciální biologickou aktivitou.

V tabulce 3 a 4 je uveden přehled jednotlivých derivátů. Tabulky obsahují číslo vzorku, číslo série, které charakterizuje substituent R_1 , označení vzorku, jehož součástí je i písmeno označující řadu. Řada charakterizuje substituent R_2 , resp. R, jedná-li se o chalkony. Dále jsou v tabulce uvedeny typy substituentů, molekulová hmotnost a sumární vzorec sloučeniny.

Obecný vzorec série derivátů 1,3-difenyprop-2-en-1-onu (označení vzorků Ac-0):



Obecný vzorec série derivátů 3-fenyl-1-pyrazin-2-ylprop-2-en-1-onu:



Tabulka 3 Přehled derivátů 3-fenyl-1-pyrazin-2-ylprop-2-en-1-onu

Číslo vzorku	Série	Označení vzorku	R1	R2	Molekulová hmotnost	Sumární vzorec
1	0	CH - 0a	H	3-OCH ₃ , 4-OH	256,26	C ₁₄ H ₁₂ N ₂ O ₃
2	0	CH - 0b	H	H	210,23	C ₁₃ H ₁₀ N ₂ O
3	0	CH - 0c	H	2-OH	226,23	C ₁₃ H ₁₀ N ₂ O ₂
4	0	CH - 0d	H	4-OH	226,23	C ₁₃ H ₁₀ N ₂ O ₂
5	0	CH - 0e	H	4-N(CH ₃) ₂	253,3	C ₁₅ H ₁₅ N ₃ O
6	0	CH - 0f	H	2-NO ₂	255,23	C ₁₃ H ₉ N ₃ O ₃
7	0	CH - 0i	H	4-NO ₂	255,23	C ₁₃ H ₉ N ₃ O ₃
8	0	CH - 0j	H	3-NO ₂	255,23	C ₁₃ H ₉ N ₃ O ₃
9	0	CH - 0m	H	4-Cl	244,698	C ₁₃ H ₉ N ₂ OCl
10	0	CH - 0n	H	3-OH	226,23	C ₁₃ H ₁₀ N ₂ O ₂
11	0	CH - 0o	H	2-OCH ₃	240,26	C ₁₄ H ₁₂ N ₂ O ₂
12	0	CH - 0p	H	3-OCH ₃	240,26	C ₁₄ H ₁₂ N ₂ O ₂
13	0	CH - 0q	H	4-OCH ₃	240,26	C ₁₄ H ₁₂ N ₂ O ₂
14	1	CH - 1a	<i>terc</i> -butyl	3-OCH ₃ , 4-OH	312,37	C ₁₈ H ₂₀ N ₂ O ₃
15	1	CH - 1b	<i>terc</i> -butyl	H	266,34	C ₁₇ H ₁₈ N ₂ O
16	1	CH - 1c	<i>terc</i> -butyl	2-OH	282,34	C ₁₇ H ₁₈ N ₂ O ₂
17	1	CH - 1d	<i>terc</i> -butyl	4-OH	282,34	C ₁₇ H ₁₈ N ₂ O ₂
18	1	CH - 1e	<i>terc</i> -butyl	4-N(CH ₃) ₂	309,41	C ₁₉ H ₂₃ N ₃ O
19	1	CH - 1f	<i>terc</i> -butyl	2-NO ₂	311,34	C ₁₇ H ₁₇ N ₃ O ₃
20	1	CH - 1i	<i>terc</i> -butyl	4-NO ₂	311,34	C ₁₇ H ₁₇ N ₃ O ₃
21	1	CH - 1j	<i>terc</i> -butyl	3-NO ₂	311,34	C ₁₇ H ₁₇ N ₃ O ₃
22	1	CH - 1m	<i>terc</i> -butyl	4-Cl	300,79	C ₁₇ H ₁₇ N ₂ OCl
23	1	CH - 1n	<i>terc</i> -butyl	3-OH	282,34	C ₁₇ H ₁₈ N ₂ O ₂
24	2	CH - 2a	isobutyl	3-OCH ₃ , 4-OH	312,37	C ₁₈ H ₂₀ N ₂ O ₃
25	2	CH - 2c	isobutyl	2-OH	282,34	C ₁₇ H ₁₈ N ₂ O ₂
26	2	CH - 2d	isobutyl	4-OH	282,34	C ₁₇ H ₁₈ N ₂ O ₂
27	2	CH - 2e	isobutyl	4-N(CH ₃) ₂	309,41	C ₁₉ H ₂₃ N ₃ O
28	2	CH - 2f	isobutyl	2-NO ₂	311,34	C ₁₇ H ₁₇ N ₃ O ₃
29	2	CH - 2i	isobutyl	4-NO ₂	311,34	C ₁₇ H ₁₇ N ₃ O ₃
30	2	CH - 2j	isobutyl	3-NO ₂	311,34	C ₁₇ H ₁₇ N ₃ O ₃
31	2	CH - 2m	isobutyl	4-Cl	300,79	C ₁₇ H ₁₇ N ₂ OCl
32	2	CH - 2n	isobutyl	3-OH	282,34	C ₁₇ H ₁₈ N ₂ O ₂
33	3	CH - 3c	butyl	2-OH	282,34	C ₁₇ H ₁₈ N ₂ O ₂
34	3	CH - 3d	butyl	4-OH	282,34	C ₁₇ H ₁₈ N ₂ O ₂
35	3	CH - 3e	butyl	4-N(CH ₃) ₂	309,41	C ₁₉ H ₂₃ N ₃ O
36	3	CH - 3f	butyl	2-NO ₂	311,34	C ₁₇ H ₁₇ N ₃ O ₃
37	3	CH - 3i	butyl	4-NO ₂	311,34	C ₁₇ H ₁₇ N ₃ O ₃
38	3	CH - 3j	butyl	3-NO ₂	311,34	C ₁₇ H ₁₇ N ₃ O ₃

Číslo vzorku	Série	Označení vzorku	R1	R2	Molekulová hmotnost	Sumární vzorec
39	3	CH - 3m	butyl	4-Cl	300,79	C ₁₇ H ₁₇ N ₂ OCl
40	3	CH - 3n	butyl	3-OH	282,34	C ₁₇ H ₁₈ N ₂ O ₂
41	4	CH - 4c	propyl	2-OH	268,31	C ₁₆ H ₁₆ N ₂ O ₂
42	4	CH - 4d	propyl	4-OH	268,31	C ₁₆ H ₁₆ N ₂ O ₂
43	4	CH - 4e	propyl	4-N(CH ₃) ₂	295,38	C ₁₈ H ₂₁ N ₃ O
44	4	CH - 4f	propyl	2-NO ₂	297,31	C ₁₆ H ₁₅ N ₃ O ₃
45	4	CH - 4i	propyl	4-NO ₂	297,31	C ₁₆ H ₁₅ N ₃ O ₃
46	4	CH - 4j	propyl	3-NO ₂	297,31	C ₁₆ H ₁₅ N ₃ O ₃
47	4	CH - 4m	propyl	4-Cl	286,76	C ₁₆ H ₁₅ N ₂ OCl
48	4	CH - 4n	propyl	3-OH	268,31	C ₁₆ H ₁₆ N ₂ O ₂
49	10	CH - 10a	isopropyl	3-OCH ₃ , 4-OH	298,34	C ₁₇ H ₁₈ N ₂ O ₃
50	10	CH - 10c	isopropyl	2-OH	268,31	C ₁₆ H ₁₆ N ₂ O ₂
51	10	CH - 10d	isopropyl	4-OH	268,31	C ₁₆ H ₁₆ N ₂ O ₂
52	10	CH - 10f	isopropyl	2-NO ₂	297,31	C ₁₆ H ₁₅ N ₃ O ₃
53	10	CH - 10i	isopropyl	4-NO ₂	297,31	C ₁₆ H ₁₅ N ₃ O ₃
54	10	CH - 10j	isopropyl	3-NO ₂	297,31	C ₁₆ H ₁₅ N ₃ O ₃
55	10	CH - 10m	isopropyl	4-Cl	286,76	C ₁₆ H ₁₅ N ₂ OCl
56	10	CH - 10n	isopropyl	3-OH	268,31	C ₁₆ H ₁₆ N ₂ O ₂

Tabulka 4 Přehled derivátů 1,3-difenylprop-2-en-1-onu

Číslo vzorku	Série	Označení vzorku	R	Molekulová hmotnost	Sumární vzorec
57	0	Ac - 0c	2-OH	224,26	C ₁₅ H ₁₂ O ₂
58	0	Ac - 0d	4-OH	224,26	C ₁₅ H ₁₂ O ₂
59	0	Ac - 0n	3-OH	224,26	C ₁₅ H ₁₂ O ₂
60	0	Ac - 0o	2-OCH ₃	238,28	C ₁₆ H ₁₄ O ₂
61	0	Ac - 0p	3-OCH ₃	238,28	C ₁₆ H ₁₄ O ₂
62	0	Ac - 0q	4-OCH ₃	238,28	C ₁₆ H ₁₄ O ₂

4.2 Použité chemikálie, chromatografický materiál, přístroje, programové vybavení, pomůcky

Chemikálie

- 6 vzorků derivátů 1,3-difenylprop-2-en-1-onu (KFCHaKL, FaF UK)
- 56 vzorků derivátů 3-fenyl-1-pyrazin-2-ylprop-2-en-1-onu (KFCHaKL, FaF UK)
- tetrahydrofuran p.a., Balex, Pardubice – Rosice n. Labem, ČR
- hydrogenfosforečnan sodný dihydrát, Lachema Neratovice, ČR
- methanol p.a., Penta, Praha, ČR
- dimethylsulfoxid
- 25% roztok H_3PO_4
- destilovaná voda

Chromatografický materiál

- TLC desky RP-18 F_{254S}, 20x20 cm, Merck KGaA, Darmstadt, Německo, š. 1.15389.0001
- vyvíjecí vany 22x22x7,5 cm

Přístroje

- analytické digitální váhy Sartorius Analytic, Sartorius AG, Göttingen, Německo
- pH metr SCHOTT CG 843, SCHOTT Instruments GmbH, Mainz, Německo
- detekční UV lampa Camag pro vlnové délky 254 a 366 nm, Camag, Muttenz, Švýcarsko

Programové vybavení

- program ACD/Log *P* verze 1.0, Advanced Chemistry Development Inc., Toronto, Ontario, Kanada
- program HyperChem verze 7.03, Hypercube Inc., Gainesville, Florida, USA

- program ChemDraw Ultra 10.0, ChemOffice 2006, CambridgeSoft Corporation, Cambridge, USA
- Microsoft Office Professional Edition 2003, Microsoft Office Excel 2003, Microsoft Corporation, USA
- On-line dostupné počítačové programy:
 - ALOGPS 2.1, <http://146.107.217.178/lab/alogps/start.html>
 - <http://www.chemaxon.com/demosite/marvin/index.html>,
ChemAxon Kft., Budapešť, Maďarsko

Pomůcky

- poloautomatická pipeta Eppendorf Research 10-100 μ l
- poloautomatická pipeta Finnpiette Thermo-electron corporation 100-1000 μ l
- odměrná baňka 1000 ml
- odměrný válec 100 ml
- pravítko

4.3 Příprava vzorků, chromatografické podmínky, detekce, zpracování dat u TLC

Chromatografické podmínky byly zvoleny na základě struktury a povahy analyzovaných látek a podle informací o užívaných chromatografických systémech získaných z literární rešerše.

Vzhledem k slabě polárnímu charakteru testovaných látek byla zvolena tenkovrstvá chromatografie na obrácených fázích, tedy systém s nepolární stacionární fází a polární mobilní fází.

Vzorky byly připraveny rozpuštěním látek v methanolu tak, aby výsledný roztok měl koncentraci 2 mg/ml. Látky, které nebyly rozpustné v methanolu, byly rozpuštěny ve směsi methanolu s dimethylsulfoxidem v poměru 2:1 ve stejné koncentraci vzorku. Roztoky jednotlivých vzorků pak byly nanášeny na start ve vzdálenosti 1,5 cm od spodního okraje desky.

Mobilní fáze byla připravena smísením tetrahydrofuranu a pufru v různých poměrech. Měření bylo provedeno při pH 7,0 mobilní fází o složení 50, 60, 70, 75 a 80% (v/v) tetrahydrofuranu. Pufry byly připraveny rozpuštěním 1,78 g hydrogenfosforečnanu sodného dihydrátu v destilované vodě a doplněním na 1000 ml. Úprava na požadované pH 7,0 byla provedena na acidimetru postupným přidáváním 25% roztoku kyseliny fosforečné.

Vyvíjecí vana byla sycena parami 100 ml mobilní fáze 30 minut. Poté byly do vyvíjecí vany vloženy desky s nanesenými vzorky a vyvíjení probíhalo do dosažení čela ve vzdálenosti 17 cm od startu. Po vyjmutí z vany byly desky usušeny a skvrny jednotlivých vzorků detekovány. Detekce probíhala pod UV lampou při vlnové délce 254 nm na základě zhášení fluorescence indikátoru obsaženého v tenké vrstvě desky.

Každé měření při daném složení mobilní fáze bylo provedeno dvakrát. K vyhodnocení se zaznamenávala vzdálenost začátku skvrny od startu, vzdálenost konce skvrny od startu a vzdálenost cíle od startu pro každou skvrnu. Z těchto hodnot byl vypočten střed skvrny a hodnota retenčního faktoru R_F . Z průměrných hodnot R_F byly podle vzorce (2) vypočteny hodnoty R_M , které byly dále použity k výpočtu hodnot

R_{MW} . Tyto byly získány lineární extrapolací hodnot R_M do 0% organické fáze, resp. 100% vodné fáze.

Hodnoty R_{MW} byly použity k srovnání vlivu jednotlivých substituentů na lipofilitu a k porovnání s hodnotami $\log P$ získanými z počítačových programů. Hodnoty R_M , R_{MW} a $\log P$ jsou uvedeny v tabulkách uvedených v kapitole 5.

5. VÝSLEDKY A DISKUSE

Cílem této diplomové práce bylo získat hodnoty R_{MW} prostřednictvím hodnot R_M vypočítaných z experimentálně získaných hodnot. Hodnoty R_{MW} pak byly použity ke srovnání příspěvků jednotlivých substituentů k lipofilitě molekuly.

Také byly počítačovými programy vypočítány teoretické hodnoty $\log P$ pro dané molekuly. Byla posouzena korelace mezi těmito hodnotami a experimentálně získanými hodnotami R_{MW} .

Naměřené hodnoty a výsledky porovnání jsou popsány v následujících kapitolách.

5.1 Hodnoty R_M a R_{MW}

V tabulce 5 jsou uvedeny hodnoty R_M a hodnoty R_{MW} . Hodnoty R_M byly získány výpočtem z průměrných hodnot R_F získaných z měření, hodnoty R_{MW} pak lineární extrapolací do 0% organické, resp. 100% vodné fáze z hodnot R_M .

V tabulce jsou uvedeny hodnoty R_M pro jednotlivé koncentrace tetrahydrofuranu v mobilní fázi. Koncentrace jsou 50, 60, 70, 75 a 80%(v/v). Koncentrace 75%(v/v) byla zvolena jako náhrada za 90%(v/v), neboť při takto vysokém zastoupení tetrahydrofuranu v mobilní fázi došlo k rozmytí skvrn a nebylo možné odečtení relevantních hodnot. Koncentraci nižší než 50%(v/v) nebylo možno zvolit, neboť skvrny by zůstaly na startu.

Tabulka 5 Hodnoty R_M získané při různém procentuálním složení mobilní fáze a R_{MW} získané lineární regresí

Číslo vzorku	Označení vzorku	R_M chalkonů a jejich pyrazinových analogů					R_{MW}
		Množství tetrahydrofuranu v mobilní fázi [% (v/v)]					
		50	60	70	75	80	
1	CH - 0a	0,2408	0,0632	-0,1130	-0,2487	-0,3475	1,2338
2	CH - 0b	0,5416	0,3232	0,0831	-0,0559	-0,2073	1,7960
3	CH - 0c	0,3337	0,1414	-0,0657	-0,2118	-0,3391	1,4693
4	CH - 0d	0,3020	0,1172	-0,0714	-0,2091	-0,3446	1,3822
5	CH - 0e	0,4554	0,2429	0,0376	-0,1085	-0,2426	1,6193
6	CH - 0f	0,4965	0,2509	0,0453	-0,1037	-0,2554	1,7284
7	CH - 0i	0,6674	0,3856	0,1323	-0,0368	-0,1863	2,0829
8	CH - 0j	0,6353	0,3632	0,1205	-0,0446	-0,2107	2,0300
9	CH - 0m	0,7426	0,4388	0,1815	0,0152	-0,1503	2,2073
10	CH - 0n	0,3400	0,1385	-0,0586	-0,1915	-0,3489	1,4769
11	CH - 0o	0,4813	0,2508	0,0589	-0,0918	-0,2323	1,6547
12	CH - 0p	0,5589	0,3047	0,0896	-0,0679	-0,2192	1,8379
13	CH - 0q	0,5208	0,2652	0,0637	-0,0860	-0,2234	1,7383
14	CH - 1a	0,7866	0,4202	0,1542	-0,0409	-0,2118	2,4086
15	CH - 1b	1,1519	0,6471	0,3181	0,1198	-0,0751	3,1097
16	CH - 1c	0,8728	0,4582	0,1739	-0,0494	-0,2024	2,6244
17	CH - 1d	0,8342	0,4617	0,1409	-0,0462	-0,2001	2,5440
18	CH - 1e	1,0289	0,5812	0,2130	0,0512	-0,1152	2,8941
19	CH - 1f	1,0594	0,5840	0,2314	0,0328	-0,1405	3,0066
20	CH - 1i	1,2885	0,7308	0,3262	0,1146	-0,0801	3,4987
21	CH - 1j	1,2594	0,6581	0,2785	0,0838	-0,1048	3,4237
22	CH - 1m	1,3908	0,7378	0,3561	0,1450	-0,0383	3,6462
23	CH - 1n	0,8431	0,4586	0,1447	-0,0366	-0,2137	2,5703
24	CH - 2a	0,6786	0,3743	0,1146	-0,0678	-0,2389	2,1890
25	CH - 2c	0,7505	0,4184	0,1326	-0,0624	-0,2358	2,3787
26	CH - 2d	0,6960	0,3923	0,1083	-0,0809	-0,2465	2,2653

Číslo vzorku	Označení vzorku	R _M chalkonů a jejich pyrazinových analogů					R _{MW}
		Množství tetrahydrofuranu v mobilní fázi [% (v/v)]					
		50	60	70	75	80	
27	CH - 2e	0,9136	0,5144	0,2247	0,0219	-0,1542	2,6476
28	CH - 2f	0,9737	0,5113	0,2259	0,0169	-0,1732	2,8027
29	CH - 2i	1,2728	0,6714	0,3269	0,1059	-0,0934	3,4282
30	CH - 2j	1,1974	0,6323	0,2833	0,0797	-0,1268	3,2946
31	CH - 2m	1,2926	0,7130	0,3606	0,1326	-0,0601	3,4455
32	CH - 2n	0,7695	0,4192	0,1658	-0,0380	-0,2472	2,4130
33	CH - 3c	0,7995	0,4771	0,1521	-0,0385	-0,2001	2,4772
34	CH - 3d	0,7662	0,4342	0,1264	-0,0686	-0,2234	2,4177
35	CH - 3e	0,9419	0,5788	0,2411	0,0315	-0,1173	2,7164
36	CH - 3f	0,9853	0,6114	0,2426	0,0280	-0,1272	2,8584
37	CH - 3i	1,2163	0,7567	0,3263	0,1099	-0,0676	3,3557
38	CH - 3j	1,1641	0,7165	0,3136	0,0887	-0,0844	3,2411
39	CH - 3m	1,2859	0,7974	0,3511	0,1265	-0,0283	3,4804
40	CH - 3n	0,8101	0,4942	0,1587	-0,0404	-0,1868	2,5004
41	CH - 4c	0,6581	0,3867	0,0935	-0,1050	-0,2387	2,1871
42	CH - 4d	0,6207	0,3573	0,0848	-0,1146	-0,2443	2,0920
43	CH - 4e	0,7925	0,4925	0,1817	-0,0114	-0,1429	2,3792
44	CH - 4f	0,8283	0,4874	0,1815	-0,0378	-0,1979	2,5423
45	CH - 4i	1,0609	0,6608	0,2768	0,0661	-0,0901	2,9908
46	CH - 4j	1,0075	0,6252	0,2526	0,0517	-0,1111	2,8809
47	CH - 4m	1,1221	0,6993	0,3100	0,0897	-0,0664	3,1093
48	CH - 4n	0,6699	0,3885	0,0875	-0,0947	-0,2151	2,1770
49	CH - 10a	0,5950	0,3377	0,0709	-0,1044	-0,2339	1,9977
50	CH - 10c	0,6759	0,3707	0,0757	-0,1044	-0,2219	2,1897
51	CH - 10d	0,6323	0,3498	0,0742	-0,1210	-0,2370	2,1063
52	CH - 10f	0,8366	0,4909	0,1638	-0,0274	-0,1743	2,5280
53	CH - 10i	1,0428	0,6425	0,2644	0,0324	-0,1076	2,9823
54	CH - 10j	1,0078	0,6424	0,2426	0,0294	-0,1340	2,9461
55	CH - 10m	1,1281	0,6488	0,2975	0,0625	-0,0941	3,1291
56	CH - 10n	0,6598	0,3562	0,0876	-0,1155	-0,2437	2,1750
57	Ac - 0c	0,5465	0,2993	0,0245	-0,1502	-0,3180	2,0035
58	Ac - 0d	0,5185	0,2734	-0,0010	-0,2007	-0,3172	1,9560
59	Ac - 0n	0,5602	0,3044	0,0255	-0,1683	-0,3200	2,0539
60	Ac - 0o	0,6972	0,4162	0,1251	-0,0720	-0,2032	2,2266
61	Ac - 0p	0,7699	0,4721	0,1644	-0,0425	-0,1716	2,3722
62	Ac - 0q	0,7168	0,4325	0,1393	-0,0851	-0,1993	2,2879

5.2 Hodnocení vlivu substituentů na lipofilitu

Z teoretických údajů vyplývá, že existuje přímá závislost mezi R_{MW} a lipofilitou. Čím vyšší je hodnota R_{MW} , tím více je látka lipofilní.

Vliv substituentů na lipofilitu byl posuzován z experimentálně získaných výsledků prostřednictvím hodnot R_{MW} . U pyrazinových analogů chalkonů bylo hodnocení vlivu provedeno u obou substituentů.

U derivátů 1,3-difenyprop-2-en-1-onu (označení Ac-0) byl hodnocen vliv dvou možných substituentů vázaných na jádře. Z měření vyplynulo, že látky substituované methoxyskupinou byly lipofilnější než látky substituované hydroxylovou skupinou. Zároveň se u obou typů substituentů ukázala jako nejvíce lipofilní substituce v poloze *tri*, resp. *meta*-poloze.

U derivátů 3-fenyl-1-pyrazin-2-ylprop-2-en-1-onu byl hodnocen vliv substituentu R_1 a R_2 . V obou případech se hodnotil vliv vždy pouze jednoho substituentu. Výsledky byly hodnoceny v sérii (hodnocení R_2) nebo v řadě (hodnocení R_1).

Při sledování vlivu substituentu R_1 na lipofilitu byly vzaty hodnoty R_{MW} a vzestupně srovnány v každé řadě zvlášť. Substituenty byly vyhodnocovány pouze v řadách, u kterých byly mezi vzorky zastoupeny všechny typy substituentu R_1 , tedy v řadách *c*, *d*, *f*, *i*, *j*, *m* a *n*. U všech řad byl jako nejméně lipofilní shledán derivát v němž $R_1 = H$, a nejvíce lipofilní derivát, v němž $R_1 = \textit{terc}$ -butyl. V případě substituentů propylu a isopropylu nebylo možné podle výsledků jednoznačně vyhodnotit, který více přispívá k lipofilitě molekuly. Celkové pořadí jednotlivých substituentů, řazeno vzestupně, bylo následující: $H < \textit{propyl} = \textit{isopropyl} < \textit{isobutyl} < \textit{butyl} < \textit{terc}$ -butyl. To odpovídá řazení sérií: 0 - 4, 10 - 2 - 3 - 1.

Srovnání ovlivnění lipofility substituentem R_2 bylo provedeno u následujících substituentů: 2-OH, 3-OH, 4-OH, 2-NO₂, 3-NO₂, 4-NO₂, 4-Cl, 4-N(CH₃)₂ a (3-OCH₃, 4-OH). Bylo tedy hodnoceno celkem 8 řad substituentů: *a*, *c*, *d*, *e*, *f*, *i*, *j*, *m* a *n*. Řady *b*, *o*, *p* a *q* nemohly být zhodnoceny pro nedostatek získaných údajů. Porovnávány byly vzorky vždy v sérii. Podle výsledků nejméně přispívají k lipofilitě methoxyskupina v poloze 3 a hydroxylová skupina v poloze 4, jsou-li navázány na téže

molekule zároveň. Nejvíce naopak lipofilitu zvyšuje chlor navázaný v poloze 4. Výsledné pořadí substituentů od nejméně k nejvíce lipofilizujícím je následující:

(3-OCH₃,

4-OH) < 4-OH < 2-OH < 3-OH < 4-N(CH₃)₂ < 2-NO₂ < 3-NO₂ < 4-NO₂ < 4-Cl.

Odpovídající řazení řad: *a - d - c - n - e - f - i - j - m*.

5.3 Hodnoty log P

Hodnoty log *P* byly získány z počítačových programů, které jsou k tomuto účelu používány. Tyto hodnoty jsou uvedeny v tabulkách 6 a 7. V tabulce 6 jsou uvedeny hodnoty log *P* získané z komerčních počítačových programů, v tabulce 7 hodnoty z on-line bezplatně dostupných programů.

Jednotlivé hodnoty získané z různých programů se liší, neboť využívají různé metody výpočtu log *P* (viz kap. 2.5). Bylo zjištěno, že většina programů použitých v této diplomové práci nedělá rozdíly v hodnotě log *P* v případě stejného substituentu, který je pouze navázán v jiné poloze.

Hodnoty log *P* jsou vypočítány pro nedisociovanou molekulu.

Tabulka 6 Hodnoty log *P* vypočtené komerčními počítačovými programy

Číslo vzorku	Označení vzorku	R1	R2	ChemDraw	ACD/Log P	HyperChem
1	CH - 0a	H	3-OCH ₃ , 4-OH	0,82	2,12	2,309
2	CH - 0b	H	H	1,33	2,35	2,846
3	CH - 0c	H	2-OH	0,94	1,61	2,562
4	CH - 0d	H	4-OH	0,94	2,36	2,562
5	CH - 0e	H	4-N(CH ₃) ₂	1,62	2,45	3,110
6	CH - 0f	H	2-NO ₂	1,32	2,08	2,800
7	CH - 0i	H	4-NO ₂	1,32	2,08	2,800
8	CH - 0j	H	3-NO ₂	1,32	2,08	2,800
9	CH - 0m	H	4-Cl	1,89	2,94	3,364
10	CH - 0n	H	3-OH	0,94	2,26	2,562
11	CH - 0o	H	2-OCH ₃	1,21	2,35	2,593
12	CH - 0p	H	3-OCH ₃	1,21	2,32	2,593
13	CH - 0q	H	4-OCH ₃	1,21	2,29	2,593
14	CH - 1a	<i>terc</i> -butyl	3-OCH ₃ , 4-OH	2,95	3,81	3,870
15	CH - 1b	<i>terc</i> -butyl	H	3,46	4,03	4,407
16	CH - 1c	<i>terc</i> -butyl	2-OH	3,07	3,30	4,123
17	CH - 1d	<i>terc</i> -butyl	4-OH	3,07	4,05	4,123
18	CH - 1e	<i>terc</i> -butyl	4-N(CH ₃) ₂	3,75	4,14	4,672
19	CH - 1f	<i>terc</i> -butyl	2-NO ₂	3,43	3,76	4,361
20	CH - 1i	<i>terc</i> -butyl	4-NO ₂	3,43	3,76	4,361
21	CH - 1j	<i>terc</i> -butyl	3-NO ₂	3,43	3,76	4,361
22	CH - 1m	<i>terc</i> -butyl	4-Cl	4,02	4,63	4,925
23	CH - 1n	<i>terc</i> -butyl	3-OH	3,07	3,95	4,123
24	CH - 2a	isobutyl	3-OCH ₃ , 4-OH	2,76	3,99	3,689
25	CH - 2c	isobutyl	2-OH	2,88	3,48	3,942
26	CH - 2d	isobutyl	4-OH	2,88	4,23	3,942
27	CH - 2e	isobutyl	4-N(CH ₃) ₂	3,56	4,32	4,490
28	CH - 2f	isobutyl	2-NO ₂	3,08	3,95	4,180

Číslo vzorku	Označení vzorku	R1	R2	ChemDraw	ACD/Log P	HyperChem
29	CH - 2i	isobutyl	4-NO ₂	3,08	3,95	4,180
30	CH - 2j	isobutyl	3-NO ₂	3,08	3,95	4,180
31	CH - 2m	isobutyl	4-Cl	3,83	4,81	4,744
32	CH - 2n	isobutyl	3-OH	2,88	4,13	3,942
33	CH - 3c	butyl	2-OH	2,97	3,66	4,007
34	CH - 3d	butyl	4-OH	2,97	4,41	4,007
35	CH - 3e	butyl	4-N(CH ₃) ₂	3,64	4,51	4,556
36	CH - 3f	butyl	2-NO ₂	3,34	4,13	4,245
37	CH - 3i	butyl	4-NO ₂	3,34	4,13	4,245
38	CH - 3j	butyl	3-NO ₂	3,34	4,13	4,245
39	CH - 3m	butyl	4-Cl	3,92	4,99	4,810
40	CH - 3n	butyl	3-OH	2,97	4,31	4,007
41	CH - 4c	propyl	2-OH	2,55	3,13	3,611
42	CH - 4d	propyl	4-OH	2,55	3,88	3,611
43	CH - 4e	propyl	4-N(CH ₃) ₂	3,23	3,98	4,160
44	CH - 4f	propyl	2-NO ₂	2,88	3,60	3,849
45	CH - 4i	propyl	4-NO ₂	2,88	3,60	3,849
46	CH - 4j	propyl	3-NO ₂	2,88	3,60	3,849
47	CH - 4m	propyl	4-Cl	3,50	4,46	4,413
48	CH - 4n	propyl	3-OH	2,55	3,78	3,611
49	CH - 10a	isopropyl	3-OCH ₃ , 4-OH	2,41	3,46	3,365
50	CH - 10c	isopropyl	2-OH	2,53	2,95	3,618
51	CH - 10d	isopropyl	4-OH	2,53	3,70	3,618
52	CH - 10f	isopropyl	2-NO ₂	2,63	3,41	3,856
53	CH - 10i	isopropyl	4-NO ₂	2,63	3,41	3,856
54	CH - 10j	isopropyl	3-NO ₂	2,63	3,41	3,856
55	CH - 10m	isopropyl	4-Cl	3,48	4,28	4,420
56	CH - 10n	isopropyl	3-OH	2,53	3,60	3,618
57	Ac - 0c	H	2-OH	3,20	3,28	3,392
58	Ac - 0d	H	4-OH	3,20	4,03	3,392
59	Ac - 0n	H	3-OH	3,20	3,93	3,392
60	Ac - 0o	H	2-OCH ₃	3,46	4,02	3,423
61	Ac - 0p	H	3-OCH ₃	3,46	3,99	3,423
62	Ac - 0q	H	4-OCH ₃	3,46	3,96	3,423

Tabulka 7 Hodnoty log *P* vypočtené on-line dostupnými počítačovými programy

Číslo vzorku	Označení vzorku	ALOGPS 2.1							ChemAxon
		A logP	IA logP	AB/logP	COSMOFrag	mi logP	Kowwin	X logP	
1	CH - 0a	1,87	1,62	1,53	1,86	1,68	0,95	1,43	1,162
2	CH - 0b	1,85	1,73	2,30	2,31	2,34	1,60	1,92	1,699
3	CH - 0c	1,75	1,81	1,68	2,04	2,11	1,12	1,51	1,415
4	CH - 0d	1,76	1,54	1,68	1,65	1,87	1,12	1,51	1,415
5	CH - 0e	2,08	2,16	2,58	3,29	2,45	1,78	2,13	1,964
6	CH - 0f	1,73	0,93	2,09	2,10	2,08	1,42	1,81	1,653
7	CH - 0i	1,72	1,04	2,09	2,12	2,30	1,42	1,81	1,653
8	CH - 0j	1,72	0,98	2,09	2,23	2,28	1,42	1,81	1,653
9	CH - 0m	2,37	2,21	2,87	2,71	3,02	2,25	2,54	2,217
10	CH - 0n	1,76	1,37	1,68	1,72	1,84	1,12	1,51	1,415
11	CH - 0o	1,86	1,97	2,26	2,95	2,17	1,69	1,83	1,447
12	CH - 0p	1,86	2,01	2,26	2,63	2,38	1,69	1,83	1,447
13	CH - 0q	1,88	2,08	2,26	2,58	2,40	1,69	1,83	1,447
14	CH - 1a	3,64	3,31	3,15	4,13	3,63	2,86	2,49	3,189
15	CH - 1b	3,55	3,00	3,92	4,56	4,29	3,51	2,98	3,726
16	CH - 1c	3,57	2,92	3,30	4,32	4,05	3,03	2,57	3,441
17	CH - 1d	3,58	2,94	3,30	3,92	3,81	3,03	2,57	3,441
18	CH - 1e	4,33	3,40	4,20	5,54	4,39	3,69	3,19	3,990
19	CH - 1f	3,71	2,69	3,71	4,34	4,02	3,33	2,87	3,679
20	CH - 1i	3,72	2,78	3,71	4,36	4,25	3,33	2,87	3,679
21	CH - 1j	3,71	2,68	3,71	4,46	4,22	3,33	2,87	3,679
22	CH - 1m	4,13	2,84	4,49	4,99	4,97	4,16	3,60	4,244
23	CH - 1n	3,57	2,31	3,30	3,99	3,79	3,03	2,57	3,441
24	CH - 2a	3,44	3,28	3,16	4,19	3,22	2,90	3,07	2,688
25	CH - 2c	3,30	3,21	3,31	4,38	3,64	3,07	3,16	2,941
26	CH - 2d	3,32	3,03	3,31	3,98	3,40	3,07	3,16	2,941
27	CH - 2e	4,12	3,68	4,21	5,60	3,99	3,73	3,77	3,489
28	CH - 2f	3,66	2,73	3,72	4,41	3,62	3,37	3,45	3,179
29	CH - 2i	3,70	2,83	3,72	4,42	3,84	3,37	3,45	3,179
30	CH - 2j	3,68	2,74	3,72	4,53	3,82	3,37	3,45	3,179
31	CH - 2m	3,32	3,43	4,50	5,05	4,56	4,20	4,18	3,743
32	CH - 2n	3,32	2,49	3,31	4,06	3,38	3,07	3,16	2,941
33	CH - 3c	3,48	3,60	3,54	4,59	3,96	3,15	3,22	3,006
34	CH - 3d	3,48	3,15	3,54	4,18	3,72	3,15	3,22	3,006
35	CH - 3e	4,07	3,81	4,44	5,81	4,30	3,80	3,83	3,555
36	CH - 3f	3,50	2,80	3,95	4,61	3,93	3,44	3,52	3,244
37	CH - 3i	3,68	2,91	3,95	4,62	4,16	3,44	3,52	3,244
38	CH - 3j	3,57	2,82	3,95	4,73	4,14	3,44	3,52	3,244
39	CH - 3m	4,08	3,75	4,73	5,26	4,88	4,27	4,25	3,809
40	CH - 3n	3,49	2,66	3,54	4,26	3,70	3,15	3,22	3,006
41	CH - 4c	3,08	2,95	3,06	3,92	3,40	2,65	2,65	2,610
42	CH - 4d	3,12	2,71	3,06	3,52	3,16	2,65	2,65	2,610
43	CH - 4e	3,63	3,38	3,96	5,15	3,74	3,31	3,26	3,159
44	CH - 4f	3,03	2,35	3,47	3,95	3,37	2,95	2,95	2,848
45	CH - 4i	3,10	2,47	3,47	3,96	3,60	2,95	2,95	2,848
46	CH - 4j	3,12	2,37	3,47	4,07	3,58	2,95	2,95	2,848

Číslo vzorku	Označení vzorku	ALOGPS 2.1							ChemAxon
		A logP	IA logP	AB/logP	COSMOFrag	mi logP	Kowwin	X logP	
47	CH - 4m	3,59	3,36	4,25	4,60	4,32	3,78	3,68	3,413
48	CH - 4n	3,11	2,26	3,06	3,60	3,14	2,65	2,65	2,610
49	CH - 10a	3,06	2,77	2,68	3,74	2,96	2,41	2,29	2,524
50	CH - 10c	2,99	2,71	2,83	3,93	3,38	2,58	2,37	2,776
51	CH - 10d	3,02	2,56	2,83	3,53	3,14	2,58	2,37	2,776
52	CH - 10f	3,13	2,21	3,24	3,95	3,35	2,88	2,67	3,014
53	CH - 10i	3,18	2,33	3,24	3,96	3,58	2,88	2,67	3,014
54	CH - 10j	3,15	2,23	3,24	4,07	3,56	2,88	2,67	3,014
55	CH - 10m	3,29	3,12	4,02	4,60	4,30	3,71	3,40	3,579
56	CH - 10n	3,00	2,10	2,83	3,61	3,12	2,58	2,37	2,776
57	Ac - 0c	3,80	3,14	3,09	3,57	3,57	3,18	3,44	3,640
58	Ac - 0d	3,79	3,41	3,09	3,33	3,33	3,18	3,44	3,640
59	Ac - 0n	3,80	3,21	3,09	3,29	3,31	3,18	3,44	3,640
60	Ac - 0o	3,50	3,85	3,67	4,48	3,64	3,74	3,76	3,671
61	Ac - 0p	3,53	3,89	3,67	4,18	3,84	3,74	3,76	3,671
62	Ac - 0q	3,54	3,96	3,67	4,25	3,87	3,74	3,76	3,671

5.4 Vzájemná korelace R_{MW} a $\log P$

Dalším úkolem této diplomové práce bylo posoudit vzájemnou korelaci dvou lipofilitních parametrů - R_{MW} a $\log P$. Korelace mezi R_{MW} a $\log P$ byla zhodnocena pro každý program zvlášť metodou lineární regrese, která měla prokázat lineární závislost mezi R_{MW} a $\log P$. Obecný tvar rovnice regresní přímky:

$$y = k \cdot x + q$$

Korelace byla zhodnocena pouze pro 56 derivátů 3-fenyl-1-pyrazin-2-ylprop-2-en-1-onu, neboť pro posouzení derivátů 1,3-difenylprop-2-en-1-onu nebyl k dispozici dostatečně velký počet látek k posouzení.

V tabulce 8 jsou zaznamenány parametry lineární regrese pro jednotlivá srovnání. Parametr n představuje velikost skupiny prvků, v tomto případě počet vzorků. Směrnice k a absolutní člen q jsou parametry lineární rovnice. Korelační koeficient R vyjadřuje míru linearitu. Parametr s_{rez} je reziduální odchylka, F určuje statistickou míru rozptylu dvou vybraných souborů.

Obecně platí, že čím je R blíže hodnotě jedna, tím je závislost lineárnější.

Tabulka 8 Parametry korelace hodnot R_{MW} a $\log P$ podle jednotlivých programů

	n	k	q	R	s_{rez}	F	
ChemDraw	56	1,256 ± 0,094	(-0,49) ± 0,24	0,877	0,427	179	
ACD/LogP	56	1,03 ± 0,11	0,95 ± 0,29	0,775	0,520	81,4	
HyperChem	56	0,977 ± 0,068	1,33 ± 0,17	0,891	0,308	208	
ALOGPS 2.1	ALOGP	56	0,985 ± 0,100	0,63 ± 0,26	0,802	0,454	97,4
	IALOGP	56	0,66 ± 0,12	0,93 ± 0,31	0,596	0,553	29,8
	AB/log P	56	1,135 ± 0,081	0,40 ± 0,21	0,884	0,371	194
	COSMOFRAG	56	1,32 ± 0,14	0,58 ± 0,35	0,796	0,622	93,2
	miLOGP	56	1,196 ± 0,073	0,44 ± 0,19	0,913	0,332	270
	KOWWIN	56	1,222 ± 0,088	(-0,26) ± 0,23	0,885	0,399	194
XLOGP	56	0,944 ± 0,088	0,42 ± 0,23	0,824	0,402	114	
ChemAxon	56	1,122 ± 0,083	0 ± 0,21	0,878	0,378	182	

Spolehlivost závislosti x na y byla ve všech případech 99,9%. Hodnoty koeficientu korelace se pohybují v rozmezí 0,775 – 0,913. Pouze u programu IALOGP byla hodnota korelačního koeficientu 0,596.

Z výsledků vyplývá, že program IALOGP není pro výpočet lipofilitních parametrů u této série látek vyhovující. Jako nejlépe korelující se ukázaly hodnoty z programu miLOGP a HyperChem. Je možné stanovit následující celkové pořadí: miLOGP – HyperChem – KOWWIN – AB/log P – ChemAxon – ChemDraw – XLOGP – ALOGP – COSMOFRAG – ACD/Log P – IALOGP.

Výše zmíněné hodnoty ukazují, že hodnoty log P vypočítané počítačovými programy velmi dobře korelují s hodnotami R_{MW} získanými experimentálně. Také je patrné, že hodnoty z volně dostupných programů korelují stejně dobře jako hodnoty z komerčních programů. Nelze tedy říci, že komerční programy jsou lepší než volně přístupné a naopak. Také nelze rozhodnout jaký přístup softwaru k výpočtu je vhodnější (viz kapitola 2.5). HyperChem a miLOGP, které se ukázaly jako nejlepší, sice využívají fragmentální přístup, ale stejně tak i IALOGP, který se ukázal jako naprosto nevyhovující. Záleží tedy na každém programu jak rozsáhlé databáze využívá. Čím rozsáhlejší databáze hodnot, tím těsnější by měla být korelace teoretických hodnot s experimentálními.

6. ZÁVĚR

V této diplomové práci byla provedena literární rešerše zaměřená na vyhledání informací o využití RP-TLC ve studiích lipofility a o užívaných experimentálních podmínkách. Bylo zjištěno, že nejčastěji užívanou stacionární fází je silikagel s kovalentně vázanými alifatickými uhlovodíkovými řetězci o délce 18 uhlíků. Mezi mobilními fázemi převládá směs methanolu, acetonu nebo acetonitrilu s vodou, případně s pufrem.

Dále byla provedena studie lipofility 62 látek metodou RP-TLC. Byly získány hodnoty R_{MW} .

Lipofilní parametr R_{MW} byl využit ke zhodnocení vlivu jednotlivých substituentů na lipofilitu molekuly. U derivátů chalkonů se ukázalo, že lipofilitu více zvyšuje hydroxylová skupina než methoxyskupina. Substituce v *meta*-poloze měla na lipofilitu v rámci testovaných substituentů největší vliv. U derivátů pyrazinových analogů chalkonů byly zhodnoceny dva způsoby substituce: v případě substituce na fenolovém jádře lipofilitu nejvíce zvyšoval v poloze 4 navázaný chlor; významně ji zvyšovala také nitroskupina. Ze substituentů na pyrazinovém jádře se ukázal jako nejvíce lipofilizující *tert*-butyl, nejméně pak vodík.

Dále byly u pyrazinových analogů chalkonů srovnány experimentální hodnoty R_{MW} s teoretickými hodnotami $\log P$ získanými prostřednictvím počítačových programů ChemDraw, ACD/log P, HyperChem, ChemAxon a ze souboru programů ALOGPS 2.1. Bylo posouzeno, zda hodnoty R_{MW} a $\log P$ vykazují lineární korelaci.

Metodou lineární regrese bylo zjištěno, že všechny použité programy vykazují lineární korelaci $\log P$ a R_{MW} . Jako nejvýhodnější ke studiu lipofility těchto analyzovaných látek se ukázaly on-line volně dostupný program miLOGP, který je součástí ALOGPS 2.1, a komerční program HyperChem. Jako nevhodný se ukázal program IALOGP, který je také součástí ALOGPS 2.1 a který vykazoval korelační koeficient pouze 0,596.

Vzhledem k získaným výsledkům korelace experimentálních a počítačovým programem vypočítaných hodnot nelze určit, zda jsou lepší komerční programy nebo on-line volně dostupné programy. Korelační koeficienty se pohybovaly v rozmezí 0,775 až 0,913 a jako lépe i hůře korelující se ukázaly volně dostupné i placené programy.

7. LITERATURA

1. ABRAHAM, M.H. et al. *J. Chromatogr. A* **749** (1996), p. 201-209
2. DROSS, K. et al. *J. Chromatogr. A* **673** (1994), p. 113-124
3. LINCOVÁ, D. et al. *Základní a aplikovaná farmakologie*. Praha : Galén, 2002. p. 5-7
4. PERUZZO, P.J. et al. *Internet. Electron. J. Mol. Des.* **2** (2003), p. 334-347
5. BALOGH, G.T. et al. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **39** (2005), p. 1057-1062
6. HARTL, J.; PALÁT, K. *Farmaceutická chemie I*. Praha : Karolinum, 2001. p. 95-97
7. LIU X. et al. *J. Chromatogr. A* **1091** (2005), p. 51-59
8. MAZÁK, K. et al. *J. Chromatogr. A* **996** (2003), p. 195-203
9. DANIELSSON, L.; ZHANG, Y. *Trends Analyt. Chem.* **15** (1996), p. 188-196
10. PODEŠŤOVÁ, D. *Diplomová práce*. Hradec Králové, 1998.
11. EARLL M. *A guide to Log P and pKa measurements and their use*. Available from <http://www.raell.demon.co.uk/chem/logp/logppka.htm>
12. POOLE, S.K.; POOLE, C.F. *J. Chromatogr. B* **797** (2003), p. 3-19
13. VALKÓ, K. *J. Chromatogr. A* **1037** (2004), p. 299-310
14. SÂRBU, C. et al. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **30** (2002), p. 739-745
15. MRKVIČKOVÁ, Z. *Diplomová práce*. Hradec Králové, 2004
16. KLIMEŠ, J. et al. *Kontrola léčiv I*. Praha : Karolinum, 2002. p. 22-23
17. KARLÍČEK, R. et al. *Analytická chemie pro farmaceuty*. Praha : Karolinum, 2005. p. 267-271
18. AČANSKI, M.M. et al. *J. Serb. Chem. Soc.* **68** (2003), p. 57-63
19. SŁAWIK, T.; KOWALSKI, C. *J. Chromatogr. A* **952** (2002), p. 295-299
20. BHAL, S.K. *LogP-Making Sense of the Value*. Available from http://www.acdlabs.com/download/app/physchem/making_sense.pdf
21. VOLECHOVÁ, S. *Diplomová práce*. Hradec Králové, 2002.
22. HOLZBECHER, Z.; CHURÁČEK, J. et al. *Analytická chemie*. Praha : SNTL/ALFA, 1987. p. 413-416, 465-474
23. MIKEŠ, O. et al. *Laboratorní chromatografické metody*. Praha : SNTL, 1980.
24. GASPARIČ, J.; CHURÁČEK, J. *Papírová a tenkovrstvá chromatografie organických sloučenin*. Praha : SNTL, 1981.
25. *Unique Thin layer chromatography by Merck – traditionally inovative*. Available from <http://chrombook.merck.de/chrombook/index.jsp>
26. POOLE, C.F. *J. Chromatogr. A* **856** (1999), p. 399-427

27. POOLE, C.F. *J. Chromatogr. A* **1000** (2003), p. 963-984
28. STAHL, E. *Thin-Layer Chromatography. A Laboratory Handbook*. Springer-Verlag, 1967. 2. vydání
29. POOLE, C.F.; DIAS, N.C. *J. Chromatogr. A* **892** (2000), p. 123-142
30. BAUER, K.; GROS, L.; SAUER, W. *Thin Layer Chromatography – An Introduction*. Heidelberg : Hüthnig Buch Verlag GmbH, 1991.
31. MANNHOLD, R.; VAN DE WATERBEEMD, H. *J. Comput. Aided Mol. Des.* **15** (2001), p. 337-354
32. GARGADENNEC, S. et al. *Pharm. Res.* **22** (2005), p. 875-882
33. LESYK, R. et al. *Bioorg. Med. Chem.* **14** (2006), p. 5230-5240
34. TRAPANI, G. et al. *Int. J. Pharm.* **166** (1995), p. 95-99
35. ŞECLĂMAN, E. et al. *Dyes Pigments* **55** (2002), p. 69-77
36. DROSS, K. et al. *J. Chromatogr.* **639** (1993), p. 287-294
37. CSERHÁTI, T. et al. *J. Chromatogr. B* **753** (2001), p. 87-92
38. CIMPAN, G. et al. *J. Chromatogr. A* **869** (2000), p. 49-55
39. CSERHÁTI, T.; FORGÁCS, E. *J. Biochem. Biophys. Methods.* **41** (1999), p. 21-30
40. BIAGI, G.L. et al. *J. Chromatogr. A* **678** (1994), p. 127-137
41. CSERHÁTI, T. *J. Biochem. Biophys. Methods.* **27** (1993), p. 133-142
42. KASTNER, P. et al. *J. Chromatogr. A* **766** (1997), p. 165-170
43. BIAGI, G.L. et al. *J. Chromatogr. A* **662** (1994), p. 341-361
44. CSERHÁTI, T.; MAGYAR, K. *J. Biochem. Biophys. Methods.* **24** (1994), p. 249-264
45. GOCAN, S. et al. *J. Chromatogr. A* **675** (1994), p. 282-285
46. MRKVIČKOVÁ Z. et al. *JPC - J. Planar Chromatogr.* **19** (2006), p. 422-426