

UNIVERZITA KARLOVA
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

Katedra analytické chemie



**VÝVOJ NOVÝCH METOD ULTRA-VYSOKOÚČINNÉ SUPERKRITICKÉ
FLUIDNÍ CHROMATOGRAFIE PRO FARMACEUTICKÉ APLIKACE**

Dizertační práce

Školitel: prof. Pharm.Dr. Lucie Nováková, Ph.D.

Hradec Králové 2020

Mgr. Kateřina Plachká

Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem, které jsem vypracovala samostatně pod vedením svého školitele. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány. Práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

Hradec Králové, 24. 02. 2020

Mgr. Kateřina Plachká

PODĚKOVÁNÍ

Ráda bych poděkovala své školitelce prof. PharmDr. Lucii Novákové, Ph.D. za odborné vedení, pomoc, cenné rady a všechny možnosti k profesnímu i osobnímu růstu, které mi nabídla během celého mého studia.

Děkuji také panu profesoru Solichovi, vedoucímu katedry, za možnost absolvovat zahraniční stáže a prezentovat své výsledky na tuzemských i zahraničních konferencích. Tyto zkušenosti obohatily nejen profesní, ale také můj osobní život.

Velké poděkování patří všem kolegům z Katedry analytické chemie za pomoc, vstřícnost, a především přátelský přístup. Velmi oceňuji vaši ochotu a podporu. Děkuji, že jsem u vás měla vždy otevřené dveře, ať jsem přišla s jakýmkoli problémem.

Také bych na tomto místě ráda poděkovala kolegům ze zahraničí, jmenovitě dr. Jean-Christophe Garriguesovi a jeho výzkumné skupině z Univerzity Toulouse a dr. Davy Guillarmeovi a jeho týmu z Univerzity Ženeva za možnost absolvovat na jejich pracovišti odbornou stáž, za možnost rozšířit si znalosti a také za příjemný čas v zahraničí.

Práce vznikla za finanční podpory Specifického vysokoškolského výzkumu SVV 260 412, Grantové agentury Univerzity Karlovy (projekty č. 1574517, 274216, 1948214 a 1828218), a projektu STARSS (CZ.02.1.01/0.0/0.015_003/0000465). Děkuji také programu Erasmus+ za finanční podporu na zahraniční stáži.

ABSTRAKT

Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra analytické chemie

Kandidát: Mgr. Kateřina Plachká

Školitel: prof. Pharm.Dr. Lucie Nováková, Ph.D.

Název dizertační práce: Vývoj nových metod ultra-vysokoúčinné superkritické fluidní chromatografie pro farmaceutické aplikace

V předložené dizertační práci je prezentován komentovaný soubor sedmi publikací a tří kapitol v odborných knihách, které jsou zaměřené na využití metod superkritické fluidní chromatografie (SFC) ve farmaceutické analýze.

První část je zaměřená na farmaceutickou kontrolu kvality s důrazem na kontrolu nečistot. Publikace se zabývají jak hledáním generického přístupu k vývoji SFC metod pro monitorování nečistot, tak následující optimalizací a validací těchto metod. Screeningové podmínky byly porovnány na základě vyvinutého matematického modelu. Na základě výsledků byla jako startovní bod pro vývoj SFC metod navrhována generická kombinace diolové stacionární fáze a 0,1 % hydroxidu amonného v methanolu jako modifikátoru nadkritického CO₂.

Během následujících optimalizací bylo popsáno několik typických problémů vývoje SFC metod a bylo navrženo jejich řešení. Jako velmi přínosný se prokázal přídavek acetonitrilu do modifikátoru mobilní fáze, spojování kolon a náhrada SFC-dedikované kolony za LC kolonu s toutéž C18 stacionární fází. V dalším kroku byly všechny vyvinuté metody validovány na základě mezinárodních směrnic ICH. Mimo tradiční přístup zahrnující potvrzení linearity, mezí detekce a stanovitelnosti, rozsahu, selektivity, správnosti a přesnosti na požadovaných koncentračních hladinách byl na vybrané metody aplikován také přístup vyhodnocení celkové chyby měření.

Jelikož pro použitelnost SFC metod v praxi musí být prokázána také jejich mezilaboratorní přenositelnost, byla s metodou SFC pro stanovení nečistot účinné látky salbutamolu provedena také studie opakovatelnosti zahrnující 19 pracovišť z 9 zemí. Statistickým zpracováním získaných výsledků byla potvrzena spolehlivost dané SFC

metody, kdy hodnoty reprodukovatelnosti byly stejné nebo dokonce lepší než ty u metody kapalinové chromatografie (LC).

Během dlouhodobě měřeného SFC projektu zaměřeného na kontrolu nečistot byly pozorovány změny retenčních časů analytů, což může způsobit, že vyvíjené metody nelze aplikovat v přísně regulovaném prostředí farmaceutické kontroly. Tento problém byl adresován v další z publikací, kdy byla sledována změna retenčních časů 70 analytů v průběhu 1 roku na sadě 8 kolon. Tyto posuny byly porovnány na jednotlivých kolonách a byly popsány praktické důsledky těchto změn.

Pro stanovení nečistot v tabletách agomelatinu byla vyvinuta jak SFC, tak LC metoda. Obě metody byly plně validovány a následně porovnány ve vybraných parametrech. Obdobný přístup byl zvolen také při vývoji chromatografických metod pro stanovení vitamínu E v potravinových doplňcích. Jelikož se vitamín E v přírodě vyskytuje v 8 formách a přípravky mohou obsahovat jak rostlinný extrakt, tak syntetický tokoferol acetát, vyvinuté metody musely být schopné separovat těchto 9 strukturně podobných látek. Přestože vyvinutá LC metoda je nejkratší prozatím publikovanou LC metodou pro stanovení tokoferolů a tokotrienolů, SFC metoda byla stále více než 2x rychlejší. Po validaci byla tato SFC metoda použita pro hodnocení kvality 8 potravinových doplňků.

Druhou část dizertační práce tvoří kapitoly publikované v odborných knihách a přehledový článek, které shrnují teoretické poznatky o SFC technice a praktické poznatky o využití v mnoha aplikačních oblastech, jako je farmaceutická analýza, bioanalýza a další.

Obdržené výsledky prokázaly vysoký potenciál rychlých SFC metod pro využití i v přísně regulovaném prostředí farmaceutické analýzy.

ABSTRACT

Charles University, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Analytical Chemistry

Candidate: Mgr. Kateřina Plachká

Supervisor: prof. Pharm.Dr. Lucie Nováková, Ph.D.

Title of Doctoral Thesis: The development of new methods of ultra-high performance supercritical fluid chromatography for pharmaceutical applications

A compilation of seven articles and three book chapters dealing with the applicability of supercritical fluid chromatography (SFC) methods in the field of pharmaceutical analysis is presented in this dissertation thesis.

The first part focuses on pharmaceutical quality control and especially impurity control. The presented articles are dealing with the searching for generic screening approach for the development of SFC methods and with the subsequent optimization and validation of these methods. The screening conditions were compared based on developed mathematical model. The generic combination of diol stationary phase and 0.1 % ammonium hydroxide in methanol as modifier of CO₂-based mobile phase was proposed as a starting point for SFC method development based on the obtained results.

Several challenges were described during optimization of UHPSFC methods and their solution was proposed. The benefits of acetonitrile added to the modifier, advantages of column coupling and the usage of LC-dedicated C18 column instead of SFC-dedicated C18 stationary phase were emphasized. In the next step, all developed methods were validated according to international guidelines ICH. Validated parameters included linearity, limit of detection and quantification, range, selectivity, accuracy, and precision at specific concentration levels. Moreover, validation using total error approach was applied on several selected methods.

The interlaboratory precision has to be proven before the use of SFC method in pharmaceutical laboratories. Therefore, a comparative study using SFC method for the determination of active pharmaceutical ingredient salbutamol and its impurities was

carried out in 19 laboratories in 9 countries. Statistic evaluation confirmed the method reproducibility with results comparable or even better than for LC method.

Retention time shifts were observed for analytes during long-term SFC project dealing with impurity control. These unrepeatable retention times can cause inapplicability of such methods in strictly controlled pharmaceutical quality control. This issue was addressed in another of presented studies in which the retention times of 70 analytes were observed during analysis over 1 year on set of 8 columns. These retention time shifts were compared on each column and their practical implications were described.

SFC as well as LC method was developed for the determination of impurities in agomelatine tablets. Both these methods were fully validated and subsequently compared in selected parameters. Similar approach was used for the development of chromatographic method for the determination of vitamin E in dietary supplements. Vitamin E exists in nature in 8 forms and dietary supplements can contain natural extracts and/or synthetic tocopherol acetate. Therefore, the developed method had to be able to separate these 9 structurally close compounds. The developed LC method was the fastest LC method for the determination of tocopherols and tocotrienols published so far. Nevertheless, the analysis time of the SFC method was still more than two times shorter. Therefore, the SFC method was validated and subsequently applied on 8 dietary supplements.

The second part of this dissertation thesis is a compilation of a review article and three book chapters summarizing theoretical aspects of SFC technique and practical findings about its use in several application fields such as pharmaceutical analysis, bioanalysis, and others.

Obtained results proved a high potential of fast SFC methods for their application even in strictly control field of pharmaceutical analysis.

OBSAH

1. Úvod.....	12
2. Cíl práce	13
3. Teoretická část.....	14
3.1 Superkritická fluidní chromatografie	14
3.1.1 Nadkritická tekutina.....	14
3.1.2 Historický vývoj superkritické fluidní chromatografie	16
3.1.3 Současná instrumentace superkritické fluidní chromatografie.....	18
3.1.4 Výhody superkritické fluidní chromatografie	23
3.1.5 Parametry vývoje metody.....	24
3.1.6 Aplikační oblasti superkritické fluidní chromatografie	28
3.2 Farmaceutická analýza	30
3.2.1 Vývoj léčiva	30
3.2.2 Požadavky na analytické metody využívané ve vývoji léčiv.....	31
3.2.3 Možnosti využití SFC ve farmaceutické analýze	33
3.2.3.1 Analýza léčivých látek a léčivých přípravků.....	33
3.2.3.2 Analýza léčivých látek a jejich metabolitů v biologickém materiálu	36
4. Komentáře k publikovaným pracím zahrnutým v dizertační práci.....	39
4.1. Vývoj, validace a srovnání UHPSFC a UHPLC metody pro stanovení agomelatinu a jeho nečistot	39
4.2. Ultra-vysokoúčinná superkritická fluidní chromatografie v kontrole nečistot: Hledání generického přístupu ke screeningu	42
4.3. Ultra-vysokoúčinná superkritická fluidní chromatografie v kontrole nečistot: Validace metod	46
4.4. První mezilaboratorní studie metody superkritické fluidní chromatografie pro stanovení farmaceutických nečistot.....	50
4.5. Efekt historie kolony v superkritické fluidní chromatografii – praktické důsledky ..	53

4.6. Výhody využití ultra-vysokoúčinné superkritické fluidní chromatografie pro stanovení lipofilních vitamínů v potravinových doplňcích	57
4.7. Souhrnný článek: Aktuální vývoj v superkritické fluidní chromatografii ve spojení s hmotnostní detekcí: Jedná se o techniku vhodnou pro analýzu komplexních vzorků?.....	61
4.8. Kapitola 16: Farmaceutická analýza	61
4.9. Kapitola 12: Ultra-vysokoúčinná superkritická fluidní chromatografie ve spojení s hmotnostní detekcí	62
4.10. Kapitola 2: Superkritická fluidní chromatografie v bioanalýze.....	62
5. Závěr	63
6. Citace	64
7. Seznam publikací a abstraktů	84
7.1 Publikace zahrnuté v dizertační práci	84
7.2 Kapitoly v monografiích	85
7.3 Publikace nezahrnuté v dizertační práci.....	86
7.4 Přednášky.....	87
A. Práce prezentované autorkou	87
B. Spoluautorské práce	88
7.5 Plakátová sdělení	89
A. Prvoautorské práce	89
B. Spoluautorské práce	90
8. Účast na projektech, zahraniční stáže	91
9. Přílohy.....	92

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

1-AA	1-aminoanthracen
2-EP	2-ethylpyridin
2-PIC	2-pikolyamin
ACN	acetonitril
API	účinná látka
BEH	hybridní stacionární fáze s ethylenovými můstky
BPR	regulátor zpětného tlaku
CAD	detektor nabitého aerosolu
CDD	celková denní dávka
DEA	diethylamin
ELSD	odpařovací detektor rozptylu světla
EMA	Evropská léková agentura
ESI	ionizace elektrosprejem
EtOH	ethanol
FDA	Úřad pro kontrolu potravin a léčiv
FID	plamenově ionizační detektor
FTN	dávkovač s průtočnou jehlou
GC	plynová chromatografie
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
HSS	vysoce odolný silikagel
ICH	Mezinárodní rada pro harmonizaci technických požadavků na humánní léčiva
LC	kapalinová chromatografie
LLE	extrakce z kapaliny do kapaliny
LLOQ	dolní mez kvantifikace
LOD	mez detekce
LOQ	mez kvantifikace
MeOH	methanol
MS	hmotnostní spektrometr
NPLC	kapalinová chromatografie na normálních fázích
PFP	pentafluorofenyl
pSFC	kolonová superkritická fluidní chromatografie

RI	Index lomu světla
RPLC	kapalinová chromatografie na reverzních fázích
RSD	relativní směrodatná odchylka
SFC	superkritická fluidní chromatografie
SLE	extrakce z kapaliny do kapaliny za podpory inertního nosiče
SPE	extrakce na tuhou fázi
UHPLC	ultra-vysokoučinná kapalinová chromatografie
UHPSFC	ultra-vysokoučinná superkritická fluidní chromatografie
UV	ultrafialové záření

1. Úvod

Superkritická fluidní chromatografie (SFC) je technika známá od 60. let 19. století. Od svého objevení prošla dlouhým a složitým vývojem. Mobilní fáze SFC metodám zaručuje krátký čas analýzy, nízký zpětný tlak a ekologičnost v souladu s principy zelené chemie. V moderním pojetí se jedná o techniku, která nabízí nejen vysokou separační účinnost, ale také jedinečnou selektivitu. Ta má obrovský význam především v oblastech, kde je nutné separovat látky s velmi rozdílnými fyzikálně-chemickými vlastnostmi nebo naopak analyty velmi podobné.

Díky výrazným zlepšením v instrumentaci, která vedla k odstranění problémů s robustností a nižší citlivostí, SFC postupně získala na popularitě i mimo obory chirálních separací a preparativní chromatografie, kde se SFC široce využívala i před tím. Důležitým milníkem byl vývoj nových SFC-dedikovaných kolon a také posun ve vnímání této techniky. Upustilo se od mobilní fáze ve striktně superkritickém stavu a začalo se využívat subkritických směsí oxidu uhličitého s organickými modifikátory namísto čistého CO₂. To vše zapříčinilo, že se SFC rozšířila do mnoha aplikačních odvětví, ať už se jedná o analýzu chirálních látek, bioanalýzu nebo potravinovou analýzu.

V případě farmaceutické analýzy se tato technika dlouho potýkala s nedůvěrou zapříčiněnou špatnou opakovatelností analýz a nízkou citlivostí při UV detekci způsobenou původní nedokonalou instrumentací. Počet publikovaných prací zabývajících se farmaceutickými SFC metodami v posledních letech roste. Avšak stále je potřeba prokázat, že tato technika ob stojí i v tomto přísně regulovaném prostředí, neboť pouze několik z těchto studií se zabývalo také důkladnou validací podle mezinárodních směrnic.

2. Cíl práce

Cílem práce bylo ověřit vhodnost metod ultra-vysokoúčinné superkritické fluidní chromatografie (UHPSFC) pro farmaceutickou kontrolu kvality.

Pro dosažení tohoto cíle byly (i) v rámci dvou studií porovnány metody SFC a LC v několika zvolených parametrech a byly popsány výhody SFC.

(ii) Byly prozkoumány možnosti screeningového přístupu k vývoji UHPSFC metod pro kontrolu nečistot ve farmaceutických vzorcích. V rámci této studie bylo porováno 8 stacionárních fází, 5 organických modifikátorů a 6 aditiv za použití 10 směsí pro kontrolu kvality, které obsahovaly účinnou látku a její nečistoty. Pro vyhodnocení získaných chromatogramů byl vyvinut matematický model a na základě jeho výsledků byly doporučeny podmínky vhodné jako výchozí pro vývoj UHPSFC metody.

(iii) Práce byla dále zaměřena na popsání typických problémů při optimalizaci UHPSFC metod a na navržení jejich řešení. V rámci této studie byly optimalizovány metody pro 10 směsí pro farmaceutickou kontrolu kvality se zaměřením na dostatečnou citlivost, a především rozlišení mezi účinnou látkou a následující nečistotou. Na základě získaných experimentálních dat bylo navrženo několik možností pro zvýšení tohoto rozlišení.

(iv) Aby byla prokázána vhodnost UHPSFC metod pro regulované prostředí farmaceutické analýzy, byly všechny vyvinuté UHPSFC metody podrobeny validaci na základě mezinárodních směrnic. V rámci těchto validací byl také vyzkoušen také nový přístup vyhodnocení za použití statistického výpočtu celkové chyby měření.

(v) Důležitou součástí validace je také důkaz mezilaboratorní přenositelnosti metody, a proto byla provedena studie zahrnující 19 laboratoří z celého světa.

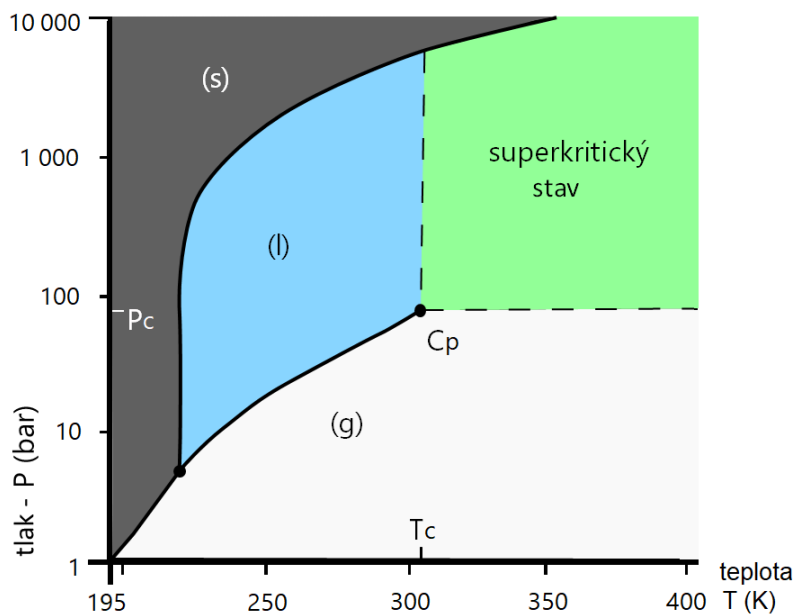
3. Teoretická část

3.1 Superkritická fluidní chromatografie

Současná superkritická fluidní chromatografie (SFC) je separační technika využívající podobné instrumentace jako vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC) a nadkritické nebo subkritické tekutiny jako mobilní fáze. Přes mnohé výhody bylo využití této techniky opomíjeno především kvůli technickým nedostatkům starší instrumentace [1]–[3]. Teprve uvedení nové instrumentace na trh v roce 2012 [4] společně s SFC-dedikovanými stacionárními fázemi umožnilo znovuobjevení a rozšíření SFC separací do mnoha odvětví včetně farmaceutické analýzy.

3.1.1 Nadkritická tekutina

Po překročení kritické hodnoty teploty a tlaku se látka dostává do tzv. nadkritického stavu (Obr. 1). V kritickém bodě dosáhne hustota plynu i kapaliny stejné hodnoty a vytvoří se tak jednotná, tzv. nadkritická, tekutina, která pak existuje za všech hodnot teploty a tlaky vyšších, než jsou hodnoty kritického bodu [1].



Obr. 1: Fázový diagram oxidu uhličitého. s - pevné skupenství, l - kapalina, g - plyn. Pc - kritický tlak, Tc - kritická teplota, Cp - kritický bod. Převezato a přepracováno z [1].

Nejčastěji používanou hlavní složkou mobilní fáze v SFC je oxid uhličitý. Nadkritického stavu je v případě CO₂ dosaženo při teplotě 31 °C a tlaku 74 bar. Solvatační síla nadkritické tekutiny závisí zejména na její hustotě. Hustota proto dlouho byla kritickým parametrem SFC separací především při používání čistého CO₂ jako mobilní fáze, kdy k eluci analytů je používán tlakový gradient. Přestože jsou vlastnosti nadkritického CO₂ změnami tlaku a teploty ovlivněny, CO₂ zůstává nepolární tekutinou vhodnou pro rozpuštění a separaci pouze nepolárních molekul [5]. V moderní SFC se proto využívá CO₂ s přídavkem organického modifikátoru, nejčastěji alkoholu, ať již v izokratickém nebo gradientovém módu. Tím je umožněna eluce také mnohem polárnějších látek [6], [7].

Tento přídavek však vede ke zvýšení nejen eluční síly, ale také kritické teploty a viskozity a snížení difuzivity. Dochází také k nárustu kritického tlaku, avšak od určitého přídavku tato hodnota opět klesá. Při 30 % přídavku modifikátoru má kritický bod parametry 135 °C a 168 bar. Maximální použitelný tlak v SFC je ovlivněn limity moderní instrumentace. Za běžně používaných podmínek (40 °C, 100 – 400 bar) se tedy již SFC mobilní fáze složená z CO₂ a organického modifikátoru nenachází v nadkritickém stavu a její vlastnosti jsou změnami tlaku, a tedy hustoty, ovlivněny naprosto minimálně [8]. Přejít mezi jednotlivými stavy však není ostrý a vlastnosti tekutiny se v oblasti pod kritickým bodem, jež je označovaná jako subkritická [1], plynule mění [9]. Pokud je zachován dostatečný tlak, riziko oddělení fází je minimální [8], [10], [11]. Termín superkritická fluidní chromatografie je tedy používán i v případě, že se mobilní fáze nachází v subkritickém stavu [1], [2], [9].

Konečné vlastnosti SFC mobilní fáze se nacházejí na rozhraní mezi vlastnostmi mobilních fází v GC a HPLC (Tab. 1). Mezi hlavní výhody SFC patří především vysoká rychlost a účinnost separací dána nízkou viskozitou a vysokou difuzivitou CO₂. To umožňuje také použití kolon s malými částicemi za vysokých průtoků a delších kolon s vyšším počtem teoretických pater, než je tomu v HPLC, neboť tlak v systému neúnosně nenaroste. Také ekvilibrace kolony je úměrně kratší [1], [9]. Oproti GC, SFC naopak umožňuje separaci netěkavých látek [5].

Tab. 1: Porovnání vlastností mobilních fází v SFC a HPLC [5]. MeOH – methanol.

	Viskozita ($\mu\text{Pa}\cdot\text{s}$)	Difuzivita ($\times 10^9 \text{ m}^2/\text{s}$)	Hustota (g/cm^3)
SFC: CO_2 s 5 % MeOH, 40 °C, 150 bar	76	10,2	0,809
HPLC: MeOH, 25 °C	545	1,9	0,786

3.1.2 Historický vývoj superkritické fluidní chromatografie

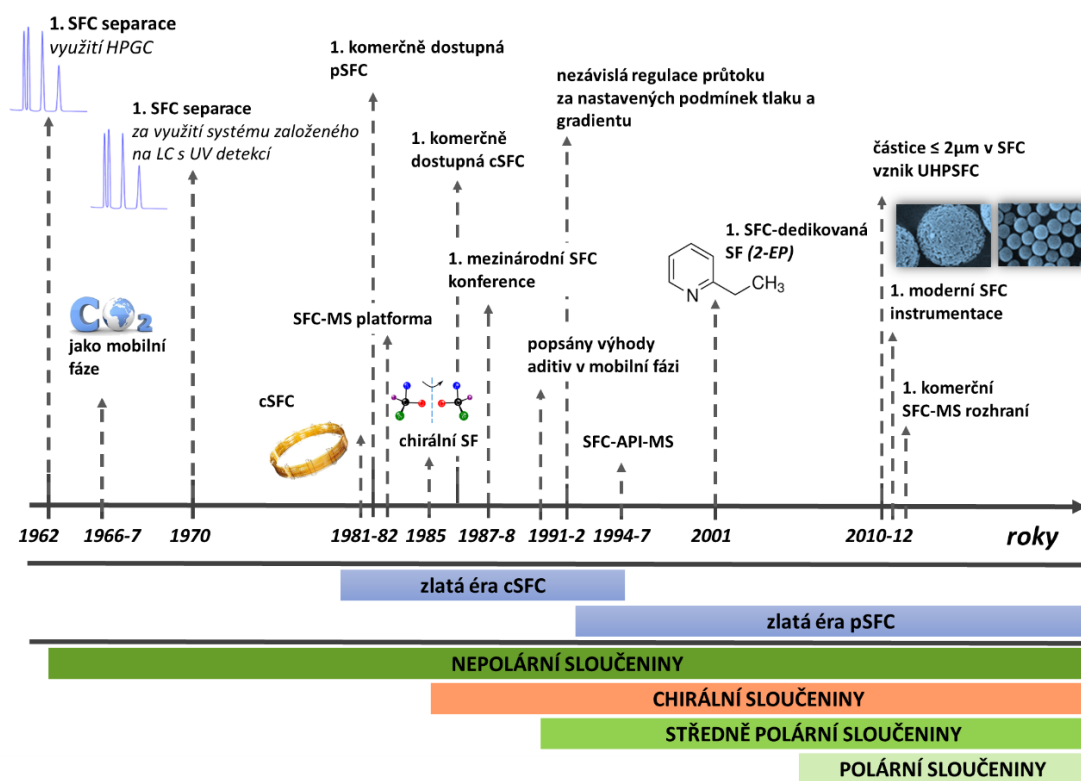
Použití nadkritické tekutiny v chromatografii představil v roce 1962 Klesper a kol. pro separaci směsi porfyrinů na polyethylen glykolové koloně za využití dichlormethanu a chlordifluormethanu jako mobilní fáze [12] při teplotě 112 °C a tlaku 70 – 98 bar. Následně bylo vyzkoušeno několik různých látek, které by mohly sloužit jako nadkritická mobilní fáze, mezi nimi např. xenon [13], [14], argon [15], oxid siřičitý [16], amoniak [17] a chlorofluorouhličitany [18]. Oxid uhličitý se však brzy stal nejrozšířenější volbou [1] vzhledem ke svým příznivým vlastnostem, jako je nízká toxicita a cena, snadno dosažitelný kritický bod, nehořlavost, inertnost k ostatním materiálům, mísitelnost se širokým spektrem organických rozpouštědel a nízká absorpce v UV oblasti [1], [6], [10], [19].

Protože v té době byla plynová chromatografie (GC) již zavedenou technikou a většina úsilí směřovala k vývoji LC [1], nový koncept kapilární SFC [20]–[22] byl představen až v 80. letech. Nejdůležitějším parametrem v kapilárním SFC bylo nastavení tlaku, které však kvůli konstantnímu tlakovému restriktoru mohlo být měněno pouze úpravou rychlosti průtoku. Vývoj metody byl proto náročný a optimálních podmínek se dosahovalo pouze obtížně. Plamenově ionizační detektor (FID) navíc umožňoval používání mobilní fáze obsahující pouze čistý CO_2 [8], [23]. Později bylo provedeno několik experimentů s předpřipravenou směsí CO_2 a organického modifikátoru, avšak bez možnosti gradientové eluce SFC v tomto upořádání nikdy nepronikla do rutinních laboratoří [8] mimo úzký okruh specifických analýz, jako je např. analýza polymerů. Výhoda vysokého počtu teoretických pater a možnost analýzy termolabilních a netěkavých látek [24] nakonec nestačila k překonání dalších problémů jako je nemožnost eluovat polárnější látky, nekompatibilita s UV detekcí a obtížně proveditelný nástřik, a tato technika byla v 90. letech nahrazena kolonovou verzí SFC [1], [3], [25].

Oproti kapilární SFC založené na GC instrumentaci, byla kolonová SFC (pSFC) navržena na základě HPLC instrumentace. Vývoj pSFC probíhal nezávisle na kapilární SFC, kdy první komerční instrumentace byla představena v roce 1981 [26]. Díky nezávislé kontrole nejen tlaku a teploty, ale také průtoku a složení mobilní fáze v této instrumentaci bylo možné přidání organického modifikátoru v požadovaném množství. pSFC tedy umožnila separaci širšího spektra i polárnějších sloučenin s odlišnou selektivitou a kratším retenčním časem [27], [28]. Robustnost je míra schopnosti analytického postupu zůstat nedotčena malými, ale úmyslnými změnami parametrů metody a poskytuje indikaci o její spolehlivosti během běžného použití [29]. Špatná opakovatelnost retenčních časů a nízká robustnost tehdejší instrumentace a také nižší citlivost v UV však v té době omezovaly možnosti praktického využití pSFC [1], [3].

Teprve nedávné technické pokroky umožnily širší využívání této analytické techniky [24]. Nová generace SFC instrumentace představila inovativní regulátor zpětného tlaku, vyšší tlakové limity a nižší mimokolonové objemy, což přispělo ke zvýšení robustnosti a spolehlivosti [1]. Nemalý vliv měla také modernizace čerpadel. Moderní SFC platformy jsou již kompatibilní se stacionárními fázemi s částicemi menšími než 2 μm , přestože mimokolonové objemy systémů jsou mnohem větší než ty v ultra-vysokoučinné kapalinové chromatografii (UHPLC). Pro tuto techniku byl tedy zaveden termín ultra-vysokoučinná superkritická fluidní chromatografie (UHPSFC) [30], [31].

Klíčové body historického vývoje SFC techniky shrnuje Obr. 2. Po představení nové instrumentace se SFC stala předmětem výzkumu mnoha skupin s cílem nejen lépe pochopit základní teoretické aspekty, ale také ukázat její výhody a možnosti uplatnění [24]. SFC se stala preferovanou technikou pro chirální separace a částečně nahradila také HPLC metody na normálních fázích, kde jednou z mnoha výhod SFC bylo využití ekologičtější mobilní fáze namísto toxických uhlovodíků jako heptan a hexan [2], [3].

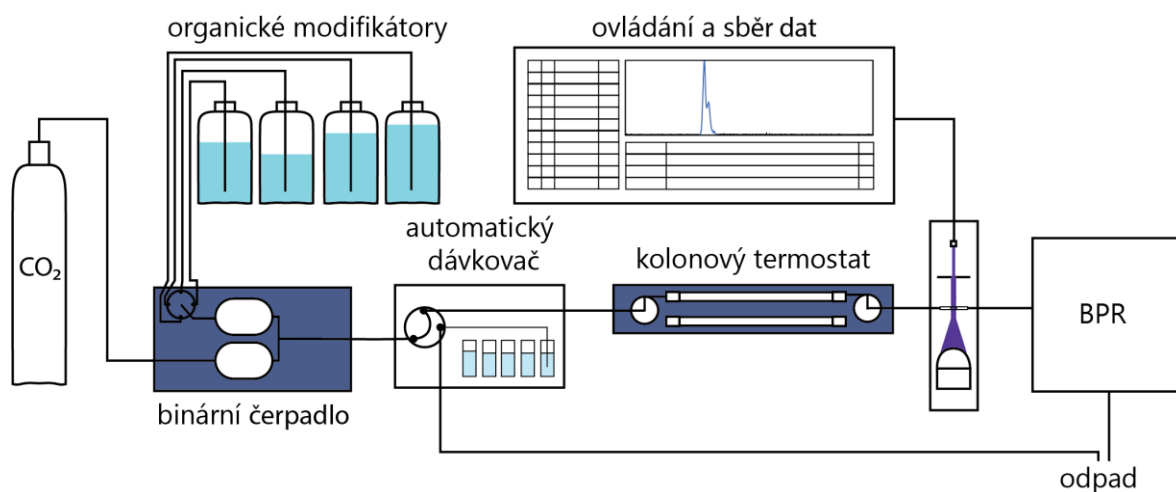


Obr. 2: Vývoj SFC techniky mezi lety 1962 a 2020. API – ionizace za atmosférického tlaku, cSFC – kapilární superkritická fluidní chromatografie, HPGC – plynová chromatografie za vysokého tlaku, SF – stacionární fáze, MS – hmotnostní spektrometrie, pSFC – kolonová superkritická fluidní chromatografie, 2-EP – 2-ethylpyridin.

3.1.3 Současná instrumentace superkritické fluidní chromatografie

Moderní SFC instrumentace je založená na HPLC instrumentaci, avšak má několik zásadních modifikací [1], [3], [5], [6], [8], [9], [32]. Každá SFC instrumentace musí obsahovat základní části (Obr. 3), jako jsou čerpadla modifikátoru a CO_2 , automatický dávkovač, kolonový termostat, detektor a regulátor zpětného tlaku (BPR).

Vzhledem k silně odlišné povaze organického modifikátoru a CO_2 , a tedy rozdílům v tlaku a stlačitelnosti těchto dvou složek, je nutné binární čerpadlo. Každé zvýšení teploty nebo pokles tlaku CO_2 vede k odpaření části tekutiny, což může způsobovat kavitaci čerpadla a přerušení toku [32]. Hustota čerpaného CO_2 , a tedy tlak potřebný k jeho čerpání je závislý na teplotě čerpadla. Aby se zabránilo tlakovému nesouladu mezi těmito dvěma složkami a snížil se kompresní poměr, je CO_2 čerpán v kapalném stavu. Toho je dosaženo chlazením hlav čerpadla pumpy na 4-5 °C [32], [33].



Obr. 3: Schéma SFC instrumentace. Přepracováno z [1].

V HPLC existují 2 typy automatického dávkovače, a to dávkovač s průtočnou jehlou (FTN – flow through needle) a dávkovač se smyčkou stálého objemu (fixed loop). Povaha SFC mobilní fáze však neumožňuje použití FTN typu automatického dávkovače, proto je v SFC vždy použit dávkovač se smyčkou stálého objemu [1], [6], [32].

Hustota SFC mobilní fáze je závislá na tlaku a teplotě. Součástí instrumentace tedy musí být i moduly kontrolující nastavení těchto stěžejních parametrů. Kolonový termostat v SFC většinou umožňuje regulaci a kontrolu teploty v rozmezí 20 – 90 °C, avšak jsou k dispozici také termostaty umožňující chlazení na nižší teploty. Nastavení teploty může sloužit také k jemnému ladění selektivity při vývoji metody [1], [6], [31], [32]. Změna tlaku většinou vede k malé změně v selektivitě separace SFC metody. Vždy však musí být zajištěna stabilita retenčních časů analytů, a tím robustnost a opakovatelnost metody. Každá změna tlaku se projeví také v citlivosti při UV detekci, kdy změnou indexu lomu dojde k ovlivnění šumu [1]. Proto je jednou z nejdůležitějších součástí každé SFC instrumentace regulátor zpětného tlaku. Moderní BPR regulátory jsou schopny zajistit kontrolu tlaku v rozmezí $\pm 0,05$ bar [30], [32], [34].

Přestože v ranných fázích vývoje SFC instrumentace využívala především GC detektory, jako je např. FID, v novějších studiích převládají UV, odpařovací detektor rozptylu světla (ELSD), detektor nabitého aerosolu (CAD) a hmotnostně spektrometrické (MS) detektory.

Univerzální detektory typu ELSD a CAD jsou založeny na nebulizaci a následné detekci částic. Použití stlačené mobilní fáze by tedy mělo poskytnout lepší podmínky pro vytvoření aerosolu, než je tomu u kapalné fáze v HPLC [1], [35]–[37]. Musí však být zajištěno vyhřívání nebulizační komory, aby bylo zabráněno kondenzaci a tvorbě suchého ledu kvůli chladicímu efektu při přechodu do atmosférických podmínek, a tedy snížení tlaku mobilní fáze. V dosud publikovaných studiích je ELSD v SFC obvykle zařazen po BPR regulátoru a jeho odpověď je závislá na mnoha parametrech včetně typu analytu, složení mobilní fáze, teplotě, rozdílu mezi mobilní fází a nebulizačním plynem, průtoku, nastříkovaném objemu a koncentraci [1], [38]. Vzhledem k snadnější nebulizaci je ELSD odezva v SFC obvykle vyšší než v HPLC, avšak není možné detekovat těkavé látky [36], [37]. V CAD získávají nebulizací vytvořené částice pozitivní náboj, který je detekován citlivým elektrometrem. V publikovaných studiích bylo popsáno zapojení CAD před i po BPR regulátoru. V prvním případě dochází k odpaření v nebulizační komoře a bylo dokázáno, že vyšší citlivosti je dosaženo při použití vyššího podílu organického modifikátoru [39], [40]. Opačný případ nastává při zapojení detektoru po BPR regulátoru, kdy k nebulizaci dochází okamžitě ve spojovací kapiláře a je vhodnější použití nižšího obsahu modifikátoru [39].

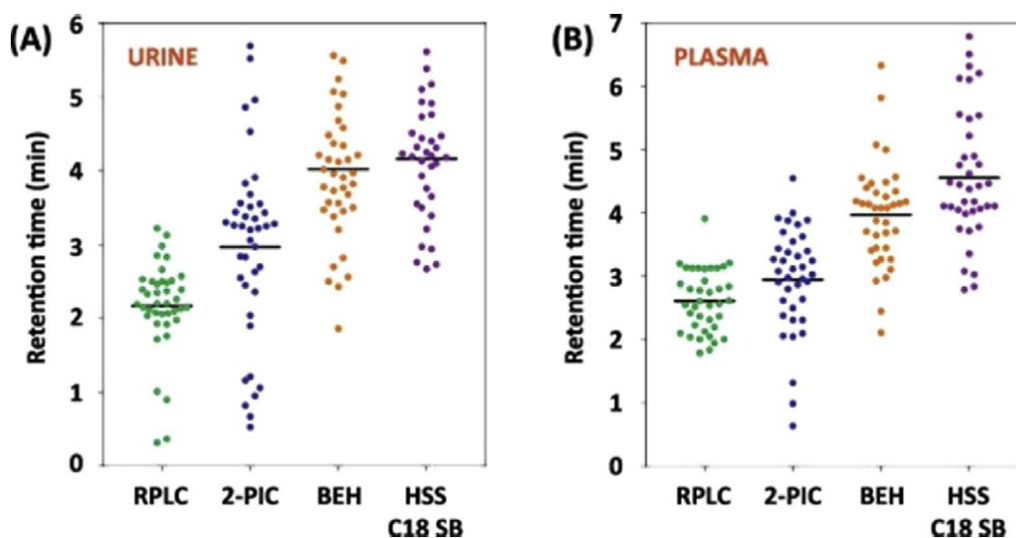
Citlivost UV detekce v SFC dlouho představovala problém, který zabraňoval rutinnímu využívání této techniky. Nízká citlivost v SFC-UV je zapříčiněna vysokým šumem na základní linii. Ten je daný jak vysokým rozdílem v indexu lomu mobilní fáze, tak kolísáním tlaku. Změny v indexu lomu (RI) jsou způsobeny změnami tlaku mobilní fáze, kdy RI oxidu uhličitého nabývá hodnot od 1,06 do 1,24 v závislosti na tlaku a teplotě [32]–[34]. Nedokonalá kontrola tlaku ve starší instrumentaci pak tuto fluktuaci ještě zvyšovala. Představení nových BPR regulátorů a čerpadel tedy umožnilo snížení vlivu tohoto problému, přestože ne jeho úplné odstranění. UV detektory jsou tedy stejného designu jako ty v HPLC, avšak jejich průtoková cela musí odolat tlaku nastavenému na BPR regulátoru, jelikož UV detektor je zapojen vždy až za ním [1].

Vzhledem k vysoké selektivitě a citlivosti bylo spojení SFC s hmotnostní detekcí předmětem mnoha studií [1], [3]. Na první pohled se SFC mobilní fáze s těkavým CO₂ může zdát pro spojení s MS ideální. Avšak stlačitelnost a fázový přechod vede k mnoha problémům v SFC-MS spojení zahrnující pokles hustoty, ztrátu solvatační síly mobilní fáze až případnou precipitaci analytů. To může vést až ke ztrátě chromatografické účinnosti,

zhoršení tvaru píků a ztrátě citlivosti a stability detektoru [1]. V průběhu let bylo představeno mnoho technologických návrhů na toto spojení [1], [41], [42] v závislosti na používaných ionizačních technikách. První SFC-MS spojení bylo představeno v 80. letech, kdy byla kapilární SFC spojena s hmotnostní detekcí s elektronovou ionizací [3]. Avšak ionizace za atmosférického tlaku, zejména ionizace elektrosprejem (ESI), se brzy staly metodou volby pro iontové zdroje v MS. Rostoucí popularitu ionizace za atmosférického tlaku a ESI iontových zdrojů v SFC-MS ukazuje také [3].

Pro spojení SFC s technikami ionizace za atmosférického tlaku bylo navrženo pět základních druhů rozhraní [42], [43]. Nejjednodušším rozhraním je přímé spojení kolony a iontového zdroje s pasivní kontrolou tlaku. Toto rozhraní je vhodné především při využívání mobilní fáze svými podmínkami blízké kapalině, kdy není přesná kontrola tlaku natolik kritická [1], [42]. Rozhraní rozdělující tok mobilní fáze před BPR (pre-BPR flow splitting) umožňuje plně kontrolovat tlak v systému i za kolonou. Rozměry převodových kapilár však musí být pečlivě voleny s ohledem na možnou precipitaci analytů. Také dělicí poměr mezi částí mobilní fáze mířící do detektoru a do BPR modulu se může lišit na základě tlaku mobilní fáze a rozměrech těchto spojovacích kapilár [42]. Další dva typy rozhraní využívají plný průtok mobilní fáze detektorem, což by mělo zaručit vyšší citlivost [1]. První z nich zavádí chromatografickou spojnicí T s nulovým mrtvým objemem, ve kterém dochází ke smísení mobilní fáze a kapaliny z nezávislého čerpadla, jehož tlak je kontrolován. Mezi výhody tohoto rozhraní patří dobrá chromatografická opakovatelnost, nízký mrtvý objem a vyšší citlivost vzhledem k tomu, že do detektoru je přiváděn celý objem mobilní fáze z kolony [42], [44]. Rozhraní využívající plného průtoku a mechanického BPR umožňuje plnou kontrolu tlaku v softwaru. Avšak tlakový převodník nutný pro tuto kontrolu zavádí do systému relativně velký mrtvý objem, který může vést k problémům s šířkou píků a chromatografickou opakovatelností [1], [41]. Nedávno byly komerčně představeny nové typy rozhraní rozdělující tok mobilní fáze před BPR [45] s nebo bez využití přídavné kapaliny. V následujících studiích byla prokázána přínosnost přídavné kapaliny vzhledem k vysoké flexibilitě možných chromatografických podmínek, robustnosti, citlivosti a jednoduchosti použití [1], [41], [45]. Aby byla zaručena kompatibilita s MS instrumentací, jsou v mobilní fázi nebo přídavné kapalině preferována těkavá aditiva, jako mravenčan, octan nebo hydroxid amonný.

Využívání MS detekce vyžaduje stanovení matricových efektů, které představují kritický parametr mnoha kvantitativních metod [1]–[3], [41]. Látky z matrice vstupují do iontového zdroje společně s analyty a mohou tedy ovlivnit proces ionizace. To se projeví na výsledné odezvě, ať už jako její zvýšení, tj. pozitivní matricové efekty, nebo snížení při negativních matricových efektech. V důsledku pak metoda může vykazovat nižší citlivost, nelineární odezvu a neopakovatelnost výsledků, čímž je snížena správnost a přesnost metody [41]. Studium matricových efektů v SFC-MS se zabývalo několik prací [43], [46]–[49]. Jednou z nejobsáhlejších je pak [49], kde byly porovnány matricové efekty v moči a plazmě na základě metody přípravy vzorků a chromatografické metody. Byly tedy porovnány matricové efekty v UHPSFC a UHPLC za použití 78 dopingových a farmaceutických látek. V souladu s ostatními publikovanými studii [47], [48], [50] byla prokázána vhodnost SFC pro stanovení vzorků moči, kde byly pozorovány velmi nízké matricové efekty ve srovnání s kapalinovou chromatografií na reverzních fázích (RPLC). Výsledky však byly silně závislé na použité stacionární fázi, jak ukazuje Obr. 4. Vzhledem k úzkému elučnímu profilu RPLC metody byly všechny analyty ovlivněny podobnými matricovými efekty. Opačný případ nastal v případě SFC metody, zvláště za využití 2-pikolylaminové (2-PIC) kolony, kdy analyty s rozdílnými retenčními časy mají nižší pravděpodobnost, že budou ovlivněny stejnými matricovými efekty [49]. Menší rozdíl ve vlivu matrice pak byl vidět, pokud byla použita specifičtější metoda přípravy vzorku než pouze ředění jako v případě výše zmíněných vzorků moči. V případě proteinové precipitace vedla v UHPSFC k nižším matricovým efektům než v RPLC pouze jedna z testovaných stacionárních fází, která nabídla širší eluční profil (Obr. 4). Minimální rozdíl v matricových efektech mezi UHPSFC a UHPLC metodou byl popsán také ve studii stanovující 441 pesticidů v potravinových vzorcích [51]. Pro pochopení matricových efektů v SFC-MS jsou proto potřeba další systematické studie [3], [49], [50].



Obr. 4: Eluční profily látek sledovaných v dopingové kontrole v (A) moči a (B) plazmě získané pomocí metody kapalinové chromatografie na reverzních fázích (RPLC) a metody superkritické fluidní chromatografie na 3 stacionárních fázích : 2-pikolylylamin (2-PIC), hybridní fáze s ethylenovými můstky (BEH) a vysoce odolný silikagel s C18 modifikací (HSS C18 SB). Převzato z [49].

3.1.4 Výhody superkritické fluidní chromatografie

SFC mobilní fáze obsahuje vysoké procento CO_2 . Viskozita této mobilní fáze je tedy mnohonásobně nižší než v LC, díky čemuž je možné využít vyšší průtoky bez ztráty rozlišení a účinnosti [2], [52]. Dalšímu zvýšení separační účinnosti pak pomůže také využití kolon s částicemi menšími než $2\ \mu\text{m}$. V UHPSFC je dosahováno nižších zpětných tlaků než v UHPLC, což umožňuje rychlejší separace a také ekvilibrace. Difuzní koeficient analytů v čistém CO_2 je obvykle 10 – 15x vyšší než ve vodných roztocích. Difuzivita ovlivňuje člen B i C van Deemterovy rovnice, což vede ke 4x vyšší optimální lineární rychlosti v SFC ve srovnání s HPLC [1]. Povaha mobilní fáze pak řadí SFC mezi techniky zelené chemie, neboť spotřeba organických rozpouštědel je mnohonásobně nižší než u kapalinové chromatografie na normálních (NPLC) i reverzních (RPLC) fázích.

Vlastnosti SFC mobilní fáze dovolují také vynechat krok odpařování organických rozpouštědel, tj. např. acetonitrilu nebo heptanu, v metodách přípravy vzorků [41] jako je extrakce na tuhou fázi (SPE) nebo extrakce z kapaliny do kapaliny (LLE), což šetří čas i energii. Díky kompatibilitě mobilní fáze a těchto extrakčních rozpouštědel je odpaření nutné pouze v případě, kdy je cílem přípravy vzorků také zakoncentrování analytů.

Moderní SFC nabízí mnoho dalších výhod včetně jedinečné selektivity, robustnosti a možnosti použít ionizace za atmosférického tlaku [3].

3.1.5 Parametry vývoje metody

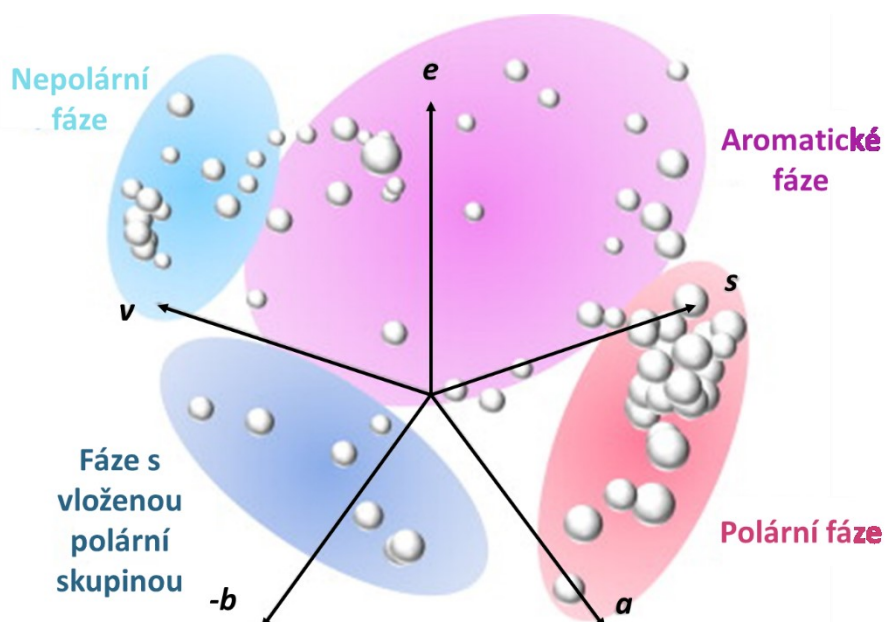
Na rozdíl od LC analýz nelze v SFC určit typické/generické chromatografické podmínky. V HPLC má každý z optimalizovaných parametrů specifický vliv na selektivitu metody. Tytéž parametry však mají často opačný či nepředvídatelný vliv na SFC separaci. Retenci a separaci v SFC ovlivňují především změny v hustotě, složení modifikátoru mobilní fáze a chemie stacionární fáze [24].

Stacionární fáze

Klasifikaci a popisu vlastností SFC kolon se věnuje mnoho prací [53]–[60], avšak žádná z nich nepředstavila stacionární fázi ekvivalentní ke generické stacionární fázi s C18 modifikací v LC. Volba kolony je tak závislá především na analyzovaných látkách. V publikovaných studiích je tedy popsána široká škála používaných stacionárních fází [2], [3], [41], které svými vlastnostmi pokrývají různé separační módy LC techniky od NPLC, přes RPLC až po HILIC. Na druhou stranu tato variabilita umožňuje analýzu širokého spektra látek, ať chirálních nebo achirálních, za použití stejné mobilní fáze na bázi CO₂ [6], [7], [61]. Obecně mohou být v SFC použity jakékoli LC kolony [53]. V průběhu let bylo představeno také několik SFC-dedikovaných kolon. První z nich byla v roce 2001 silikagelová stacionární fáze s navázaným 2-ethylpyridinem [62], která měla snížit chvostování píků bazických látek.

Vzhledem k těmto širokým možnostem, je zvolení správné kolony kritickým parametrem při vývoji SFC metody [30], [60]. Nepolární stacionární fáze obsahující substituenty jako např. C5, C8 nebo C18, zadržují především hydrofobní látky a nabízejí tak retenční chování podobné RPLC s vysokým podílem organické složky mobilní fáze [63], [64]. Opačná situace nastává u polárních stacionárních fází, jako je čistý silikagel nebo silikagel se substituenty jako aminopropyl nebo propandiol. Zde se analyty chovají podobně jako v kapalinové chromatografii na normálních fázích (NPLC) [65]. Další stacionární fáze jako jsou např. s fenylpropyl nebo pentafluorofenyl substituentem, pak nabízejí selektivitu nesrovnatelnou s NP- nebo RPLC [6]. Pro klasifikaci těchto stacionárních fází byl vyvinut

model, který je členěn na základě 5 deskriptorů a to, interakce s π -elektrony, dipol-dipol, disperze a akceptor nebo donor vodíkové vazby. Tento model (Obr. 5) by měl pomoci se správným výběrem stacionární fáze pro zamýšlenou analýzu, kdy polární a nepolární fáze jsou na opačných koncích a fáze s dalšími odlišnými vlastnostmi uprostřed [61], [66], [67]. Zde jsou pak stacionární fáze dále rozděleny dle toho, zda obsahují aromatický substituent, které jsou pak v horní části, anebo vloženou polární skupinu, které se naopak nacházejí v dolní části grafu. Velikost částic SFC kolon následovala trend v LC, kdy $5\mu\text{m}$ plně porézní částice jsou v poslední době nahrazovány částicemi menšími než $2\mu\text{m}$ nebo $3\mu\text{m}$ povrchově porézními částicemi [4], [48], [50], [68]–[71].

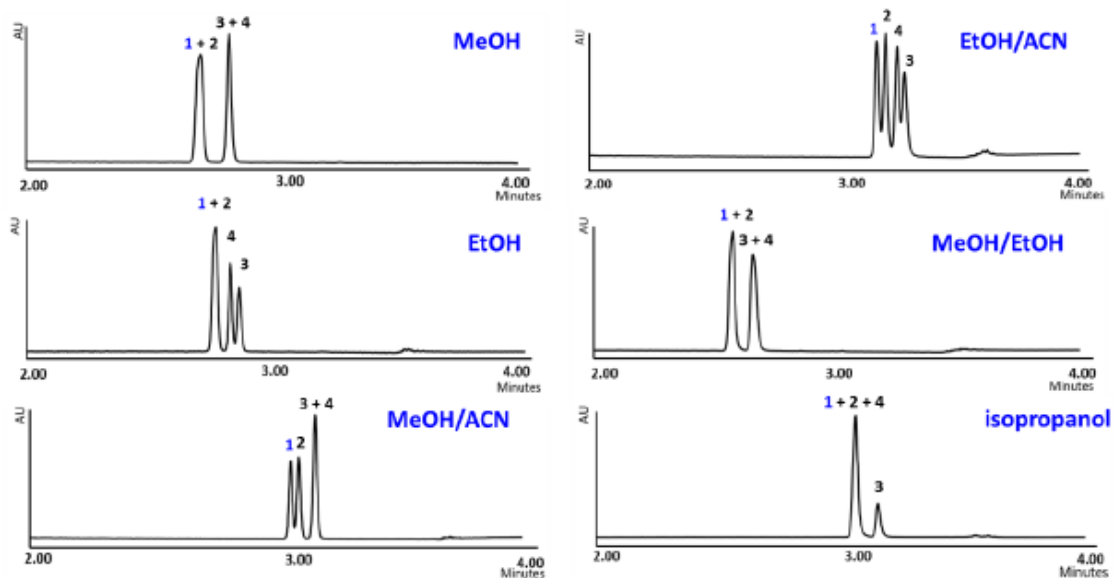


Obr. 5: Klasifikace achirálních SFC kolon. *e* – interakce s π -elektrony, *s* – dipol-dipol, *v* – disperze, *a* – akceptor vodíkové vazby, *b* – donor vodíkové vazby. Převzato a přepracováno z [6].

Mobilní fáze

Historicky byly vlastnosti mobilní fáze ovlivňovány především tlakem a teplotou. V moderním pojetí SFC se však jedná především o přidavek polárního organického modifikátoru a aditiv do CO_2 [2], [7], [41]. Organický modifikátor pak má několik hlavních funkcí [7], [30], [31]. Mění polaritu mobilní fáze, a tím také její solvatační sílu, čímž dochází nejen k rychlejší eluci a ke zkrácení času analýz, ale také ke snížení rizika precipitace analytů [7], [10]. Sorpcí na stacionární fázi dochází k úpravě jejího povrchu a případně také

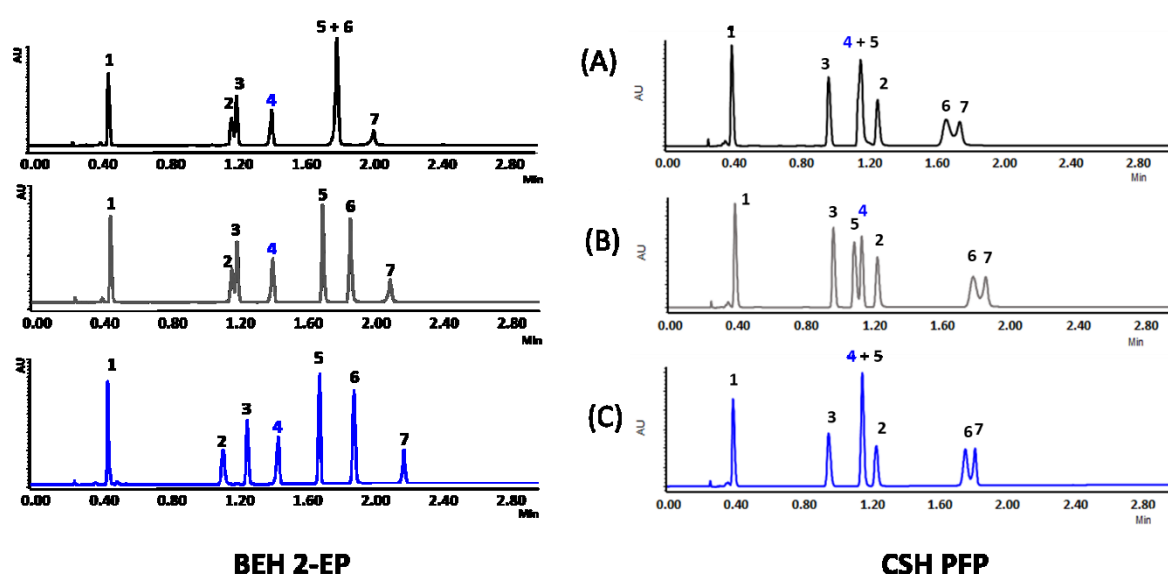
k zablokování jejich aktivních míst [53], [72]. Methanol je organickým modifikátorem volby díky vysoké eluční síle, relativně nízké viskozitě, vysoké polaritě a nízké absorbanční mezi v UV oblasti [73]–[75]. Díky mísitelnosti s CO₂ v širokém rozsahu tlaků a teplot je možné v SFC využívat jako modifikátor i jiné alkoholy [7], [30]. Druh organického modifikátoru je pak většinou volen během optimalizace metody na základě eluční síly, selektivity a tvaru píku analytů [76], [77], jak ukazuje Obr. 6. Acetonitril nemá dostatečnou eluční sílu, aby mohl být úspěšně použit jako organický modifikátor SFC mobilní fáze [30], [73], [77], [78], a často má také negativní vliv na tvar píku. V posledních letech však roste využívání směsí alkoholu s acetonitrem, a to díky jedinečné selektivitě této kombinace [77] (Obr. 6).



Obr. 6: Srovnání UHPSFC analýzy tikagreloru a jeho 4 nečistot za využití různých organických modifikátorů. Chromatografické podmínky : Torus Diol kolona (100 x 3,0 mm, 1,7 μm), gradient 5-40 % organického modifikátoru v 3. min, průtok 1,5 ml/min, teplota 40 °C, BPR 13,8 MPa, UV detekce při 225 nm. MeOH - methanol, EtOH – ethanol, ACN – acetonitril. Převzato z [1].

Pro analýzu látek s acidobazickými vlastnostmi je kromě organického modifikátoru nutný také přídavek aditiva do mobilní fáze. Jako aditivum slouží většinou silně polární sloučenina rozpuštěná v organickém modifikátoru v koncentraci 0,05 – 2 % [1]. Mechanismů, jakým aditivum napomáhá separaci, je několik. Změna kyselosti mobilní fáze případně iontového stavu analytů a aktivních míst stacionární fáze je jeden z nich. Může však dojít také k navázání aditiva na aktivní místa stacionární fáze, a tím ke změně vlastností a polaritě kolony [24], [53], [76], [79]. Přestože přídavkem alkoholu do CO₂ vzniká

methylkarbonová kyselina [1], a tím mobilní fáze odpovídající pH 4-5 [80], [81], přídavek silnějších kyselin jako aditiv byl v několika studiích prospěšný. Obecně kyselá aditiva jako je kyselina mravenčí, octová, citronová a trifluoroctová zlepšují tvar píků organických kyselin a bazická aditiva, tj. amoniak, isopropylamin, diethylamin a trimethylamin jsou vhodná pro analýzu zásad [82]–[84]. Příklad vlivu rozdílných aditiv na separaci farmaceutických látek je ukázán na Obr. 7. V posledních letech roste obliba těžkavých aditiv, které umožňují spojení s MS detekcí. Dalším z moderních trendů v SFC je pak využívání malého procenta vody jako aditiva, což vede opět ke zlepšení tvaru píků a zrychlení eluce polárních látek [2], [31], [48].



Obr. 7: Srovnání UHPSFC analýzy vardenafilu (API, 1) a jeho 6 nečistot na koloně CSH PFP a agomelatinu (API, 4) a jeho 6 nečistot na koloně BEH 2-ethylpyridin s použitím (A) methanolu, (B) 10 mM mravenčanu amonného v methanolu a (C) 10mM octanu amonného v methanolu. Převzato z [1].

Tlak a teplota

Vzhledem k využívání organických modifikátorů mají další z parametrů, tedy tlak a teplota, většinou pouze minoritní vliv na selektivitu SFC metody. Vliv teploty je závislý na mnoha faktorech jako je hustota mobilní fáze, parametry rozpustnosti analytu i superkritické tekutiny, afinita analytu ke stacionární fázi a vlastnosti analytu [85]. Při zvyšování teploty dochází většinou nejprve ke zvýšení retence látky a po dosažení maxima k následnému poklesu retence. Těchto vysokých teplot není běžně v SFC dosahováno. V některých případech však mohou i malé změny v retenci při běžných teplotách mít vliv na selektivitu vyvíjené metody [33]. Přídavkem organického modifikátoru klesá

stlačitelnost mobilní fáze, čímž je také vliv nastavení tlaku v moderním SFC omezen. Se zvýšením tlaku bude pozorováno snížení retence. Změnou tlaku je ovlivněna především eluční síla čistého nadkritického CO₂. Při gradientové eluci bude tedy tento vliv více patrný u látek eluovaných na začátku gradientu při nižším procentuálním obsahu organického modifikátoru než u těch eluovaných při větším obsahu organického modifikátoru později v gradientu [33].

3.1.6 Aplikační oblasti superkritické fluidní chromatografie

V minulosti se SFC analýzy využívaly především pro chirální separace, jelikož nabízí nejen lepší enantioselektivitu, ale také mnohem kratší čas ekvilibrace i analýzy než kapalinová chromatografie [86], [87]. Protože ale mechanismus enantioseparace stále zůstává neobjasněn, může být vývoj chirální SFC metody časově náročný [87], [88]. Přesto bývá většinou vývoj SFC metody kratší ve srovnání s chirální LC metodou a pravděpodobnost úspěšné enantioseparace je naopak vyšší [89], [90].

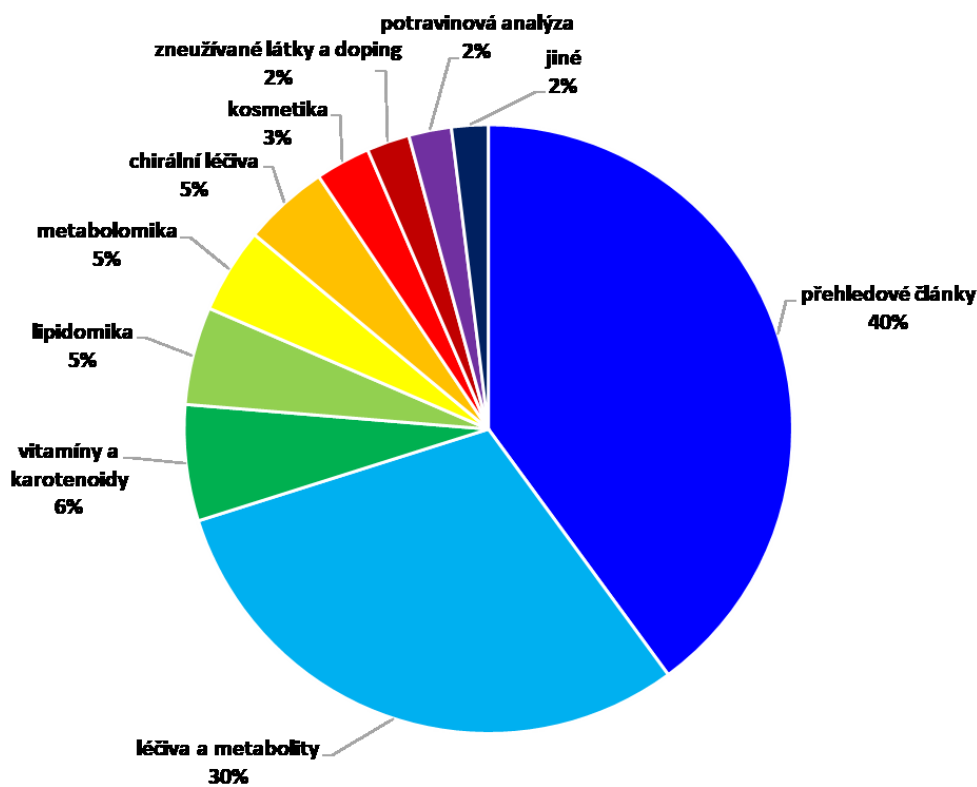
V bioanalýze je SFC využívána především k analýze lipofilních vitamínů, tokoferolů a karotenoidů, kde se uplatňuje nejen nízká polarita mobilní fáze, ale také schopnost SFC separovat strukturně podobné látky [91]–[95]. Použití SFC-MS je pak rozšířeno také v lipidomice [96]–[100]. Analýza lipidů je extrémně náročná především vzhledem k jejich vysoké rozmanitosti, která je dána složitou kombinací hydrofobních uhlíkatých řetězců a širokého spektra polárních skupin [41]. SFC tak nabízí jedinečnou možnost analýzy za využití různých separačních mechanismů, kterých je dosaženo pouze změnou složení mobilní fáze [41], [101]. Naopak SFC analýza polárních léčiv, metabolitů, aminokyselin a peptidů není tak přímočará [3]. Pro tyto analýzy je většinou nutné použít více než 40 % organického modifikátoru v mobilní fázi a polární aditiva. Přesto již bylo publikováno několik úspěšných studií zabývajících se analýzou dopingových látek [82], [102], [103], polárních metabolitů [104], [105], neurotransmiterů [106], gangliosidů [107], aminokyselin [108] a také směsi lipofilních i hydrofilních vitamínů [109].

Analýza rostlinných a přírodních materiálů hraje významnou roli také ve farmaceutickém výzkumu, kde mohou sloužit jako zdroj nových bioaktivních látek [3], [110], [111]. Mezi časté analyty patří opět karoteny, xantofyly, chlorofyly a lipofilní

vitamíny. Pomocí SFC však byly analyzovány také sekundární analyty v rostlinných extraktech, acetogeniny [112], saponiny [113], ginsenosidy [114] a také aminokyseliny v čajích [115].

V potravinové analýze se využití SFC soustřeďuje kolem separací potravinových lipidů jako jsou triacylglyceroly, diacylglyceroly a volné mastné kyseliny [116]–[118]. Další často analyzovanou skupinou pak jsou pesticidy, herbicidy, fungicidy a insekticidy [119]–[121]. Ty jsou stanovovány nejen v potravinových vzorcích, ale také v rámci environmentální analýzy vody v řekách, odpadních vodách a půdě [122]. V těchto matricích jsou často sledovány také další kontaminanty životního prostředí jako jsou léčiva [123] a průmyslové přísady [124]. Petrochemie patří k tradičním oblastem SFC analýz. Kvalita petrochemických výrobků je stanovována na základě obsahu parafinů, olefinů a aromatických a nearomatických uhlovodíků [125], [126], což jsou látky s ideálními vlastnostmi pro stanovení pomocí SFC.

Zastoupení SFC v jednotlivých aplikačních oblastech shrnuje Obr. 8. Mezi oblastmi s rostoucím zájmem o SFC separace patří také farmaceutická analýza, které se věnuje následující kapitola.



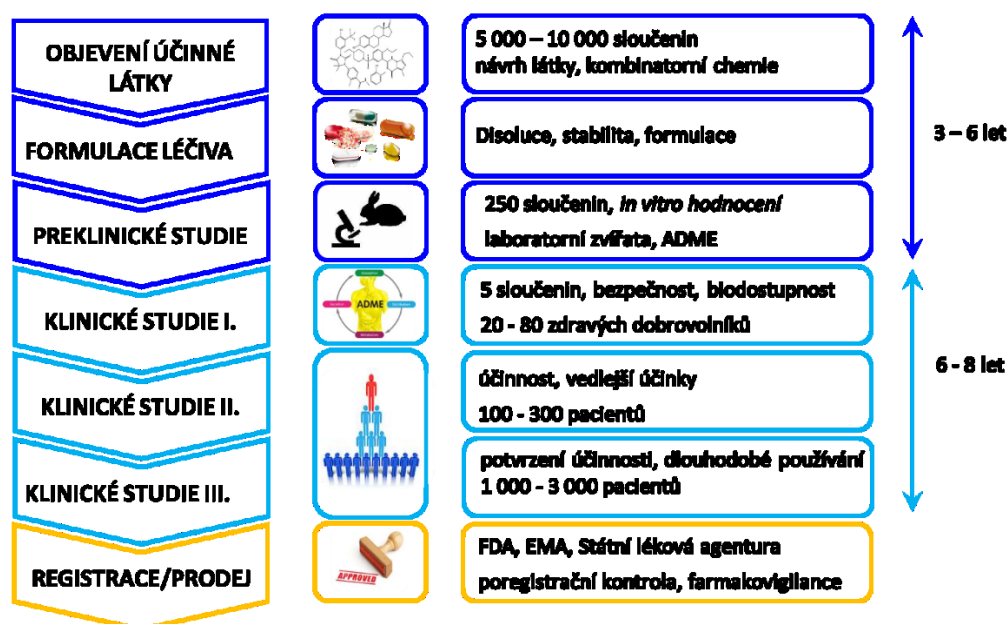
Obr. 8: Zastoupení SFC techniky v různých aplikačních oblastech. Farmaceutická analýza zahrnuta ve skupině léčiva a metabolity mimo analýzy chirálních léčiv, které jsou uvedeny samostatně. Převzato a aktualizováno z [1].

3.2 Farmaceutická analýza

3.2.1 Vývoj léčiva

Vývoj léčiva je mnoha krokový proces od objevení nové léčivé látky až po uvedení léku na trh (Obr. 9).

Nejprve musí být popsána potenciální aktivní molekula. Jejím zdrojem může být screening rostlinných, živočišných nebo nově syntetizovaných látek, modelování *in-silico* nebo založené na interakci receptoru/ligandu, případně také úprava tělu vlastních molekul či jiných již objevených léčiv [127]. Nově syntetizované analogy této aktivní molekuly jsou biologicky a farmakologicky testovány a slibné molekuly jsou pak formulovány spolu s pomocnými látkami do léčiva [128]. Při formulaci je nutné brát ohled především na stabilitu konečného přípravku a jeho rozpustnost, která může ovlivňovat biologickou dostupnost při podání pacientovi. Tato formulace léčiva zajistí možnost podání aktivní látky během klinických testů, avšak často je během vývoje dále modifikována na základě nových zjištění během preklinických a klinických studií. Během tohoto kroku je také potřeba zjistit krátkodobou, dlouhodobou a teplotní stabilitu navrhovaného přípravku. Zjištěné degradační produkty jsou následně zohledněny při vývoji specifických analytických metod pro identifikaci a kvantifikaci nečistot, které budou v budoucnu použity pro kontrolu kvality daného přípravku [129], [130].



Obr. 9: Jednotlivá stádia vývoje léčiva, přepracováno z [2].

V rámci preklinických studií jsou shromažďovány informace o absorpci, distribuci, metabolismu a exkreci navrhované aktivní látky a je také stanovena toxicita a letální dávka přípravku. Využívá se jak *in vitro* přístup, tak testování na laboratorních zvířatech. Po potvrzení bezpečnosti a účinnosti je přistoupeno ke klinickému testování na lidech, které probíhá ve 3 fázích. V první fázi je léčivo podáno zdravým dobrovolníkům a je stanovena biologická dostupnost, doporučená dávka a případné nežádoucí účinky [2]. V druhé fázi je studován účinek léčiva na malém okruhu vybraných pacientů. Nežádoucí účinky stejně jako vliv dlouhodobého podávání jsou pak zhodnoceny v rámci třetí fáze na širším okruhu pacientů. Všechny tyto studie, ať již preklinické nebo klinické, vyžadují monitorování koncentrace léčiva v biologickém materiálu, kterým může být plazma, sérum, tkáň nebo moč [2], [127], [131]. Proto jsou v těchto fázích vývoje léčivého přípravku nezbytné metody pro přípravu těchto vzorků a chromatografické metody pro stanovení koncentrací zkoumaných látek. Po úspěšném dokončení těchto výzkumných stádií je nutné připravit dokumentaci pro schvalovací řízení, tedy registraci [2], [132]. Tato dokumentace musí obsahovat autoritou předepsané důkazy o bezpečnosti a účinnosti léčiva stejně jako protokoly pro výrobu a kontrolu kvality. V závislosti na předpokládaném trhu je možné léčiva registrovat v rámci jednotlivých zemí nebo v rámci evropské (Evropská léková agentura - EMA) nebo americké lékové agentury (Úřad pro kontrolu potravin a léčiv - FDA). I po tomto schválení a uvedení na trh je však léčivo podrobeno dalšímu sledování v rámci čtvrté fáze klinického výzkumu [2].

3.2.2 Požadavky na analytické metody využívané ve vývoji léčiv

Nejběžnější analytické postupy využívané ve vývoji léčiva vycházejí ze směrnice Q2 Mezinárodní rady pro harmonizaci technických požadavků na humánní léčiva (ICH) a slouží k identifikaci, kvantitativnímu či limitnímu hodnocení nečistot a ke stanovení obsahu účinné látky [29]. K těmto stanovením, ať už v léčivém přípravku nebo léčivé látce, se využívá široké spektrum analytických metod [2]. Jejich kombinace by měla zajistit dostatečné informace o identitě, čistotě, obsahu a stabilitě výchozích látek i konečného produktu [2], [29].

Nečistoty vzniklé během syntézy i skladování léčiva musí být dle závazných směrnic kontrolovány společně s účinnou látkou (API). Hodnoty jednotlivých limitů, kdy je nutné nečistoty hlásit, identifikovat, či kvantitativně hodnotit, jsou určeny na základě maximální denní dávky jak pro API, tak pro léčivý přípravek [133], [134]. Tyto hodnoty shrnuje Tab. 2. Pokud je účinnou látkou enantiomer, příslušný opačný enantiomer je také považován za nečistotu [135]. Jiné limity platí pro potenciálně genotoxické nečistoty. Ty jsou vzhledem k vysoké toxicitě velmi nízké, např. identifikační limit je nastaven na 1,5 µg celkové denní dávky dané nečistoty [136].

Tab. 2: Limity pro hodnocení obsahu nečistot v účinné látce a léčivém přípravku na základě mezinárodních směrnic ICH Q3A [133] a Q3B [134]. CDD - celková denní dávka.

	Maximální denní dávka	Limit pro hlášení	Identifikační limit	Kvantifikační limit
Léčivý přípravek	≤ 1g	0,1 %		
	> 1 g	0,05 %		
	< 1 mg		1,0 % nebo 5 µg CDD	
	1 – 10 mg		0,5 % nebo 20 µm CDD	
	> 10 mg – 2g		0,2 % nebo 2 mg CDD	
	> 2 g		0,1 %	
	< 10mg			1,0 % nebo 50 µg CDD
	10-100 mg			0,5 % nebo 200 µg CDD
	> 100 mg – 2 g			0,2 % nebo 3 mg CDD
	> 2 g			0,15 %
Účinná látka	≤ 2g	0,05 %	0,1 % nebo 1 mg	0,15 % nebo 1 mg
	> 2 g	0,03 %	0,05 %	0,05 %

Na všechny analytické metody využívané ve vývoji léčiv jsou kladeny vysoké nároky především v oblasti rychlosti a vysoké prostupnosti vzorků. Dalším důležitým kritériem je selektivita daných metod, jelikož separované nečistoty mohou mít podobnou chemickou strukturu jako API, a tedy velmi podobné fyzikálně-chemické vlastnosti. V tomto případě je separace těchto nečistot a API značně náročná. Opačný problém představují látky naprosto odlišné, např. zbytkové látky ze syntézy, které je však přesto potřeba v ideálním případě stanovit v rámci jedné analýzy [2], [30], [137]. Před samotným použitím musí být všechny metody také řádně validovány [138]. Typicky stanovovanými parametry je mez detekce

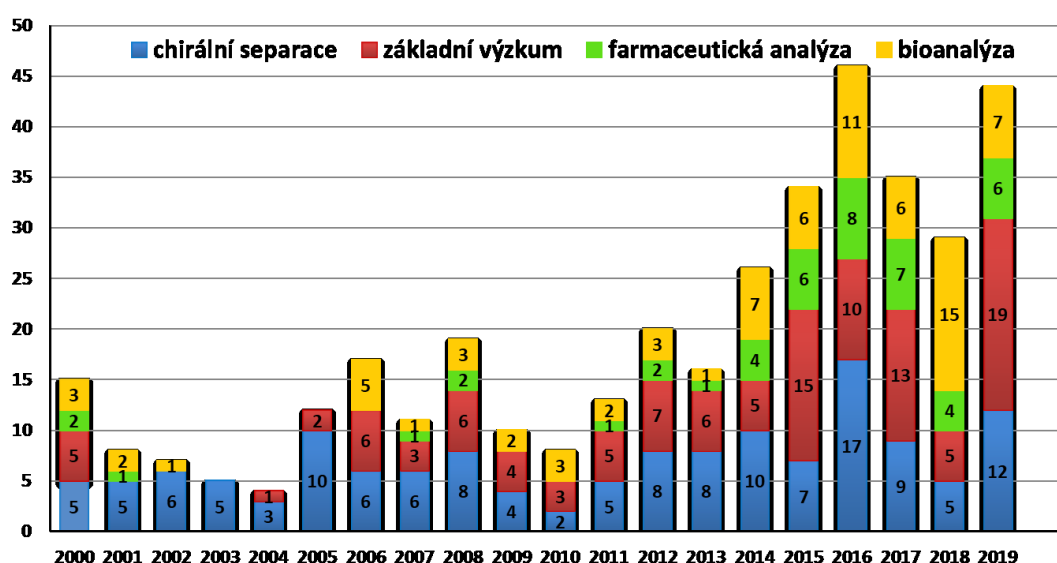
(LOD), dolní mez stanovitelnosti (LLOQ), linearita a rozsah. Metody pro kvantitativní hodnocení dále musí splnit podmínky správnosti a přesnosti [29]. Kromě konvenčního způsobu může být pro validaci použit také přístup určení celkové chyby měření (total error approach) [138], jak bylo ukázáno v několika publikovaných studiích [139]–[144].

3.2.3 Možnosti využití SFC ve farmaceutické analýze

3.2.3.1 Analýza léčivých látek a léčivých přípravků

Zastoupení SFC metod ve farmaceutické analýze v posledních letech roste (Obr. 10). V zavedených oblastech, jako jsou chirální separace, zůstává zastoupení SFC přibližně stejné, avšak postupně narůstá počet SFC prací zabývajících se farmaceutickou kontrolou kvality a bioanalýzou. Přesto toto číslo nemusí být konečné, neboť mnoho farmaceutických společností využívá SFC aniž by výsledky byly publikovány [30], [145], [146].

V současnosti je pro identifikaci nově nalezených nebo syntetizovaných látek kromě infračervené spektroskopie a nukleární magnetické rezonance využívána především hmotnostní spektrometrie, a to ve spojení s kapalinovou chromatografií [2]. Vzhledem ke svým výhodám má však SFC potenciál v blízké době doplnit či v určitých případech nahradit LC. Mimo ekologičnost, vysokou rychlost, účinnost a unikátní selektivitu [2], [30], [31], [147] nabízí SFC také možnost analýzy méně polárních látek, které jsou silně zadržovány v LC, a také analýzu látek špatně rozpustných nebo nestabilních ve vodných mobilních fázích [2].



Obr. 10: Počet publikovaných článků zabývajících se SFC v různých oblastech farmaceutické analýzy. Převzato z [2] a aktualizováno.

Oblastí, ve které je již nyní SFC šířeji využívána ve farmaceutickém průmyslu je hodnocení chirální čistoty při syntéze nových léčivých látek [30], [148], [149]. Stereochemie je důležitým faktorem lékového profilu látek s dopadem na adsorpci, metabolismus i toxicitu [2], [150], [151]. Většina lékových agentur tak nyní vyžaduje prokázání chirální čistoty nového léčiva před jeho uvedením na trh [151]. Chirální separace může kromě SFC probíhat za využití mnoha analytických technik jako jsou např. kapalinová chromatografie na normálních nebo reverzních fázích, plynová chromatografie, tenkovrstvá chromatografie nebo kapilární elektroforéza [2], [52], [152], [153].

Další z oblastí, ve kterých je již využití SFC zavedeno do praxe je přečišťování chirálních i achirálních látek pomocí preparativní SFC [2], [154], [155]. Preparativní chromatografie je v praxi využívána pro přečišťování od miligramových množství nově syntetizovaných látek až po kilogramy konečného produktu za den [156]. Vzhledem k vysoké těkavosti SFC mobilní fáze odpadá v této metodě zdlouhavý krok odpařování získaného eluátu, což šetří čas i potřebnou energii.

Oproti výše zmiňovanému využívání SFC při objevování a vývoji nových léčiv, zavedení SFC do regulovaných farmaceutických laboratoří pro analýzu léčivých látek a přípravků bylo mnohem pomalejší [2]. Nižší citlivost, reprodukovatelnost, správnost a robustnost starších SFC platforem zapříčinily obtížnou validaci těchto metod, což je vyžadováno všemi lékovými agenturami [133], [134], [157], [158]. Většina z těchto nevýhod však byla překonána zavedením nové moderní instrumentace, jak bylo diskutováno v kapitole 3.1.3. Tato nová generace SFC přístrojů tedy může být využívána za podmínek správné výrobní praxe (GMP), jak bylo prokázáno v práci Hickse a spol. [159] a také první studií mezilaboratorní přenositelnosti SFC metody pro stanovení nečistot salbutamolu [160].

Vzhledem k vysoké koncentraci účinné látky, která může dosahovat až 1000násobku koncentrace nečistoty, je pík API většinou relativně široký a chvostuje. Nečistoty v mnohem nižších koncentracích proto nemusí být detekovány, pokud eluují v širokém retenčním okně API [161], [162]. Přestože unikátní selektivita UHPSFC může být v tomto případě velmi výhodná, pouze několik málo studií se zatím věnovalo UHPSFC metodám pro kontrolu nečistot [140], [147], [161], [163]–[166]. Potenciál SFC ve farmaceutické analýze však byl prokázán v mnoha fundamentálních studiích [2]. Ty

využívaly uměle připravené směsi farmaceutických standardů anebo vzorky pro kontrolu kvality, které sloužily jako příklady pro studium odezvy detektorů [35], [167], porovnání stacionárních fází [18], [55], [66], složení mobilní fáze [18], [168], [169] a vlivu aditiv [73], [170], teploty a tlaku. Bohužel publikované práce zabývající se SFC analýzami vzorků v rámci regulovaného prostředí nejsou zatím tak časté.

V rámci různých stupňů ve vývoji léčiva jsou zapotřebí metody zaměřené na rozdílné parametry. Metoda pro kvantitativní hodnocení hlavní účinné látky a případně dalších komponent je nutná především při kvantitativním hodnocení léčiva, při stabilitních testech a studiích disoluce. Při validaci takovéto metody pak není nutné stanovovat mez stanovitelnosti a kvantifikace, jelikož se nepředpokládá analýza velmi nízkých koncentrací API. Pouze několik publikovaných prací diskutovalo vývoj a validaci SFC metod pro kvantitativní hodnocení. Jednou z nich je studie stanovující chlorzoxazon, paracetamol a aceklofenak v jednotlivých i kombinovaných lékových formách [171]. Podobně byla vyvinuta SFC metoda pro stanovení isoniazidu a pyrazinamidu [172], ramiprilu a telmisartanu [173], několika antibiotik [139]. Puppala a kol. popsali metodu pro stanovení R- a S-eliglustatu [174]. Všechny tyto práce byly validovány, avšak u některých z nich nebyly vyhodnoceny všechny potřebné parametry, jako je např. selektivita [171].

Druhým typem analytických metod jsou metody pro kontrolu nečistot využívané během kontroly kvality a při studiu degradačních procesů [2]. Syntéza API většinou zahrnuje několik kroků a konečný produkt proto může obsahovat nízké koncentrace zbytkových nečistot ze syntézy. Dále se mohou přidat nečistoty vzniklé během skladování, degradační produkty, vedlejší produkty syntetických reakcí a katalyzátory [2], [158]. Obsah všech těchto látek podléhá přísné kontrole a je tedy nutné vyvinout analytickou metodu, která bude tyto nečistoty identifikovat a také kvantifikovat [2], což je nezbytné, aby byla zaručena bezpečnost konečných léčivých přípravků. Stanovení všech nečistot v rámci jedné analýzy je obtížné. Aby bylo minimalizováno riziko přehlédnutí některé z nečistot kvůli koeluci s API či jinou nečistotou, jsou v praxi většinou využívány minimálně dva komplementární chromatografické systémy nebo metody. V rámci validace je pak u těchto metod nutné prokázat především selektivitu, a tedy schopnost stanovovat každý z analytů za přítomnosti ostatních látek. Vzhledem k předpokládaným nízkým koncentracím nečistot je taktéž požadováno určení meze stanovitelnosti a kvantifikace, a to za přítomnosti API

na mnohonásobně vyšší koncentrační hladině. Poměr koncentračních hladin API a stanovovaných nečistot upravují směrnice ICH Q3A a Q3B [133], [134] jak pro léčivou látku tak pro léčivý přípravek. Tyto hladiny byly diskutovány v kapitole 3.2.2 a jsou shrnuty v Tab. 2.

Pro použití metody ke kontrole kvality a stanovování nečistot je samozřejmě nutný vývoj a optimalizace takové metody. Několik skupin se proto zabývalo přístupem SFC generického screeningu [54], [55], [66], [142], [169] a volbou správné stacionární [6], [7], [56], [61], [175] a mobilní fáze [142], [168], [176]. Přestože se několik SFC prací věnovalo stanovení nečistot ve farmaceutických přípravcích, pouze několik z nich bylo validováno dle požadavků mezinárodních autorit [140], [147], [160], [164]–[166], [177]–[179]. Dvě z těchto metod byly vyvinuty jako alternativa k zavedeným enantioselektivním LC metodám [159], [178]. Dispas a kol. navrhli SFC metodu jako náhradu za lékopisnou LC metodu pro stanovení nečistot salbutamolu sulfátu [147]. Tato metoda následně posloužila k prokázání mezilaboratorní přenositelnosti [160]. Kvantitativní hodnocení látek pomocí SFC bylo provedeno v mnoha typech farmaceutický produktů včetně krému [180], oleje [181], vodného roztok [182] a tablet [163], [172], [179]. Validována byla také SFC metoda pro limitní hodnocení nitrosaminových nečistot v sartanech [183]. Přes současný rostoucí počet studií, validované SFC metody pro stanovení achirálních látek ve farmaceutických přípravcích představuje stále pouze zlomek SFC prací.

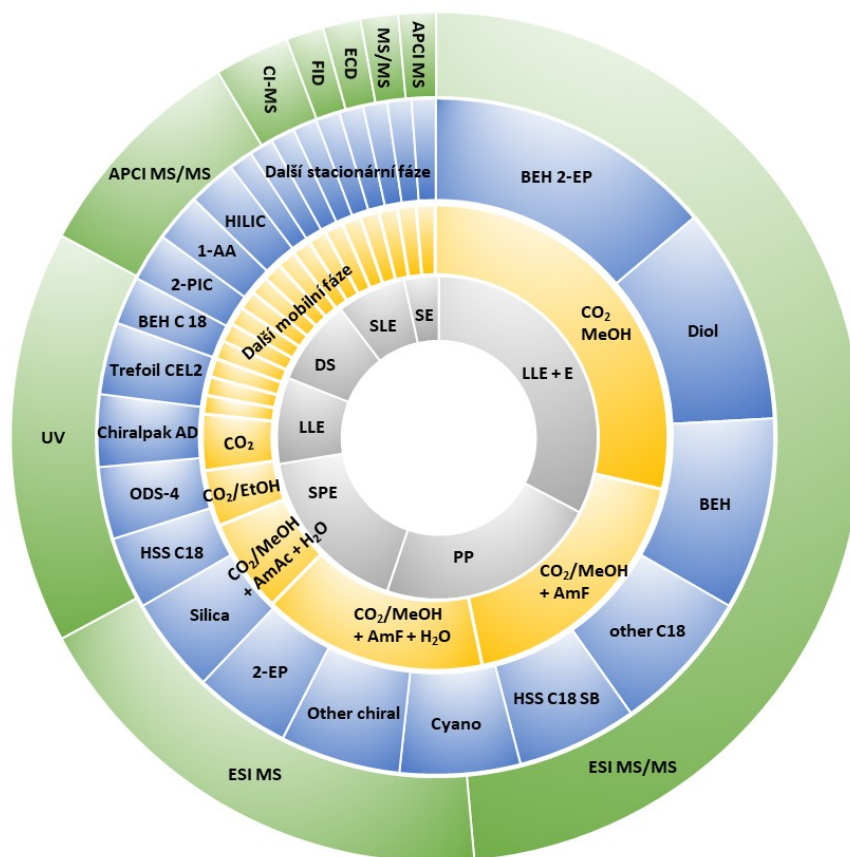
3.2.3.2 Analýza léčivých látek a jejich metabolitů v biologickém materiálu

V rámci studia chování léčivé látky po podání do organismu je nutné stanovit tuto látku a její metabolity v biologickém materiálu, kde se přirozeně vyskytují. Takovým materiálem může být krev, plazma, sérum, moč nebo např. sliny [2], [3], [41]. Jelikož se jedná o komplexní vzorky, které ve většině případů nejsou kompatibilní s chromatografickým systémem, důležitou součástí těchto analýz je příprava vzorků. Ta by v ideálním případě měla odstranit interferující sloučeniny, jako jsou např. soli, fosfolipidy a proteiny [2], [3], [41]. Mezi nejčastěji používané metody přípravy vzorku patří srážení proteinů (PP), extrakce z kapaliny do kapaliny (LLE) a extrakce na tuhou fázi (SPE). V případě LC analýz většinou následuje odpaření a rekonstituce vzorku v rozpouštědle kompatibilním

s LC mobilní fází. Tento krok však odpadá při SFC analýzách, což snižuje čas přípravy a zvyšuje prostupnost vzorků [3], [41], [46]. Pokud je však nutné zakoncentrování vzorků, je tento krok potřebný také v SFC. Naopak vzorky moči, u kterých je možno v LC analýze využít jednoduché ředění vodou a přímý nástřik, představují v SFC složitější problém. Ředící rozpouštědlo musí být totiž zvoleno jako kompromis mezi tvarem píků a možností precipitace solí při použití příliš silného organického činidla [2], [41]. V několika studiích však byla prokázána možnost použití tohoto postupu přípravy vzorků, a to za využití vody [46], [48] nebo 75% acetonitrilu jako ředících rozpouštědel.

Analyzované látky jsou v biologických vzorcích přítomny v nízkých koncentracích na rozdíl od interferujících látek, jejichž koncentrační hladiny bývají mnohonásobně vyšší. Kritickým parametrem chromatografických metod je proto selektivita a citlivost. Té bývá dosaženo detekcí pomocí hmotnostní spektrometrie, která bývá využívána ve většině bioanalytických metod (Obr. 11). Ve více než polovině případů se jedná o MS/MS analýzy, avšak i přes nižší citlivost je i MS detekce široce zastoupená. Ionizace elektrosprejem je pak preferována v obou těchto módech [41]. Jak již bylo zmíněno výše, u všech SFC-MS metod je nutné stanovit matricové efekty. První z publikovaných SFC metod tato doporučení opomíjely [2], avšak v novějších pracích jsou již matricové efekty stanoveny [93], [184], [185], jak vyžadují závazné směrnice [186], [187]. Z ostatních detektorů je pak šířeji zastoupena pouze UV detekce [41].

Přestože LC je stále metodou volby, počet bioanalytických SFC metod v posledních letech roste. Této problematice se věnuje několik souhrnných článků [30], [146], [188] a byly popsány především výhody odlišné selektivity pro analýzu dopingových látek [189], chirálních látek [190], metabolitů [82], [105], [191], antibiotik [192], lipidů [101], [193], lipofilních vitamínů [93], [94], [109], a také pro terapeutické monitorování lékových hladin [194].



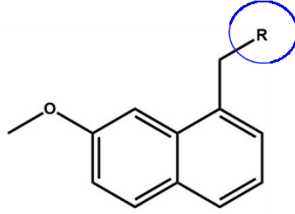
Obr. 11: Zastoupení rozdílných chromatografických podmínek typických pro SFC metody v bioanalýze. LLE - extrakce z kapaliny do kapaliny, E - odpaření, PP - proteinová precipitace, SPE - extrakce na tuhou fázi, DS - ředění a přímý nástřik, SLE - extrakce z kapaliny do kapaliny za podpory inertního nosiče, SE - odpaření rozpouštědla, MeOH – methanol, AmF – mravenčan amonný, AmAc – octan amonný, EtOH – ethanol, 2-EP – 2-ethylpyridin, ODS – octadecylsilikagel, 2-PIC – 2-pikolylylamin, 1-AA – 1-aminoantracen, ESI – ionizace elektrosprejem, APCI – chemická ionizace za atmosférického tlaku, CI – chemická ionizace, FID – plamenově-ionizační detektor, ECD – detektor záchytu elektronů. Převzato z [41].

4. Komentáře k publikovaným pracím zahrnutým v dizertační práci

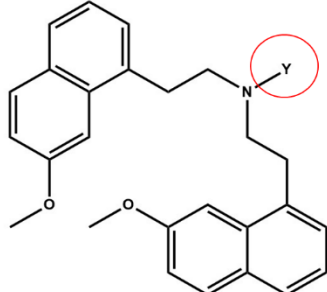
4.1. Vývoj, validace a srovnání UHPSFC a UHPLC metody pro stanovení agomelatinu a jeho nečistot

Cílem této práce bylo vyvinout UHPSFC a UHPLC metodu pro stanovení agomelatinu a jeho 6 nečistot a následně tyto metody validovat dle ICH směrnic a porovnat v několika zvolených parametrech.

Agomelatin se řadí mezi syntetické analogy hormonu epifýzy melatoninu. Jedná se o agonistu melatoninu a selektivního antagonistu serotoninu, díky čemuž agomelatin reguluje cirkadiánní rytmy a je používán pro léčbu depresivní poruchy u dospělých [195]. Pro zajištění farmaceutické kontroly kvality musí být společně s agomelatinem stanovováno 6 nečistot uvedených na Obr. 12.



	R	Mw	logP	pKa^a	pKa^b	akceptor H⁺	donor H⁺
Kyselina	-COOH	216,23	2,41	4,33	-	3	1
Amid	-CONH ₂	215,25	1,76	16,11	-0,67	3	2
Nitril	-CN	197,23	2,69	NA	NA	2	0
AgoSůl	-CH ₂ -NH ₂ · HCl	237,73	2,23	10,00	-	-	-
Agomelatin	-CH ₂ -NHCO-CH ₃	243,30	2,46	16,17	-0,53	3	1



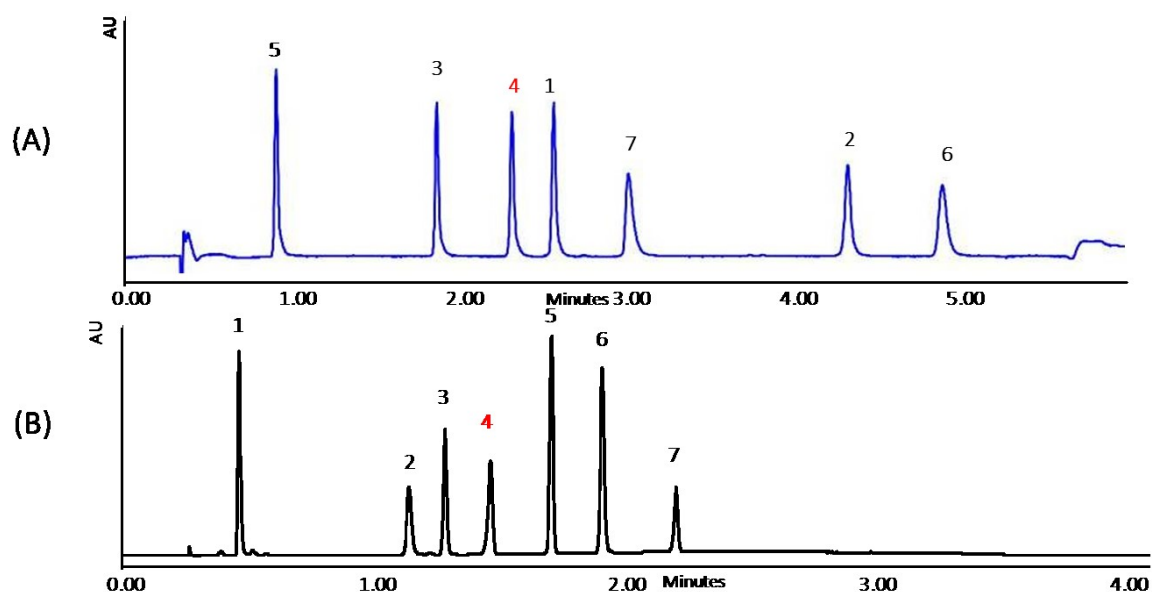
	Y	Mw	logP	pKa^a	pKa^b	akceptor H⁺	donor H⁺
Amin	-H	385,50	6,96	-	9,73	3	1
Dimer	-COCH ₃	427,53	6,58	-	0,59	4	0

Obr. 12: Chemická struktura a fyzikálně-chemické vlastnosti stanovovaných nečistot agomelatinu. pKa^a – pKa nejkyselejší skupiny ve struktuře, pKa^b – pKa nejbazičtější skupiny ve struktuře.

Vzhledem k rozdílným fyzikálně-chemickým vlastnostem těchto látek je jejich analýza obtížná. V době realizace studie existovaly pouze 2 publikované práce popisující metody pro analýzu agomelatinu a jeho nečistot [196]. Obě tyto metody využívaly kapalinovou chromatografii s časem analýzy 30, respektive 50 min. Vzhledem k obtížnosti současné analýzy těchto látek s velmi odlišnými fyzikálně-chemickými vlastnostmi byly

nakonec zvoleny dva přístupy k vývoji metody. Jak vyplývá ze zmíněných publikovaných prací, kapalinová chromatografie může být využita pro separaci těchto analytů, avšak za cenu delšího času analýzy. Proto byla optimalizována metoda UHPLC, která by měla umožnit zkrácení času analýzy. Druhým přístupem byl vývoj metody na systému SFC, který nabízí odlišnou selektivitu.

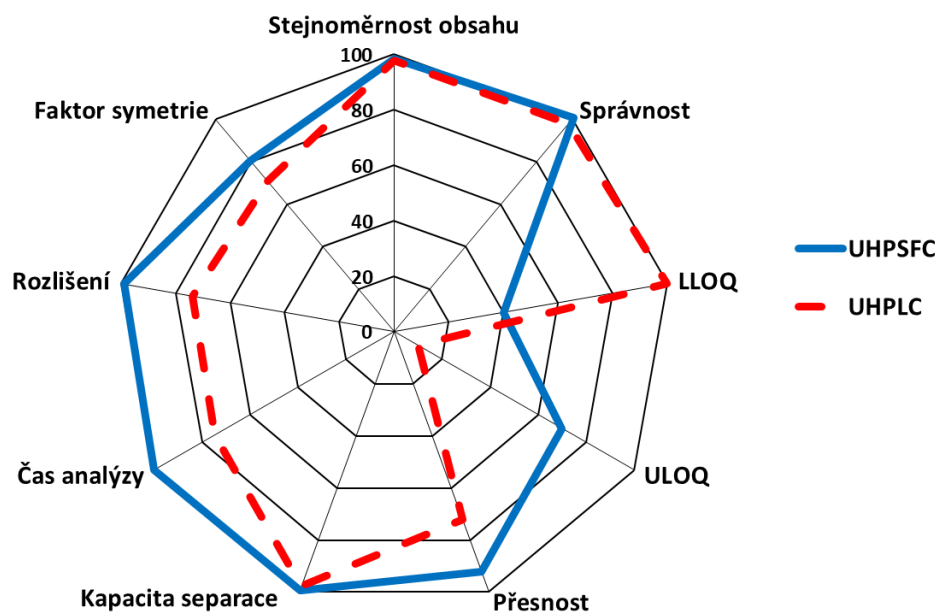
Během optimalizace byly na obou systémech vyzkoušeny různé stacionární i mobilní fáze. Byl testován taktéž vliv odlišného nastavení gradientu a na SFC také tlaku BPR a teploty. Podmínky finálních metod (Obr. 13) byly následující: UHPSFC metoda využívala BEH 2-EP stacionární fázi, 20mM mravenčan amonný v methanolu s 5 % vody jako modifikátor, gradient 5–40 % modifikátoru ve 3 min, teplotu kolony 40 °C, průtok 2 ml/min a BPR tlak 13,8 MPa. UHPLC separace byla provedena na koloně BEH Shield RP18 s mobilní fází (A) methanol/acetonitril (1:1) a (B) 10mM pufr octanu amonného o pH 9.5. Gradient byl nastaven z 5 % složky A na 70 % v 5 min s gradientovou křivkou č. 4. Průtok byl 0,6 ml/min, teplota kolony 30°C.



Obr. 13: Separace agomelatinu a jeho nečistot za použití (A) UHPLC a (B) UHPSFC metody.

Po detailní optimalizaci byly metody validovány dle ICH směrníc Q3A a Q3B [133], [134], kdy byly stanoveny parametry linearita, mez detekce, mez kvantifikace, přesnost, správnost a mezidenní přesnost. Dalším krokem byla aplikace obou metod na vzorky tablet, čímž byla potvrzena jednotnost obsahu jednodávkových přípravků, jak uvádí Evropský Lékopis [197]. Na závěr byly finální metody porovnány ve zvolených parametrech (Obr. 14).

Přestože obě metody splnily validační kritéria, UHPSFC metoda poskytla mírně lepší výsledky pro přesnost (RSD 0,2 oproti 1,4 %) a rozlišení mezi API a následující nečistotou (8,21 oproti 5,54), což je v metodách kontroly kvality kritický parametr. Také čas analýzy byl o více než minutu kratší. Na druhou stranu, UHPLC metoda poskytla 2,5x vyšší citlivost.



Obr. 14: Porovnání vyvinutých UHPSFC a UHPLC metod pro stanovení agomelatinu a jeho nečistot.

4.2. Ultra-vysokoúčinná superkritická fluidní chromatografie v kontrole nečistot: Hledání generického přístupu ke screeningu

Tato práce byla zaměřena na separaci směsí pro kontrolu kvality (QC), které vždy obsahovaly API a její příslušné nečistoty. Celkem se jednalo o 10 směsí, kdy v 5 z nich byly přítomny převážně látky s acidobazickými vlastnostmi a zbývajících 5 obsahovalo převážně neutrální látky. Jako 11 byla přidána směs 7 betablokátorů, aby byly zastoupeny také látky se silně bazickými vlastnostmi. V rámci studie byl zkoumán vliv modifikátorů a aditiv na chromatografickou separaci na 7 kolonách hybridního typu, tj. BEH, BEH 2-ethylpyridin (2-EP), CSH pentafluorofenyl (PFP), Torus Diol, Torus diethylamin (DEA), Torus 2-picolyamin (2-PIC), Torus 1-aminoanthracen (1-AA)) a silikagelové koloně HSS C18 SB. Nejprve byly systematicky testovány modifikátory mobilní fáze, jejíž hlavní složkou byl CO₂, včetně methanolu, ethanolu, isopropanolu, jejich směsí a směsí s acetonitrilem. Poté byl vyhodnocen vliv jednotlivých aditiv (0,1% kyselina mravenčí, 10mM mravenčan amonný, 10mM octan amonný, 0,1% hydroxid amonný, 2% voda) přidaných do methanolu.

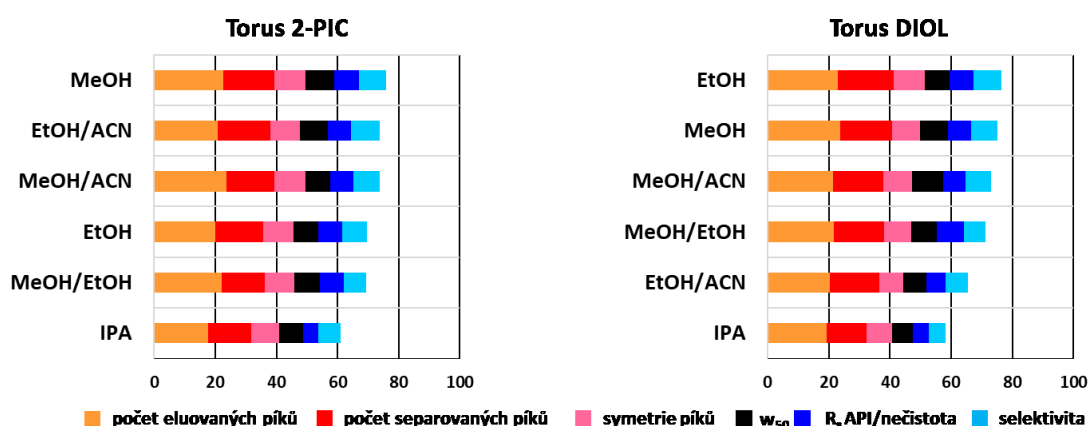
Hlavním cílem práce bylo zjistit, zda existují generické podmínky vhodné jako výchozí bod pro vývoj UHPSFC metody pro kontrolu nečistot. Pro porovnání testovaných podmínek bylo proto vybráno 6 parametrů a byl vytvořen matematický model, který daným chromatografickým podmínkám přiřadil procentuální hodnocení. Prvním z parametrů byl počet eluovaných látek (n_e). Maximální hodnota, tj. 100 %, zde odpovídala celkovému počtu látek v dané směsi. Totéž platilo pro druhý parametr, počet separovaných látek (n_s). Jelikož se jedná o dva nejdůležitější parametry v každé analytické metodě, byla na ně v konečné rovnici vložen dvojnásobný důraz. Třetím parametrem byla symetrie píků (s). Ta byla spočítána jako průměr symetrií všech píků v chromatogramu vztažený na optimální symetrii, tj. 1. Obdobně byla určena šířka píků v 50 % výšky (w_{50}). Zde však jako referenční hodnota sloužila nejnižší hodnota v daném setu analýz. Výpočet selektivity byl složitější, jelikož průměrná selektivita z chromatogramu musela být vynásobena poměrem počtu separovaných píků a počtu látek ve směsi. Tento přepočítání bylo nutné, aby nedocházelo ke zkreslení výsledků v případech, kdy eluoval nižší počet látek, než kolik jich QC směs opravdu obsahovala. Jako referenční hodnota pak byla použita nejvyšší hodnota získaná v daném setu měření.

Tato studie byla zaměřena na kontrolu nečistot v reálných QC vzorcích. Proto bylo bráno v potaz také rozlišení mezi API a následující nečistotou, což je často kritický parametr ve farmaceutických aplikacích. Byly stanoveny celkem 4 možnosti. Pokud API koeluovala s nečistotou, byl výsledek tohoto parametru 0 %. 100 % pak odpovídalo rozlišení mezi 2–6. Rozlišení nižší než 2 je nedostatečné pro analýzu API a nečistot v nízkých koncentracích. Naopak rozlišení vyšší než 6 může vést k nepotřebnému prodloužení analýzy. Těmto možnostem byly přiřazeny výsledky 50, respektive 75 %. Celá rovnice je uvedena v Obr. 15.

$$\% = n_e \cdot 2 + n_s \cdot 2 + s + w_{50} + R_s$$

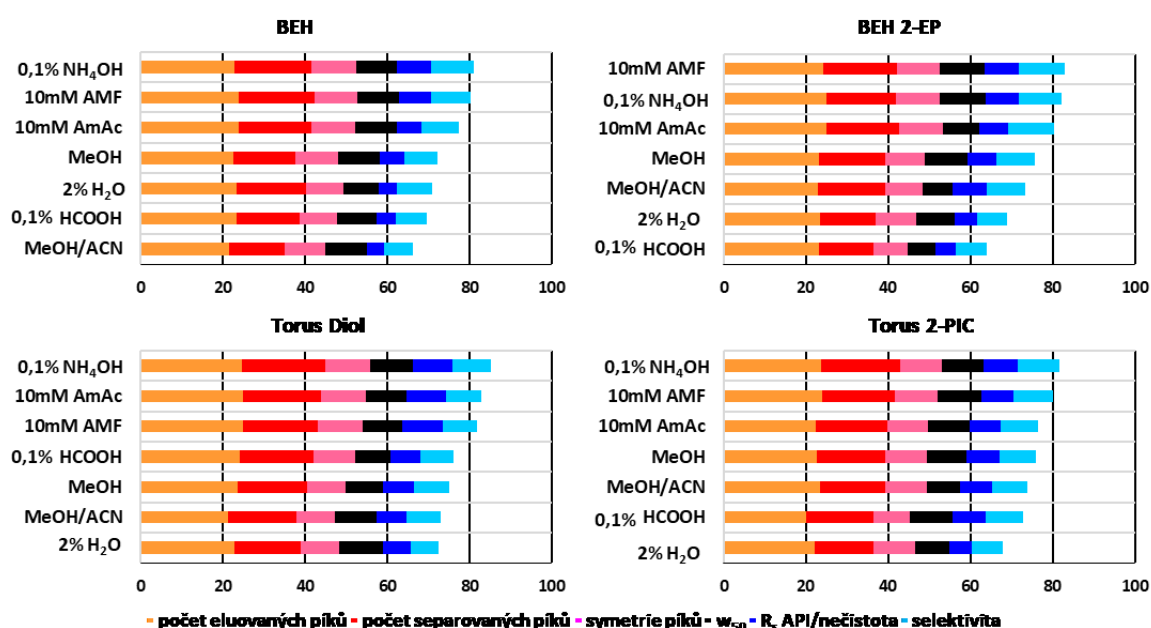
Obr. 15: Rovnice popisující model použitý pro porovnání UHPSFC separací.

Torus kolony jsou zástupci nové generace SFC stacionárních fází, u nichž by měla být omezena nutnost použití aditiv. Proto na nich byla provedena separace všech 11 směsí za použití 6 modifikátorů (methanol, ethanol, isopropanol, methanol/ethanol, methanol/acetonitril, ethanol/acetonitril) bez přídavku aditiv. Isopropanol byl jednoznačně nejméně vhodným generickým modifikátorem, kdy dosáhl nejnižšího hodnocení na všech kolonách především kvůli nízké eluční síle (Obr. 16). Na druhou stranu, methanol prokázal své generické vlastnosti díky své eluční síle, symetrii a šířce píků. Po vyhodnocení vhodnosti jednotlivých modifikátorů na každé z kolon byly tyto výsledky zkombinovány. Při porovnání výsledků na všech 4 kolonách, směs methanol/acetonitril poskytla výsledky lepší ve srovnání s ethanolem a jen mírně horší než methanol. Navíc nabídla zajímavé možnosti změny selektivity.



Obr. 16: Vyhodnocení vlivu organických modifikátorů na UHPSFC separaci 11 QC směsí na koloně Torus Diol (3,0 x 100 mm; 1,7 μm) a Torus 2-PIC (3,0 x 100 mm; 1,7 μm). MeOH – methanol, EtOH – ethanol, ACN – acetonitril, IPA – isopropanol, 2-PIC – 2-pikolyamin

Další část studie byla již provedena všech 8 kolonách. Kromě čistého methanolu a výše zmíněných aditiv byla do této části zařazena také směs methanol/acetonitril. Opět byly sestaveny souhrnné grafy, aby bylo možno pozorovat změny v chromatografické separaci (Obr. 17). Toto porovnání potvrdilo užitečnost těkavých aditiv v SFC mobilní fázi, a to i na Torus kolonách. Mravenčan amonný, octan amonný a hydroxid amonný byly mezi třemi nejlépe hodnocenými aditivami na všech kolonách. Rozdíly mezi nimi byly minimální a záležely na separovaných látkách. Hydroxid amonný přesto dosáhl nejlepších výsledků na 7 z 8 testovaných kolon. Směs methanol/acetonitril byla důležitá pro separaci kritických párů neutrálních látek nebo isomerů.



Obr. 17: Souhrnné vyhodnocení vlivu modifikátorů a aditiv na UHPSFC separaci 11 QC směsí na 4 kolonách (3,0 x 100 mm; 1,7 μm). AmAc – octan amonný, AMF – mravenčan amonný, MeOH – methanol, ACN – acetonitril, 2-PIC – 2-pikolyamin, 2-EP – 2-ethylpyridin.

V Tab. 3 jsou shrnuty kombinace stacionárních a mobilních fází, které poskytly nejlepší separace zkoumaných směsí pro kontrolu kvality. V posledním sloupečku jsou uvedeny další kolony, na kterých bylo dosaženo separace na základní linii. Všechny směsi kromě vardenafilu a betablokátorů byly úspěšně separovány na koloně Torus Diol. Tím bylo prokázáno široké aplikační pole této stacionární fáze, která by tudíž mohla být s výhodou použita jako generická fáze pro vývoj metody v oblasti kontroly kvality ve

farmacii. Kolona HSS C18 SB ukázala svou užitečnost v separaci látek, které byly těžko separovatelné za jiných podmínek. Jednalo se především o sloučeniny s podobnou strukturou nebo izomery.

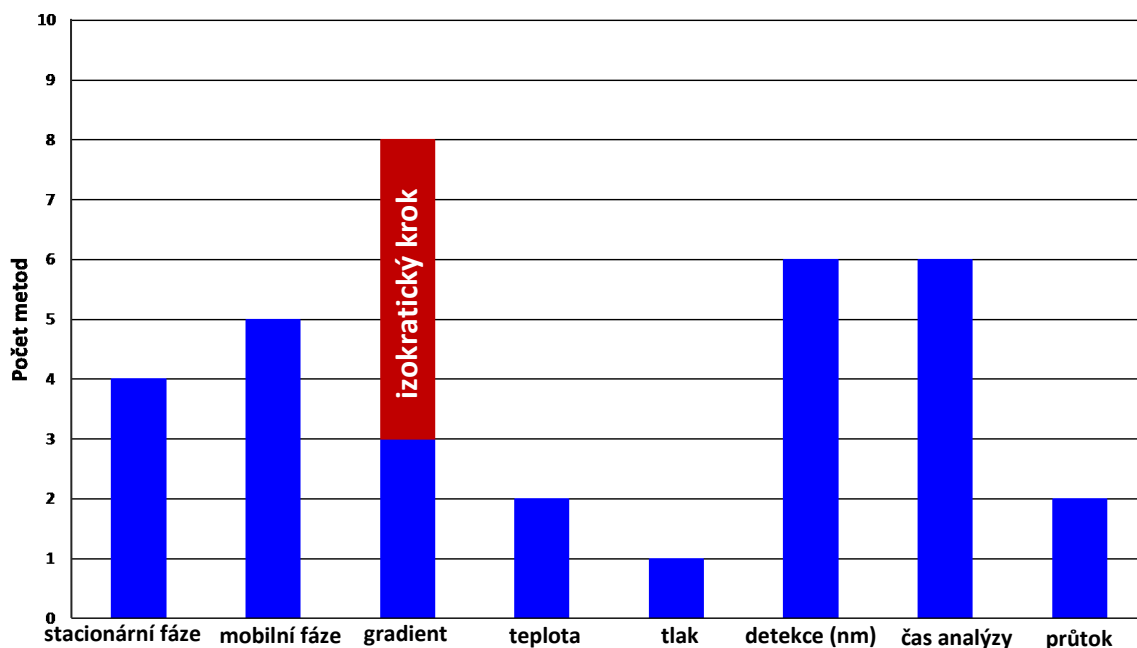
Tab. 3: Nejlepší podmínky UHPSFC separací pro každou z QC směsí. MeOH – methanol, ACN – acetonitril, AmF – mravenčan amonný, DEA – diethylamin, PFP – pentafluorofenyl, 2-PIC – 2-pikolyamin, AA – amino antracen, 2-EP – 2-ethylpyridin.

	kolona	Modifikátor/aditivum	Další možnosti
abirateron	BEH 2-EP	MeOH:ACN (1:1)	4 (Diol, BEH, DEA, HSS C18)
agomelatin	Torus Diol	MeOH + NH ₄ OH	5 (BEH, CSH PFP, HSS C18, 2-PIC, DEA)
atomoxetin	Torus Diol	MeOH + NH ₄ OH	2 (2-PIC, AA)
atorvastatin	HSS C18 SB	MeOH + NH ₄ OH	2 (Diol, AA)
betablokátory	Torus DEA	MeOH + NH ₄ OH	-
dasatinib	HSS C18 SB	MeOH + AmF	1 (Diol)
enzatulamid	Torus Diol	MeOH:ACN (1:1)	6 (BEH 2-EP, HSS C18, BEH, AA, DEA, 2-PIC)
estradiol	Torus Diol	MeOH	2 (2-PIC, BEH 2-EP)
ezetimib	Torus Diol	MeOH	5 (BEH, HSS C18, BEH 2-EP, 2-PIC, AA)
ticagrelor	HSS C18	MeOH:ACN (1:1)	1 (Diol)
varденаfil	Torus 2-PIC	MeOH + NH ₄ OH	2 (BEH, CSH PFP)

4.3. Ultra-vysokoučinná superkritická fluidní chromatografie v kontrole nečistot: Validace metod

Tato studie přímo navazuje na předchozí práci, v jejímž rámci byly vyvinuty UHPSFC metody pro stanovení 10 směsí pro kontrolu kvality, kdy každá směs obsahovala API a její příslušné nečistoty. Přestože většina z těchto metod poskytla rozlišení analytů na základní linii, většina z nich musela být dále optimalizována. Hlavní překážkou se ukázalo být rozlišení mezi API a následující nečistotou, které na základě experimentálních dat muselo být větší než 3. Nutné bylo také odstranit problémy s opakovatelností retenčních časů látek eluujících blízko mrtvého objemu nebo na konci gradientu a posun retenčních časů vlivem stárnutí kolon nebo efektu aditiva. Zastoupení jednotlivých parametrů změněných během optimalizace je uveden na Obr. 18. Nejčastěji bylo měněno nastavení gradientu, kdy u 5 metod byl přidáván do metody izokratický krok. Byla popsána také přínosnost výměny kolony Viridis UPC² HSS C18 SB za Acquity UPLC HSS C18 SB. Jedná se o kolony se stejnou chemií stacionární fáze, kdy první z nich je dedikovaná pro SFC separace a druhá pro HPLC separace. Jediným rozdílem ve vlastnostech je pak o 0,5 % vyšší pokrytí uhlíkem na SFC koloně. Tato minimální změna byla velmi důležitá především pro separaci strukturně podobných nečistot ve směsích atorvastatinu a tikagreloru. Další přínosnou změnou bylo přidání acetonitrilu k methanolu jako modifikátoru mobilní fáze, které bylo prospěšné pro malé změny v rozlišení. Pro separaci směsi estradiolu a jeho nečistot bylo potřeba použít spojení 2 kolon Torus diol. Za použití pouze jedné kolony bylo rozlišení mezi kritickými páry analytů nedostatečné.

Před měřením vzorků tablet byly všechny metody validovány na základě požadavků směrnice ICH Q2 [29], [133], [134]. V rámci validace byly stanoveny následující parametry: specifická, linearita, rozsah, dolní a horní mez stanovitelnosti (LLOQ, ULOQ), mez detekce (LOD), správnost a přesnost. Pro stanovení linearit bylo ve všech případech použito minimálně 8 koncentračních hladin. LOD a LLOQ byly stanoveny na základě poměru signálu a šumu, tj. ≥ 3 pro LOD a ≥ 10 pro LLOQ, a také na základě rovnice (Rov. 1, Rov. 2) navržené v ICH směrnici [29].



Obr. 18: Zastoupení jednotlivých parametrů změněných během optimalizace UHPSFC metod pro stanovení 10 směsí pro farmaceutickou kontrolu kvality.

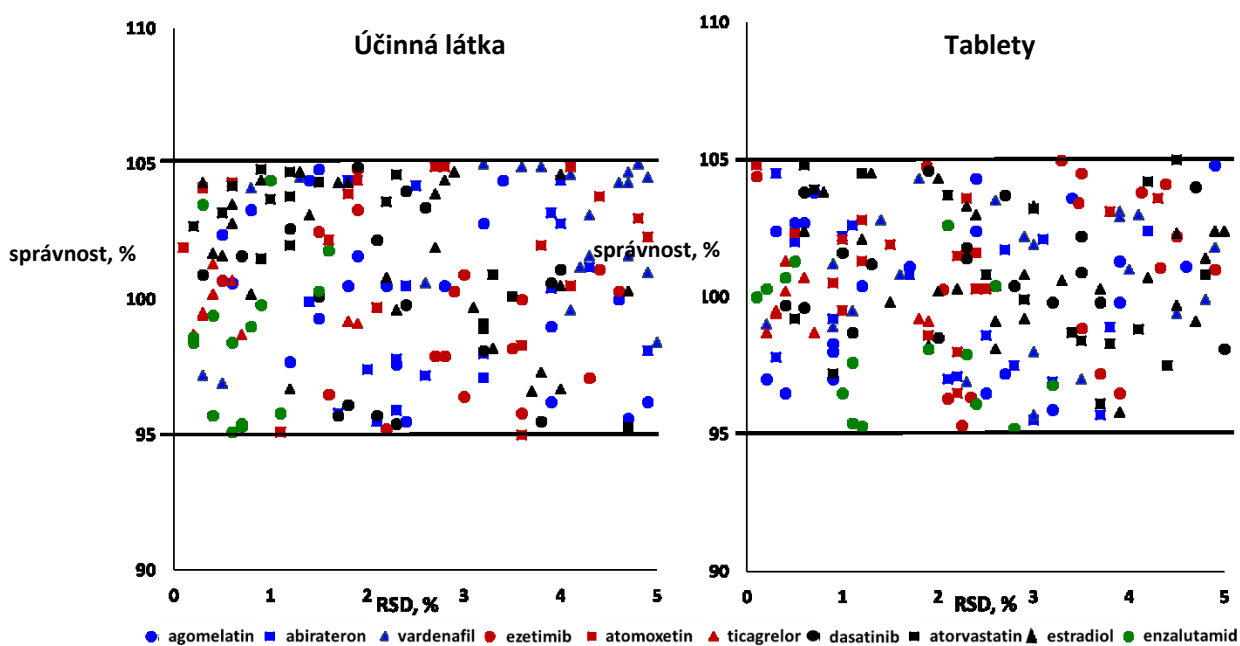
$$LOD = 3,3\sigma/S$$

Rov. 1: Rovnice popisující výpočet meze detekce (LOD) na základě ICH Q2 směrnice.

$$LOQ = 10\sigma/S$$

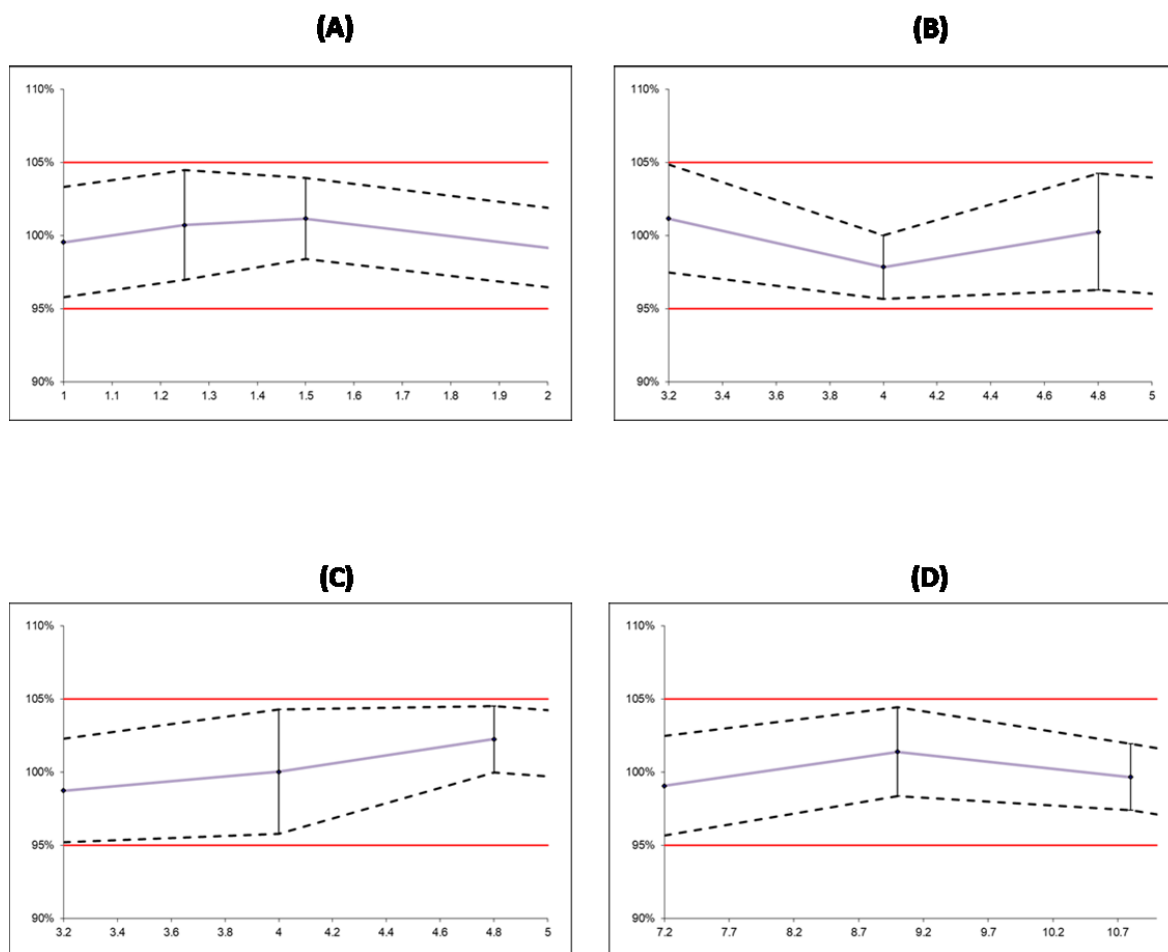
Rov. 2: Rovnice popisující výpočet meze stanovitelnosti (LOQ) na základě ICH Q2 směrnice.

Správnost byla stanovena na základě porovnání s referenční hodnotou, přesnost jako relativní směrodatná odchylka RSD mezi výsledky získanými v rámci jednoho dne nebo v rámci 3 následujících dnů. Testované koncentrace byly stanoveny specificky pro každou z 10 metod s ohledem na maximální denní dávky API, citlivost metody a přímočarost ředění. U všech testovaných koncentrací nečistot však bylo zachováno pravidlo koncentrace nečistoty odpovídající 0,05 % z koncentrace API, jak požaduje ICH směrnice Q3A a Q3B [133], [134]. Validace byla pro každou z metod provedena jak na lékové substanci, tak za využití tabletových přípravků. Výsledky validací splnily požadovaná kritéria, kdy správnost byla mezi 95–105 % a přesnost RSD \leq 5% (Obr. 19).



Obr. 19: Výsledky správnosti a přesnosti UHPSFC metod pro stanovení 10 směsí pro kontrolu kvality.

Pro 4 z metod byla navíc stanovena také mezidenní přesnost, kdy 3 rozdílné sety QC vzorků byly změřeny ve 3 různých dnech na jednom nebo více SFC systémech jedním nebo dvěma operátory. I zde byly splněny parametry správnosti a přesnosti. Na výsledky z těchto 4 metod byl navíc aplikován přístup stanovení celkové chyby měření, což je nový způsob statistického vyhodnocení validačních dat. Ukázky profilů jsou uvedeny na Obr. 20, kde červená linie představuje limit nastavený na 5 %. Pro každou ze 3 hodnocených koncentračních hladin byl vypočítán očekávaný limit tolerance β (expectation tolerance limit) dle postupů uvedených v [198], [199], který je vyznačen v grafech černou přerušovanou čarou. Relativní zkreslení (bias) pro každou koncentrační hladinu je uveden fialově.

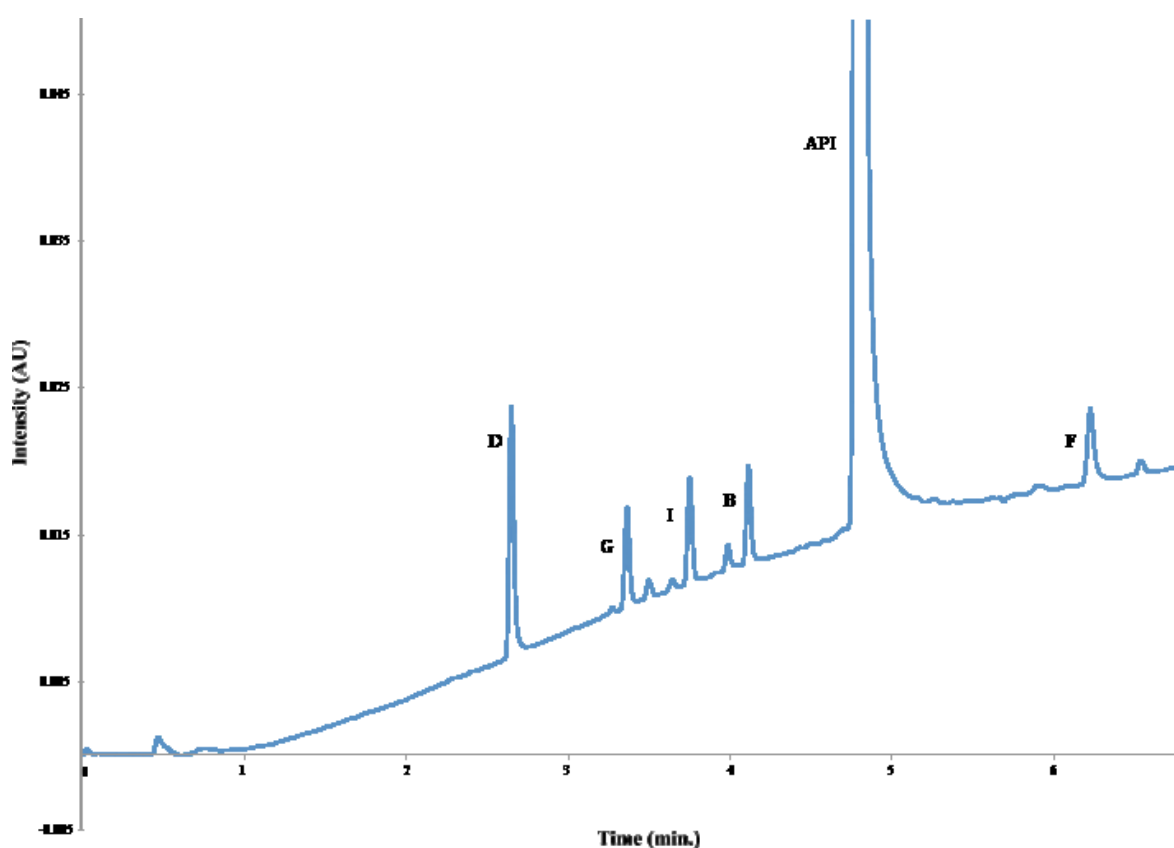


Obr. 20: Profily správnosti UHPSFC metod pro stanovení (A) nečistoty agomelatinu, (B) nečistoty atorvastatinu, (C) nečistoty enzalutamidu a (D) nečistoty tikagreloru. Přípustný limit – červeně, očekávaný limit tolerance β – černě, relativní bias – fialově.

4.4. První mezilaboratorní studie metody superkritické fluidní chromatografie pro stanovení farmaceutických nečistot

Pro zavedení SFC metod do praxe a speciálně v přísně regulovaném oboru farmaceutické analýzy je kromě vývoje a validace v jednotlivých laboratořích nutné také prokázat možnost přenosu SFC metod mezi laboratořemi.

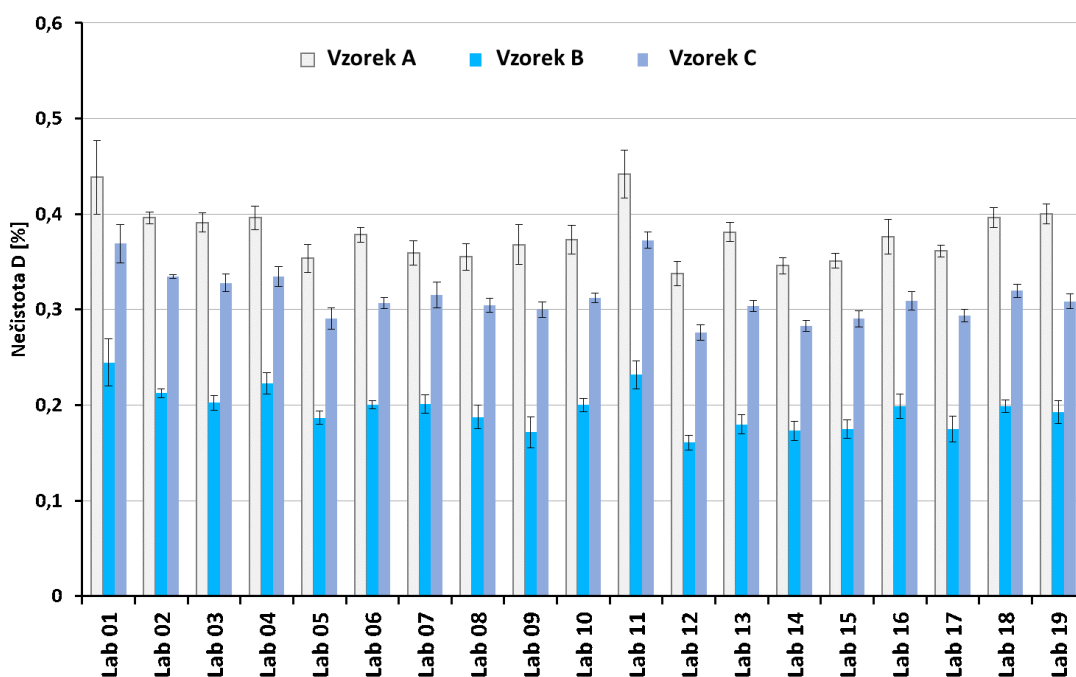
Tato studie zahrnovala 19 laboratoří ze 4 kontinentů a 9 zemí. Jednalo se jak o akademické skupiny, tak o farmaceutické firmy a laboratoře výrobců SFC instrumentace. Pro studii byla použita UHPSFC metoda pro stanovení salbutamolu sulfátu a jeho nečistot (Obr. 21), která využívala stacionární fázi Torus diethylamin a gradientovou eluci s CO₂ a 0,1% hydroxidem amonným v methanolu [147].



Obr. 21: UHPSFC chromatogram separace salbutamolu a jeho nečistot.

Protokol studie byl navržen v souladu s mezinárodní směrnicí ISO 5725-2 [200]. V první části studie bylo ověřeno nastavení metody v každé z laboratoří, a to vyhodnocením parametrů jako je selektivita metody a citlivost. Byl také proveden test

vhodnosti systému. Citlivost byla stanovena na základě poměru signálu a šumu pro nečistot D. Ve všech laboratořích byla tato hodnota vyšší než limitně nastavených 25, avšak rozmanitost byla vysoká, kdy se výsledky pohybovaly od 34 do 918 s průměrem 143. Toto bylo přiřazeno rozdílnosti v opotřebením UV lamp v jednotlivých laboratořích a použití jiných vyhodnocovacích softwarů. Mimo citlivost musely všechny laboratoře potvrdit také separaci API a nečistot na základní linii. Odchytky v retenčních časech mezi 6 nástřiky musely být nižší než 0,2 %. Totéž platilo pro plochu píků, kde byl ale limit 2 %.



Obr. 22: Jednotlivými laboratořemi změřený obsah nečistoty D ve vzorcích A, B a C.

Po potvrzení těchto kritérií byl zadanou metodou stanoven obsah nečistoty D ve 3 neznámých vzorcích. Každý ze vzorků byl analyzován v triplikátu a ve 3 různých dnech. Byla zkoumána opakovatelnost v rámci replikátů, jednoho dne i mezi dny (Obr. 22). Statistické vyhodnocení výsledků z jednotlivých laboratoří bylo provedenou zadávací skupinou Dr. Dispas v Belgii a jeho výsledky jsou shrnuty v Tab. 4. Získané výsledky pak byly porovnány s publikovanými hodnotami pro metodu kapalinové chromatografie [201], [202].

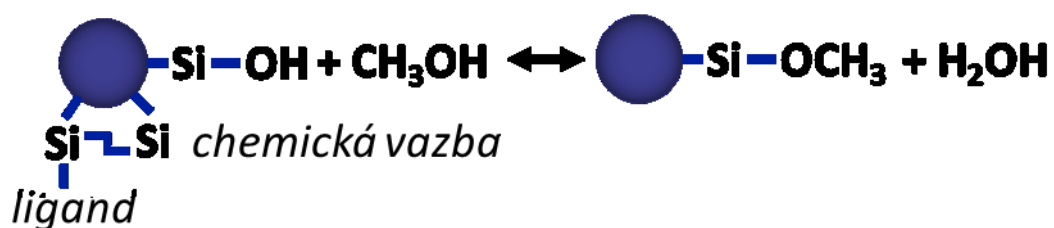
Tab. 4: Stanovení komponent rozptylu.

Zdroj variability	Nečistota D konc. 0,2 % (vzorek B)	Nečistota D konc. 0,3 % (vzorek C)	Nečistota D konc. 0,4 % (vzorek A)
Odchylky			
Laboratoře ($s^2_{\text{laboratoř}}$)	$3,23 \times 10^{-4}$	$4,67 \times 10^{-4}$	$5,83 \times 10^{-4}$
Dny (s^2_{den})	$5,96 \times 10^{-5}$	$1,04 \times 10^{-4}$	$1,27 \times 10^{-4}$
Replikáty ($s^2_{\text{replikát}}$)	$4,19 \times 10^{-5}$	$7,37 \times 10^{-5}$	$1,26 \times 10^{-4}$
Odchylka opakovatelnosti (s^2_r)	$4,19 \times 10^{-5}$	$7,37 \times 10^{-5}$	$1,26 \times 10^{-4}$
Odchylka reprodukovatelnosti (s^2_R)	$4,24 \times 10^{-4}$	$6,45 \times 10^{-4}$	$8,36 \times 10^{-4}$
Poměr (s^2_R)/ (s^2_r)	10,13	8,75	6,62
Opakovatelnost sd (s_r)	$6,47 \times 10^{-3}$	$8,59 \times 10^{-3}$	$1,13 \times 10^{-2}$
Reprodukovatelnost sd (s_R)	$2,06 \times 10^{-2}$	$2,54 \times 10^{-2}$	$2,89 \times 10^{-2}$
Poměr (s_R)/ (s_r)	3,18	2,96	2,57
Opakovatelnost RSD (%)	3,36 %	2,77 %	2,99 %
Reprodukovatelnost (%)	10,68 %	8,19 %	7,69 %

Mezilaboratorní studie potvrdila přenositelnost UHPSFC metody. Hodnoty reprodukovatelnosti byly stejné nebo dokonce nižší než ty reportované u LC metody. Jak bylo očekáváno, potvrdila se lineární závislost směrodatné odchylky na koncentraci nečistoty D, kdežto relativní směrodatná odchylka byla konstantní na všech koncentračních hladinách. RSD reprodukovatelnosti byly v této studii blízko nebo nižší než 10 %, a to i v případě že byly započítány všechny zdroje variability, tj. 3 replikáty, 3 dny a 18 laboratoří s 18 různými pracovníky.

4.5. Efekt historie kolony v superkritické fluidní chromatografii – praktické důsledky

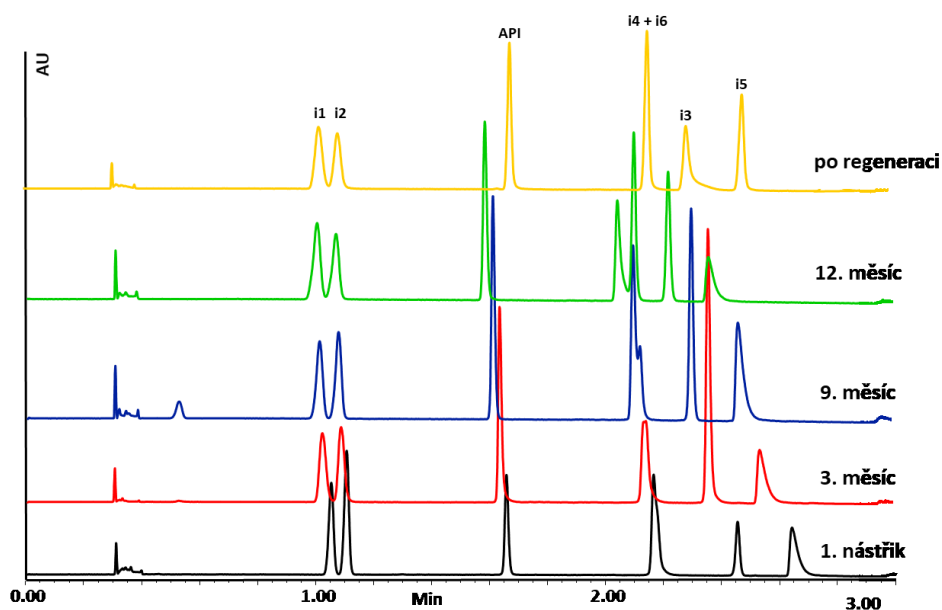
Jak ukázala i předchozí studie, změna retenčních časů během životnosti kolony může způsobit nemožnost aplikovat vyvinutou metodu do praxe v jakémkoli oboru, avšak především ve farmaceutické kontrole, kde jsou zavedena velmi přísná pravidla na opakovatelnost a validaci metody [29]. Kromě efektu aditiva, které se může vázat na stacionární fázi a měnit tak její vlastnosti, je za tyto posuny retenčních časů zodpovědná také tvorba silyl-etherů. Silanolové skupiny na povrchu stacionární fáze reagují s alkoholem přítomným v mobilní fázi a tím dochází k tvorbě silyl-etherů (Obr. 23), které následně snižují hydrofilitu kolony. Vystavením kolony vodě by mělo dojít ke zvrácení této reakce, proto propláchnutí kolony vodou může být součástí regeneračních postupů SFC kolon [29].



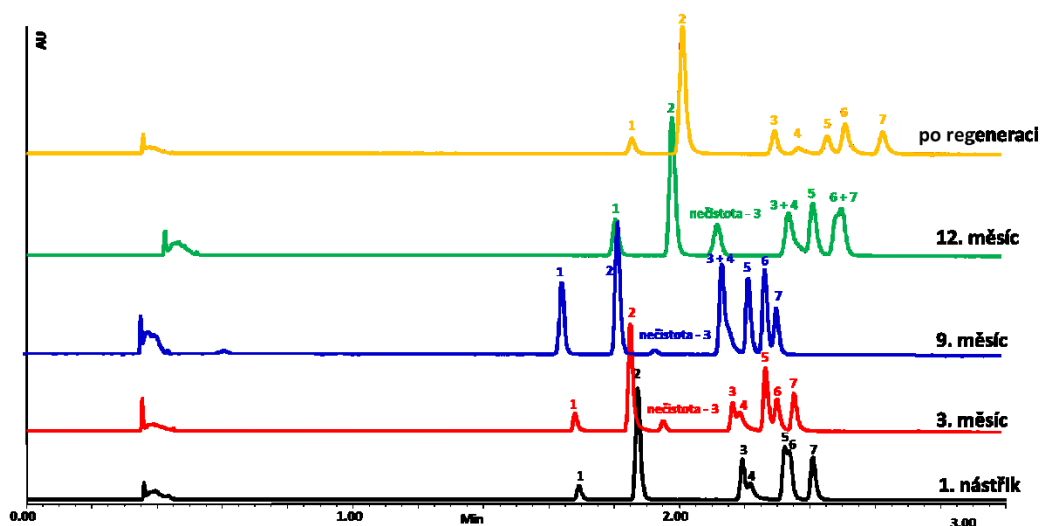
Obr. 23: Tvorba silyl-etheru na povrchu stacionární fáze.

Tyto výsledky byly naměřeny v rámci předchozí studie zabývající se screeningem a validací UHPSFC metod. Byly tedy pozorovány změny retenčních časů 70 analytů s různými fyzikálně-chemickými vlastnostmi v přesně stanovených časových úsecích (0., 3., 9., 12. měsíc) po dobu 1 roku a následně ihned po regeneraci kolon. Analýzy probíhaly za využití 3 různých modifikátorů CO_2 mobilní fáze, a to methanolu, 0,1% hydroxidu amonného v methanolu a 10mM mravenčanu amonného v methanolu. Testováno bylo chování celkem 8 stacionárních fází. Tři z nich byly zástupci hybridní technologie (BEH, BEH 2-EP, CSH PFP) a další silikagelové kolony bez endcappingu (HSS C18 SB). Zbývající 4 kolony patřily do druhé generace SFC stacionárních fází, které využívají propandiol jako síťovadlo (crosslinker) mezi silanolovými skupinami a ligandy (Torus diol, Torus DEA, Torus 2-PIC, Torus 1-AA).

Rozdíly v retenčních časech vardenafilu a jeho 6 nečistot ukazuje Obr. 25. Přestože v prvním nástřiku nečistoty 4 a 6 koeluovaly, postupem času došlo k tak výrazné změně povrchu stacionární fáze, že při analýze po 12. měsících byly tyto dvě nečistoty rozděleny. U všech látek zde došlo k poklesu retenčních časů a po regeneraci kolony pak k navrácení retence do původního stavu. Další příklad ukazuje Obr. 24. Při této separaci betablokátorů došlo k posunu retenčních časů, avšak tyto posuny již nenásledovaly jednotný trend.

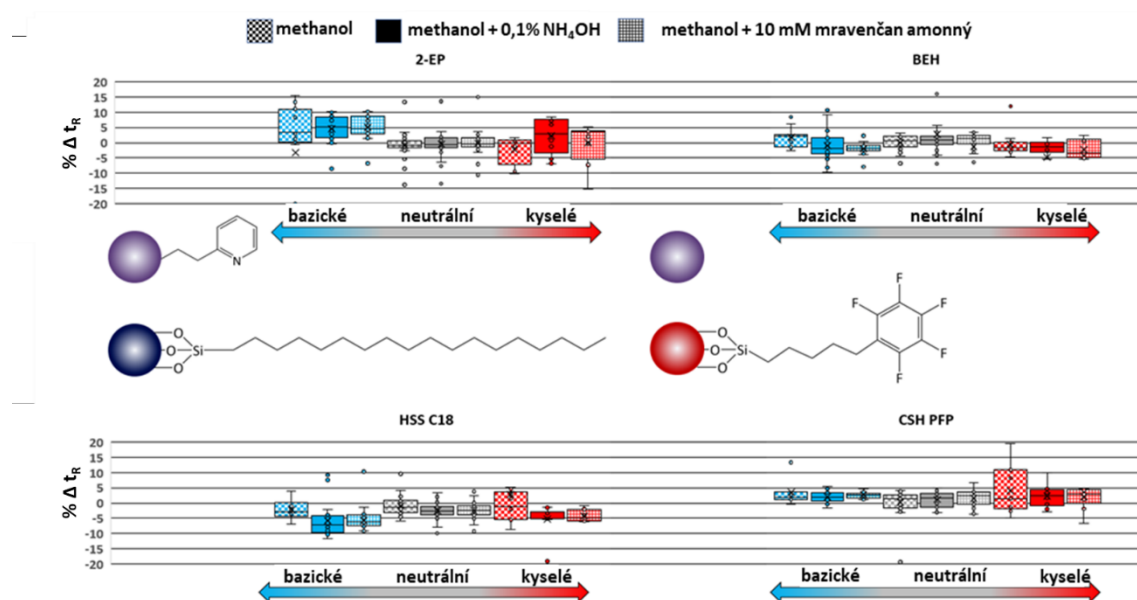


Obr. 25: Posun retenčních časů vardenafilu (API) a jeho 6 nečistot (i1 – i6) při analýze stejnou UHPSFC metodou: kolona BEH 2-EP (3,0 x 100 mm, 1,7 μ m), 10mM mravenčan amonný v methanolu jako modifikátor CO_2 mobilní fáze, generický gradient 5-40% modifikátoru v

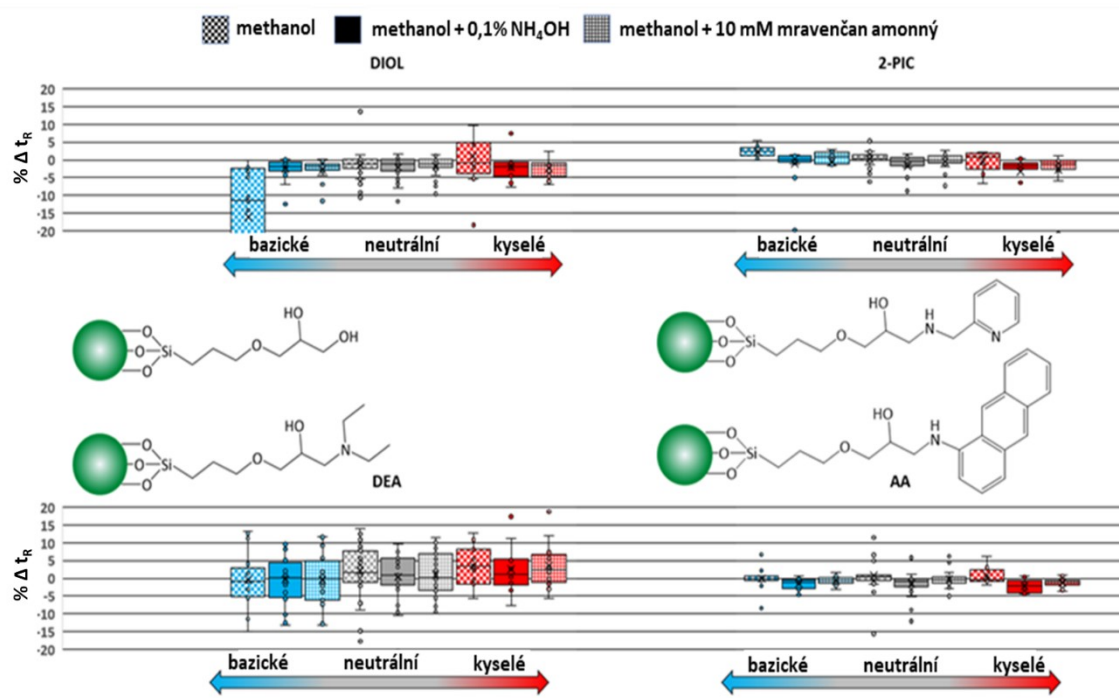


Obr. 24: Posun retenčních časů betablokátorů při analýze stejnou UHPSFC metodou: kolona BEH 2-EP (3,0 x 100 mm, 1,7 μ m), 0,1% hydroxid amonný v methanolu jako modifikátor CO_2 mobilní fáze, generický gradient 5-40% modifikátoru ve 3. min, průtok 1,5 ml/min, BPR tlak 13,8 MPa, UV detekce. 1- metoprolol, 2- propranolol, 3- bopindolol, 4- labetalol, 5- pindolol, 6 – acebutolol, 7 – atenolol.

Obr. 26 ukazuje procentuální rozdíly v retenčních časech analytů na prvních 4 kolonách. Změny byly vyhodnoceny mezi prvním nástřikem a nástřikem po regeneraci kolony. Jsou zde také ukázány rozdíly v chování neutrálních, kyselých a bazických látek. Pro Torus kolony toto rozložení shrnuje Obr. 27.

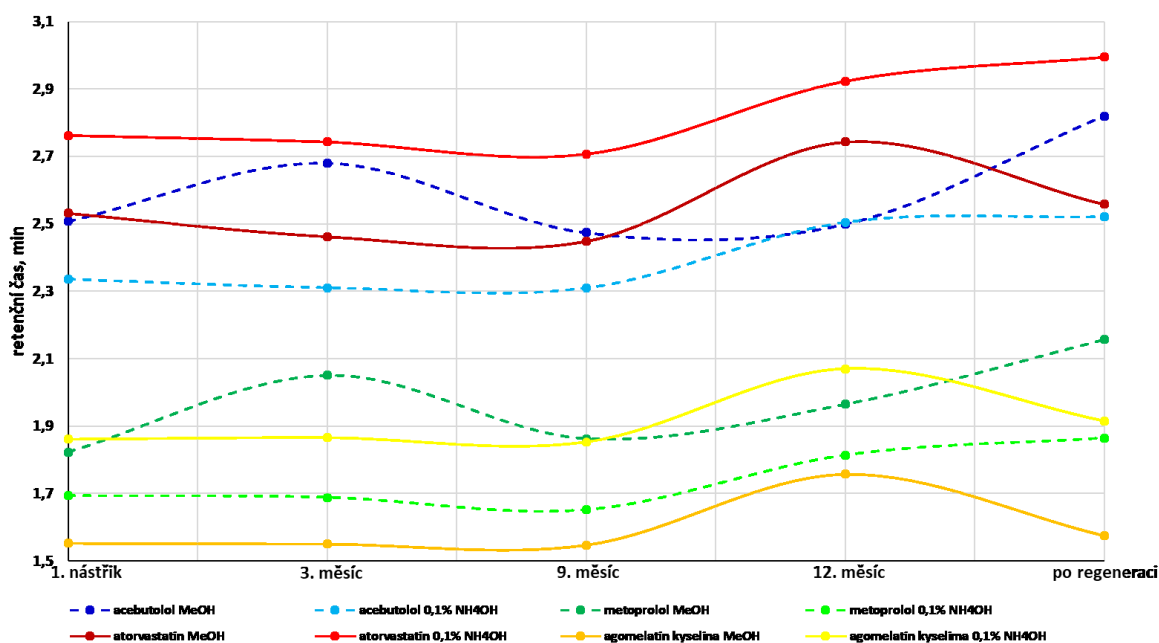


Obr. 26: Rozložení procentuálních rozdílů retenčních časů mezi prvním nástřikem a nástřikem po regeneraci na kolonách BEH, BEH 2-EP, CSH PFP a HSS C18 SB.



Obr. 27: Rozložení procentuálních rozdílů retenčních časů mezi prvním nástřikem a nástřikem po regeneraci na Torus kolonách.

Z porovnání chování jednotlivých skupin analytů je zřetelné, že vlastnosti analytů hrály naprosto minimální roli na kolonách Torus 1-AA, BEH a CSH PFP, kde jsou trendy chování těchto tří skupin látek porovnatelné i za využití rozdílných modifikátorů. Volba modifikátoru má mnohem větší vliv na koloně HSS C18 SB. Retenční časy bází a kyselin na koloně diol za využití čistého methanolu vykázaly klesající trend oproti koloně BEH 2-EP, kde tomu bylo především pro bazické látky naopak. Neutrální látky poskytly užší distribuci rozdílů retenčních časů, ale zároveň také více odlehlých hodnot. V souhrnu všech výsledků měření tato porovnání ukázala, že většina kombinací kolona/modifikátor/analyt nevykazuje žádný specifický trend (Obr. 28). Aby bylo možno odlišit vliv aditiva navázaného na stacionární fázi a tvorbu silyletherů na posuny retenčních časů, bylo by nutné provést tyto experimenty tak, aby na každé koloně byl použit vždy pouze jeden modifikátor. Vzhledem k vyplývající finanční náročnosti, tato studie zatím nemohla být provedena.



Obr. 28: Posuny retenčních časů vybraných analytů na koloně BEH 2-ethylpyridin (3,0 x 100 mm, 1,7 μm). bazické látky – přerušovaná čára, kyselé látky – plná čára.

Z dalších hodnocení, jako je např. sledování linearitu závislosti retenčních časů na měsíci měření, bylo učiněno několik dalších závěrů. U Torus kolon hrála velkou roli sterická přístupnost stacionární fáze. Kolony Torus 1-AA a Torus 2-PIC poskytly významně menší posuny retenčních časů ve srovnání s Torus DEA a Torus diol.

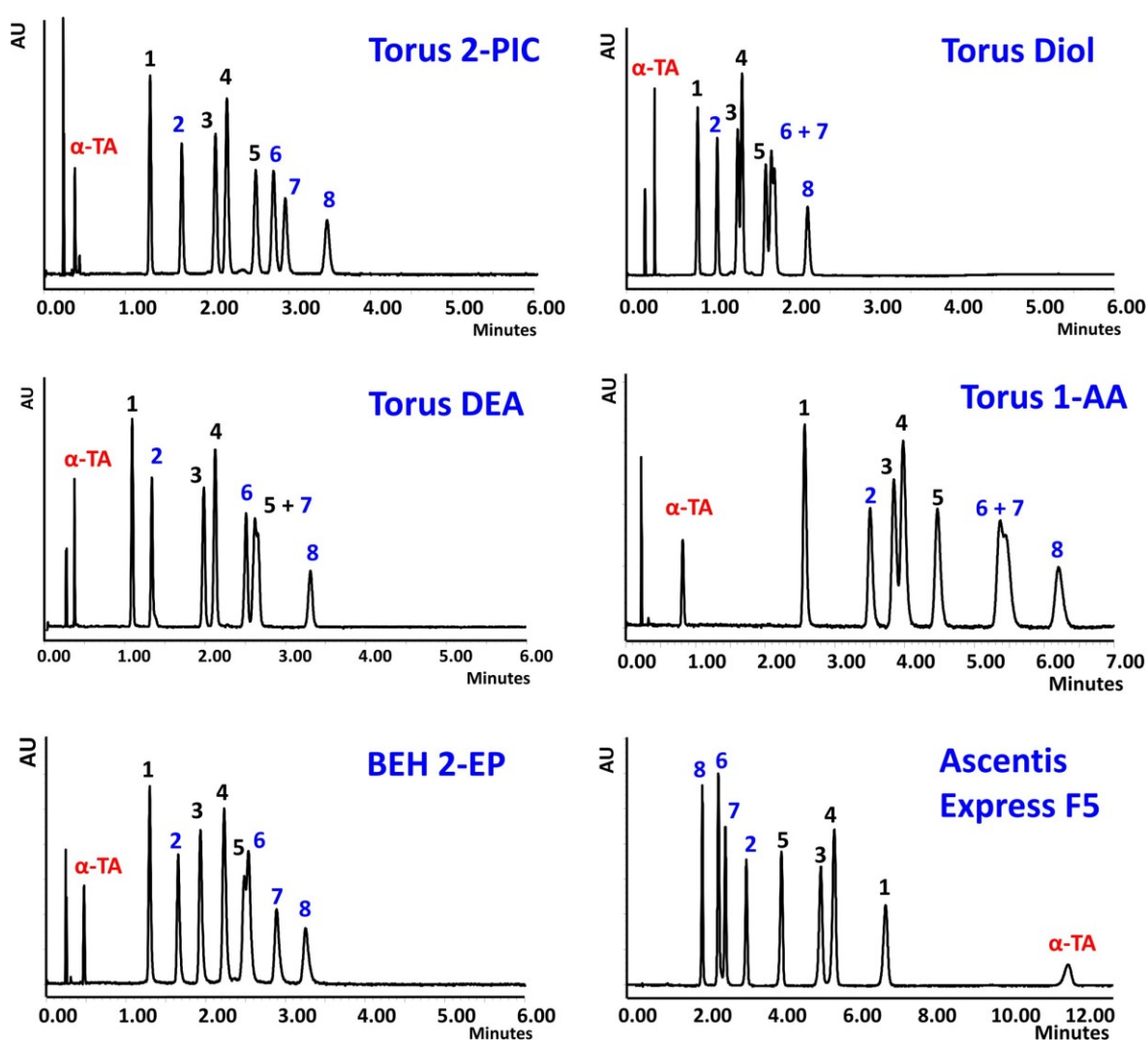
4.6. Výhody využití ultra-vysokoúčinné superkritické fluidní chromatografie pro stanovení lipofilních vitamínů v potravinových doplňcích

Vitamin E se přirozeně vyskytuje v 8 formách [203]. Všechny z nich obsahují aromatický kruh chromanolu s hydroxylovou skupinou [204], [205], liší se však postranním řetězcem, kdy tokoferoly obsahují nasycený isoprenoid a tokotrienoly mají v řetězci 3 trans dvojité vazby [91]. Na základě pozice methylové skupiny na chromanolovém kruhu se pak rozlišují α , β , γ a δ formy tokoferolů a tokotrienolů. Za biologickou aktivitu vitamínu E jsou zodpovědné obě zmíněné části struktury. Hydrofobní postranní řetězec umožňuje průnik přes biologické membrány [204], kdežto hydroxylová skupina je zodpovědná za redukci volných radikálů [205], a tím ochranu nenasycených lipidů [206]. Tato antioxidační aktivita pak může vést ke snížení oxidativního stresu v lidském organismu, který je zodpovědný např. za aterosklerózu, kardiovaskulární onemocnění a zánět [207]. Vzhledem k vyšší stabilitě esterifikovaných forem α -tokoferolu se v potravinových doplňcích využívá právě α -tokoferol acetát. Efekt tokoferolu jak pak zachován díky hydrolýze této esterové vazby během trávení [208].

Trh s potravinovými doplňky neustále roste [207]. V mnoha zemích je však jejich kontrola naprosto minimální, což může vést k mnoha problémům jako je falšování, nedostatečná kontrola kvality, čistoty a účinnosti [209], [210]. Proto jsou nezbytné analytické metody pro stanovení těchto bioaktivních látek, které by zajistily požadovanou kvalitu potravinových doplňků. Zlatým standardem pro stanovení tokoferolů jsou v dnešní době HPLC metody na normálních fázích [91], [204], [211], [212]. Několik RP-HPLC metod bylo také publikováno [208], [213], [214], stejně jako možnost GC analýzy [215]. Žádná z těchto metod však neseparovala α -tokoferol acetát společně s ostatními 8 formami vitamínu E. Cílem této studie proto bylo vyvinout rychlou analytickou metodu zahrnující jak přípravu vzorku, tak separaci, která by byla vhodná pro kontrolu kvality potravinových doplňků s obsahem různých forem vitamínu E.

V rámci studie byla vyvinuta jak UHPSFC, tak UHPLC metoda, aby bylo možno určit, která z metod je pro kontrolu kvality přípravků s obsahem vitamínu E vhodnější. Vývoj UHPSFC metody vycházel z již dříve vyvinuté UHPSFC metody, která byla použita pro stanovení tokoferolů a tokotrienolů v séru [93]. Avšak α -tokoferol acetát nebyl součástí

této metody a zároveň se na trhu objevila nová generace stacionárních fází Torus určených pro SFC. Proto byl proveden screening těchto kolon společně s původní BEH 2-EP (Obr. 29) za využití izokratické eluce s 3 % methanolu. Detailnější optimalizace pak byla provedena na koloně BEH 2-EP a Torus 2-PIC, které poskytly nejlepší rozlišení analytů. Vzhledem k problematické nízké retenci α -tokoferol acetátu byly testovány také modifikátory mobilní fáze s nižší eluční silou jako je ethanol, methanol/acetonitril a ethanol/acetonitril. To však vedlo k neúměrnému prodloužení analýzy. Bylo tudíž upraveno nastavení eluce, kdy byl na začátek analýzy přidán izokratický krok s pouze 1 % modifikátoru. Eluce tokoferolů s vyššími retenčními časy pak byla umožněna gradientovým zvýšením obsahu modifikátoru na 4 %.



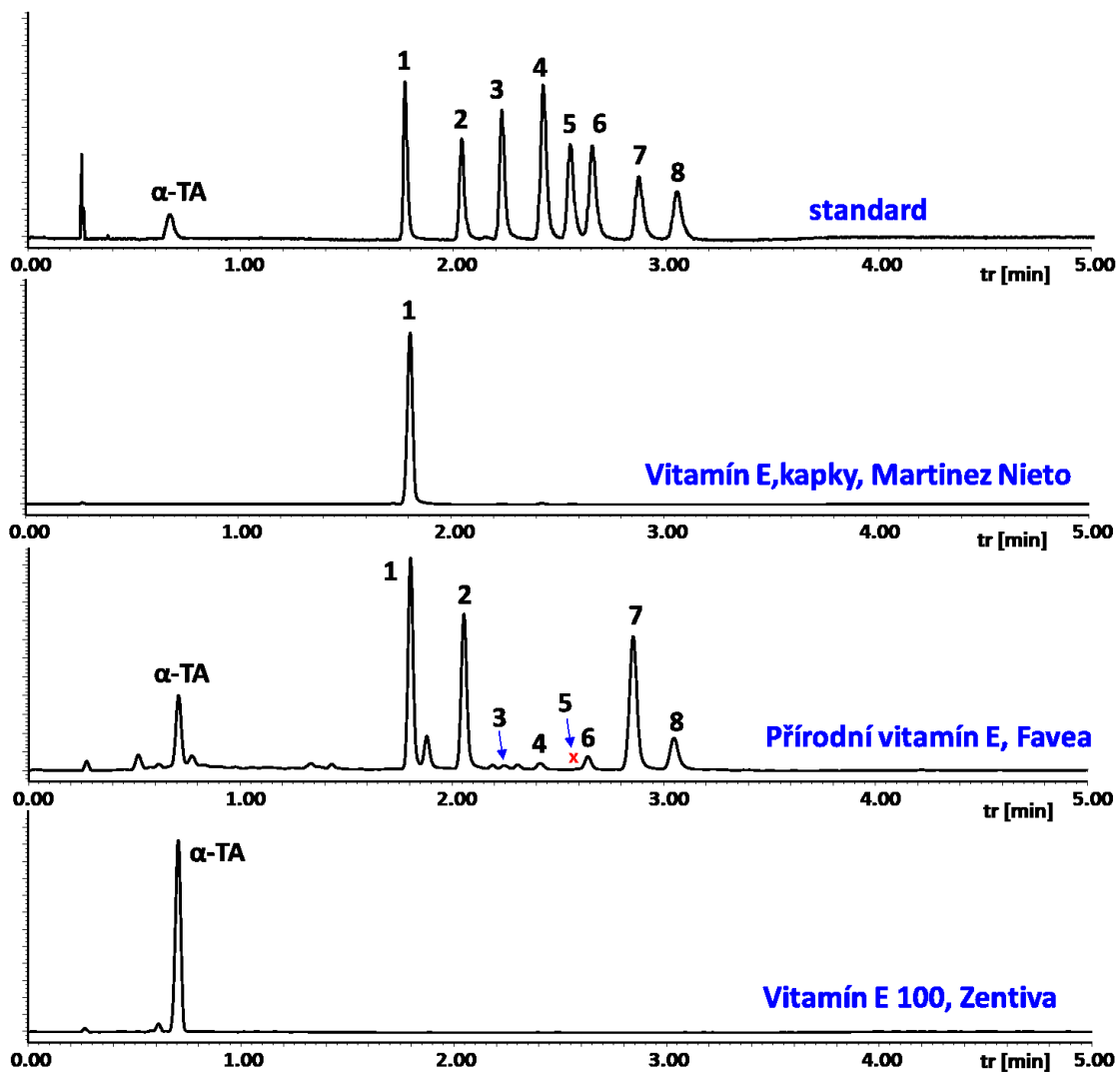
Obr. 29: Separace devíti derivátů tokoferolu pomocí UHPSFC (Torus 2-PIC, Torus DEA, Torus Diol, Torus 1-AA, BEH 2-EP) a UHPLC (Ascentis Express F5). α -TA – α -tokoferol acetát, 1 – α -tokoferol, 2- α -tokotrieniol, 3- β -tokoferol, 4- γ -tokoferol, 5- δ -tokoferol, 6- β -tokotrieniol, 7- γ -tokotrieniol, 8- δ -tokotrieniol.

Na UHPLC systému bylo taktéž testováno několik kolon (CSH C18, CSH PFP, CSH phenyl, Kinetex PFP) a složení mobilní fáze. Po důkladné optimalizaci bylo separace na základní linii dosaženo za použití kolony Ascentis Express F5, mobilní fáze (A) acetonitril/methanol a (B) voda v poměru 75/25. Finální chromatogramy potvrdily komplementaritu UHPSFC a UHPLC metody, kdy eluční pořadí analytů bylo téměř opačné. Přestože 12min vyvinutá UHPLC metoda je nejkratší prozatím publikovanou UHPLC metodou pro stanovení tokoferolů a tokotrienolů, UHPSFC metoda byla stále více než 2x rychlejší. Další nespornou výhodou UHPSFC metody pak byl také rychlejší proces přípravy vzorků, pro kterou byla zvolena extrakce z kapaliny do kapaliny. V případě UHPSFC metody tak odpadla nutnost odpaření získaného extraktu, neboť ho bylo možné díky kompatibilitě s mobilní fází přímo dávkovat. Proto byla pro další analýzy přípravků s vitamínem E použita pouze UHPSFC metoda.

Metody pro přípravu vzorků byly optimalizovány pro každý typ přípravku, tj. tablety, granulát, kapsle a kapky. Následně byly všechny tyto metody validovány dle požadavků ICH Q2 [29]. Výsledky stanovení obsahu vitamínu E v jednotlivých přípravcích shrnuje Tab. 5. Testované přípravky se lišily svým deklarovaným obsahem i obsahovou látkou, jelikož v některých byl obsažen α -tokoferol, v jiných α -tokoferol acetát nebo přímo rostlinný extrakt (Obr. 30). V tomto přípravku byl potvrzen obsah 7 forem tokoferolů a tokotrienolů. 6 z testovaných přípravků splnilo přísná farmaceutická kritéria na obsah účinné látky, kdy se obsah pohyboval v rozmezí 95-105 % deklarovaného obsahu. U 2 forem byl dokonce nalezen mírně vyšší obsah α -tokoferol acetátu.

Tab. 5: Obsah vitamínu E nalezený v jednotlivých potravinových doplňcích.

Název produktu	Deklarovaný obsah (mg)	Nalezený obsah (mg)	Deklarovaný vs. nalezený (%)	RSD (%)
Přírodní vitamín E, Favea	12	11,5	95,5	4,1
Vitamín E 100, Zentiva	100	102,6	102,6	1,8
Vitamín E 100, Noventis	100	100,3	100,3	2,3
Vitamín E 100 I.U, Generica	100	101,5	101,5	2,5
Pupalka dvouletá, Vitaharmony	5	6,9	138,3	0,8
Selzink, PRO.MED	31.5	31,8	101,0	3,4
Dologran, Farmex	3,6 mg/2 g	117,1	117,1	2,5
Vitamín E, kapky, Martin Nieto	24 mg/1 ml	102,1	102,1	2,4



Obr. 30: UHPSFC separace 9 forem vitamínu E ve standardním roztoku a vybraných doplňcích stravy. α -TA – α -tokoferol acetát, 1 – α -tokoferol, 2- α -tokotrienol, 3- β -tokoferol, 4- γ -tokoferol, 5- δ -tokoferol, 6- β -tokotrienol, 7- γ -tokotrienol, 8- δ -tokotrienol.

4.7. Souhrnný článek: Aktuální vývoj v superkritické fluidní chromatografii ve spojení s hmotnostní detekcí: Jedná se o techniku vhodnou pro analýzu komplexních vzorků?

V rámci tohoto souhrnného článku byl popsán historický vývoj SFC a moderní SFC instrumentace. Další část článku je věnována spojení SFC s hmotnostní spektrometrií. Jsou popsány jednotlivé iontové zdroje i s jejich procentuálním zastoupením v publikovaných studiích, a také různé typy rozhraní, které umožňují spojení SFC s MS. Jsou uvedeny výhody i nevýhody jednotlivých typů společně s nejběžněji používanými podmínkami. Dalším široce diskutovaným tématem jsou matricové efekty včetně rozdílů ve výskytu v SFC-MS oproti GC- a LC-MS.

Druhá část článku je věnována aplikacím SFC-MS pro analýzu komplexních vzorků. Jsou popsány možnosti chirálních separací, analýz rostlinných a přírodních produktů, potravinových a environmentálních vzorků. Článek popisuje také rozvíjející se využití SFC-MS v bioanalýze a metabolomice. Zmíněny jsou také aplikace v petrochemickém průmyslu.

Z prezentovaných studií je jasně viditelná stoupající obliba SFC separací v mnoha aplikačních oblastech. Na rozdíl od prvotních prací, které se zaměřovaly pouze na analýzu lipofilních látek, moderní SFC byla již úspěšně použita také pro analýzu širokého spektra polárních látek. Zájem o SFC separace narostl také ve chvíli, kdy bylo na trh uvedeno první komerční rozhraní pro spojení SFC a MS. Unikátní selektivita SFC vede k odlišným matricovým efektům, které jsou, především u polárních matric, často nižší než v LC-MS. Proto lze předpokládat, že využití SFC-MS bude i v následujících letech dále růst.

4.8. Kapitola 16: Farmaceutická analýza

Kapitola je součástí odborné knihy *Supercritical Fluid Chromatography* editované Colinem Poolem a vydané v nakladatelství Elsevier Inc. Kapitola nejprve krátce představuje vývoj léčiv, mezinárodní směrnice a analytické metody, které se v tomto oboru využívají. Hlavní část je pak věnována využití SFC techniky v jednotlivých oblastech jako je výzkum nových léčiv a jejich vývoj, analýza účinných látek a léčivých přípravků až po analýzu biologického materiálu v rámci klinických studií.

4.9. Kapitola 12: Ultra-vysokoučinná superkritická fluidní chromatografie ve spojení s hmotnostní detekcí

Kapitola je součástí odborné knihy Handbook of Advance Chromatography/Mass Spectrometry Technigues editované Michalem Holčapkem a Craigem Byrdwelem a vydané v nakladatelství Elsevier Inc. Kapitola se nejprve zabývá teorií superkritických tekutin a historickým vývojem SFC techniky. Následně je detailně představena SFC instrumentace a specificky také UHPSFC instrumentace. Jsou diskutovány podmínky SFC separací, tedy mobilní a stacionární fáze, BPR tlak, teplota, průtok a nástřikové rozpouštědlo. Druhá polovina kapitoly je věnována spojení SFC s technikou hmotnostní detekce. Jsou popsány jednotlivé iontové zdroje a rozhraní v SFC-MS. Kapitola také nastiňuje podmínky běžně používané v SFC-MS a na závěr diskutuje aplikační oblasti SFC a SFC-MS.

4.10. Kapitola 2: Superkritická fluidní chromatografie v bioanalýze

Kapitola je součástí odborné knihy Supercritical Fluid Chromatography, Volume 2 editované Gérardem Rosé a vydané v nakladatelství De Gruyter. Bioanalýza vyžaduje mnoho odlišných metod pro stanovení jak endogenních látek, tak xenobiotik v biologických matricích. Vzhledem ke komplexnosti vzorků, vysoké rozmanitosti a často nízkým koncentracím analytů musí mít tyto metody vysokou selektivitu a citlivost.

Úvod kapitoly je věnován právě bioanalýze obecně a požadavkům na bioanalytické metody. Dále jsou uvedeny typické podmínky SFC metod používaných v SFC a možnosti spojení SFC s hmotnostní spektrometrií. Detailně jsou také diskutovány matricové efekty, které tvoří důležitou součást všech chromatografických bioanalytických metod. Závěrečná část je věnována aplikacím SFC v bioanalýze a to např. analýze léčiv a jejich metabolitů, analýze chirálních léčiv, dopingové kontrole, analýze lipofilních vitamínů, metabolomice a lipidomice.

5. Závěr

Předložená dizertační práce shrnuje mou práci publikovanou během tří a půl let doktorského studia. Věnuje se využití superkritické fluidní chromatografie (SFC) pro stanovení účinných látek v léčivech i potravinových doplncích. SFC prokázala svůj potenciál ve farmaceutické kontrole kvality, kdy ve dvou studiích byly vyvinuty a následně porovnány SFC a LC metody. Porovnáním těchto metod byla potvrzena jejich ortogonalita, stejně jako schopnost SFC dosahovat stejných případně lepších výsledků než LC. Mezi hlavní výhody SFC patřila několikanásobně rychlejší separace a také menší množství spotřebovaných organických rozpouštědel. V rámci screeningové studie byly testovány stacionární fáze, organické modifikátory a aditiva za využití 10 směsí pro farmaceutickou kontrolu kvality. Po vyhodnocení získaných výsledků navrženým matematickým modelem byly doporučeny generické podmínky vhodné jako výchozí bod pro vývoj metody. Tyto podmínky využívaly diolové stacionární fáze a 0,1 % hydroxidu amonného v methanolu jako modifikátoru mobilní fáze na bázi CO₂. Detailní pozornost byla věnována jednotlivým parametrům chromatografických metod a jejich vlivu především na rozlišení, což je kritický parametr metod farmaceutické kontroly kvality. Bylo také navrženo řešení častých problémů při optimalizaci SFC metod, kdy se jako výhodné ukázalo přidání acetonitrilu k methanolu jako modifikátoru mobilní fáze a také spojování kolon. Významná část je zaměřena na validace metod, kdy všechny vyvinuté UHPSFC metody splnily parametry vyžadované mezinárodními směrnici. V rámci mezinárodní spolupráce byla prokázána také mezilaboratorní přenositelnost SFC metody pro stanovení nečistot salbutamolu. Byla diskutována také stabilita retenčních časů během dlouhodobého používání SFC kolon. Kromě efektu aditiva, které se může vázat na aktivní místa stacionární fáze, je za tyto posuny zodpovědná také tvorba silyl-etherů. Vliv těchto faktorů byl porovnán na 8 kolonách během ročního používání.

U všech optimalizovaných metod byl ukázán přínos SFC techniky. Nejen že SFC poskytla rychlé a ekologické metody, ale splněním doporučených limitů kvantifikace pro nečistoty byla dokázána dostatečná citlivost SFC metod, což byla v minulosti často diskutovaná nevýhoda SFC. Úspěšná validace u všech vyvinutých metod prokázala také možnost jejich využití i za přísně regulovaných podmínek ve farmaceutické kontrole kvality.

6. Citace

- [1] L. Nováková, K. Plachká, and P. Jakubec, "Ultra-High Performance Supercritical Fluid Chromatography–Mass Spectrometry," in *Handbook of Advanced Chromatography /mass Spectrometry Techniques*, Elsevier, 2017, pp. 445–487.
- [2] L. Nováková and K. Plachká, "Chapter 16 - Pharmaceutical Applications," C. F. B. T.-S. F. C. Poole, Ed. Elsevier, 2017, pp. 461–494.
- [3] V. Pilařová, K. Plachká, M. A. Khalikova, F. Svec, and L. Nováková, "Recent developments in supercritical fluid chromatography – mass spectrometry: Is it a viable option for analysis of complex samples?," *TrAC - Trends Anal. Chem.*, vol. 112, pp. 212–225, 2019.
- [4] A. Grand-Guillaume Perrenoud, J. L. Veuthey, and D. Guillarme, "The use of columns packed with sub-2 μm particles in supercritical fluid chromatography," *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, vol. 63. Elsevier B.V., pp. 44–54, 01-Dec-2014.
- [5] D. P. Poe, "Chapter 2 - Theory of Supercritical Fluid Chromatography," C. F. B. T.-S. F. C. Poole, Ed. Elsevier, 2017, pp. 23–55.
- [6] E. Lesellier and C. West, "The many faces of packed column supercritical fluid chromatography - A critical review," *Journal of Chromatography A*, vol. 1382. Elsevier, pp. 2–46, 20-Feb-2015.
- [7] A. Tarafder, "Metamorphosis of supercritical fluid chromatography to SFC: An Overview," *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, vol. 81. Elsevier B.V., pp. 3–10, 01-Jul-2016.
- [8] M. Saito, "History of supercritical fluid chromatography: instrumental development.," *J. Biosci. Bioeng.*, vol. 115, no. 6, pp. 590–9, Jun. 2013.
- [9] G. Guiochon and A. Tarafder, "Fundamental challenges and opportunities for preparative supercritical fluid chromatography," *Journal of Chromatography A*, vol. 1218, no. 8. pp. 1037–1114, 25-Feb-2011.
- [10] T. A. Berger, "Separation of polar solutes by packed column supercritical fluid chromatography," *Journal of Chromatography A*, vol. 785, no. 1–2. pp. 3–33, 17-Oct-1997.
- [11] M. Maftouh *et al.*, "Screening approach for chiral separation of pharmaceuticals: Part III. Supercritical fluid chromatography for analysis and purification in drug discovery," in *Journal of Chromatography A*, 2005, vol. 1088, no. 1–2, pp. 67–81.
- [12] E. Klesper, A. H. Corwin, and D. A. Turner, "High pressure gas chromatography above

- critical temperatures," *J. Org. Chem.*, vol. 27, pp. 700–701, 1962.
- [13] M. W. Raynor, G. F. Shilstone, K. D. Bartle, A. A. Clifford, M. Cleary, and B. W. Cook, "Use of xenon as a mobile phase for on-line capillary supercritical fluid chromatography-fourier transform infrared spectrometry," *J. High Resolut. Chromatogr.*, vol. 12, no. 5, pp. 300–302, May 1989.
- [14] S. French and M. Novotny, "Xenon, a unique mobile phase for supercritical fluid chromatography," *Anal. Chem.*, vol. 58, no. 1, pp. 164–166, Jan. 1986.
- [15] K. B. Thurbide and B. W. Cooke, "Supercritical argon as a mobile phase for the flame photometric detection of sulfur," 2003.
- [16] E. Leren, K. E. Landmark, and T. Greibrokk, "Sulphur dioxide as a mobile phase in supercritical fluid chromatography," *Chromatographia*, vol. 31, no. 11–12, pp. 535–538, Jun. 1991.
- [17] H. H. Lauer, D. McManigill, and R. D. Board, "Mobile-Phase Transport Properties of Liquefied Gases in Near-Critical and Supercritical Fluid Chromatography," *Anal. Chem.*, vol. 55, no. 8, pp. 1370–1375, 1983.
- [18] T. A. Berger and J. F. Deye, "Effects of Column and Mobile Phase Polarity using Steroids as Probes in Packed-Column Supercritical Fluid Chromatography," *J. Chromatogr. Sci.*, vol. 29, no. 7, pp. 280–286, Jul. 1991.
- [19] R. M. Smith, "Supercritical fluids in separation science--the dreams, the reality and the future.," *J. Chromatogr. A*, vol. 856, no. 1–2, pp. 83–115, Sep. 1999.
- [20] P. A. Peaden and M. L. Lee, "Theoretical treatment of resolving power in open tubular column supercritical fluid chromatography," *J. Chromatogr. A*, vol. 259, no. C, pp. 1–16, 1983.
- [21] P. A. Peaden, J. C. Fjeldsted, M. L. Lee, S. R. Springston, and M. Novotny, "Instrumental Aspects of Capillary Supercritical Fluid Chromatography," *Anal. Chem.*, vol. 54, no. 7, pp. 1090–1093, 1982.
- [22] S. R. Springston and M. Novotny, "Kinetic optimization of capillary supercritical fluid chromatography using carbon dioxide as the mobile phase," *Chromatographia*, vol. 14, no. 12, pp. 679–684, Dec. 1981.
- [23] P. J. Arpino and P. Haas, "Recent developments in supercritical fluid chromatography-mass spectrometry coupling," *Journal of Chromatography A*, vol. 703, no. 1–2, pp. 479–488, 26-Jun-1995.
- [24] W. P. Farrell, "Chapter 3 - Practical Approaches to Column Selection for Supercritical Fluid Chromatography," C. F. B. T.-S. F. C. Poole, Ed. Elsevier, 2017, pp. 57–101.

- [25] M. T. Combs, M. Ashraf-Khorassani, and L. T. Taylor, "Packed column supercritical fluid chromatography-mass spectroscopy: A review," *J. Chromatogr. A*, vol. 785, pp. 85–85, 1997.
- [26] D. R. Gere, R. Board, and D. McManlill, "Supercritical Fluid Chromatography with Small Particle Diameter Packed Columns," *Anal. Chem.*, vol. 54, no. 4, pp. 736–740, 1982.
- [27] J. B. Crowther and J. D. Henion, "Supercritical Fluid Chromatography of Polar Drugs Using Small-Particle Packed Columns with Mass Spectrometric Detection," *Anal. Chem.*, vol. 57, no. 13, pp. 2711–2716, 1985.
- [28] P. J. Schoenmakers and L. G. M. Uunk, "Effects of the column pressure drop in packed-column supercritical-fluid chromatography," *Chromatographia*, vol. 24, no. 1, pp. 51–57, Dec. 1987.
- [29] ICH, "International COncference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use ICH Harmonised Tripartite Guideline Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2(R1)," *ICH Harmon. Tripart. Guidel.*, vol. 62, no. 96, pp. 27463–7, 1997.
- [30] V. Desfontaine, D. Guillarme, E. Francotte, and L. Nováková, "Supercritical fluid chromatography in pharmaceutical analysis," *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, vol. 113. Elsevier, pp. 56–71, 14-Mar-2015.
- [31] L. Nováková, A. Grand-Guillaume Perrenoud, I. Francois, C. West, E. Lesellier, and D. Guillarme, "Modern analytical supercritical fluid chromatography using columns packed with sub-2 μ m particles: A tutorial," *Analytica Chimica Acta*, vol. 824. Elsevier, pp. 18–35, 08-May-2014.
- [32] T. A. Berger, "Instrumentation for analytical scale supercritical fluid chromatography," *J. Chromatogr. A*, vol. 1421, pp. 171–183, 2015.
- [33] T. A. Berger, *Supercritical fluid chromatography. Primer*. Agilent Technologies, Inc., 2015.
- [34] T. A. Berger and B. K. Berger, "Minimizing UV noise in supercritical fluid chromatography. I. Improving back pressure regulator pressure noise," *J. Chromatogr. A*, vol. 1218, no. 16, pp. 2320–2326, Apr. 2011.
- [35] E. Lesellier, E. Destandau, C. Grigoras, L. Fougère, and C. Elfakir, "Fast separation of triterpenoids by supercritical fluid chromatography/evaporative light scattering detector," *J. Chromatogr. A*, vol. 1268, pp. 157–165, Dec. 2012.
- [36] E. Lesellier, A. Valarché, C. West, and M. Dreux, "Effects of selected parameters on the response of the evaporative light scattering detector in supercritical fluid

- chromatography," *J. Chromatogr. A*, vol. 1250, pp. 220–226, Aug. 2012.
- [37] E. LESELLIER, T. BIZET, A. VALARCHE, C. WEST, and M. DREUX, "Coupling Supercritical Fluid Chromatography with Evaporative Light Scattering Detection: A Study of the Relevant Parameters Ruling Response," *LC GC North Am.*, vol. 30, no. 3, 2012.
- [38] M. LecoEUR, N. Simon, V. Sautou, B. Decaudin, and C. Vaccher, "A chemometric approach to elucidate the parameter impact in the hyphenation of evaporative light scattering detector to supercritical fluid chromatography," *J. Chromatogr. A*, vol. 1333, pp. 124–133, Mar. 2014.
- [39] C. Brunelli, T. Górecki, Y. Zhao, and P. Sandra, "Corona-Charged Aerosol Detection in Supercritical Fluid Chromatography for Pharmaceutical Analysis," *Anal. Chem.*, vol. 79, no. 6, pp. 2472–2482, Mar. 2007.
- [40] M. Swartz, M. Emanuele, and A. Awad, "Charged Aerosol Detection in Pharmaceutical Analysis: An Overview," in *Charged Aerosol Detection for Liquid Chromatography and Related Separation Techniques*, 2017, pp. 355–377.
- [41] L. Nováková, K. Plachká, M. Khalikova, and F. Švec, "2. Supercritical fluid chromatography in bioanalysis," in *Supercritical Fluid Chromatography*, De Gruyter, 2018, pp. 33–76.
- [42] J. D. Pinkston, "Advantages and Drawbacks of Popular Supercritical Fluid Chromatography / Mass Spectrometry Interfacing Approaches—A User's Perspective," *Eur. J. Mass Spectrom.*, vol. 11, no. 2, pp. 189–197, Apr. 2005.
- [43] G. L. Losacco, J. L. Veuthey, and D. Guillarme, "Supercritical fluid chromatography – Mass spectrometry: Recent evolution and current trends," *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, vol. 118. Elsevier B.V., pp. 731–738, 01-Sep-2019.
- [44] T. L. Chester and J. D. Pinkston, "Pressure-regulating fluid interface and phase behavior considerations in the coupling of packed-column supercritical fluid chromatography with low- pressure detectors," *J. Chromatogr. A*, vol. 807, no. 2, pp. 265–273, 1998.
- [45] A. Grand-Guillaume Perrenoud, J. L. Veuthey, and D. Guillarme, "Coupling state-of-the-art supercritical fluid chromatography and mass spectrometry: FROM hyphenation interface optimization to high-sensitivity analysis of pharmaceutical compounds," *J. Chromatogr. A*, vol. 1339, pp. 174–184, Apr. 2014.
- [46] L. Nováková, "Challenges in the development of bioanalytical liquid chromatography-mass spectrometry method with emphasis on fast analysis," *Journal of Chromatography A*, vol. 1292. pp. 25–37, 31-May-2013.
- [47] V. Desfontaine *et al.*, "Liquid chromatography and supercritical fluid

- chromatography as alternative techniques to gas chromatography for the rapid screening of anabolic agents in urine,” *J. Chromatogr. A*, vol. 1451, pp. 145–155, Jun. 2016.
- [48] L. Nováková *et al.*, “Ultra high performance supercritical fluid chromatography coupled with tandem mass spectrometry for screening of doping agents. II: Analysis of biological samples,” *Anal. Chim. Acta*, vol. 853, no. 1, pp. 647–659, 2015.
- [49] V. Desfontaine, F. Capetti, R. Nicoli, T. Kuuranne, J. L. Veuthey, and D. Guillarme, “Systematic evaluation of matrix effects in supercritical fluid chromatography versus liquid chromatography coupled to mass spectrometry for biological samples,” *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.*, vol. 1079, pp. 51–61, Mar. 2018.
- [50] L. Nováková, A. Grand-Guillaume Perrenoud, R. Nicoli, M. Saugy, J. L. Veuthey, and D. Guillarme, “Ultra high performance supercritical fluid chromatography coupled with tandem mass spectrometry for screening of doping agents. I: Investigation of mobile phase and MS conditions,” *Anal. Chim. Acta*, vol. 853, no. 1, pp. 637–646, 2015.
- [51] Y. Fujito, Y. Hayakawa, Y. Izumi, and T. Bamba, “Importance of optimizing chromatographic conditions and mass spectrometric parameters for supercritical fluid chromatography/mass spectrometry,” *J. Chromatogr. A*, vol. 1508, pp. 138–147, Jul. 2017.
- [52] C. M. Galea, Y. Vander Heyden, and D. Mangelings, “Separation of Stereoisomers,” in *Supercritical Fluid Chromatography: Handbooks in Separation Science*, Elsevier Inc., 2017, pp. 345–379.
- [53] C. F. Poole, “Stationary phases for packed-column supercritical fluid chromatography,” *Journal of Chromatography A*, vol. 1250, pp. 157–171, 10-Aug-2012.
- [54] C. Galea, C. West, D. Mangelings, and Y. Vander Heyden, “Is the solvation parameter model or its adaptations adequate to account for ionic interactions when characterizing stationary phases for drug impurity profiling with supercritical fluid chromatography?,” *Anal. Chim. Acta*, vol. 924, pp. 9–20, Jun. 2016.
- [55] E. Lemasson, S. Bertin, P. Hennig, H. Boiteux, E. L. Westa, and C. West, “Development of an achiral supercritical fluid chromatography method with ultraviolet absorbance and mass spectrometric detection for impurity profiling of drug candidates. Part II. Selection of an orthogonal set of stationary phases,” *J. Chromatogr. A*, vol. 1408, pp. 227–235, Jul. 2015.
- [56] C. West and E. Lesellier, “A unified classification of stationary phases for packed column supercritical fluid chromatography,” *J. Chromatogr. A*, vol. 1191, no. 1–2, pp. 21–39, May 2008.

- [57] C. West, M. A. Khalikova, E. Lesellier, and K. Héberger, "Sum of ranking differences to rank stationary phases used in packed column supercritical fluid chromatography," *J. Chromatogr. A*, vol. 1409, pp. 241–250, Aug. 2015.
- [58] C. West, E. Lemasson, S. Bertin, P. Hennig, and E. Lesellier, "An improved classification of stationary phases for ultra-high performance supercritical fluid chromatography," *J. Chromatogr. A*, vol. 1440, pp. 212–228, Apr. 2016.
- [59] C. G. A. da Silva, C. H. Collins, E. Lesellier, and C. West, "Characterization of stationary phases based on polysiloxanes thermally immobilized onto silica and metalized silica using supercritical fluid chromatography with the solvation parameter model," *J. Chromatogr. A*, vol. 1315, pp. 176–187, Nov. 2013.
- [60] V. Desfontaine, J. L. Veuthey, and D. Guillarme, "Evaluation of innovative stationary phase ligand chemistries and analytical conditions for the analysis of basic drugs by supercritical fluid chromatography," *J. Chromatogr. A*, vol. 1438, pp. 244–253, Mar. 2016.
- [61] E. Lesellier, "Retention mechanisms in super/subcritical fluid chromatography on packed columns," *Journal of Chromatography A*, vol. 1216, no. 10. pp. 1881–1890, 06-Mar-2009.
- [62] T. BERGER, B. BERGER, and R. MAJORS, "A Review of Column Developments for Supercritical Fluid Chromatography," *LC GC North Am.*, vol. 28, no. 5, 2010.
- [63] C. West and E. Lesellier, "Characterisation of stationary phases in subcritical fluid chromatography by the solvation parameter model: II. Comparison tools," *J. Chromatogr. A*, vol. 1110, no. 1–2, pp. 191–199, Mar. 2006.
- [64] C. West and E. Lesellier, "Characterization of stationary phases in subcritical fluid chromatography by the solvation parameter model: I. Alkylsiloxane-bonded stationary phases," *J. Chromatogr. A*, vol. 1110, no. 1–2, pp. 181–190, Mar. 2006.
- [65] C. West and E. Lesellier, "Characterisation of stationary phases in subcritical fluid chromatography with the solvation parameter model. III. Polar stationary phases.," *J. Chromatogr. A*, vol. 1110, no. 1–2, pp. 200–13, Mar. 2006.
- [66] C. Galea, D. Mangelings, and Y. Vander Heyden, "Method development for impurity profiling in SFC: THE selection of a dissimilar set of stationary phases," *J. Pharm. Biomed. Anal.*, vol. 111, pp. 333–343, Jul. 2015.
- [67] S. Khater, C. West, and E. Lesellier, "Characterization of five chemistries and three particle sizes of stationary phases used in supercritical fluid chromatography," *J. Chromatogr. A*, vol. 1319, pp. 148–159, Dec. 2013.
- [68] S. Delahaye, K. Broeckhoven, G. Desmet, and F. Lynen, "Application of the isopycnic

- kinetic plot method for elucidating the potential of sub-2 μm and core-shell particles in SFC,” *Talanta*, vol. 116, pp. 1105–12, Nov. 2013.
- [69] E. Lesellier, A. Latos, and A. L. de Oliveira, “Ultra high efficiency/low pressure supercritical fluid chromatography with superficially porous particles for triglyceride separation,” *J. Chromatogr. A*, vol. 1327, pp. 141–148, Jan. 2014.
- [70] A. Grand-Guillaume Perrenoud, J. L. Veuthey, and D. Guillarme, “Comparison of ultra-high performance supercritical fluid chromatography and ultra-high performance liquid chromatography for the analysis of pharmaceutical compounds,” *J. Chromatogr. A*, vol. 1266, pp. 158–167, Nov. 2012.
- [71] T. A. Berger, “Characterization of a 2.6 μm Kinetex porous shell hydrophilic interaction liquid chromatography column in supercritical fluid chromatography with a comparison to 3 μm totally porous silica,” *J. Chromatogr. A*, vol. 1218, no. 28, pp. 4559–4568, Jul. 2011.
- [72] J. R. Strubinger, H. Song, and J. F. Parcher, “High-Pressure Phase Distribution Isotherms for Supercritical Fluid Chromatographic Systems. 2. Binary Isotherms of Carbon Dioxide and Methanol,” *Anal. Chem.*, vol. 63, no. 2, pp. 104–108, Jan. 1991.
- [73] C. Brunelli, Y. Zhao, M.-H. Brown, and P. Sandra, “Pharmaceutical analysis by supercritical fluid chromatography: Optimization of the mobile phase composition on a 2-ethylpyridine column,” *J. Sep. Sci.*, vol. 31, no. 8, pp. 1299–1306, May 2008.
- [74] C. Brunelli, Y. Zhao, M. H. Brown, and P. Sandra, “Development of a supercritical fluid chromatography high-resolution separation method suitable for pharmaceuticals using cyanopropyl silica,” *J. Chromatogr. A*, vol. 1185, no. 2, pp. 263–272, Mar. 2008.
- [75] W. Zou, J. G. Dorsey, and T. L. Chester, “Modifier effects on column efficiency in packed-column supercritical fluid chromatography,” *Anal. Chem.*, vol. 72, no. 15, pp. 3620–3626, Aug. 2000.
- [76] C. West and E. Lesellier, “Effects of mobile phase composition on retention and selectivity in achiral supercritical fluid chromatography,” *J. Chromatogr. A*, vol. 1302, pp. 152–162, Aug. 2013.
- [77] K. Plachká, F. Švec, and L. Nováková, “Ultra-high performance supercritical fluid chromatography in impurity control: Searching for generic screening approach,” *Anal. Chim. Acta*, vol. 1039, pp. 149–161, 2018.
- [78] J. A. Blackwell, R. W. Stringham, and J. D. Weckwerth, “Effect of Mobile Phase Additives in Packed-Column Subcritical and Supercritical Fluid Chromatography,” *Anal. Chem.*, vol. 69, no. 3, pp. 409–415, 1997.

- [79] C. West, "Chapter 4 - Column Characterization," C. F. B. T.-S. F. C. Poole, Ed. Elsevier, 2017, pp. 103–125.
- [80] D. Wen and S. V. Olesik, "Characterization of pH in liquid mixtures of methanol/H₂O/CO₂," *Anal. Chem.*, vol. 72, no. 3, pp. 475–480, 2000.
- [81] Z. J. Dijkstra, A. R. Doornbos, H. Weyten, J. M. Ernsting, C. J. Elsevier, and J. T. F. Keurentjes, "Formation of carbamic acid in organic solvents and in supercritical carbon dioxide," *J. Supercrit. Fluids*, vol. 41, no. 1, pp. 109–114, May 2007.
- [82] A. Sen *et al.*, "Analysis of polar urinary metabolites for metabolic phenotyping using supercritical fluid chromatography and mass spectrometry," *J. Chromatogr. A*, vol. 1449, pp. 141–155, Jun. 2016.
- [83] T. A. Berger and W. H. Wilson, "Separation of basic drugs by packed-column supercritical fluid chromatography 3. Stimulants," *J. Pharm. Sci.*, vol. 84, no. 4, pp. 489–492, 1995.
- [84] T. A. Berger and J. F. Deye, "Effect of basic additives on peak shapes of strong bases separated by packed-column supercritical fluid chromatography," *J. Chromatogr. Sci.*, vol. 29, no. 7, pp. 310–317, 1991.
- [85] X. Lou, H. G. Janssen, and C. A. Cramers, "Temperature and pressure effects on solubility in supercritical carbon dioxide and retention in supercritical fluid chromatography," *J. Chromatogr. A*, vol. 785, no. 1–2, pp. 57–64, Oct. 1997.
- [86] D. Mangelings and Y. Vander Heyden, "Chiral separations in sub- and supercritical fluid chromatography," *J. Sep. Sci.*, vol. 31, no. 8, pp. 1252–1273, May 2008.
- [87] K. De Klerck, D. Mangelings, D. Clicq, F. De Boever, and Y. Vander Heyden, "Combined use of isopropylamine and trifluoroacetic acid in methanol-containing mobile phases for chiral supercritical fluid chromatography," *J. Chromatogr. A*, vol. 1234, pp. 72–79, Apr. 2012.
- [88] L. Nováková and M. Douša, "General screening and optimization strategy for fast chiral separations in modern supercritical fluid chromatography," *Anal. Chim. Acta*, vol. 950, pp. 199–210, Jan. 2017.
- [89] C. West, "Recent trends in chiral supercritical fluid chromatography," *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, vol. 120. Elsevier B.V., 01-Nov-2019.
- [90] L. C. Harps, J. F. Joseph, and M. K. Parr, "SFC for chiral separations in bioanalysis," *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, vol. 162. Elsevier B.V., pp. 47–59, 05-Jan-2019.
- [91] C. Fanali, G. D'Orazio, S. Fanali, and A. Gentili, "Advanced analytical techniques for

- fat-soluble vitamin analysis," *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, vol. 87. Elsevier B.V., pp. 82–97, 01-Feb-2017.
- [92] F. Petruzzello, A. Grand-Guillaume Perrenoud, A. Thorimbert, M. Fogwill, and S. Rezzi, "Quantitative Profiling of Endogenous Fat-Soluble Vitamins and Carotenoids in Human Plasma Using an Improved UHPSFC-ESI-MS Interface," *Anal. Chem.*, vol. 89, no. 14, pp. 7615–7622, Jul. 2017.
- [93] V. Pilařová *et al.*, "Development and optimization of ultra-high performance supercritical fluid chromatography mass spectrometry method for high-throughput determination of tocopherols and tocotrienols in human serum," *Anal. Chim. Acta*, vol. 934, pp. 252–265, Aug. 2016.
- [94] F. Jumaah *et al.*, "A rapid method for the separation of vitamin D and its metabolites by ultra-high performance supercritical fluid chromatography-mass spectrometry," *J. Chromatogr. A*, vol. 1440, pp. 191–200, Apr. 2016.
- [95] C. Jenkinson, A. Taylor, K. H. Storbeck, and M. Hewison, "Analysis of multiple vitamin D metabolites by ultra-performance supercritical fluid chromatography-tandem mass spectrometry (UPSFC-MS/MS)," *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.*, vol. 1087–1088, pp. 43–48, Jun. 2018.
- [96] T. Yamada *et al.*, "Supercritical fluid chromatography/orbitrap mass spectrometry based lipidomics platform coupled with automated lipid identification software for accurate lipid profiling," *J. Chromatogr. A*, vol. 1301, pp. 237–242, Aug. 2013.
- [97] J. W. Jones *et al.*, "Ultraperformance convergence chromatography-high resolution tandem mass spectrometry for lipid biomarker profiling and identification," *Biomed. Chromatogr.*, vol. 31, no. 3, p. e3822, Mar. 2017.
- [98] T. Uchikata, A. Matsubara, E. Fukusaki, and T. Bamba, "High-throughput phospholipid profiling system based on supercritical fluid extraction-supercritical fluid chromatography/mass spectrometry for dried plasma spot analysis," *J. Chromatogr. A*, vol. 1250, pp. 69–75, Aug. 2012.
- [99] M. D. Jones, P. D. Rainville, G. Isaac, I. D. Wilson, N. W. Smith, and R. S. Plumb, "Ultra high resolution SFC-MS as a high throughput platform for metabolic phenotyping: Application to metabolic profiling of rat and dog bile," *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.*, vol. 966, pp. 200–207, Sep. 2014.
- [100] M. Lída and M. Holčapek, "High-Throughput and Comprehensive Lipidomic Analysis Using Ultrahigh-Performance Supercritical Fluid Chromatography–Mass Spectrometry," *Anal. Chem.*, vol. 87, no. 14, pp. 7187–7195, Jul. 2015.
- [101] Y. Yang, Y. Liang, J. Yang, F. Ye, T. Zhou, and L. Gongke, "Advances of supercritical fluid chromatography in lipid profiling," *Journal of Pharmaceutical Analysis*, vol. 9,

- no. 1. Xi'an Jiaotong University, pp. 1–8, 01-Feb-2019.
- [102] M. K. Parr *et al.*, “SFC-MS/MS as an orthogonal technique for improved screening of polar analytes in anti-doping control,” *Anal. Bioanal. Chem.*, vol. 408, no. 24, pp. 6789–6797, Sep. 2016.
- [103] M. Khaferaj, E. Naegele, and M. K. Parr, “Ion exchange in supercritical fluid chromatography tandem mass spectrometry (SFC-MS/MS): Application for polar and ionic drugs and metabolites in forensic and anti-doping analysis,” *J. Chromatogr. A*, 2019.
- [104] G. M. Fassauer *et al.*, “Ketamine metabolites with antidepressant effects: Fast, economical, and eco-friendly enantioselective separation based on supercritical-fluid chromatography (SFC) and single quadrupole MS detection,” *J. Pharm. Biomed. Anal.*, vol. 146, pp. 410–419, Nov. 2017.
- [105] L. Akbal and G. Hopfgartner, “Supercritical fluid chromatography–mass spectrometry using data independent acquisition for the analysis of polar metabolites in human urine,” *J. Chromatogr. A*, vol. 1609, Jan. 2020.
- [106] D. Wolrab, P. Frühauf, and C. Gerner, “Quantification of the neurotransmitters melatonin and N-acetyl-serotonin in human serum by supercritical fluid chromatography coupled with tandem mass spectrometry,” *Anal. Chim. Acta*, vol. 937, pp. 168–174, Sep. 2016.
- [107] W. Si *et al.*, “An offline two-dimensional supercritical fluid chromatography × reversed phase liquid chromatography tandem quadrupole time-of-flight mass spectrometry system for comprehensive gangliosides profiling in swine brain extract,” *Talanta*, vol. 208, Feb. 2020.
- [108] A. Raimbault, A. Noireau, and C. West, “Analysis of free amino acids with unified chromatography-mass spectrometry—application to food supplements,” *J. Chromatogr. A*, 2019.
- [109] K. Taguchi, E. Fukusaki, and T. Bamba, “Simultaneous analysis for water- and fat-soluble vitamins by a novel single chromatography technique unifying supercritical fluid chromatography and liquid chromatography,” *J. Chromatogr. A*, vol. 1362, pp. 270–277, Oct. 2014.
- [110] A. Grand-Guillaume Perrenoud, D. Guillarme, J. Boccard, J. L. Veuthey, D. Barron, and S. Moco, “Ultra-high performance supercritical fluid chromatography coupled with quadrupole-time-of-flight mass spectrometry as a performing tool for bioactive analysis,” *J. Chromatogr. A*, vol. 1450, pp. 101–111, Jun. 2016.
- [111] M. Ganzera and A. Muraier, “Separation of Natural Products,” in *Supercritical Fluid Chromatography: Handbooks in Separation Science*, Elsevier Inc., 2017, pp. 439–460.

- [112] L. Laboureur, N. Bonneau, P. Champy, A. Brunelle, and D. Touboul, "Structural Characterisation of Acetogenins from *Annona muricata* by Supercritical Fluid Chromatography Coupled to High-Resolution Tandem Mass Spectrometry," *Phytochem. Anal.*, vol. 28, no. 6, pp. 512–520, Nov. 2017.
- [113] B. Yang *et al.*, "Purification of lignans from *Fructus Arctii* using off-line two-dimensional supercritical fluid chromatography/reversed-phase liquid chromatography," *J. Sep. Sci.*, vol. 40, no. 16, pp. 3231–3238, Aug. 2017.
- [114] Y. Huang *et al.*, "Simultaneous analysis of nucleobases, nucleosides and ginsenosides in ginseng extracts using supercritical fluid chromatography coupled with single quadrupole mass spectrometry," *J. Pharm. Biomed. Anal.*, vol. 144, pp. 213–219, Sep. 2017.
- [115] Y. Huang, T. Wang, M. Fillet, J. Crommen, and Z. Jiang, "Simultaneous determination of amino acids in different teas using supercritical fluid chromatography coupled with single quadrupole mass spectrometry," *J. Pharm. Anal.*, vol. 9, no. 4, pp. 254–258, Aug. 2019.
- [116] P. Donato, V. Inferrera, D. Sciarrone, and L. Mondello, "Supercritical fluid chromatography for lipid analysis in foodstuffs," *J. Sep. Sci.*, vol. 40, no. 1, pp. 361–382, Jan. 2017.
- [117] B. Gao, Y. Luo, W. Lu, J. Liu, Y. Zhang, and L. (Lucy) Yu, "Triacylglycerol compositions of sunflower, corn and soybean oils examined with supercritical CO₂ ultra-performance convergence chromatography combined with quadrupole time-of-flight mass spectrometry," *Food Chem.*, vol. 218, pp. 569–574, Mar. 2017.
- [118] F. Jumaah *et al.*, "Rapid and Green Separation of Mono- and Diesters of Monochloropropanediols by Ultrahigh Performance Supercritical Fluid Chromatography–Mass Spectrometry Using Neat Carbon Dioxide as a Mobile Phase," *J. Agric. Food Chem.*, vol. 65, no. 37, pp. 8220–8228, Sep. 2017.
- [119] Q. Tan *et al.*, "Stereoselective quantification of triticonazole in vegetables by supercritical fluid chromatography," *Talanta*, vol. 164, pp. 362–367, Mar. 2017.
- [120] X. Pan, F. Dong, J. Xu, X. Liu, Z. Chen, and Y. Zheng, "Stereoselective analysis of novel chiral fungicide pyrisoxazole in cucumber, tomato and soil under different application methods with supercritical fluid chromatography/tandem mass spectrometry," *J. Hazard. Mater.*, vol. 311, pp. 115–124, Jul. 2016.
- [121] Y. Cheng *et al.*, "Stereoselective Analysis and Dissipation of Propiconazole in Wheat, Grapes, and Soil by Supercritical Fluid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry," *J. Agric. Food Chem.*, vol. 65, no. 1, pp. 234–243, Jan. 2017.
- [122] S. Bieber, G. Greco, S. Grosse, and T. Letzel, "RPLC-HILIC and SFC with Mass

- Spectrometry: Polarity-Extended Organic Molecule Screening in Environmental (Water) Samples," *Anal. Chem.*, vol. 89, no. 15, pp. 7907–7914, Aug. 2017.
- [123] D. Camacho-Muñoz, B. Kasprzyk-Hordern, and K. V. Thomas, "Enantioselective simultaneous analysis of selected pharmaceuticals in environmental samples by ultrahigh performance supercritical fluid based chromatography tandem mass spectrometry," *Anal. Chim. Acta*, vol. 934, pp. 239–251, Aug. 2016.
- [124] M. S. Gross, H. J. Olivos, D. M. Butryn, J. R. Olson, and D. S. Aga, "Analysis of hydroxylated polybrominated diphenyl ethers (OH-BDEs) by supercritical fluid chromatography/mass spectrometry," *Talanta*, vol. 161, pp. 122–129, Dec. 2016.
- [125] H. E. Schwartz, "Simulated Distillation by Packed Column Supercritical Fluid Chromatography," *J. Chromatogr. Sci.*, vol. 26, no. 6, pp. 275–279, Jun. 1988.
- [126] G. Lavison-Bompard *et al.*, "Hyphenation of atmospheric pressure chemical ionisation mass spectrometry to supercritical fluid chromatography for polar car lubricant additives analysis," *J. Chromatogr. A*, vol. 1216, no. 5, pp. 837–844, Jan. 2009.
- [127] S. Levin, "High Performance Liquid Chromatography (HPLC) in the Pharmaceutical Analysis," *Pharmaceutical Sciences Encyclopedia*. pp. 1–34, 25-Jun-2010.
- [128] B. A. Rasool Hassan, "Overview on Pharmaceutical Formulation and Drug Design," *Pharm. Anal. Acta*, vol. 03, no. 10, p. 4172, 2012.
- [129] EMEA, "Note for Guidance on Stability Testing: Stability Testing of New Drug Substances and Products (Cmpmp/Ich/2736/99)," *Bmj*, vol. 333, no. 7574, pp. 873–873, 2006.
- [130] ICH, "ICH Q1C stability testing requirements," *ICH Harmon. Tripart. Guidel.*, no. June 1996, pp. 1–2, 1998.
- [131] M. Ashraf-Khorassani and M. Combs, "Chapter 5 - Method Development in Supercritical Fluid Chromatography," C. F. B. T.-S. F. C. Poole, Ed. Elsevier, 2017, pp. 127–152.
- [132] L. Součková, H. Kostková, and R. Demlová, "Jak se vyvíjí nový lék," vol. 11, no. 4, pp. 144–147, 2015.
- [133] ICH, "ICH Topic Q 3 B (R) Impurities in New Drug Products NOTE FOR GUIDANCE ON IMPURITIES IN NEW DRUG," *ICH Harmon. Tripart. Guidel.*, no. August, 2003.
- [134] ICH, "Quality Guidelines : ICH Q3B (R2) Impurities in New Drug Products," *ICH Harmonised Tripartite Guideline*. [Online]. Available: <https://www.ema.europa.eu/en/ich-q3b-r2-impurities-new-drug-products>.

[Accessed: 11-Nov-2019].

- [135] ICH, "International Conference On Harmonisation Of Technical Requirements For Registration Of Pharmaceuticals For Human Use Ich Harmonised Tripartite Guideline Specifications: Test Procedures And Acceptance Criteria For New Drug Substances And New Drug Products," *ICH Harmon. Tripart. Guidel.*, 1999.
- [136] ICH, "M7 Assessment and Control of DNA Reactive (Mutagenic) Impurities in Pharmaceuticals to Limit Potential Carcinogenic Risk," *ICH Harmon. Tripart. Guidel.*, no. May, p. 35, 2015.
- [137] R. Holm and D. P. Elder, "Analytical advances in pharmaceutical impurity profiling," *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, vol. 87. Elsevier B.V., pp. 118–135, 25-May-2016.
- [138] A. Dispas, P. Lebrun, and P. Hubert, "Chapter 11 - Validation of Supercritical Fluid Chromatography Methods," C. F. B. T.-S. F. C. Poole, Ed. Elsevier, 2017, pp. 317–344.
- [139] A. Dispas, P. Lebrun, E. Ziemons, R. Marini, E. Rozet, and P. Hubert, "Evaluation of the quantitative performances of supercritical fluid chromatography: From method development to validation," *J. Chromatogr. A*, vol. 1353, pp. 78–88, Aug. 2014.
- [140] B. Andri *et al.*, "Optimization and validation of a fast supercritical fluid chromatography method for the quantitative determination of vitamin D3 and its related impurities," *J. Chromatogr. A*, vol. 1491, pp. 171–181, Mar. 2017.
- [141] M. A. Khalikova, E. Lesellier, E. Chapuzet, D. Šatínský, and C. West, "Development and validation of ultra-high performance supercritical fluid chromatography method for quantitative determination of nine sunscreens in cosmetic samples," *Anal. Chim. Acta*, vol. 1034, pp. 184–194, Nov. 2018.
- [142] A. Dispas, P. Lebrun, P. Y. Sacré, and P. Hubert, "Screening study of SFC critical method parameters for the determination of pharmaceutical compounds," *J. Pharm. Biomed. Anal.*, vol. 125, pp. 339–354, Jun. 2016.
- [143] D. Baudalet *et al.*, "Enantioseparation of pyroglutamide derivatives on polysaccharide based chiral stationary phases by high-performance liquid chromatography and supercritical fluid chromatography: A comparative study," *J. Chromatogr. A*, vol. 1363, pp. 257–269, Oct. 2014.
- [144] H. Jambo *et al.*, "Implementation of a generic SFC-MS method for the quality control of potentially counterfeited medicinal cannabis with synthetic cannabinoids," *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.*, vol. 1092, pp. 332–342, Aug. 2018.
- [145] K. Yaku and F. Morishita, "Separation of drugs by packed-column supercritical fluid chromatography," *J. Biochem. Biophys. Methods*, vol. 43, no. 1–3, pp. 59–76, Jul.

- 2000.
- [146] E. Abbott, T. D. Veenstra, and H. J. Issaq, "Clinical and pharmaceutical applications of packed-column supercritical fluid chromatography," *J. Sep. Sci.*, vol. 31, no. 8, pp. 1223–1230, May 2008.
- [147] A. Dispas *et al.*, "Quantitative determination of salbutamol sulfate impurities using achiral supercritical fluid chromatography," *J. Pharm. Biomed. Anal.*, vol. 134, pp. 170–180, Feb. 2017.
- [148] J. M. Płotka, M. Biziuk, C. Morrison, and J. Namieśnik, "Pharmaceutical and forensic drug applications of chiral supercritical fluid chromatography," *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, vol. 56. Elsevier B.V., pp. 74–89, 2014.
- [149] Y. Zhao, G. Woo, S. Thomas, D. Semin, and P. Sandra, "Rapid method development for chiral separation in drug discovery using sample pooling and supercritical fluid chromatography-mass spectrometry," *J. Chromatogr. A*, vol. 1003, no. 1–2, pp. 157–166, Jun. 2003.
- [150] B. K. Patel, A. J. Hutt, and A. J. Hutt, "Stereoselectivity in Drug Action and Disposition: An Overview," pp. 139–186, Mar. 2004.
- [151] "Development of New Stereoisomeric Drugs | FDA." [Online]. Available: <https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/development-new-stereoisomeric-drugs>. [Accessed: 17-Dec-2019].
- [152] Y. Zhang, D. R. Wu, D. B. Wang-Iverson, and A. A. Tymiak, "Enantioselective chromatography in drug discovery," *Drug Discovery Today*, vol. 10, no. 8. pp. 571–577, 15-Apr-2005.
- [153] S. Declerck, Y. Vander Heyden, and D. Mangelings, "Enantioseparations of pharmaceuticals with capillary electrochromatography: A review," *J. Pharm. Biomed. Anal.*, vol. 130, pp. 81–99, Oct. 2016.
- [154] E. R. Francotte, "Practical Aspects and Applications of Preparative Supercritical Fluid Chromatography," in *Supercritical Fluid Chromatography: Handbooks in Separation Science*, Elsevier Inc., 2017, pp. 275–315.
- [155] A. Tarafder, "Theories for Preparative SFC," in *Supercritical Fluid Chromatography: Handbooks in Separation Science*, Elsevier Inc., 2017, pp. 245–274.
- [156] A. Rajendran, "Design of preparative-supercritical fluid chromatography," *Journal of Chromatography A*, vol. 1250. pp. 227–249, 10-Aug-2012.
- [157] "U.S. Food and Drug Administration." [Online]. Available: <https://www.fda.gov/>. [Accessed: 17-Dec-2019].

- [158] “European Medicines Agency |.” [Online]. Available: <https://www.ema.europa.eu/en>. [Accessed: 17-Dec-2019].
- [159] M. B. Hicks, E. L. Regalado, F. Tan, X. Gong, and C. J. Welch, “Supercritical fluid chromatography for GMP analysis in support of pharmaceutical development and manufacturing activities,” *J. Pharm. Biomed. Anal.*, vol. 117, pp. 316–324, Jan. 2016.
- [160] A. Dispas *et al.*, “First inter-laboratory study of a Supercritical Fluid Chromatography method for the determination of pharmaceutical impurities,” *J. Pharm. Biomed. Anal.*, vol. 161, no. August, pp. 414–424, 2018.
- [161] A. J. Alexander, T. F. Hooker, and F. P. Tomasella, “Evaluation of mobile phase gradient supercritical fluid chromatography for impurity profiling of pharmaceutical compounds,” *J. Pharm. Biomed. Anal.*, vol. 70, pp. 77–86, Nov. 2012.
- [162] E. Lemasson, S. Bertin, P. Hennig, E. Lesellier, and C. West, “Comparison of ultra-high performance methods in liquid and supercritical fluid chromatography coupled to electrospray ionization – mass spectrometry for impurity profiling of drug candidates,” *J. Chromatogr. A*, vol. 1472, pp. 117–128, Nov. 2016.
- [163] K. Plachká, L. Chrenková, M. Douša, and L. Nováková, “Development, validation and comparison of UHPSFC and UHPLC methods for the determination of agomelatine and its impurities,” *J. Pharm. Biomed. Anal.*, vol. 125, pp. 376–384, Jun. 2016.
- [164] W. Li, J. Wang, and Z. Y. Yan, “Development of a sensitive and rapid method for rifampicin impurity analysis using supercritical fluid chromatography,” *J. Pharm. Biomed. Anal.*, vol. 114, pp. 341–347, Oct. 2015.
- [165] A. J. Alexander, L. Zhang, T. F. Hooker, and F. P. Tomasella, “Comparison of supercritical fluid chromatography and reverse phase liquid chromatography for the impurity profiling of the antiretroviral drugs lamivudine/BMS-986001/efavirenz in a combination tablet,” *J. Pharm. Biomed. Anal.*, vol. 78–79, pp. 243–251, May 2013.
- [166] Z. Wang, H. Zhang, O. Liu, and B. Donovan, “Development of an orthogonal method for mometasone furoate impurity analysis using supercritical fluid chromatography,” *J. Chromatogr. A*, vol. 1218, no. 16, pp. 2311–2319, Apr. 2011.
- [167] J. Duval, C. Colas, P. Bonnet, and E. Lesellier, “Hyphenation of ultra-high performance supercritical fluid chromatography with atmospheric pressure chemical ionisation high resolution mass spectrometry: Part 2. Study of chromatographic and mass spectrometry parameters for the analysis of natural non-polar compounds,” *J. Chromatogr. A*, vol. 1596, pp. 199–208, Jul. 2019.
- [168] E. Lemasson, S. Bertin, P. Hennig, H. Boiteux, E. L. Westa, and C. West, “Development of an achiral supercritical fluid chromatography method with ultraviolet absorbance and mass spectrometric detection for impurity profiling of drug candidates. Part I:

- Optimization of mobile phase composition," *J. Chromatogr. A*, vol. 1408, pp. 217–226, Jul. 2015.
- [169] C. Muscat Galea, D. Mangelings, and Y. Vander Heyden, "Investigation of the effect of mobile phase composition on selectivity using a solvent-triangle based approach in achiral SFC," *J. Pharm. Biomed. Anal.*, vol. 132, pp. 247–257, Jan. 2017.
- [170] A. Cazenave-Gassiot *et al.*, "Effect of increasing concentration of ammonium acetate as an additive in supercritical fluid chromatography using CO₂-methanol mobile phase," *J. Chromatogr. A*, vol. 1216, no. 36, pp. 6441–6450, Sep. 2009.
- [171] P. P. Desai, N. R. Patel, O. D. Sherikar, and P. J. Mehta, "Development and Validation of Packed Column Supercritical Fluid Chromatographic Technique for Quantification of Chlorzoxazone, Paracetamol and Aceclofenac in their Individual and Combined Dosage Forms," *J. Chromatogr. Sci.*, Jun. 2012.
- [172] P. Prajapati and Y. K. Agrawal, "SFC-MS/MS for identification and simultaneous estimation of the isoniazid and pyrazinamide in its dosage form," *J. Supercrit. Fluids*, vol. 95, pp. 597–602, 2014.
- [173] S. Mehta, S. Singh, K. Chikhaliya, P. Mehta, and T. Dadhania, "Determination of assay and uniformity of content of ramipril and telmisartan in their multiple dosage forms by a developed and validated supercritical fluid chromatographic technique," *Anal. Methods*, vol. 6, no. 17, pp. 7068–7074, Sep. 2014.
- [174] U. Puppala, K. S. V. Srinivas, K. Venkateshwara Reddy, M. Kaliyaperumal, and S. R. Pakalapati, "Enantiospecific UPC₂ SFC-MS method for separation and quantification of R & S-Eliglustat tartrate in presence of its stereo isomers and degradation impurities," in *Materials Today: Proceedings*, 2019, vol. 19, pp. 420–428.
- [175] E. Lesellier, "Overview of the retention in subcritical fluid chromatography with varied polarity stationary phases," *J. Sep. Sci.*, vol. 31, no. 8, pp. 1238–1251, May 2008.
- [176] M. Ventura, B. Murphy, and W. Goetzinger, "Ammonia as a preferred additive in chiral and achiral applications of supercritical fluid chromatography for small, drug-like molecules," *J. Chromatogr. A*, vol. 1220, pp. 147–155, Jan. 2012.
- [177] K. Plachká, L. Chrenková, M. Douša, and L. Nováková, "Development, validation and comparison of UHPSFC and UHPLC methods for the determination of agomelatine and its impurities," *J. Pharm. Biomed. Anal.*, vol. 125, pp. 376–384, 2016.
- [178] A. Marley and D. Connolly, "Determination of (R)-timolol in (S)-timolol maleate active pharmaceutical ingredient: Validation of a new supercritical fluid chromatography method with an established normal phase liquid chromatography method," *J. Chromatogr. A*, vol. 1325, pp. 213–220, Jan. 2014.

- [179] N. Patel, T. Dadhaniya, and A. Gajjar, "Supercritical Fluid Chromatographic Method for Montelukast: Application in Content Uniformity and Degradation Study," *Curr. Anal. Chem.*, vol. 12, no. 6, pp. 529–536, Oct. 2016.
- [180] T. DePhillipo and R. Chen, "Separation and Quantitative Determination of Hydrocortisone in Cortizone 10 Plus creme by Supercritical Fluid Chromatography (SFC) | Request PDF." [Online]. Available: https://www.researchgate.net/publication/292569798_Separation_and_Quantitative_Determination_of_Hydrocortisone_in_Cortizone_10_Plus_creme_by_Supercritical_Fluid_Chromatography_SFC. [Accessed: 17-Dec-2019].
- [181] M. Méjean, M. Vollmer, A. Brunelle, and D. Touboul, "Quantification of retinoid compounds by supercritical fluid chromatography coupled to ultraviolet diode array detection," *Chromatographia*, vol. 76, no. 17–18, pp. 1097–1105, Sep. 2013.
- [182] P. S. Mukherjee, "Validation of direct assay of an aqueous formulation of a drug compound AZY by chiral supercritical fluid chromatography (SFC)," *J. Pharm. Biomed. Anal.*, vol. 43, no. 2, pp. 464–470, Jan. 2007.
- [183] S. Schmidtsdorff and A. H. Schmidt, "Simultaneous detection of nitrosamines and other sartan-related impurities in active pharmaceutical ingredients by supercritical fluid chromatography," *J. Pharm. Biomed. Anal.*, vol. 174, pp. 151–160, Sep. 2019.
- [184] M. Liu, L. Zhao, D. Yang, J. Ma, X. Wang, and T. Zhang, "Preclinical pharmacokinetic evaluation of a new formulation of a bifendate solid dispersion using a supercritical fluid chromatography-tandem mass spectrometry method," *J. Pharm. Biomed. Anal.*, vol. 100, pp. 387–392, Nov. 2014.
- [185] R. Yang, Y. Li, C. Liu, Y. Xu, L. Zhao, and T. Zhang, "An improvement of separation and response applying post-column compensation and one-step acetone protein precipitation for the determination of coenzyme Q10 in rat plasma by SFC-MS/MS," *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.*, vol. 1031, pp. 221–226, Sep. 2016.
- [186] E. Medicines Agency, "2** Committee for Medicinal Products for Human Use (CHMP) Guideline on bioanalytical method validation," 1922.
- [187] Fda and Cder, "Bioanalytical Method Validation Guidance for Industry Biopharmaceutics Bioanalytical Method Validation Guidance for Industry Biopharmaceutics Contains Nonbinding Recommendations," 2018.
- [188] A. Ríos, M. Zougagh, and F. De Andréés, "Bioanalytical applications using supercritical fluid techniques," *Bioanalysis*, vol. 2, no. 1, pp. 9–25, Jan-2010.
- [189] Y. Liang, J. Liu, Q. Zhong, T. Huang, and T. Zhou, "An automatic online solid-phase dehydrate extraction-ultra-high performance supercritical fluid chromatography-tandem mass spectrometry system using a dilution strategy for the screening of

- doping agents in human urine,” *Anal. Chim. Acta*, 2019.
- [190] L. Chen, B. Dean, H. La, Y. Chen, and X. Liang, “Stereoselective supercritical fluidic chromatography –mass spectrometry (SFC-MS) as a fast bioanalytical tool to assess chiral inversion in vivo and in vitro,” *Int. J. Mass Spectrom.*, vol. 444, Oct. 2019.
- [191] D. Spaggiari *et al.*, “Comparison of liquid chromatography and supercritical fluid chromatography coupled to compact single quadrupole mass spectrometer for targeted in vitro metabolism assay,” *J. Chromatogr. A*, vol. 1371, pp. 244–256, Dec. 2014.
- [192] Y. Zhang *et al.*, “A simple, accurate, time-saving and green method for the determination of 15 sulfonamides and metabolites in serum samples by ultra-high performance supercritical fluid chromatography,” *J. Chromatogr. A*, vol. 1432, pp. 132–139, Feb. 2016.
- [193] T. Bamba, J. W. Lee, A. Matsubara, and E. Fukusaki, “Metabolic profiling of lipids by supercritical fluid chromatography/mass spectrometry,” *J. Chromatogr. A*, vol. 1250, pp. 212–219, Aug. 2012.
- [194] L. Wang, J. Wang, J. Zhang, Q. Jiang, L. Zhao, and T. Zhang, “Simultaneous determination of topiramate, carbamazepine, oxcarbazepine and its major metabolite in human plasma by SFC-ESI-MS/MS with polarity switching: Application to therapeutic drug monitoring,” *Arab. J. Chem.*, vol. 12, no. 8, pp. 4775–4783, Dec. 2019.
- [195] R. A. Sansone and L. A. Sansone, “Agomelatine: A novel antidepressant,” *Innov. Clin. Neurosci.*, vol. 8, no. 11, pp. 10–14, Nov. 2011.
- [196] Y. Liu, L. Chen, and Y. Ji, “Quantification and structural elucidation of potential impurities in agomelatine active pharmaceutical ingredient,” *J. Pharm. Biomed. Anal.*, vol. 81–82, pp. 193–201, Jul. 2013.
- [197] “European Pharmacopoeia (Ph. Eur.) 9th Edition | EDQM.” [Online]. Available: <https://www.edqm.eu/en/european-pharmacopoeia-ph-eur-9th-edition>. [Accessed: 17-Dec-2019].
- [198] A. Gustavo González and M. Ángeles Herrador, “A practical guide to analytical method validation, including measurement uncertainty and accuracy profiles,” *TrAC - Trends Anal. Chem.*, vol. 26, no. 3, pp. 227–238, Mar. 2007.
- [199] A. Dispas, P. Lebrun, and P. Hubert, “Validation of Supercritical Fluid Chromatography Methods,” in *Supercritical Fluid Chromatography: Handbooks in Separation Science*, Elsevier Inc., 2017, pp. 317–344.
- [200] ISO, *ISO 5725-2:1994 Accuracy (trueness and precision) of measurement methods*

and results -- Part 2: Basic method for the determination of repeatability and reproducibility of a standard measurement method. 1994, p. 47 p.

- [201] R. D. Marini *et al.*, "Collaborative study of an liquid chromatographic method for the determination of R-timolol and other related substances in S-timolol maleate," *Anal. Chim. Acta*, vol. 546, no. 2, pp. 182–192, Aug. 2005.
- [202] P. Dehouck *et al.*, "Interlaboratory study of a liquid chromatography method for erythromycin: Determination of uncertainty," *J. Chromatogr. A*, vol. 1010, no. 1, pp. 63–74, Aug. 2003.
- [203] A. Azzi, "Many tocopherols, one vitamin E," *Molecular Aspects of Medicine*, vol. 61. Elsevier Ltd, pp. 92–103, 01-Jun-2018.
- [204] M. P. San Andrés, J. Otero, and S. Vera, "High performance liquid chromatography method for the simultaneous determination of α -, γ - And δ -tocopherol in vegetable oils in presence of hexadecyltrimethylammonium bromide/n-propanol in mobile phase," *Food Chem.*, vol. 126, no. 3, pp. 1470–1474, Jun. 2011.
- [205] J. M. Zingg, "Vitamin E: An overview of major research directions," *Molecular Aspects of Medicine*, vol. 28, no. 5–6. pp. 400–422, Oct-2007.
- [206] J. M. Oberson, E. Campos-Giménez, J. Rivière, and F. Martin, "Application of supercritical fluid chromatography coupled to mass spectrometry to the determination of fat-soluble vitamins in selected food products," *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.*, vol. 1086, pp. 118–129, Jun. 2018.
- [207] E. Sieniawska *et al.*, "LC-QTOF-MS analysis and activity profiles of popular antioxidant dietary supplements in terms of quality control," *Oxid. Med. Cell. Longev.*, vol. 2017, 2017.
- [208] F. J. Rupérez, D. Martín, E. Herrera, and C. Barbas, "Chromatographic analysis of α -tocopherol and related compounds in various matrices," *Journal of Chromatography A*, vol. 935, no. 1–2. pp. 45–69, 23-Nov-2001.
- [209] M. M. Phillips *et al.*, "Dietary supplement laboratory quality assurance program: the first five exercises.," *J. AOAC Int.*, vol. 94, no. 3, pp. 803–14.
- [210] N. Sarma, G. Giancaspro, and J. Venema, "Dietary supplements quality analysis tools from the United States Pharmacopeia," *Drug Test. Anal.*, vol. 8, no. 3–4, pp. 418–423, Mar. 2016.
- [211] G. W. Chase, R. R. Eitenmiller, and A. R. Long, "A liquid chromatographic method for analysis of all-rac-alpha-tocopheryl acetate and retinyl palmitate in medical food using matrix solid-phase dispersion in conjunction with a zero reference material as a method development tool.," *J. AOAC Int.*, vol. 82, no. 1, pp. 107–11.

- [212] G. W. Chase, R. R. Eitenmiller, and A. R. Long, "Analysis of all-rac-alpha-tocopheryl acetate and retinyl palmitate in medical foods using a zero control reference material (ZRM) as a method development tool.," *J. AOAC Int.*, vol. 82, no. 2, pp. 271–5.
- [213] J. Vigo, M. J. Lucero, and M. J. Leon, "Determination of alpha-tocopherol in semisolid gelled preparations by reversed phase HPLC.," *Boll. Chim. Farm.*, vol. 131, no. 11, pp. 415–8, Dec. 1992.
- [214] Ž. T. Rakuša, E. Srečnik, and R. Roškar, "Novel HPLC-UV method for simultaneous determination of fat-soluble vitamins and coenzyme Q10 in medicines and supplements," *Acta Chim. Slov.*, vol. 64, no. 3, pp. 523–529, 2017.
- [215] M. P. Labadie and C. E. Boufford, "Gas chromatographic assay of supplemental vitamin E acetate concentrates: collaborative study.," *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, vol. 71, no. 6, pp. 1168–71.

7. Seznam publikací a abstraktů

7.1 Publikace zahrnuté v dizertační práci

I. **Plachká K.**, Chrenková L., Douša M., Nováková L.

Development, validation, and comparison of UHPSFC and UHPLC methods for the determination of agomelatine and its impurities.

Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2016, vol. 125, p. 376-384, **IF₂₀₁₉ 2.983**

- Podíl autorky: experimentální práce (optimalizace a validace UHPSFC a UHPLC metody), zpracování dat, příprava a revize publikace

II. **Plachká, K.**, Švec, F., Nováková, L.

Ultra-high performance supercritical fluid chromatography in impurity control: Searching for generic screening approach.

Analytica Chimica Acta, 2018, vol. 1039, p. 149-161, **IF₂₀₁₉ 5.256**

- Podíl autorky: experimentální práce a zpracování dat, příprava a revize publikace

III. **Plachká K.**, Khalikova M., Babičová B., Němcová Z., Roubíčková L., Svec F., Nováková L.

Ultra-high performance supercritical fluid chromatography in impurity control II: Method validation

Analytica Chimica Acta, v recenzním řízení

- Podíl autorky: experimentální práce a zpracování dat, příprava a revize publikace

IV. Dispas A., Marini R., Desfontaine V., Veuthey J.-L., Kotoni D., Losacco, L. G., Clarke A., Galea Ch. M., Mangelings D., Jocher B. M., Regalado E. L., **Plachká K.**, Nováková L., Wuyts B., Francois I., Gray M., Aubin A. J., Tarafder A., Cazes M., Desvignes Ch., Villemet L., Sarrut M., Raimbault A., Lemasson E., Lesellier E., West C., Leek T., Wong M., Dai L., Zhang K., Grand-Guillaume Perrenoud A., Brunelli C., Hennig P., Bertin S., Mauge F., Da Costa N., Farrell W. P., Hill M., Desphande N., Grangrade M., Sadaphule S., Yadav R., Rane S., Shringare S., Iguiniz M., Heinisch S., Lefevre J., Corbel E., Roques N., Heyden Y. V., Guillarme D., Hubert P.

First inter-laboratory study of a Supercritical Fluid Chromatography method for the determination of pharmaceutical impurities

Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2018, vol. 161, p. 414-424, IF₂₀₁₉ **2.983**

- Podíl autorky: experimentální práce provedené na FaF UK (ověření metody a analýza poskytnutých vzorků dle závazného protokolu) a zpracování získaných dat, revize publikace

V. Nováková L., Sejkorová M., Smolková K., **Plachká K.**, Švec, F.

The benefits of ultra-high-performance supercritical fluid chromatography in determination of lipophilic vitamins in dietary supplements.

Chromatographia, 2018, p. 1-11, IF₂₀₁₉ **1.552**

- Podíl autorky: spolupráce na experimentální práci a zpracování dat, příprava a revize publikace

VI. Plachká K., Jakubec P., Nováková L.

Effect of column history in supercritical fluid chromatography after one-year use – practical implications

manuskript připravený k podání do *Journal of Separation Science*

- Podíl autorky: experimentální práce, příprava a revize publikace

VII. Pilařová V., **Plachká K.**, Khalikova M., Svec F., Nováková L.

Recent developments in supercritical fluid chromatography – mass spectrometry: Is it a viable option for analysis of complex samples?

TrAC Trends in Analytical Chemistry, 2019, 112, p. 212-225, IF₂₀₁₉ **8.428**

- Podíl autorky: rešerše literatury zabývající se využitím SFC-MS metod v environmentální analýze a petrochemii, příprava a revize publikace

7.2 Kapitoly v monografiích

I. Supercritical Fluid Chromatography, Volume 2

Editor: Gérard Rosé

De Gruyter, 2018, ISBN: 978-3-11-061898-3

Kapitola 2: Supercritical fluid chromatography in bioanalysis

Autoři: Nováková L., **Plachká K.**, Khalikova M., Švec F.

II. Handbook of Advanced Chromatography /Mass Spectrometry Techniques

Editoři: Michal Holčapek, Wm. Craig Byrdwel

Elsevier Inc., 2017, ISBN: 978-0-12-811732-3

Kapitola 12: Ultra-high performance supercritical fluid chromatography-mass spectrometry

Autoři: Nováková L., **Plachká K.**, Jakubec P.

III. Supercritical Fluid Chromatography

Editor: Colin F. Poole

Elsevier Inc., 2017, ISBN: 978-0-12-809207-1

Kapitola 16: Pharmaceutical Applications

Autoři: Nováková L., **Plachká K.**

7.3 Publikace nezahrnuté v dizertační práci

VIII. Pilařová V., **Plachká K.**, Chrenková L., Najmanová I., Mladěnka P., Švec, F., Novák, O., Nováková, L.

Simultaneous determination of quercetin and its metabolites in rat plasma by using ultra-high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry.

Talanta, 2018, vol. 185, p. 71-79, **IF₂₀₁₉ 4.916**

- Podíl autorky: experimentální práce (optimalizace a validace SPE metody), revize publikace

IX. Svoboda P., Sander D., **Plachká K.**, Nováková L.

Development of matrix effect-free MISPE-UHPLC-MS/MS method for determination of lovastatin in Pu-erh tea, oyster mushroom, and red yeast rice.

Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2017, vol. 140, p. 367-376, **IF₂₀₁₉ 2.983**

- Podíl autorky: experimentální práce (analýza vzorků pomocí UHPLC-MS), revize publikace

7.4 Přednášky

A. Práce prezentované autorkou

- I. Plachká K., Pezzatti J., Nicoli R., Veuthey J.-L., Guillarme D., Nováková L. **Ion mobility spectrometry in doping analysis**. 10. Postgraduální a 8. Postdoktorandská vědecká conference, Hradec Králové, ČR (22. 1. – 23. 1. 2020)
- II. **Plachká K.**, Khalikova M., Babičová B., Němcová Z., Roubíčková L., Jung O., Švec F., Nováková L. **The potential of Supercritical fluid Chromatography in pharmaceutical analysis**. Česká chromatografická Škola – HPLC 2019, Zaječí, ČR (12.5. – 15. 5. 2019)
- III. **Plachká K.**, Khalikova M., Babičová B., Němcová Z., Roubíčková L., Jung O., Švec F., Nováková L. **Ultra-high performance supercritical fluid chromatography in pharmaceutical quality control: tackling the method validation**, 9. Postgraduální a 7. Postdoktorandská vědecká konference, Hradec Králové, ČR (23. 1. – 24. 1. 2019)
- IV. **Plachká K.**, Nováková L. **Applicability of ultra-high performance Supercritical fluid chromatography in pharmaceutical quality control**, 8. Postgraduální a 6. Postdoktorandská vědecká konference, Hradec Králové, ČR (24. 1. – 25. 1. 2018)
- V. **Plachká K.**, Svoboda P., Zelená L., Sklenářová H., Nováková L. **Determination of lovastatin in food samples using UHPLC-MS/MS method and automated molecularly imprinted solid phase extraction**, 23. International Symposium on Separation Sciences (ISSS 2017), Vídeň, Rakousko (19.9. – 22.9. 2017)
- VI. **Plachká K.**, Douša M., Nováková L. **Development of UHPSFC-UV-MS achiral screening approach for impurity profiling**, 7. Postgraduální a 5. Postdoktorandská vědecká konference, Hradec Králové, ČR (7. 2. – 8. 2. 2017)

- VII. **Plachká K.**, Chrenková L., Douša M., Nováková L. **Optimization, validation and comparison of UHPSFC and UHPLC methods for the determination of agomelatine and its impurities**, Česká Chromatografická škola – HPLC 2015, Rožnov pod Radhoštěm, ČR (3. – 5. 5. 2015)

B. Spoluautorské práce

- I. Nováková L., **Plachká K.**, Jakubec P., Khalikova M., Švec F. **Does current supercritical fluid chromatography meet the requirements of regulated environment?** 48th International Symposium on High Performance Liquid Phase Separations and Related Techniques, Milán, Itálie (16. – 20. 6. 2019)
- II. Nováková L., Sejkorová M., Smolková K., **Plachká K.**, Švec F. **Analysis of tocopherols and tocotrienols in dietary supplements**, Česká Chromatografická škola – HPLC 2019, Vinařství u Kapličky, Zaječí, ČR (12. – 15. 5. 2019)
- III. Nováková L., **Plachká K.**, Jakubec P., Pilařová V. **Supercritical fluid chromatography in pharmaceutical analysis and in bioanalysis**, Advances in Chromatography and Electrophoresis & CHIRANAL 2018, Olomouc, ČR (29. 1. -30. 1. 2018)
- IV. Nováková L., Pilařová V., **Plachká K.** **High-throughput analysis of vitamin E by means of UHPSFC-MS and evaluation of matrix effects in plasma and in urine**, SFC 2017, Rockville MD, USA (15.10 – 17.10.2017)
- V. Nováková L., Pilařová V., **Plachká K.** **Development of UHPSFC-MS method for high-throughput analysis of vitamin E isomers and evaluation of matrix effects when using different sample preparation approaches**, 45th International Symposium on High Performance Liquid Phase Separations and related techniques, Praha, ČR (17. 6. – 22. 6. 2017)
- VI. Nováková L., **Plachká K.**, Douša M. **Development of impurity profiling methods for pharmaceuticals using UHPSFC-MS**, SFC 2016, Vídeň, Rakousko (05. – 07. 10. 2016)

- VII. Chrenková L., **Plachká K.**, Mišík J., Pilařová V., Vlčková H., Nováková L. **Development of SPE and UHPLC-MS/MS methods for the determination of quercetin and its 9 metabolites**, Česká Chromatografická škola – HPLC 2015, Rožnov pod Radhoštěm, ČR (3. – 5. 5. 2015)

7.5 Plakátová sdělení

A. Prvoautorské práce

- I. **Plachká K.**, Jakubec P., Švec F., Nováková L. **Effect of different make-up solvent compositions on ionization in supercritical fluid chromatography-mass spectrometry**, SFC 2019, Filadelfie, USA (30.9. – 1.10. 2019)
- II. **Plachká K.**, Jakubec P., Nováková L. **Hyphenation of supercritical fluid chromatography with a single quadrupole mass spectrometry**, SFC 2018, Strasbourg, Francie (17.-19.10. 2018)
- III. **Plachká K.**, Švec, F. Nováková L. **Is supercritical fluid chromatography applicable in pharmaceutical quality control?** 32nd International Symposium on Chromatography (ISC 2018), Cannes-Mandelieu, Francie (23.9. – 27.9. 2018)
- IV. **Plachká K.**, Nováková L. **Aging of columns for supercritical fluid chromatography packed with eight different stationary phases**, SFC 2017, Rockville MD, USA (15.10 – 17.10.2017)
- V. **Plachká K.**, Svoboda P., Zelená L., Sklenářová H., Nováková L. **Determination of lovastatin in food samples using UHPLC-MS/MS method and automated molecularly imprinted solid phase extraction**, 23rd International Symposium on Separation Sciences (ISSS 2017), Vídeň, Rakousko (19.9. – 22.9. 2017)
- VI. **Plachká K.**, Zelená L., Svoboda P., Sklenářová H., Nováková L. **Determination of lovastatin using UHPLC-MS/MS method and automated SPE procedure with laboratory-made molecularly imprinted polymer sorbent**, 45th International

Symposium on High Performance Liquid Phase Separations and related techniques,
Praha, ČR (17. 6. – 22. 6. 2017)

B. Spoluautorské práce

- I. Jakubec P., **Plachká K.**, Nováková L. **Chrial.cloud – a tool enabling the comparison of chiral columns enantioselectivity and chiral separations library exchange**, SFC 2019, Filadelfie, USA (30.9. – 1.10. 2019)
- II. Nováková L., **Plachká K.**, Jakubec P., Pilařová V. **Supercritical fluid chromatography in pharmaceutical analysis and dietary supplements control**, 32nd International Symposium on Chromatography (ISC 2018), Cannes-Mandelieu, Francie (23.9. – 27.9. 2018)
- III. Zelená L., Svoboda P., **Plachká K.**, Nováková L., Sklenářová H. **MISPE procedure for lovastatin determination – comparison of on-line and off-line approaches**, 19th International Symposium on Advances in Extraction Technologies, Santiago de Compostela, Španělsko (27. 6. – 30. 6. 2017)
- IV. Pilařová V., **Plachká K.**, Chrenková L., Novák O., Nováková L. **Conventional and modern extraction approaches to the determination of quercetin and its metabolites in rat plasma**, 45th International Symposium on High Performance Liquid Phase Separations and related techniques, Praha, ČR (17. 6. – 22. 6. 2017)
- V. Chrenková L., Pilařová V., **Plachká K.**, Novák O., Nováková L. **Challenges in development of extraction and chromatographic methods for the determination of quercetin and its metabolites**. Česká chromatografická škola – HPLC 2017, Rožnov pod Radhoštěm, ČR (12.3. - 15. 3. 2017)
- VI. Nováková L., **Plachká K.**, Chrenková L., Douša M. **Development of UHPSFC and UHPLC methods for the determination of agomelatine and its impurities in tablets**, SFC 2015, Philadelphia, USA (22. – 23. 7. 2015)

8. Účast na projektech, zahraniční stáže

STARSS project, reg. no. CZ.02.1.01/0.0/0.015_003/0000465

Člen výzkumného týmu – Specialista na kapilární elektroforézu a superkritickou fluidní chromatografii

GA UK 1828218/2018

Studie zabývající se spojením superkritické fluidní chromatografie a hmotnostní spektrometrie (hlavní řešitel)

GA UK 274216/2016

Syntéza molekulárně vtištěných polymerů pro selektivní SPE extrakci lovastatinu ze vzorků potravy a snížení vlivu matricových efektů na LC-MS analýzu (spoluřešitel, hlavní řešitel)

GA UK 1574517/2017

Vývoj metod pro chirální separace za využití superkritické fluidní chromatografie (spoluřešitel)

GA UK 1948214/2014

SFC-MS metoda pro analýzu biologického materiálu s důrazem na matricové efekty (spoluřešitel)

03-05/2018 Výzkumná stáž (Francie), projekt Erasmus+

Université de Toulouse, Centre national de la recherche scientifique, Laboratoire des Interactions Moléculaires et Réactivités Chimiques et Photochimiques

Školitel: Dr. Jean-Christophe Garrigues

Práce: Vývoj metody přípravy vzorků pro stanovení tokoferolů a tokotrienolů v moči a plazmě za využití systému ActiVials

09-12/2019 Výzkumná stáž (Švýcarsko), projekt STARSS

Université de Genève, Centre Médical Universitaire, Section des sciences pharmaceutiques

Školitel: Dr. Davy Guillarme

Práce: Iontová mobilita v dopingové analýze

9. Přílohy

Seznam publikačních příloh

Příloha č.1: Development, validation and comparison of UHPSFC and UHPLC methods for the determination of agomelatine and its impurities

Příloha č.2: Ultra-high performance supercritical fluid chromatography in impurity control: Searching for generic screening approach

Příloha č. 3: Ultra-high performance supercritical fluid chromatography in impurity control II: Method validation

Příloha č. 4: First inter-laboratory study of a supercritical fluid chromatography method for the determination of pharmaceutical impurities

Příloha č. 5: The benefits of ultra-high-performance supercritical fluid chromatography in determination of lipophilic vitamins in dietary supplements

Příloha č. 6: Effect of column history in supercritical fluid chromatography after one-year use – practical implications

Příloha č. 7: Recent developments in supercritical fluid chromatography – mass spectrometry: Is it a viable option for analysis of complex samples?

Příloha č. 8: Supercritical Fluid Chromatography, Volume 2, Kapitola 2: Supercritical fluid chromatography in bioanalysis

Příloha č. 9: Handbook of Advanced Chromatography /Mass Spectrometry Techniques, Kapitola 12: Ultra-high performance supercritical fluid chromatography-mass spectrometry

Příloha č. 10: Supercritical Fluid Chromatography, Kapitola 16: Pharmaceutical Applications

Příloha č. 11: Simultaneous determination of quercetin and its metabolites in rat plasma by using ultra-high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry

Příloha č. 12: Development of matrix effect-free MISPE-UHPLC-MS/MS method for determination of lovastatin in Pu-erh tea, oyster mushroom, and red yeast rice