

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ
KATEDRA FARMACEUTICKÉ CHEMIE A KONTROLY LÉČIV



RIGORÓZNÍ PRÁCE

Využití alternativních stacionárních fází v HPLC analýze léčiv

V Hradci Králové 2009

Vedoucí rigorózní práce

Mgr. Petra Holásková

PharmDr. Radim Kučera, Ph. D.

„Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány.“

Petra Holásková

Ráda bych poděkovala PharmDr. Radimovi Kučerovi, Ph. D. za cenné rady, připomínky a odborné vedení při vypracování rigorózní práce. Další moje poděkování patří PharmDr. Václavovi Žižkovskému, Ph. D. za pomoc při získávání experimentálních dat. V neposlední řadě děkuji všem pracovníkům katedry za ochotu a pomoc.

OBSAH

1	ÚVOD.....	7
2	CÍL PRÁCE.....	10
3	TEORETICKÁ ČÁST	12
3.1	Vysokoučinná kapalinová chromatografie (HPLC).....	13
3.1.1	Součásti kapalinového chromatografu	14
3.2	Validace	21
3.2.1	Test způsobilosti systému.....	21
3.2.2	Validační parametry	21
3.3	Doxazosin a jeho nečistoty	23
4	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	27
4.1	CHEMIKÁLIE A PŘÍSTROJE	28
4.1.1	CHEMIKÁLIE.....	28
4.1.2	PŘÍSTROJE	28
4.1.3	Další pomůcky	29
4.2	PŘÍPRAVA ROZTOKŮ A MOBILNÍCH FÁZÍ	29
4.2.1	Příprava zásobních roztoků.....	29
4.2.2	Příprava roztoků pro optimalizaci.....	29
4.2.3	Příprava roztoku doxazosinu pro linearitu.....	29
4.2.4	Příprava roztoku nečistot pro linearitu	30
4.2.5	Příprava roztoků pro opakovatelnost a přesnost.....	30
4.2.6	Příprava pufrů	30
4.2.7	Příprava mobilních fází	31
5	VÝSLEDKY A DISKUZE	32
5.1	HLEDÁNÍ VHODNÉ STACIONÁRNÍ A MOBILNÍ FÁZE.....	33
5.1.1	Zirkoniová kolona modifikována polybutadienem (Zr-PBD)	33
5.1.2	Zirkoniová kolona modifikovaná polystyrenem (Zr-PS).....	36
5.1.3	Zirkoniová kolona modifikovaná uhlíkem C18 (Zr-C).....	40
5.1.4	Gradientová eluce s využitím zirkoniové kolony modifikované polystyrenem .41	
5.2	VALIDACE	47
5.2.1	Linearita.....	47
5.2.2	Opakovatelnost nastříknutí a přesnost metody	51
6	ZÁVĚR.....	57

7	ABSTRAKT	59
8	ABSTRACT	61
9	POUŽITÁ LITERATURA.....	63

1 ÚVOD

Počátky kapalinové chromatografie byly objeveny roku 1903 ruským botanikem, fyziologem a biochemikem M. S. Cvěttem, který jako první rozdělil na sloupci sorbentu listová barviva¹. Jeho práce položily principiální základ všem chromatografickým technikám, které se později začaly vytvářet. Tato původní sloupcová chromatografie sice umožňovala rozdělit i složité přírodní směsi, měla však řadu nedostatků, pro které byla v zápětí téměř zapomenuta.

Teprve počátkem čtyřicátých let minulého století, po objevení rozdělovací chromatografie, se kolonová kapalinová chromatografie začala vyvíjet ve své klasické podobě. Díky objevení nových stacionárních fází a konstrukci nových aparatur, zejména vysokotlakých čerpadel a detektorů, se od roku 1965 stává jednou z nejrozšířenějších separačních a analytických metod.

Mezi současnými chromatografickými způsoby zaujímají metody kolonové chromatografie stále první místo. Jejich význam neustále roste, a to zejména proto, že umožňují analyzovat prakticky veškeré látky obsažené v množstvích od desítek procent do stotisečtin procenta a to v rozpětí molekulových hmotností od stovky do několika desítek či stovek tisíc². Jedná se především o chromatografii plynovou (v mezifázi plyn – kapalina) a kapalinovou (v mezifázi kapalina – tuhá látka), u nichž jsou dostatečně vyvinuty adsorbenty s vysoce homogenním povrchem, dále přístrojové techniky, zejména vysoce citlivé detektory a kapalinové chromatografy s vysokým tlakem na vstupu do kolony pro metodu HPLC^{3,4}.

Vysokoúčinná kapalinová chromatografie je rozšířená separační technika, která zaujímá vedoucí postavení v běžných farmaceutických analýzách⁵. Jde o metodu plně automatizovanou a dobře reprodukovatelnou, kterou lze využít jak pro kvalitativní, tak kvantitativní analýzu. Ve srovnání s metodami bioanalytickými, které jsou také rozsáhle automatizované, rychlé a citlivé, má HPLC separace vyšší specifickou a umožňuje současně stanovit jak analyzovanou látku, tak i její metabolity, popřípadě nečistoty. Velmi často se HPLC využívá nejen pro analýzu syntetických léčiv, ale též pro sloučeniny izolované z přírodních materiálů⁶.

Srdcem chromatografického systému je bezesporu chromatografická kolona. Nejčastěji používaným nosičem pro přípravu HPLC kolon je stále silikagel, který se však v alkalických roztocích pozvolna rozpouští, což limituje volbu pH mobilních fází. Snaha o rozšíření pracovního rozmezí pH vedla k vývoji nových materiálů pro HPLC se zlepšenými vlastnostmi. Relativně nedávno byly připraveny alternativní HPLC kolony na bázi oxidů kovů: oxidu hlinitého, titaničitého a především zirkoničitého. Materiály na bázi ZrO₂ vykazují mnoho unikátních vlastností. Mají vynikající stabilitu při pH až do 14 a vysokou tlakovou a tepelnou odolnost, takže je lze využít i pro rychlé separace při vysokých teplotách

(do 200°C)^{7,8}. Nevýhodou ZrO₂ oproti silanolovým skupinám je fakt, že se chová jako silná Lewisova kyselina, což způsobuje úplnou a pevnou adsorpci silných Lewisových bází (např. R-SO₃⁻, R-PO₃⁻, R-COO⁻). Vzniklé donor-akceptorové interakce jsou příčinou zvláště pomalé kinetiky desorbce, což se projeví širokými a chvostujícími píky. Proto se do mobilní fáze záměrně přidává dostatečné množství Lewisovy báze (PO₄³⁻, F⁻, karboxyláty), která dynamicky brání adsorpci eluentu a zlepšuje tvar píku analytu^{5,8,9,10}.

Zirkoniové stacionární fáze byly použity pro separaci mnoha chemických sloučenin různých struktur, s různými fyzikálně-chemickými vlastnostmi. Příkladem mohou být nepolární aromatické polohové isomery, triaziny, steroidy¹¹, antidepressiva¹², beta-blokátory, lokální anestetika, p-alkylbenzylaminy^{7,9}, testosteron a podobné sloučeniny¹³. Z chemického hlediska se jedná o sloučeniny bazického nebo neutrálního charakteru. Separace vzorků obsahujících třeba i v malém množství silné Lewisovy báze, např. anionty kyselých sloučenin, nukleotidů, peptidů nebo proteinů je značně problematické vzhledem k přítomnosti již zmiňovaného ZrO₂ povrchu, který se chová jako silná Lewisova kyselina. Přestože jsou využívány různé polymery k pokrytí těchto kyselých míst na povrchu ZrO₂, nejsou vždy blokována zcela dostatečně. Z toho důvodu je potřebná přítomnost soli k potlačení silných coulombických interakcí a k blokaci vzniku nechtěných Lewisových donor-akceptorových vazeb^{14,15,16,17,18,19}.

Doxazosin mesilát – chemickým názvem 1-(4-amino-6,7-dimethoxychinazolin-2-yl)-4-[(2RS)-2,3-dihydro-1,4-benzodioxin-2-ylkarbonyl]piperazin methansulfonát je derivát prazosinu ze skupiny léčiv α_1 -blokátorů. Ovlivňuje dynamickou složku benigní hyperplazie prostaty tím, že snižuje tonus svalstva kapsuly a tonus svalové tkáně celé prostaty. Nepříjemným nežádoucím účinkem je někdy i velmi výrazná hypotenze, která je dána jejich vazodilatačním účinkem²⁰. Lze ho tedy indikovat i pro léčbu hypertenze, a to v monoterapii nebo v kombinaci s jinými antihypertenzivy.

Počáteční dávka doxazosinu je 1 mg denně. Podle klinické odpovědi by měla být dávka postupně zvyšována v 1 - až 2 – týdenních intervalech na 2 mg, 4 mg až 8 mg jedenkrát denně. Obvyklá denní dávka je 2 – 8 mg doxazosinu. Maximální denní dávka u benigní hyperplazie prostaty je 8 mg, u hypertenze pak 16 mg.

2 CÍL PRÁCE

Cílem rigorózní práce je navrhnout vhodné chromatografické podmínky pro kvalitativní a kvantitativní analýzu doxazosinu a jeho pěti nečistot s využitím HPLC se spektrofotometrickým detektorem. Pozornost bude soustředěna především na:

- typ stacionární fáze - vyzkoušeny budou zirkoniové kolony s povrchovou vrstvou uhlíkovou, polybutadienovou a polystyrenovou
- optimální složení mobilní fáze – typ a koncentrace organické a anorganické složky, vliv změny hodnoty pH
- vliv teploty kolony na separaci
- validaci výsledných chromatografických podmínek.

3 TEORETICKÁ ČÁST

3.1 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC)

Chromatografické metody jsou vysokoúčinné separační metody sloužící k oddělení analyzovaných složek ze směsi a zároveň k jejich kvalitativní a kvantitativní analýze. Vynikají nejen při analýzách jednodušších, ale i složitějších směsí látek, kde se jiné analytické metody, hlavně spektrofotometrické, nedají principiálně použít. Vzhledem k tomu, že většina přírodních i jiných látek (např. lékové formy – léčiva, rozkladné produkty, pomocné látky, zbytky rozpouštědel) má charakter směsi, mají chromatografické metody v analýze léčiv prvořadý význam.

Mezi metodami kapalinové chromatografie zaujímá významné místo technika HPLC. Zkratka je odvozena od dvou přípustných názvů této techniky a to „high performance liquid chromatography“ (vysokoúčinná kapalinová chromatografie) nebo „high pressure liquid chromatography“ (vysokotlaká kapalinová chromatografie). Mobilní fází je v tomto případě kapalina. Stacionární fází je film příslušné látky zakotvený na povrchu nosiče nebo pevný adsorbent. Přístroj, na kterém se provádí HPLC analýzy se nazývá kapalinový chromatograf²¹.

V moderní kolonové chromatografii prochází mobilní fáze kolonou předem volitelnou rychlostí a pod příslušným tlakem, který odpovídá jak zvolené rychlosti, tak vlastnostem sorbentu. Současný vývoj směřuje k získání vysoké účinnosti a potřebného rozlišení při co nejkratším čase analýzy. Pracuje se stále s vyššími tlaky, vyšší rychlostí a snižujícími se elučními časy chromatografovaných látek. Aby bylo dosaženo zvolené rychlosti průtoku, jsou však potřebné vyšší tlaky na vstupu do kolony²².

Další možností směřující ke zrychlení analýzy a dosažení lepší separace je využití gradientové eluce, která spočívá v kontinuální nebo diskontinuální změně složení mobilní fáze s časem. Jedná se o velmi využívanou techniku analýzy, zejména v oblasti komplikovanějších směsí látek s širokým rozsahem retenčních konstant. Při tvorbě gradientu se mění s časem eluční síla mobilní fáze, změna polarity, změna pH, či změna v koncentraci např. komplexotvorných činidel, konečně i změna iontové síly elučního činidla apod. To vše klade značné nároky na aparaturní zařízení tvorby gradientu a mnohdy se podřizuje i koncepční řešení celého přístroje².

Izokratické eluce, tedy dělení směsi látek jedinou mobilní fází, jejíž složení se během chromatografie nemění, se využívá tehdy, pokud se pKa a lipofilita separovaných látek příliš neliší.

Při nástřiku dvojice látek do chromatografické kolony se nejprve vytvoří eluční pás obsahující směs obou látek. Chromatografované látky jsou tokem mobilní fáze unášeny

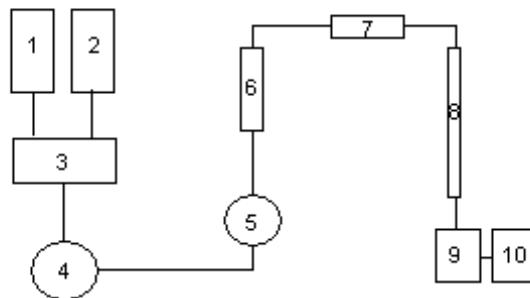
kolonou, přičemž interagují se stacionární fází a opět přechází do mobilní fáze, s níž mohou také interagovat. Liší-li se dostatečně separační funkce těchto dělených látek (distribuční konstanty, adsorpční isothermy apod.), dojde po určité době k jejich rozdělení. Po výstupu první látky z kolony indikuje detektor její přítomnost v eluátu a zaznamená eluční pík². Po vyjití obou rozdělených látek jsou na chromatogramu patrné dva eluční píky.

Chromatogram je tedy tvořen soustavou píků, které mají různou plochu a výšku, mají od sebe různou vzdálenost a v ideálním případě jsou symetrické a mají tvar Gaussovy křivky. Identifikační charakteristikou látky je za přesně stanovených chromatografických podmínek její retenční čas. Pro kvantitativní stanovení látky potom slouží výška píku nebo častěji plocha pod píkem²¹. Kvantitativní analýzu lze provést několika způsoby. Mezi nejpoužívanější patří metoda vnitřního standardu, kdy se ke zkoušenému a porovnávacímu roztoku přidají stejná množství látky, kterou lze odlišit od zkoušené látky a která s ní nereaguje (vnitřní standard). Koncentrace zkoušené látky se stanoví porovnáním poměru ploch píků nebo výšek píků stanovované látky a vnitřního standardu pro zkoušený roztok a odpovídajícího poměru pro porovnávací roztok²³. Dalším možným způsobem kvantifikace je využití metody vnějšího standardu. Koncentrace stanovované složky se určí porovnáním odezvy píku složky naměřené pro zkoušený roztok a odpovídající odezvy pro porovnávací roztok²³. Obecně přesnější je použití standardu vnitřního, protože tak probíhá analýza sledované látky i standardu za stejných podmínek.

Kvantifikace může být prováděna i pomocí dvou dalších lékopisných metod, a to metodou normalizace nebo kalibrace. Při normalizaci se obsah jedné či více složek zkoušené látky v procentech vypočítá z plochy nebo ploch jako procento celkové plochy všech píků, s výjimkou píků rozpouštědel nebo přidaných reakčních činidel a píků, které jsou v limitu zanedbatelnosti píků. Při kalibraci se stanoví vztah mezi měřeným nebo vyhodnocovaným signálem a množstvím stanovované látky a vypočítá se kalibrační funkce. Výsledky analýzy se vypočítají ze změřeného nebo vyhodnoceného signálu stanovované látky pomocí inverzní funkce²³.

3.1.1 Součásti kapalinového chromatografu

Kapalinový chromatograf se skládá z částí, které zabezpečují transport mobilní fáze, separaci látek a jejich detekci. Blokové schéma kapalinového chromatografu, které může mít řadu obměn je na obr. č. 1, v zásadě však musí být zachováno zařazení jednotlivých elementů za sebou, i když je možno mnohé při speciálních procesech buď vynechat nebo doplnit.



Obr. č. 1. Blokové schéma kapalinového chromatografu

Kapalinový chromatograf tvoří tyto hlavní části:

1,2 – zásobníky mobilní fáze

3 – směšovač

4 – odplyňovač

5 – vysokotlaké čerpadlo

6 – dávkovací ventil

7– předkolona

8 – kolona

9 – detektor

10 – řídicí jednotka – počítač s chromatografickým softwarem

3.1.1.1 ZÁSObNÍKY MOBILNÍ FÁZE

Jako zásobníky mobilní fáze se obvykle používají skleněné uzavíratelné nádoby. Měli by být umístěné tak, aby byly dobře chráněny před světlem, otevřeným ohněm a prachem ve vzduchu.

Mobilní fáze musí být velmi čisté a zbavené rozpuštěných plynů probubláváním heliem nebo působením ultrazvuku. U novějších zařízení probíhá odplyňování přímo v přístroji²⁴.

3.1.1.2 ČERPADLA

Čerpadla vedou mobilní fázi ze zásobníků na kolonu. Důležitá je jejich velká přesnost a dobrá reprodukovatelnost průtoku v celém rozsahu parciálních tlaků. Můžeme je rozdělit na pulzní a bezpulzní, dále na pístové a membránové²⁴. Principiálně se vysokotlaká čerpadla dělí do dvou hlavních skupin, v nichž hlavní rozlišovací prvky jsou konstantní tlak nebo konstantní objemový průtok².

Vysokotlaká bezpulzní pumpa je velmi důležitou součástí HPLC aparatury. Kolony pro HPLC jsou plněny mikročásticemi, které při průchodu mobilní fáze kladou značný odpor. Z toho důvodu musí být mobilní fáze pod vysokým tlakem, až 60 Mpa, aby mohla projít přes kolonu. Dostatečný tlak a konstantní průtok mobilní fáze, v rozmezí 0,1 – 10 ml/min, zajišťuje právě vysokotlaká pumpa.

Čerpadla jsou obecně nejnáročnější součástí chromatografu²⁴.

3.1.1.3 DÁVKOVAČ

Používají se pro dávkování vzorku do proudu mobilní fáze. Vzorek se nejprve dokonale rozpustí ve vhodném rozpouštědle, nejlépe v mobilní fázi. U starších přístrojů jsme se mohli setkat s tzv. „stop flow“ dávkovači. Z moderních aparatur ale už úplně vymizely. V dnešní době se uplatňují dávkovače s šesticestnými ventily, které lze rozdělit na manuální, a plně automatizované, tzv. autosamplery.

3.1.1.4 KOLONY

Ve vysokoúčinné kapalinové chromatografii má výběr kolony rozhodující význam. O účinnosti kolon rozhoduje nejen kvalita použitého sorbentu, ale i jejich délka, tvar, materiál z něhož jsou zhotoveny, spojovací součásti, jejich vnitřní povrch a další faktory, jako je způsob plnění kolon, velikost mrtvých objemů v systému a podobně.

Analytické kolony pro HPLC jsou rovné ocelové, titanové nebo PEEKové trubice 5-30 cm dlouhé o vnitřním průměru 2–8 mm, které jsou chemicky odolné proti působení mobilní fáze a vysokým tlakům. Náplň kolony musí být naprosto homogenní a rovnoměrná, proto se už dnes používají kolony plněné a testované přímo výrobcem. Velikost zrn sorbentu se nejčastěji pohybuje v rozmezí 1,8-5 μm . S rozměrem kolon souvisí i její celková kapacita.

Se čtvercem průměru kolony roste i množství vzorku, jímž můžeme kolonu zatížit. Délka kolony se odvíjí od velikosti zrn sorbentu. Čím menší je velikost zrn, tím kratší je kolona²⁵.

V chromatografické koloně je základním fyzikálně chemickým procesem, který zabezpečuje vysokou selektivitu dělení, interakce molekul dělených složek s povrchem stacionární fáze. Tato interakce nemá být příliš silná, ale spíše relativně slabá, aby děj byl reverzibilní a zároveň aby molekuly dávkované do kolony nepodléhaly katalytickým a chemickým přeměnám a vycházely z ní za dostatečně krátký čas⁴.

V HPLC se nejčastěji používají tzv. chemicky vázané stacionární fáze zakotvené na silikagelovém nosiči. Přípravují se reakcí silikagelu s chlorsilany nebo alkoxyxilany. Navázané mohou být dlouhé alkylové řetězce hydrofóbního charakteru (C8 -oktyl, C18 -oktadecyl), které vytváří na povrchu nosiče nepolární fázi. Mobilní fáze je pak charakteru polárního, např. voda, methanol, acetonitril a jejich směsi v různých vzájemných poměrech, pufrů a další. Takovéto provedení bývá označováno jako chromatografie na reverzních fázích (reverse phase HPLC - RP HPLC).

Pokud není výrobcem uvedeno jinak, předpokládá se, že kolony na chromatografii s obrácenými fázemi s náplní na bázi silikagelu jsou stabilní v mobilních fázích o zdánlivém pH 2,0 až 8,0²³. Jiné zdroje uvádí, že pro zachování dlouhodobé chemické stability stacionární fáze je pH mobilní fáze limitováno rozsahem 3 - 7²⁶. Pokud klesne pH pod hodnotu 4, dochází ke kyselé hydrolyze vázaných funkčních skupin na povrchu silikagelu a tím následné ztrátě chromatografické retence^{27, 28}. Naopak, pokud je hodnota pH větší než 9, dochází k rozpuštění silikagelu, což vede k rapidní ztrátě výkonnosti kolony^{27, 29}.

Navázané mohou být i kratší C2, C3 řetězce obsahující polární funkční skupinu (-CN,-OH, -NH₂), kde se pak jedná o fázi středně polární.

Existují také polymerní stacionární fáze, které vykazují stabilitu ve velkém rozsahu pH (1 - 14). Jsou však omezeny maximálním pracovním tlakem na koloně a to 20 Mpa. Nežádoucí jev, který může nastat, jsou změny ve velikosti pórů během separace, které jsou způsobeny nabýváním a smršťováním sorbentu. K tomu dochází při gradientové separaci, když se začíná s mobilní fází s velkým obsahem vodné fáze a končí s velkým obsahem organické složky. Tento efekt vede ke slabé separační účinnosti^{30,31}.

Byla snaha vyvinout kolony, které by dosahovaly vyšší odolnosti vůči rozpouštědlům a pufrům v širším rozsahu pH, jako organické stacionární fáze a zároveň měly velikou odolnost vůči tlakům, jako kolony silikagelové. I když jsou takové kolony dostupné, např. kolony obsahující silikagel s vázanými alkyly a pokryté polymerní vrstvou

nebo silikagel s kovalentně vázaným polymerem, jejich používání je omezeno na speciální aplikace^{30,31}.

Odlíšným přístupem je použití částic z oxidu titaničitého, oxidu zirkoničitého nebo oxidu hlinitého, které vykazují vyšší stabilitu vůči hydrolyze než silikagel. V chromatografii jsou používány již řadu let. Oxid zirkoničitý se jeví teplotně i chemicky nejstabilnější. Je absolutně stálý v rozsahu pH od 1 do 14³² a termálně stálý do 200°C. Jeho povrch lze mnoha způsoby modifikovat.

Veškeré pokusy o modifikaci povrchu oxidů kovů můžeme rozdělit do tří skupin:

- DYNAMICKÁ, CHEMICKÁ MODIFIKACE - je uskutečňována přidáváním silných interagujících sloučenin (např. fosfáty, fluoridy, EDTA) do mobilní fáze např. k potlačení aktivních míst na povrchu kovů majících charakter silných Lewisových kyselin^{33, 34, 35}.
- PERMANENTNÍ, KOVALENTNÍ MODIFIKACE - pokusy o vytvoření permanentní kovalentní modifikace povrchu oxidů kovů byly zahájeny navázáním alkylů a to metodou silanizace. Provázela je však řada problémů, jako je nestabilita vazby Si-O-Zr nebo struktura hydroxylů na zirkoniovém povrchu a jejich bazicita^{36,37}. Byly vyzkoušeny i jiné metody, např. pokrytí oxidu hlinitého (Al₂O₃) polystyren - divinylbenzenem, polybutadienem, polyoktadecylsilanem⁵² Vzniklý materiál měl vynikající pH stabilitu, ale poměrně slabou chromatografickou výkonnost. Bylo využito i silných interakcí mezi Al₂O₃ a kyselinou fosforečnou. Vzniklá vazba =Al-O-P-C18 na povrchu byla využita pro separaci proteinů a peptidů^{38,39}. Stejný postup byl použit pro modifikaci povrchu ZrO₂⁴⁰. Takto vzniklé stacionární fáze jsou vhodné pro separaci silných bází. Nevýhodou je jejich nízká stabilita⁴¹. Také reakcí kyseliny maleinové byl syntetizován polymer, který byl ukotven na povrchu Al₂O₃ a následně modifikován kopolymerací s oktadecylem. Pro zesíťování a tím vytvořením vyšší stability byl do polymerizačního procesu přidán divinylbenzen. Výsledná reverzní fáze byla stabilní ve vysokém i nízkém pH^{42,43}.

Jak již bylo uvedeno výše, oxid zirkoničitý má na svém povrchu aktivní místa chovající se jako silné Lewisovy kyseliny. V reakci se silnými Lewisovými bázemi vznikají jedinečné a užitečné stacionární fáze. Jako první byly použity fosfát a fluorid, následně i fosfonátový analog ethylendiamin-N,N'-tetraoctové kyseliny (EDTA)⁴⁴. Silné interakce mezi fosfátem a zirkoničtým povrchem byly využity ke zlepšení chromatografické výkonnosti⁴⁵. Proběhne-li reakce s fosfátem dostatečně, neutralizují se kyselá místa na povrchu oxidu zirkoničitého a vznikne fáze vhodná pro chromatografickou separaci silných Lewisových bází. Tato fáze je stabilní do pH 10⁴⁶.

Fluoridem modifikovaný oxid zirkoničitý je velmi vhodný pro separaci proteinů. Má velkou kapacitu a byl zkoumán především pro čištění bílkovin. Tato fáze ale není použitelná v nízkém pH v důsledku vytváření fluorovodíkové kyseliny, která není vhodná pro kapalinovou chromatografii a navíc může poškodit detektor⁴⁷.

Úspěšnost fosfátových a fluoridových fází vedla k hledání jiných silných Lewisových bází, které by mohli poskytovat odlišnou selektivitu. Tím se ukázal analog EDTA ethylendiamin-N,N'-tetramethylfosforečná kyselina (EDTPA)^{48,49}. Reakcí s ZrO₂ vznikl iontovýměnný materiál schopný separovat silně bazické bílkoviny. Úspěšně byl též použit k dosažení vysoce čistých monoklonálních protilátek ze supernatantu buněčných kultur.

- MODIFIKACE ZAVEDENÍM POLYMERU – první polymerem modifikovaná stacionární fáze vznikla v roce 1960⁵⁰. Vrstva polystyrenu byla zavedena na neporézní sklo a následně zesíťována divinylbenzenem. Z důvodu chemické nestability siliky byly polymery též použity k její ochraně před interakcemi s agresivními eluenty a nevhodnými silanofilními interakcemi, dále ke snížení přístupu k aktivním místům na povrchu oxidů kovů^{51,52}.

Způsob přípravy takto modifikovaných stacionárních fází je dvojího typu. Na povrchu oxidu může být buď iniciována polymerizace přítomných monomerů nebo je přímo ukotven již předsyntetizovaný polymer⁵³. Následné zesíťování pomocí chemicky aktivních skupin je žádoucí pro sníženou rozpustnost polymeru v mobilní fázi a zvýšení jeho stability⁵⁴. Jako polymery k modifikaci povrchu oxidů kovů se využívá polybutadien (PBD), polystyren (PS) nebo vrstvička grafitizovaného uhlíku (C).

Polybutadien byl použit již k modifikaci silikagelu ke zlepšení jeho stability ve vyšším pH k deaktivaci silanofilních interakcí⁵⁵. Vlastnosti takto modifikované stacionární fáze využívané v RPLC byly podmětem k pokusu zavedení PBD na povrch oxidu zirkoničitého. Modifikace pomocí PBD nabízí vyšší pH a termální stabilitu. PBD-ZrO₂ je stabilní v rozsahu pH od 1 do 14^{56,57}. Vykazuje vysokou stabilitu i v zásaditých podmínkách. Nebyla zaznamenána žádná degradace povrchu dokonce ani po vystavení 1M NaOH⁵⁸ nebo 200 °C⁵⁹. PBD modifikovaný oxid zirkoničitý je využíván především jako reverzní stacionární fáze pro chromatografii jednoduchých neelektrolytů.

Polystyren se používá jako alternativa polybutadienu na zirkoniových stacionárních fázích zejména pro analyty, které se neseperují na PBD-ZrO₂⁶⁰. Dále vykazuje vyšší selektivitu pro separaci strukturálních isomerů, které se liší polohou fenylových skupin⁶⁰. Co se týče chromatografické stability, PS-ZrO₂ poskytuje výbornou separační schopnost a symetrické píky v obou extrémních podmínkách, v kyselém prostředí 0,1 M HNO₃ a zásaditém 0,13 M NaOH⁵¹. Studována byla i stabilita PS-ZrO₂ v pH 1 až 13 při vysoké

teplotě (80, 120, 160 °C). Nebyla sledována žádná degradace povrchu kolony ani při dlouhodobém užívání⁶¹.

Uhlíkové adsorbenty pro chromatografii byly velmi široce studovány. Je popsána aplikace uhlíku v kapalinové i plynové chromatografii^{62,63,64}. Většina metod pro ukotvení uhlíku na povrchu je založena na pyrolýze uhlíkatého prekurzoru při teplotě 700 - 1000 K. Z oxidů kovů může být pro účely HPLC uhlíkem modifikován pouze oxid zirkoničitý. Je ideálním materiálem pro ukotvení pyrogenního uhlíku. Může být zahřátý až na teplotu 700 °C, aniž by se změnila jeho struktura pórů⁶⁵. Proces modifikace totiž probíhá při vysoké teplotě, kdy organická pára prochází skrze póry částic oxidu zirkoničitého za sníženého tlaku⁶⁶. Tak dojde k pokrytí až 97% zirkoniového povrchu uhlíkem⁶⁶. Jako zdroj uhlíku mohou být použity různé organické sloučeniny, nejlepší výsledky, jako je tvar píku nebo výkonnost kolony, byly dosaženy při použití alkanů⁶⁵.

3.1.1.5 DETEKTORY

V metodě HPLC je dostupná řada různých detektorů, které se liší principem funkce, konstrukcí, selektivitou, citlivostí a lineárním dynamickým rozsahem. Jsou na ně kladeny mimořádné požadavky, jako je vysoká citlivost, reprodukovatelnost a linearita odezvy, nezávislost odezvy na změně složení mobilní fáze při gradientové eluci a univerzálnost²⁵. Metoda HPLC využívá tyto typy detektorů: spektrofotometrický detektor (UV-VIS), fluorescenční detektor, hmotnostní spektrometr, refraktometrický detektor, elektrochemický a další. Volba detektoru opět závisí na konkrétní aplikaci⁶. V rigorózní práci byl použit detektor spektrofotometrický.

Spektrofotometrický detektor je nejčastěji používán při HPLC analýze léčiv. Proměňuje absorbanci elektromagnetického záření určité vlnové délky složkami eluátu protékajícího celou detektorem²⁴. Jako zdroj elektromagnetického záření se v oblasti UV spektra (190 – 400 nm) používá deuteriová lampa, v oblasti viditelné (400 – 800 nm) lampa wolfram-halogen⁶⁷. Z uvedeného vyplývá selektivita detektoru. Zaznamenává pouze látky schopné absorbce v uvedených oblastech spektra. V praxi se uplatňují především UV detektory, eventuelně UV-VIS detektory²⁵.

Minimální detekovatelné množství UV detektoru je 10^{-10} g/ml. V dnešní době jsou využívány detektory s proměnnou vlnovou délkou, u nichž máme možnost libovolného nastavení vlnové délky, dále scanning UV detektory, které snímají během několika sekund absorpční spektrum v maximu píku hodnoceného léčiva²⁵.

Nejvíce informací lze získat spektrofotometrem s diodovým polem (diode array) řízeným počítačem a snímajícím celé absorpční spektrum eluátu²⁴. Dovoluje současný sběr chromatogramů při různých vlnových délkách během jednoho nástřiku⁶⁷. Výsledkem je trojrozměrný chromatogram jako závislost absorbance na vlnové délce a na čase, ze kterého lze rychle identifikovat eluované látky a posoudit jejich čistotu²⁴.

3.2 Validace

Validace analytické metody je soubor validačních parametrů, kterými se zjišťují hlavní charakteristiky dané metody. Cílem je ověřit účinnost metody a experimentálně doložit spolehlivost a reprodukovatelnost analytických výsledků.

3.2.1 Test způsobilosti systému

Test způsobilosti systému představuje nedílnou součást metody a slouží k zajištění přiměřené účinnosti chromatografického systému. Pro hodnocení účinnosti kolony se používají následující parametry: zdánlivá účinnost, kapacitní faktor, rozlišení, relativní retence a faktor symetrie. Faktory, které mohou ovlivnit chromatografické chování, zahrnují složení mobilní fáze, její iontovou sílu, teplotu a zdánlivé pH, průtokovou rychlost, délku kolony, teplotu a tlak, charakteristiku stacionární fáze, včetně porozity, velikosti a typu částic, specifického povrchu a u nosičů používaných v chromatografii s obrácenými fázemi rozsah chemické modifikace (odstranění povrchových silanolových skupin, obsah vázaného uhlíku atd.)²³.

3.2.2 Validací parametry

3.2.2.1 LINEARITA

Linearita vyjadřuje rozmezí koncentrací, v němž je koncentrace analytu lineární k odezvě detektoru. Vyjadřuje se graficky nebo matematicky, kdy se využívají výsledky lineární regrese analýzy. Mírou linearit je korelační faktor kalibrační křivky, který by měl být blízký jedné. Analyzuje se minimálně pět koncentrací standardní látky a to v rozsahu 80 – 120% deklarovaného obsahu. Při stanovování nečistot se linearita nejčastěji vyjadřuje od limitu kvantifikace po 120% maximálně povoleného množství.

3.2.2.2 PŘESNOST

Stanovení vyjadřuje shodu výsledků zjištěných při sérii šesti analýz téhož vzorku. Vyjadřuje se relativní směrodatnou odchylkou. Podle podmínek opakování rozlišujeme *opakovatelnost* a *reprodukovatelnost*. Opakovatelnost ověřuje spolehlivost měření nízkých i vysokých koncentrací látky z kalibrační křivky v téže laboratoři, na témže přístroji jedním analytikem. Naopak v druhém případě se metoda provádí v laboratoři jiné a za stejných podmínek. Většinou se tak děje i v delším časovém období. Tzv. mezidenní přesnost je ověření spolehlivosti měření v téže laboratoři ve dvou různých dnech.

3.2.2.3 LIMIT DETEKCE A KVANTIFIKACE

Detekční limit vyjadřuje nejmenší množství látky, které je ještě za daných podmínek detekovatelné oproti šumu základní linie. Kvantitativní limit je analogicky nejnižší koncentrace látky, která může být ještě kvantifikována za daných podmínek s akceptovatelnou správností a přesností. Oba limity se určují výpočtem z velikosti šumu základní linie na blankovém chromatogramu v místech, kde by byl očekáván pík analytu. Dle ČL 2009 je limit detekce trojnásobkem maximální odchylky odezvy šumu, limit kvantifikace pak desetinásobkem. Vypočtená hodnota obou parametrů se ověřuje analýzou vzorku v příslušné koncentraci.

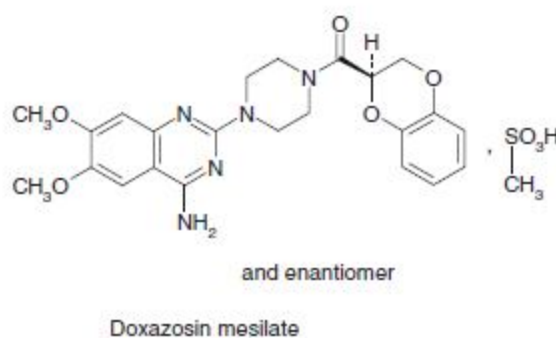
3.2.2.4 ROBUSTNOST

Robustnost je míra vlivu kolísání jednotlivých parametrů analýzy na výsledek analytického hodnocení. Zjišťuje se schopnost poskytovat správné a přesné výsledky i při nechtěných změnách pracovních podmínek jako je vliv pracovního postupu (možná proměnlivost hodnoty pH, změna složení mobilní fáze, vliv průtoku mobilní fáze, atd.) nebo míra vlivu odlišného chromatografického systému, tzn. účinnost dané metody při užití jiným pracovníkem na jiném přístroji, za použití kolony jiného výrobce atd. Výsledkem testování robustnosti by mělo být tolerované rozmezí hodnot předepsané pro každý parametr metody.

3.2.2.5 SELEKTIVITA

Selektivita je schopnost správného a přesného určení hodnocené látky v přítomnosti jiných složek. Může se jednat o rezidua endogenních látek biologické matrice, nečistoty nebo rozkladné produkty, zbytky rozpouštědel atd. Dokazuje se experimentálně a to porovnáním chromatografického záznamu čistého vzorku a vzorku s případnými nečistotami nebo jinými složkami.

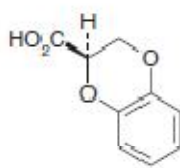
3.3 Doxazosin a jeho nečistoty



Obr. č. 2: Strukturní vzorec doxazosinu mesilátu

Doxazosin, lékopisným názvem doxazosin mesylát, je bílý nebo téměř bílý krystalický prášek, který je nerozpustný ve vodě, ale snadno rozpustný v dimethylsulfoxidu, mírně pak v methanolu. Vykazuje polymorfismus a taje při 276 °C²³.

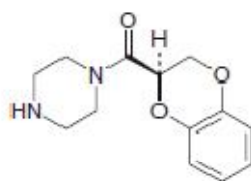
Evropský i Americký lékopis uvádí osm příbuzných sloučenin, které se mohou vyskytovat ve vzorku doxazosinu jako nečistoty. Dle Evropského lékopisu jsou označovány písmeny A, B, C, D, E, F, G až H⁶⁸, dle Amerického písmeny A, B, C, D, E, F a terazosinu příbuzné sloučeniny A a C⁶⁹. Oba lékopisy se liší v limitech povoleného množství. Evropský lékopis dovoluje 0,1% nespecifických nečistot, přičemž celkové množství všech nečistot nesmí převyšovat 0,3%. Americký lékopis uvádí, že přítomnost terazosinu příbuzné sloučeniny A nesmí být vyšší než 0,3%, ostatní identifikované nečistoty nesmí překročit 0,25%, nespecifikované nečistoty pak 0,1%. Celkové množství všech nečistot nesmí být vyšší než 1%. V práci je použito označení námi analyzovaných nečistot dle lékopisu evropského (Obr. č. 3 – 7).



and enantiomer

(2*RS*)-2,3-dihydro-1,4-benzodioxine-2-carboxylic acid

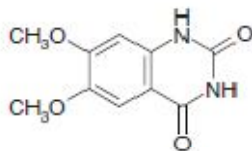
Obr. č. 3: Strukturí vzorec nečistoty A



and enantiomer

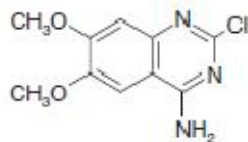
1-[(2*RS*)-2,3-dihydro-1,4-benzodioxin-2-ylcarbonyl]piperazine

Obr. č. 4: Strukturí vzorec nečistoty B



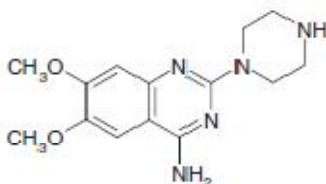
6,7-dimethoxyquinazoline-2,4(1*H*,3*H*)-dione

Obr. č. 5: Strukturí vzorec nečistoty D



2-chloro-6,7-dimethoxyquinazolin-4-amine

Obr. č. 6: Strukturální vzorec nečistoty F



6,7-dimethoxy-2-(piperazin-1-yl)quinazolin-4-amine

Obr. č. 7: Strukturální vzorec nečistoty G

V literatuře můžeme nalézt různé chromatografické metody používané pro analýzu doxazosinu. Již na konci minulého století byla popsána analýza doxazosinu extrahovaného z lidského séra. Analýza probíhala pomocí kapalinové chromatografie za využití stacionární fáze C18 a fluorescenční detekce^{70,71,72,73}. V jiné studii byl doxazosin analyzován taktéž za pomoci fluorescenční detekce, jako sorbent v koloně byl ale použit polární oxid hlinitý⁷⁴.

V letech 1997-98 byl doxazosin stanoven z tablet pomocí diferenční pulzní polarografie^{75,76}, také pomocí voltametrických technik^{77,78,79}. O čtyři roky později byl doxazosin analyzován s využitím moderní vysokoúčinné tenkovrstvé chromatografie po extrakci z tablet⁸⁰. V témže roce byl stanoven i průtokovou analýzou se spektrofotometrickou detekcí⁸¹. V roce 2006 byl doxazosin analyzován na monolitické iontovýměnné koloně s využitím UV detekce⁸². Hmotnostní spektrometr byl použit při analýze doxazosinu přímo ze surové plasmy bez předchozí extrakce^{83,84}.

V Evropském lékopise je monografie týkající se doxazosin mesilátu zavedena od roku 2006. Stacionární fáze je tvořena silikagelem, který je hydrofobizován navázanými oktýlovými řetězci. Kolona je temperována na 30°C a rychlost průtoku kolonou je 0,8 ml/min. Celková doba analýzy trvá asi 50 minut a je vyhodnocována, stejně jako zkouška na příbuzné látky, UV detekcí⁶⁹. Obdobné chromatografické parametry obsahuje monografie doxazosin

mesilátu uvedená v lékopise americkém⁶⁹. Hlavní rozdíl nalezneme ve složení mobilní fáze a celkové době analýzy, která dosahuje 40-ti minut.

4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 CHEMIKÁLIE A PŘÍSTROJE

4.1.1 CHEMIKÁLIE

Acetonitril – Merck, KgaA, Německo

Amoniak – Fluka Chemie GmbH, Německo

Deionisovaná voda – čištěná pomocí Milli-Q systému, Millipore (Bedford, MA, USA)

Dihydrogenfosforečnan amonný – Lach-Ner a.s., ČR

Doxazosin mesilát – Zentiva, ČR

Fluorid amonný – Lachema a.s., ČR

Hydrogenfosforečnan amonný – Lachema a.s., ČR

Kyselina fosforečná – Lachema a.s., ČR

(2RS)-2,3-dihydro-1,4-benzodioxin-2-karboxylová kyselina (nečistota A) – Zentiva, ČR

1-[(2RS)-2,3-dihydro-1,4-benzodioxin-2-ylkarbonyl]piperazin (nečistota B) – Zentiva, ČR

6,7-dimethoxychinazolin-2,4(1H,3H)-dion (nečistota D) – Zentiva, ČR

2-chloro-6,7-dimethoxychinazolin-4-amin (nečistota F) – Zentiva, ČR

6,7-dimethoxy-2-(piperazin-1-yl)chinazolin-4-amin (nečistota G) – Zentiva, ČR

Octan amonný – Lachema a.s., ČR

Tetrahydrofuran - Merck, KgaA, Německo

4.1.2 PŘÍSTROJE

Použité přístroje byly součástí sestavy HPLC firmy Shimadzu: System kontroler CMB 20A, DAD detektor SPD-M20A, pumpa LC-20AD, autoinjektor SIL-20AC, kolonový prostor CTO-20AC, on-line degasser DGU-20A₃, PC s chromatografickým softwarem LC solution, ver. 1.21 SP1. K proměření UV spekter byl použit UV-spektrometr Shimadzu UV2401PC. V experimentální práci byly použity následující analytické kolony: Discovery®Zr-CarbonC18, 150 x 4.6 mm I.D., velikost částic 3 μm, Discovery®Zr-PS, 150 x 4.6 mm I.D., velikost částic 5 μm, Sigma – Aldrich (Schnelldorf, Germany). Zirchrom-PBD, 150 x 4.6 mm I.D., velikost částic 5 μm, ZirChrom Separation (Anoka, USA).

Dále byly používány digitální váhy A&D HR – 120, Helago s.r.o. (ČR), laboratorní magnetická míchačka MM2A, Laboratorní přístroje Praha (ČR), pH metr Acidimetr 333, Duoapta Praha (ČR).

4.1.3 Další pomůcky

kádinky, odměrné baňky, odměrné válce, Erlenmayerovy baňky, odsávací baňky, dělené pipety, nedělené pipety, balonek k pipetě, automatické pipety, zkumavky, frita, stříčka, laboratorní lžičky, nálevky

4.2 PŘÍPRAVA ROZTOKŮ A MOBILNÍCH FÁZÍ

4.2.1 Příprava zásobních roztoků

Zásobní roztoky doxazosinu a jeho nečistot byly připraveny o koncentraci 1 mg/ml. 1,078 mg doxazosinu bylo rozpuštěno v 1 ml 30% tetrahydrofuranu. 1,133 mg nečistoty A bylo rozpuštěno v 1 ml vody, 1,049 mg nečistoty B taktéž v 1 ml vody. 0,938 mg nečistoty D bylo rozpuštěno v 1 ml acetonitrilu. 1,083 mg nečistoty F také v 1 ml acetonitrilu a 1,166 mg nečistoty G v 1 ml vody.

4.2.2 Příprava roztoků pro optimalizaci

Ze zásobních roztoků doxazosinu a jeho nečistot o koncentraci 1 mg/ml bylo vždy z každého pipetováno 20 μ l a doplněno vodou na objem 1 ml. Výsledná koncentrace každého analytu byla 0,02 mg/ml.

Pro zjednodušení a urychlení práce byl připraven směsný roztok doxazosinu a jeho nečistot. Ze zásobních roztoků nečistot o koncentraci 1 mg/ml bylo vždy pipetováno 50 μ l a následně doplněno vodou na 1 ml. Z tohoto roztoku bylo odpipetováno 10 μ l, k nimž bylo přidáno 500 μ l zásobního roztoku doxazosinu a doplněno vodou na 1 ml. Výsledná koncentrace doxazosinu byla 500 μ g/ml, nečistot pak 0,5 μ g/ml, což je hodnota odpovídající limitním koncentracím nečistot dle platného Evropského lékopisu⁶⁸.

4.2.3 Příprava roztoku doxazosinu pro linearitu

0,0504 g doxazosinu bylo rozpuštěno v 10 ml 30% tetrahydrofuranu. Následně byl pipetován 1 ml tohoto roztoku a opět zředěn tetrahydrofuranem na 10 ml. Výsledný roztok o koncentraci doxazosinu 500 μ g/ml byl posléze naředěn v koncentračním rozmezí 10 – 120% pomocí výsledné mobilní fáze, která obsahovala 10% acetonitrilu (MF č. 14, viz Tab. č. 1).

4.2.4 Příprava roztoku nečistot pro linearitu

Z každého zásobního roztoku nečistoty bylo pipetováno 50 μl a doplněno vodou na 1 ml. Byla získána koncentrace 50 $\mu\text{g/ml}$. Odtud bylo pak pipetováno 100 μl a doplněno vodou na 10 ml. Tím byl získán roztok s limitní koncentrací nečistot 0,5 $\mu\text{g/ml}$, který byl dále naředěn v koncentračním rozmezí 10 – 120% pomocí výsledné mobilní fáze, která obsahovala 10% acetonitrilu (MF č. 14, viz Tab. č. 1).

4.2.5 Příprava roztoků pro opakovatelnost a přesnost

Ze zásobních roztoků nečistot o koncentraci 1 mg/ml bylo vždy pipetováno 50 μl a doplněno vodou na 1 ml. Následně bylo pipetováno 10 μl a přidáno 500 μl zásobního roztoku doxazosinu o koncentraci 1 $\mu\text{g/ml}$. Pomocí výsledné mobilní fáze (viz níže) byl objem doplněn na 1 ml. Výsledná koncentrace doxazosinu byla 500 $\mu\text{g/ml}$, nečistot 0,5 $\mu\text{g/ml}$.

4.2.6 Příprava pufrů

20 mM pufr č. 1:

Do 500,0 ml odměrné baňky bylo naváženo 1,3206 g hydrogenfosforečnanu amonného ($M_r = 132,06$) a přidáno 450 ml vody. Po rozpuštění pevné látky bylo naměřeno pH 8, dle potřeby pak bylo upraveno pomocí 10% amoniaku na 9 nebo pomocí 85% kyseliny fosforečné na 7 nebo 6. Následně byl objem doplněn vodou na 500,0 ml a přefiltrován za využití podtlaku.

20 mM pufr č. 2:

Do 500,0 ml odměrné baňky bylo naváženo 1,1503 g dihydrogenfosforečnanu amonného ($M_r = 115,03$) a přidáno 450 ml vody. pH nebylo upraveno a jeho hodnota zůstala 3,85. Následně byl objem doplněn vodou na 500,0 ml a přefiltrován za využití podtlaku.

20 mM pufr č. 3:

Do 500,0 ml odměrné baňky bylo naváženo 0,3704 g fluoridu amonného ($M_r = 37,04$) a přidáno 450 ml vody. pH bylo upraveno pomocí 10% amoniaku na 7. Následně byl objem doplněn vodou na 500,0 ml a přefiltrován za využití podtlaku.

20 mM pufr č. 4:

Do 500,0 ml odměrné baňky bylo naváženo 0,7702 g octanu amonného ($M_r = 77,02$) a přidáno 450 ml vody. pH bylo upraveno pomocí 85% kyseliny fosforečné na 7. Následně byl objem doplněn vodou na 500,0 ml a přefiltrován za využití podtlaku.

4.2.7 Příprava mobilních fází

Do 1000,0 ml odměrné baňky bylo vždy odměřeno požadované množství organické složky (acetonitrilu) a pomocí pufru doplněno na objem 1000,0 ml. V následující tabulce (Tab. č. 1) je uvedeno 13 použitých mobilních fází, typ pufru, koncentrace acetonitrilu a hodnota pH.

Mobilní fáze č.	pufr (20 mM)	Acetonitril (v/V)	pH
1	(NH ₄) ₂ HPO ₄	30%	9
2	(NH ₄) ₂ HPO ₄	20%	9
3	(NH ₄) ₂ HPO ₄	20%	8
4	(NH ₄) ₂ HPO ₄	20%	7
5	NH ₄ H ₂ PO ₄	20%	3,85
6	(NH ₄) ₂ HPO ₄	15%	9
7	(NH ₄) ₂ HPO ₄	20%	6
8	NH ₄ F	20%	7
9	CH ₃ COONH ₄	20%	7
10	(NH ₄) ₂ HPO ₄	10%	7
11	(NH ₄) ₂ HPO ₄	10%	9
12	(NH ₄) ₂ HPO ₄	10%-20% (gradient)	7
13	(NH ₄) ₂ HPO ₄	10%-20% (gradient)	8
14	(NH ₄) ₂ HPO ₄	10%-20% (gradient)	9

Tab. č. 1.: Použité mobilní fáze a jejich charakteristiky

5 VÝSLEDKY A DISKUZE

5.1 HLEDÁNÍ VHODNÉ STACIONÁRNÍ A MOBILNÍ FÁZE

Jak už bylo uvedeno výše, rigorózní práce se zabývá navržením vhodných podmínek pro chromatografii doxazosinu pomocí HPLC se spektrofotometrickým detektorem. Pro zvolení vhodných vlnových délek na detektoru bylo potřeba nejdříve proměřit absorpční spektra doxazosinu a všech jeho nečistot (viz Tab. č. 2). Na základě těchto spekter jsme pracovali při vlnových délkách 274 nm a 330 nm.

	Maxima absorpce (nm)		
Doxazosin	330,4	245,6	
Nečistota A	274,0	199,4	
Nečistota B	274,2	199,4	
Nečistota D	318,6	257,0	234,4
Nečistota G	339,6	246,4	216,2
Nečistota F	333,2	325,2	246,2

Tab. č. 2.: Absorpční maxima doxazosinu a jeho nečistot

Byly vyzkoušeny tři typy kolon na bázi oxidu zirkoničitého. Jeho povrch byl v prvním případě modifikován polybutadienem, dále polystyrenem a uhlíkem. U mobilní fáze se měnil typ pufru, koncentrace acetonitrilu a pH. Zkoušeli jsme též měnit rychlost průtoku mobilní fáze kolonou a měnila se i teplota kolony.

5.1.1 Zirkoniová kolona modifikována polybutadienem (Zr-PBD)

Mobilní fáze č. 1

Mobilní fáze obsahovala 30% acetonitrilu, anorganická fáze byla tvořena hydrogenfosforečnanovým pufrům, jehož pH bylo upraveno na hodnotu 9 pomocí 10% amoniaku. Průtoková rychlost byla 1 ml/min, teplota byla nastavena na 40 °C, velikost nástřiku 25 µl.

V tabulce č. 3 jsou souhrně zapsány retenční časy doxazosinu a jeho nečistot A, B, D, G a F ve vzestupném pořadí jejich eluce. Nečistoty D a F se eluují příliš blízko sebe, navíc v blízkosti startu, což znemožňuje jejich kvalitativní i kvantitativní analýzu. Z tohoto důvodu byla v další mobilní fázi snížena koncentrace acetonitrilu na 20%.

	Rt (min)
D	1,73
F	1,83
A	2,22
Doxazosin	3,37
B	3,61
G	7,56

Tab. č. 3: Retenční časy doxazosinu a jeho nečistot

Mobilní fáze č. 2

Mobilní fáze č. 2 obsahovala 20% acetonitrilu, ostatní chromatografické podmínky zůstaly stejné. V tabulce č. 4 jsou opět zaznamenány všechny retenční časy vzestupně. Snížením organické složky došlo k výraznému prodloužení celkové doby analýzy a ke změně v pořadí eluce nečistoty B a doxazosinu, jednotlivé analyty se vzájemně rozestoupily, nicméně nečistota D s retenčním časem 1,86 min se eluuje stále příliš blízko startu.

	Rt (min)
D	1,86
F	2,17
A	3,02
B	6,03
Doxazosin	10,86
G	13,08

Tab. č. 4: Retenční časy doxazosinu a jeho nečistot

Mobilní fáze č. 3

V mobilní fázi č. 3 jsme ponechali 20% acetonitrilu a pH jsme snížili na 8. Celková doba analýzy se prodloužila na 21 minut, kdy se eluuje nečistota G. Stejně tak se prodloužil retenční čas doxazosinu a nečistoty B, retenční časy nečistot D a F zůstaly téměř nezměněny. Z chromatogramu nečistoty A bylo patrné rozložení vzorku, vyčtený retenční čas 3,06 min nebyl znovu analyticky podložen. Všechny retenční časy vidíme v tabulce č. 5.

	Rt (min)
D	1,88
F	2,20
A	3,06
B	11,28
Doxazosin	13,57
G	21,21

Tab. č. 5: Retenční časy doxazosinu a jeho nečistot

Mobilní fáze č. 4

V další mobilní fázi bylo pH sníženo na hodnotu 7 pomocí 85% kyseliny fosforečné. Ostatní chromatografické podmínky zůstaly nezměněny. Snahou bylo především prodloužit retenční čas nečistoty D, což se nepovedlo. Navíc se prodloužil retenční čas nečistoty G, která se eluuje až v 39 minutě. Retenční časy ostatních analytů jsou opět shrnuty v tabulce č. 6. Nečistota A se eluovala opět jako dvojpík, i přesto, že vzorek byl připraven nový.

	Rt (min)
D	1,89
F	2,23
A	3,11
B	19,09
Doxazosin	20,59
G	38,31

Tab. č. 6: Retenční časy doxazosinu a jeho nečistot

Mobilní fáze č. 5

V mobilní fázi č. 5 bylo ponecháno 20% acetonitrilu, anorganická fáze byla zaměněna za dihydrogenfosforečnan amonný namísto hydrogenfosforečnanu diamonného. pH nebylo upravováno a jeho hodnota zůstala 3,85.

Důsledkem nízkého pH vzrostl retenční čas doxazosinu na 41,8 min, nečistota G se nestačila eluovat ani do 90 minuty (Tab. č. 7). Na nečistoty D a F neměla změna pufru ani pH žádný vliv. Následně jsme se proto vrátili k původnímu hydrogenfosforečnanu.

	Rt (min)
D	1,94
F	2,68
A	2,04
B	31,18
Doxazosin	41,8
G	>90

Tab. č. 7: Retenční časy doxazosinu a jeho nečistot

Závěr: Nepodařilo se nám optimálně separovat doxazosin a jeho nečistoty na zirkoniové koloně modifikované polybutadienem. Řešením by mohlo být použití gradientové eluce.

5.1.2 Zirkoniová kolona modifikovaná polystyrenem (Zr-PS)

Mobilní fáze č. 2

Po výměně kolony jsme se vrátili ke složení již použité mobilní fáze č. 2, která obsahovala 20% acetonitrilu, anorganickou složkou byl 20 mM hydrogenfosforečnan diamonný, pH bylo upraveno na 9. Ve srovnání s kolonou s povrchem polybutadienovým se všechny nečistoty eluují do 8 minuty (Tab. č. 8), doxazosin má pak retenční čas 12,41 min (Tab. č. 8).

	Rt (min)
D	1,87
F	2,31
A	3,15
B	3,93
G	7,30
Doxazosin	12,41

Tab. č. 8: Retenční časy doxazosinu a jeho nečistot

Mobilní fáze č. 6

Vzhledem ke skutečnosti, že se nečistota D stále eluuje blízko startu, snížili jsme množství acetonitrilu na 15%. Zbylé chromatografické podmínky zůstaly stejné. Posloupnost eluce jednotlivých analytů byla zachována, znatelně se ovšem prodloužila celková doba

analýzy. Retenční čas doxazosinu dosáhl 32,84 min. Přehled retenčních časů všech analytů nalezneme opět v tabulce (Tab. č. 9).

	Rt (min)
D	2,01
F	2,87
A	4,06
B	4,96
G	10,48
Doxazosin	32,84

Tab. č. 9: Retenční časy doxazosinu a jeho nečistot

Mobilní fáze č. 3

U další analýzy jsme se vrátili k mobilní fázi č. 3, která byla již také použita u předchozí kolony. Organická fáze obsahovala 20% acetonitrilu a pH zůstalo bez úpravy. Jeho hodnota byla 8. Opětovným zvýšením eluční síly jsme dosáhli celkové doby analýzy 13 min, kdy se jako poslední eluoval doxazosin. Při srovnání s mobilní fází č. 2, která měla stejné složení, vyjma hodnoty pH, zjistíme, že nejvíce snížené pH ovlivnilo retenční časy nečistot B a G (Obr. č. 45, 46), které se téměř zdvojnásobily (srovnání viz Tab.8 a Tab. 10).

	Rt (min)
D	1,88
F	2,31
A	3,15
B	6,97
G	11,66
Doxazosin	12,57

Tab. č. 10: Retenční časy doxazosinu a jeho nečistot

Mobilní fáze č. 4

Mobilní fáze č. 4 zůstala stejná jako předchozí, pouze došlo k úpravě pH na 7 pomocí 85% kyseliny fosforečné. Opět jsme se přesvědčili, že nejcitlivější je na změnu pH nečistota B a G, jejichž retenční časy byly 11,36 min a 20,12 min. Negativně se tak prodloužila celková doba separace (Tab. č. 11).

	Rt (min)
D	1,87
F	2,30
A	3,14
B	11,36
Doxazosin	13,51
G	20,12

Tab. č. 11: Retenční časy doxazosinu a jeho nečistot

Mobilní fáze č. 7

V další mobilní fázi bylo pH sníženo pomocí 85% kyseliny fosforečné na 6, pufr i koncentrace acetonitrilu zůstala stejná jako u mobilní fáze č. 4. Došlo k očekávanému prodloužení retenčního času doxazosinu a nečistot B a G, na ostatní analyty neměla změna pH opět žádný vliv (Tab. č. 12).

	Rt (min)
D	1,88
F	2,33
A	3,18
B	16,64
Doxazosin	17,21
G	83,72

Tab. č. 12: Retenční časy doxazosinu a jeho nečistot

Mobilní fáze č. 8

V mobilní fázi č. 8 byl vyzkoušen jako anorganická fáze 20 mM fluorid amonný, koncentrace acetonitrilu zůstala 20%, pH bylo upraveno na 7. Při srovnání s výsledky, kdy byly nastavené stejné podmínky za použití fosforečnanu diamonného jako pufru (Tab. č. 11), vidíme, že nečistoty D, F, A mají téměř totožné retenční časy, výrazně se prodloužil retenční čas nečistoty G, která se eluuje v 61. minutě namísto 20., k posunu došlo i u samotného doxazosinu a nečistoty B (Tab. č. 13).

	Rt (min)
D	1,89
F	2,33
A	3,17
Doxazosin	15,53
B	20,45
G	60,41

Tab. č. 13: Retenční časy doxazosinu a jeho nečistot

Mobilní fáze č. 9

Další mobilní fáze se od předchozí lišila pouze typem pufru, kdy byl použit octan amonný namísto fluoridu, pH bylo opět rovno 7. Největší retenční čas měla opět nečistota G, která se eluovala v 27. minutě. Výsledky jsou opět přehledně seřazeny v tabulce č. 14.

	Rt (min)
D	1,93
F	2,37
A	3,26
B	13,69
Doxazosin	16,60
G	26,39

Tab. č. 14: Retenční časy doxazosinu a jeho nečistot

Mobilní fáze č. 10

V dalším kroku jsme se vrátili k fosforečnanu diamonnému jako anorganické fázi, pH bylo upraveno na 7, obsah acetonitrilu jsme snížili na 10%. Průtok mobilní fáze kolonou byl ponechám 1 ml/min, teplota kolony temperována na 40° C.

Retenční časy se výrazně prodloužily. Dokonce i nečistota D se eluovala v 2,38 min, nečistota F v 4,4 min a nečistota A dokonce až s retenčním časem 6,18 min. Nečistoty B, G a doxazosin se vzhledem k nízké eluční síle neeluovaly ani do 80 minuty.

Pro urychlení analýzy jsme ponechali všechny chromatografické podmínky, pouze jsme zvýšili průtok mobilní fáze na 1,5 ml/min. Retenční časy jsou uvedeny v tabulce č. 15, doxazosin se neeluoval ani do 80. minuty.

	Rt (min)
D	1,61
F	3,02
A	4,14
B	17,15
G	46,36
Doxazosin	-

Tab. č. 15: Retenční časy doxazosinu a jeho nečistot

Mobilní fáze č. 11

V mobilní fázi č. 11 zůstaly podmínky opět stejné jako předchozí, tzn. 10% acetonitrilu, 20 mM pufr fosforečnanu diamonného, průtok mobilní fáze 1,5 ml/min, teplota 40 °C, jen pH bylo zvýšeno na 9. Doxazosin se opět neeluoval ani do 80. minuty. Opět uvádím přehled retenčních času v tabulce č. 16.

	Rt (min)
D	1,58
F	2,98
A	4,07
B	5,22
G	13,65
Doxazosin	-

Tab. č. 16: Retenční časy doxazosinu a jeho nečistot

Závěr: I přes fakt, že při použití zirkoniové kolony s povrchem modifikovaným polystyrenem budeme nuceni přistoupit ke gradientové eluci, ve srovnání s předchozí kolonou jsme docílili nižší retence a také změny pořadí eluovaných analytů, kdy se jako poslední eluuje doxazosin.

5.1.3 Zirkoniová kolona modifikovaná uhlíkem C18 (Zr-C)

Vyzkoušena byla i kolona modifikovaná uhlíkem. Původní mobilní fáze obsahovala 20% acetonitrilu, anorganická fáze byla tvořena 20 mM pufrém fosforečnanu diamonného, pH bylo upraveno na 7, průtok mobilní fáze byl 1,5 ml/min a teplota kolony 40 °C. Při nástřiku analytů nebyly znatelné žádné píky, výsledky nebyly lepší ani po zvýšení koncentrace acetonitrilu na 50% nebo 80% a upravení pH na hodnotu 9.

5.1.4 Gradientová eluce s využitím zirkoniové kolony modifikované polystyrenem

Následně jsme se vrátili k zirkoniové koloně modifikované polystyrenem a vyzkoušeli gradientovou eluci, kdy se od 3. do 5. minuty plynule zvyšovala koncentrace acetonitrilu z 10% na 20%. Anorganická fáze byla tvořena opět 20 mM fosforečnanem diamonným, pH bylo 7, průtok mobilní fáze 1,5 ml/min (MF č. 12). Jako poslední se v 17. minutě eluovala nečistota G (viz Tab. č. 17).

	Rt (min)
D	1,61
F	3,03
A	4,26
B	10,63
Doxazosin	14,07
G	16,91

Tab. č. 17: Retenční časy doxazosinu a jeho nečistot

Vzhledem k tomu, že předchozí výsledky ukázaly, že nečistota G je velmi citlivá na hodnotu pH mobilní fáze a se zvyšujícím se pH se zkracuje její retenční čas, zkusili jsme ponechat předchozí podmínky a zvýšit pH na 8 (Tab. č. 18) a následně ještě na 9 (Tab. č. 19). Náš předpoklad se potvrdil a dosáhli jsme nejen kratšího retenčního času nečistoty G, ale i kratší celkové doby analýzy. Při pH 8 se nečistota G eluuje ve 12. minutě, při pH 9 dokonce v minutě 9. V obou případech se jako poslední eluuje doxazosin v minutě 14.

Mobilní fáze č. 13

pH = 8 (grad. 10-20% ACN, 20 mM (NH₄)₂HPO₄, 40 °C, průtok 1,5 ml/min)

	Rt (min)
D	1,61
F	3,05
A	4,32
B	8,07
G	11,99
Doxazosin	13,18

Tab. č. 18: Retenční časy doxazosinu a jeho nečistot

Mobilní fáze č. 14

pH = 9 (grad. 10-20% ACN, 20 mM (NH₄)₂HPO₄, 40 °C, průtok 1,5 ml/min)

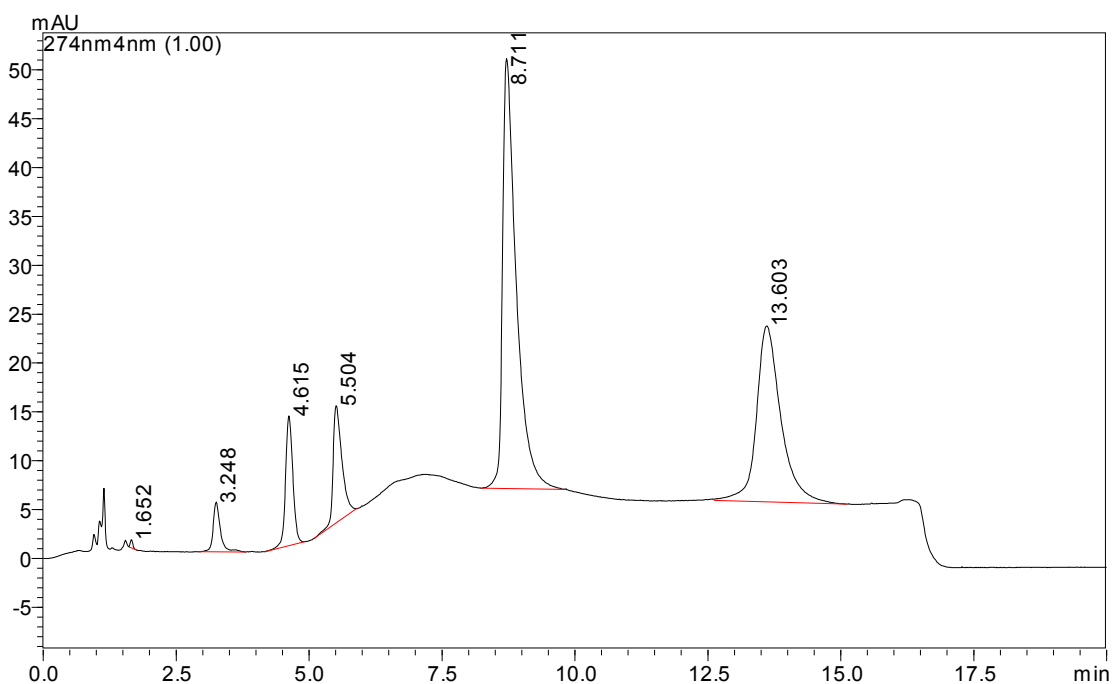
	Rt (min)
D	1,59
F	3,10
A	4,59
B	5,17
G	8,78
Doxazosin	13,17

Tab. č. 19: Retenční časy doxazosinu a jeho nečistot

Z dosavadních výsledků se poslední chromatografické podmínky s využitím gradientové eluce zdají nejvhodnější. Na obrázku č. 8 můžeme vidět analýzu směsného vzorku doxazosinu a jeho nečistot. Všechny nečistoty se eluují do 9. minuty, doxazosin se následně eluuje s dostatečným odstupem až v minutě 14. Retenční časy jsou ještě jednou přehledně shrnuty v tabulce č. 20.

	Rt (min)
D	1,65
F	3,25
A	4,62
B	5,50
G	8,71
Doxazosin	13,60

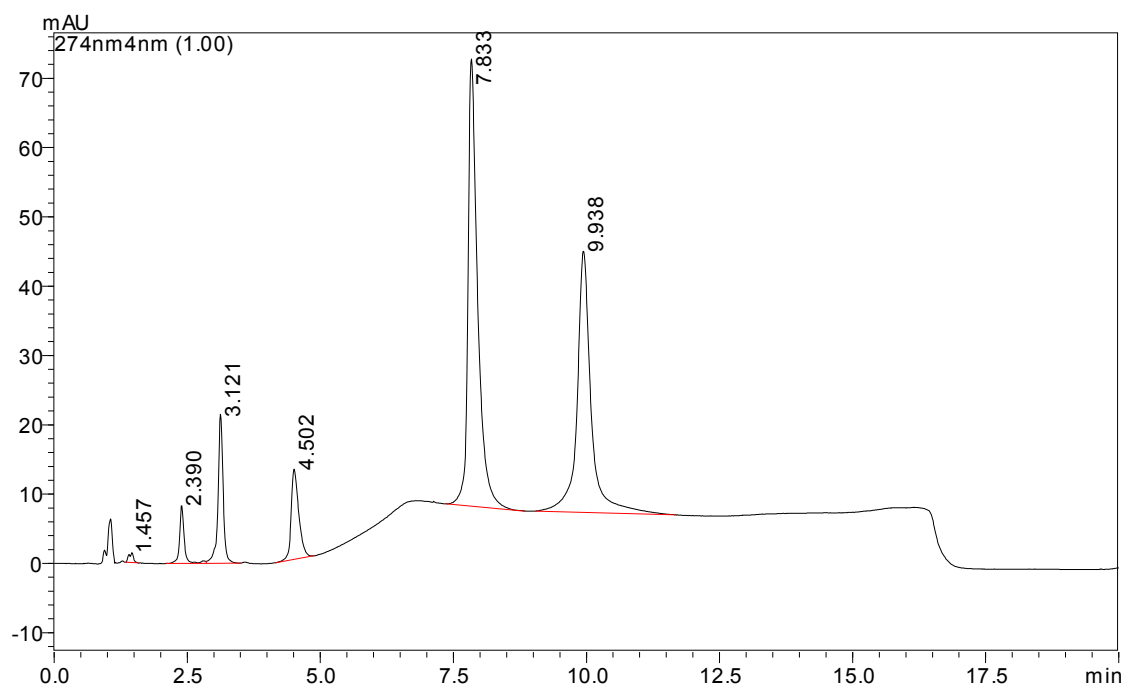
Tab. č. 20: Retenční časy doxazosinu a jeho nečistot



Obr. č. 8: Chromatografický záznam směsného vzorku doxazosinu a jeho nečistot
 Kolona: Discovery®Zr-PS, RP (150x4.6 mm ID, 5 µm), Sigma-Aldrich, Německo
 Rychlost průtoku mobilní fáze 1,5 ml/min, teplota 40 °C, tlak 128 bar, nástřík 25 µl, spektrofotometrická detekce

5.1.4.1 Optimalizace výsledné separace změnou teploty

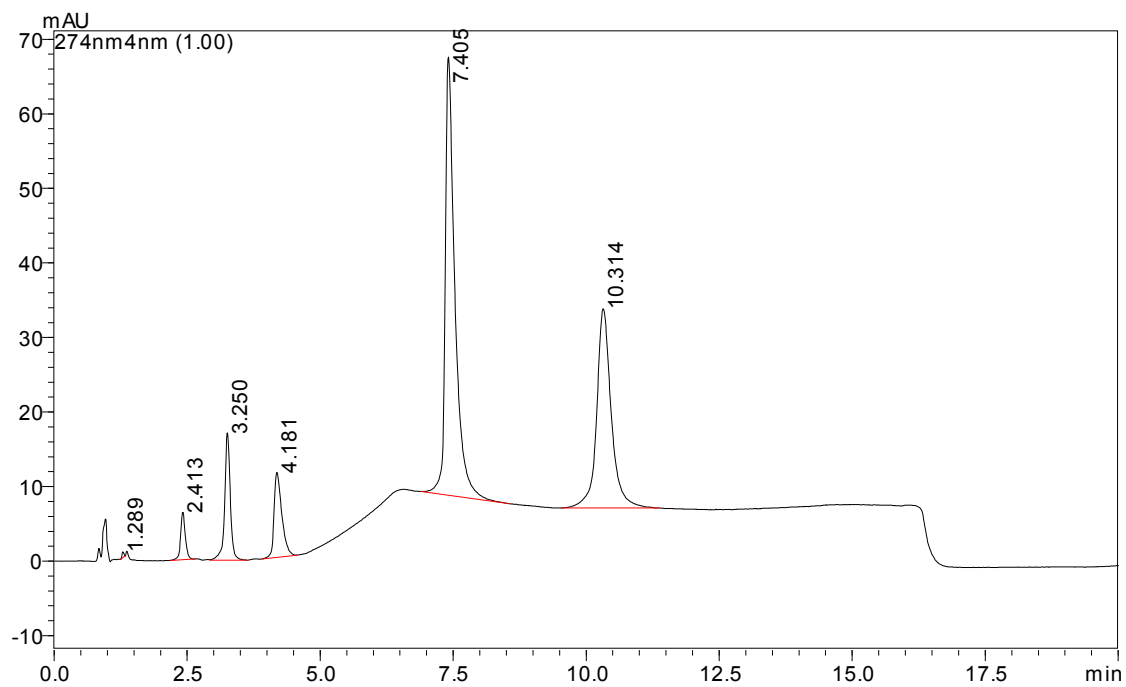
Následně jsme zkoušeli, do jaké míry má změna teploty kolony vliv na výslednou separaci, která dosud probíhala při 40 °C. Analýzu jsme provedli při 30 °C, 50 °C, 60 °C (Obr. č. 9) a 70 °C. Ostatní chromatografické podmínky zůstaly původní. Bylo zřejmé, že čím větší byla teplota kolony, tím kratší byla celková doba analýzy. Při 70 °C se už výrazně zmenšovala vzdálenost mezi nečistotou G a doxazosinem. Při větší koncentraci doxazosinu by pak mohla být jeho analýza nepřesná.



Obr. č. 9: Chromatografický záznam směšného vzorku doxazosinu a jeho nečistot
 Kolona: Discovery®Zr-PS, RP (150x4.6 mm ID, 5 µm), Sigma-Aldrich, Německo
 Rychlost průtoku mobilní fáze 1,5 ml/min, teplota 60 °C, tlak 128 bar, nástřik 25 µl, spektrofotometrická detekce

5.1.4.2 Optimalizace výsledné separace změnou průtoku mobilní fáze kolonou

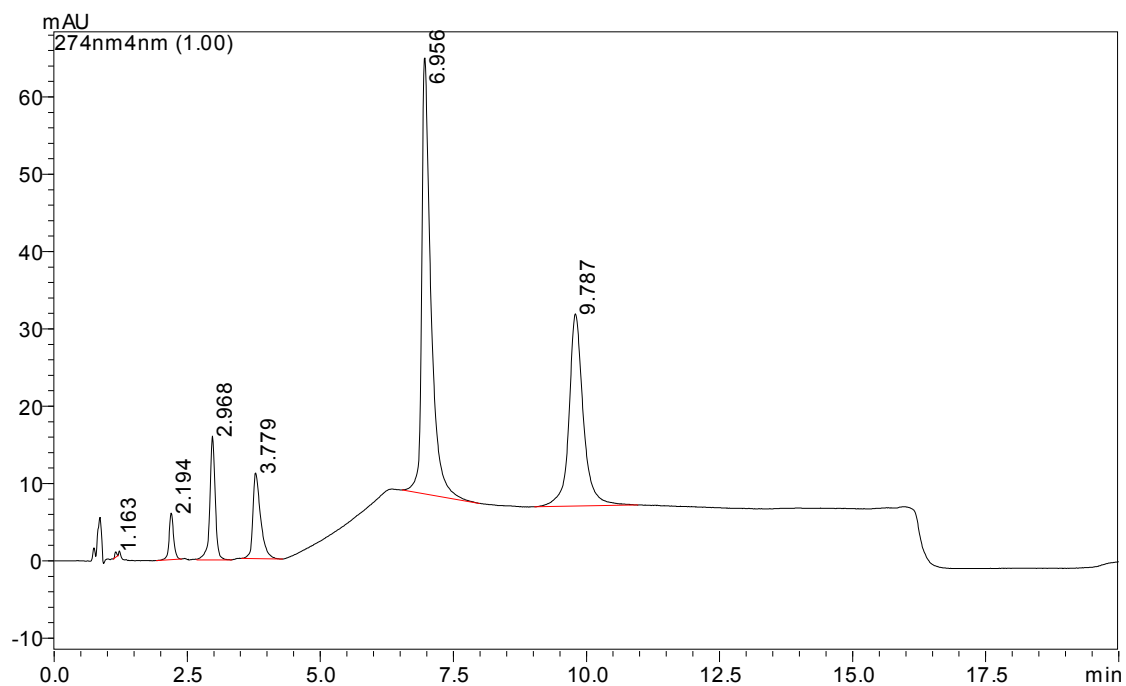
V další fázi byl vyzkoušen vliv rychlosti průtoku mobilní fáze na celkovou separaci. Snížili jsme průtok na 1,3 ml/min, následně zvýšili na 1,7 ml/min (Obr. č. 10), 1,9 ml/min (Obr. č. 11), 2,1 ml/min, 2,3 ml/min a 2,5 ml/min. Opět platilo, že čím větší průtok, tím rychlejší byla celá analýza. Při průtoku 2,1 ml/min se eluovala nečistota G právě v křivce narůstajícího gradientu, což jsme nepokládali za vhodné. Navíc se se vzrůstajícím průtokem zvyšoval tlak v koloně. Proto jsme dále volili mezi průtokem 1,7 ml/min a 1,9 ml/min. V obou případech jsme zkusili ještě zvýšit teplotu na 60 °C (Obr. č. 12, 13).



Obr. č. 10: Chromatografický záznam směšného vzorku doxazosinu a jeho nečistot

Kolona: Discovery®Zr-PS, RP (150x4.6 mm ID, 5 μm), Sigma-Aldrich, Německo

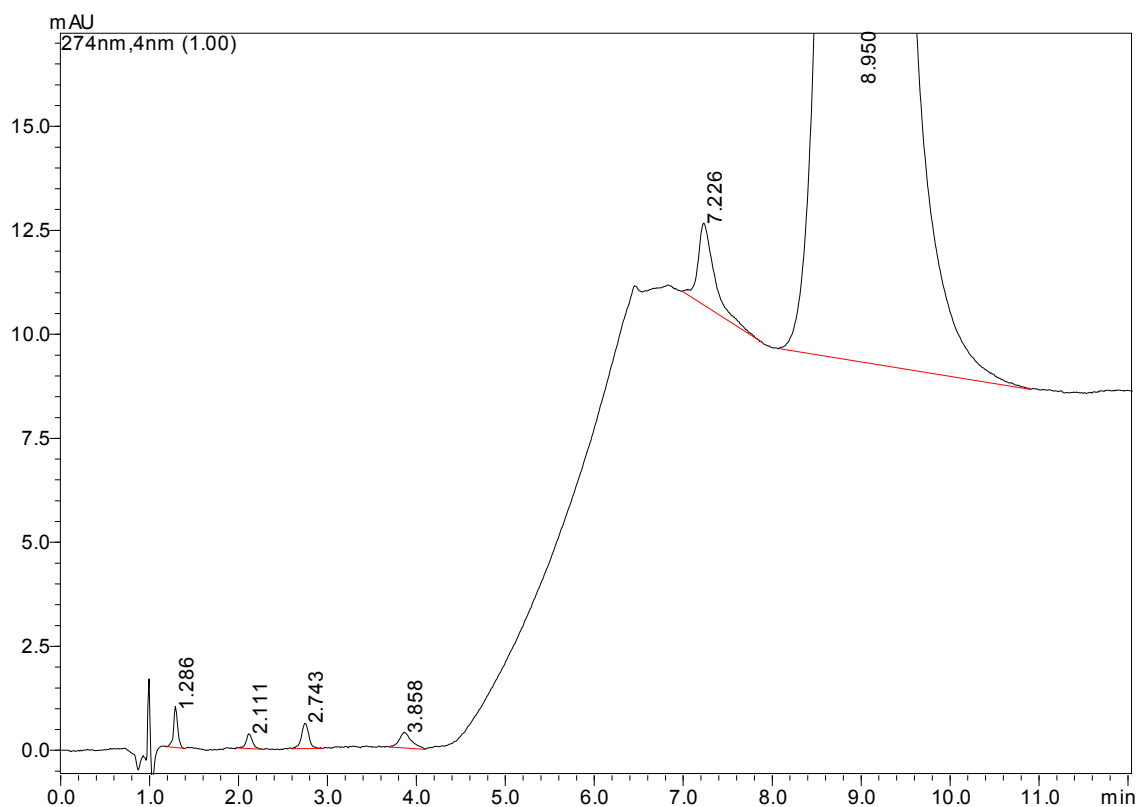
Rychlost průtoku mobilní fáze 1,7 ml/min, teplota 50 °C, tlak 129 bar, nástřik 25 μl, spektrofotometrická detekce



Obr. č. 11: Chromatografický záznam směšného vzorku doxazosinu a jeho nečistot

Kolona: Discovery®Zr-PS, RP (150x4.6 mm ID, 5 μm), Sigma-Aldrich, Německo

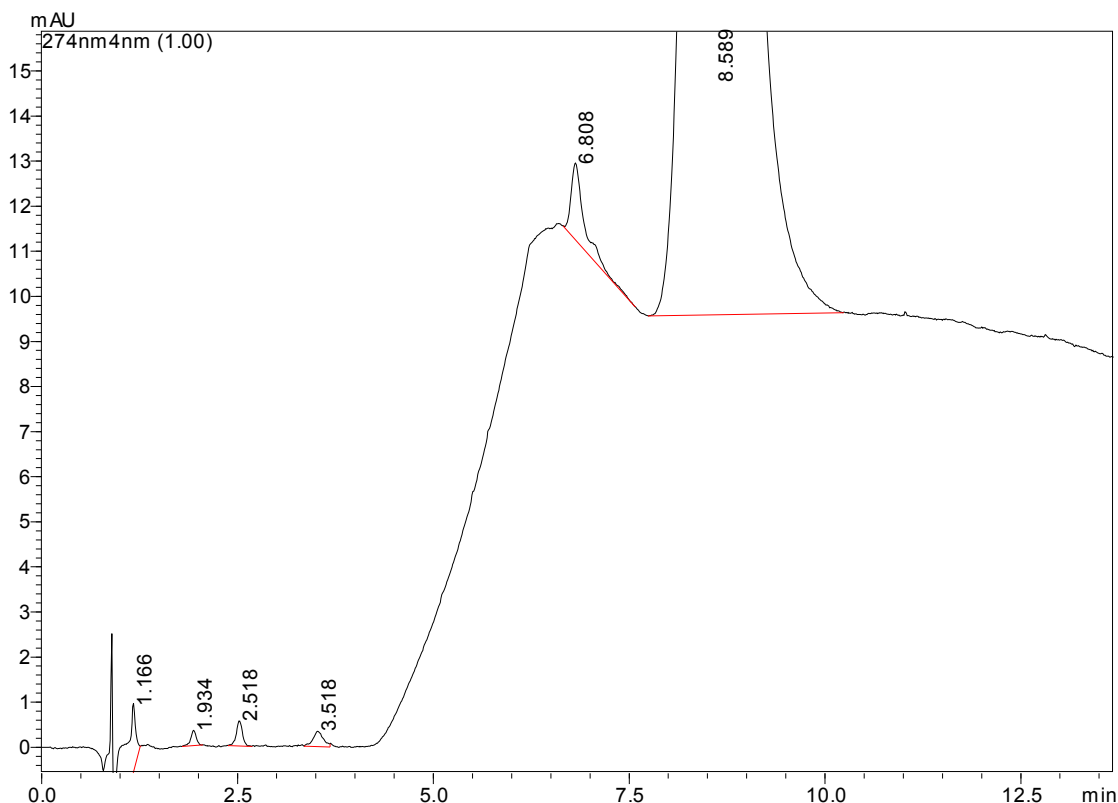
Rychlost průtoku mobilní fáze 1,9 ml/min, teplota 50 °C, tlak 144 bar, nástřik 25 μl, spektrofotometrická detekce



Obr. č. 12: Chromatografický záznam směšného vzorku doxazosinu a jeho nečistot

Kolona: Discovery®Zr-PS, RP (150x4.6 mm ID, 5 μm), Sigma-Aldrich, Německo

Rychlost průtoku mobilní fáze 1,7 ml/min, teplota 60 °C, tlak 128 bar, nástřik 25 μl, spektrofotometrická detekce



Obr. č. 13: Chromatografický záznam směsného vzorku doxazosinu a jeho nečistot

Kolona: Discovery®Zr-PS, RP (150x4.6 mm ID, 5 μm), Sigma-Aldrich, Německo

Rychlost průtoku mobilní fáze 1,9 ml/min, teplota 60 °C, tlak 140 bar, nástřik 25 μl, spektrofotometrická detekce

Jako finální byla nakonec zvolena rychlost průtoku mobilní fáze 1,7 ml/min s ohledem především na nižší tlak, který je šetrnější ke koloně, dále teplota 60 °C, jenž oproti 50 °C zkracuje dobu analýzy o minutu, aniž by byla nějak negativně ovlivněna celková analýza.

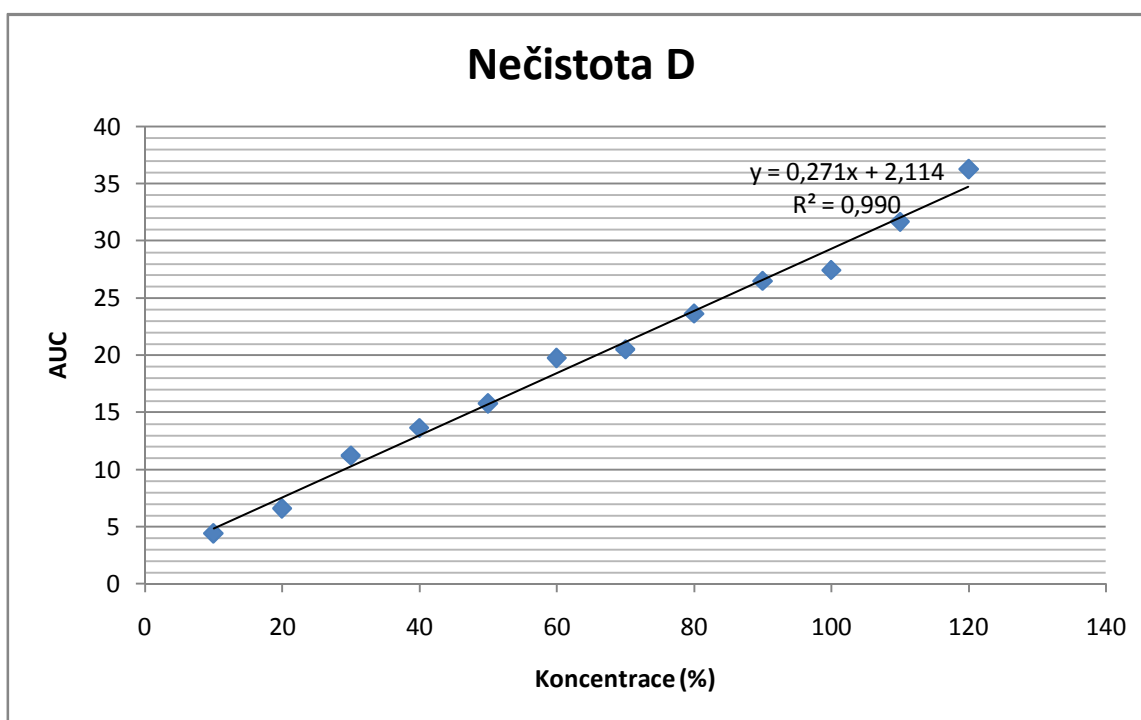
5.2 VALIDACE

5.2.1 Linearita

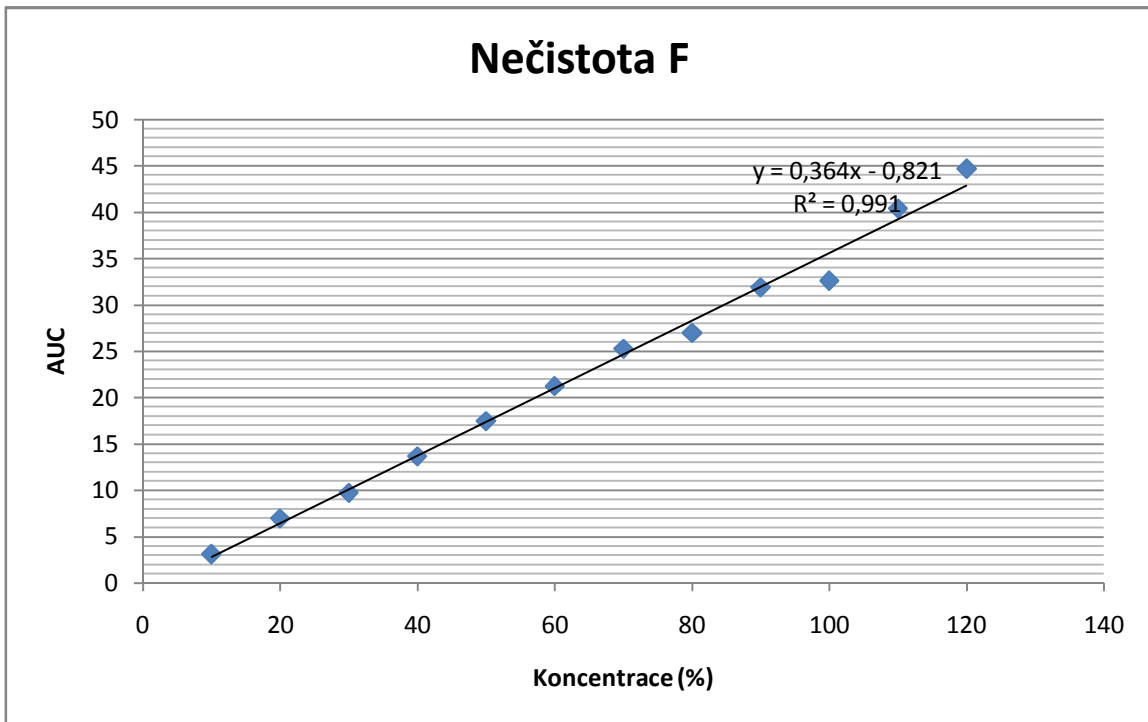
Linearita (Tab. č. 21) vyjadřuje rozmezí koncentrací, v němž je odezva detektoru lineární. Použit byl roztok doxazosinu o koncentraci 500 μg/ml a naředěn v koncentračním rozmezí 10 – 120%, stejně tak byly připraveny roztoky všech jeho nečistot o původní koncentraci 0,5 μg/ml. Lineární regrese ukázala, že v rámci všech látek hodnota druhé mocniny korelačního koeficientu je vyšší nebo rovna 0,990 (Graf č. 1 - 6).

Koncentrace	AUC					
	D	F	A	B	G	DOX
10	4436	3146,5	1414,5	1965,5	-	4577670
20	6606	6978,5	2410	4496,5	11452,5	8944734
30	11223,5	9754	2753	7011	18997,5	13351238
40	13636,5	13686,5	3641,5	8746,5	22885	18277729
50	15777	17484,5	4346,5	13033,5	33026	22799551
60	19745	21239	4670,5	15148	38858	27810082
70	20506	25275	5657	18617	46057	31844837
80	23621	26994	6555,5	19989,5	52021	36695204
90	26477	31915	6585,5	24074	58267,5	39709708
100	27439	32608,5	7169	24079,5	63073,5	46008454
110	31644	40393,5	7673	28085	71919	50050147
120	36246	44692	8701	32207,5	76378,5	54890027

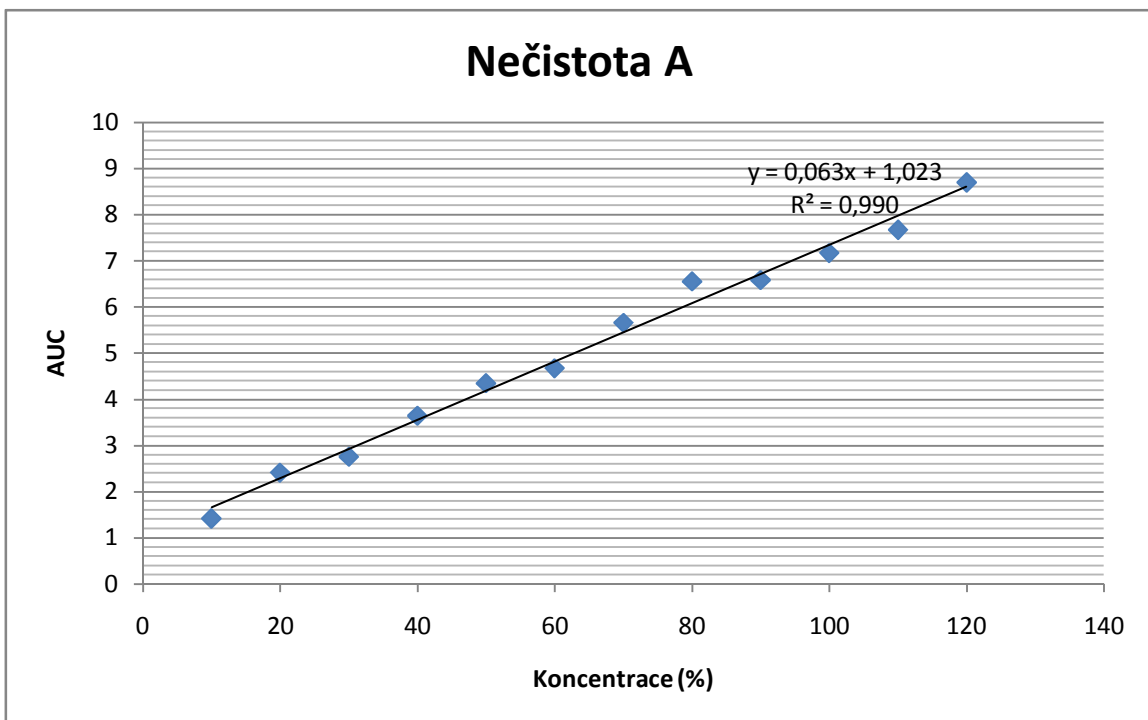
Tab. č. 21: Vliv koncentrace doxazosinu a jeho nečistot na velikosti ploch pod píky (AUC)



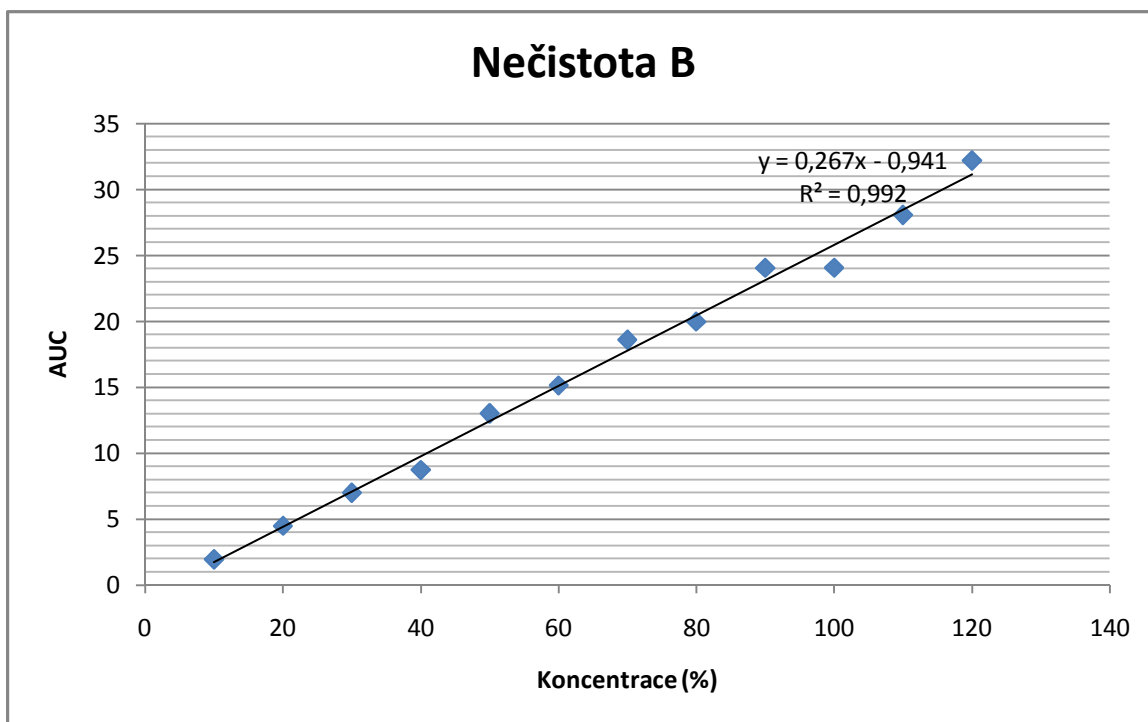
Graf. č. 1: Lineární regrese nečistoty D



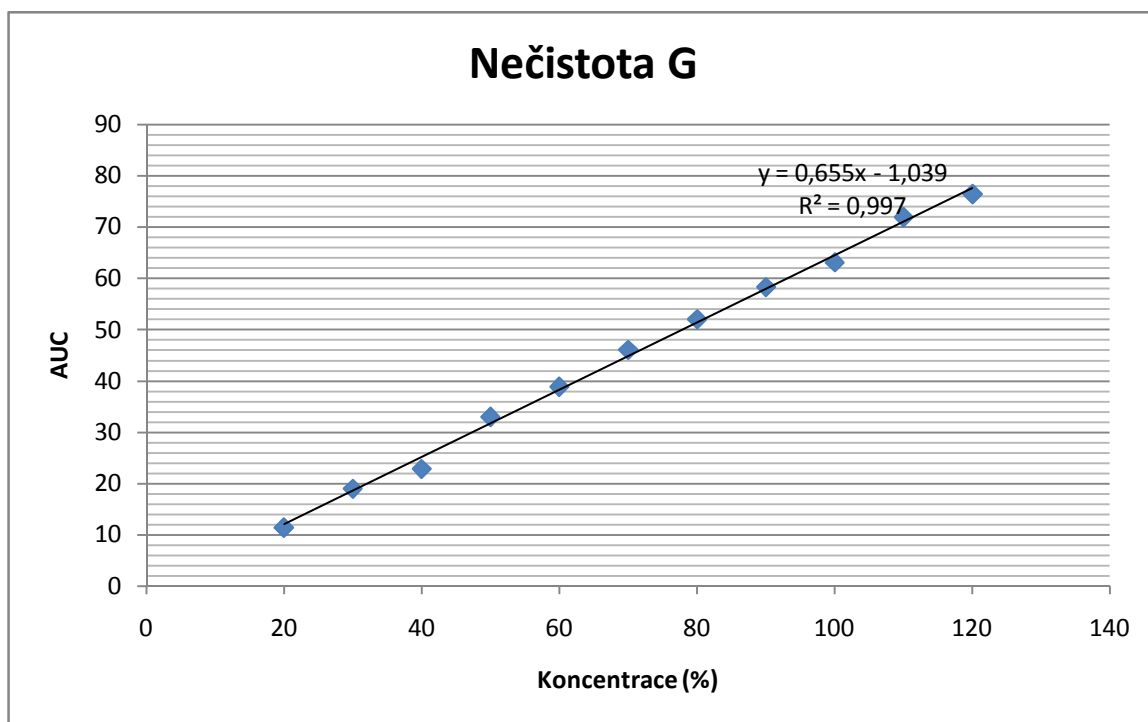
Graf. č. 2: Lineární regrese nečistoty F



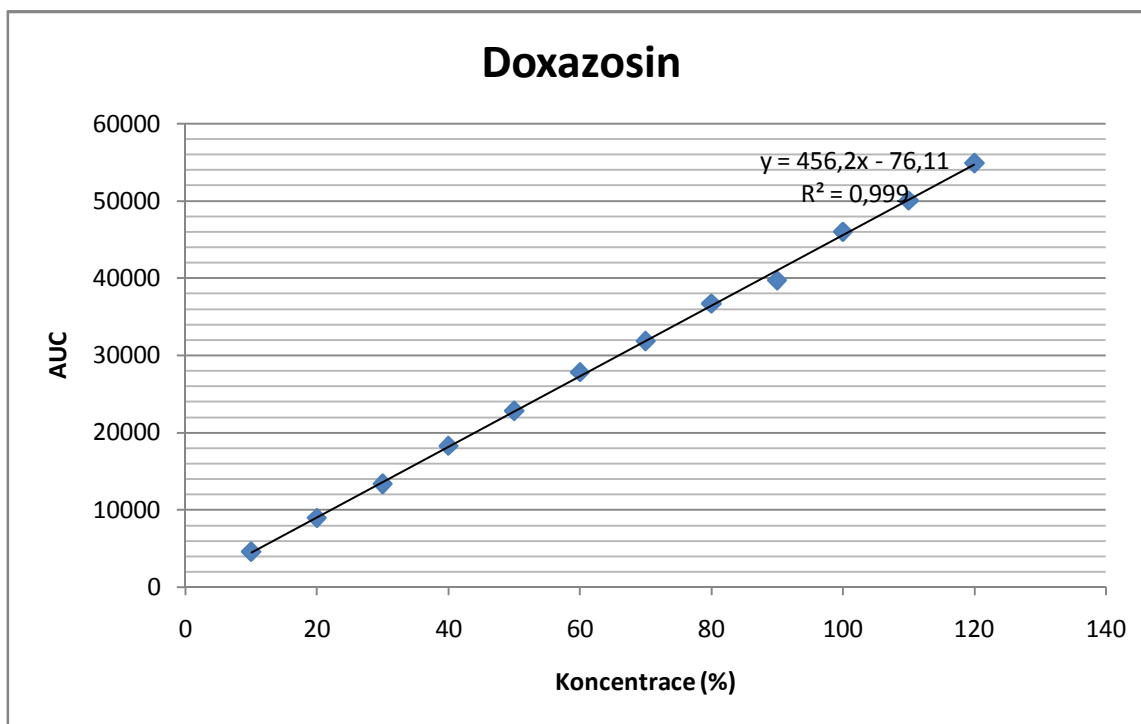
Graf. č. 3: Lineární regrese nečistoty A



Graf. č. 4: Lineární regrese nečistoty B



Graf. č. 5: Lineární regrese nečistoty G



Graf. č. 6: Lineární regrese doxazosinu

5.2.2 Opakovatelnost nastříknutí a přesnost metody

OPAKOVATELNOST (Tab. č. 22)

Stanovení vyjadřuje shodu výsledků zjištěných při sérii šesti analýz téhož vzorku. Vyjadřuje se relativní směrodatnou odchylkou a ověřuje spolehlivost měření v téže laboratoři, na téže přístroji jedním analytikem. Připraven byl vzorek, kde koncentrace doxazosinu byla 0,5 mg/ml a koncentrace všech nečistot 0,5 µg/ml.

Nástřík	AUC D	AUC F	AUC A	AUC B	AUC G	AUC DOX
1	1873201	43260	19954	23009	45162	43780697
2	1876933	44478	20069	22133	44989	43867841
3	1863337	43563	18811	22882	45206	43702436
4	1877388	45292	19401	22890	44339	43870591
5	1878086	44725	19679	22953	45160	43784523
6	1876539	44685	19049	23500	45092	43781100
průměr	1874247	44333,83	19493,83	22894,5	44991,33	43797865
směrodatná odchylka %	0,299162	1,736236	2,564516	1,917109	0,729988	0,14457

Tab. č. 22: Opakovatelnost nastříknutí

PŘESNOST

Bylo připraveno 6 směsných vzorků doxazosinu a jeho nečistot, kde koncentrace doxazosinu byla 0,5 mg/ml, koncentrace všech nečistot 0,5 µg/ml. Každý z těchto vzorků byl následně 6x zanalyzován (Tab. č. 23). Výsledné průměry ploch pod píkem jednotlivých látek byly dále zprůměrovány a byla vypočtena směrodatná odchylka (Tab. č. 24).

	Nástřik	AUC D	AUC F	AUC A	AUC B	AUC G	AUC DOX
VZ1	1	1910472	41339	14720	22534	48053	43693926
	2	1926670	39895	14567	21140	43730	43434288
	3	1939170	40194	14675	20308	44566	43570231
	4	1947989	38568	14624	21396	44573	43378121
	5	1925438	39715	14659	21922	43545	43367037
	6	1932178	39852	14308	21581	43146	43370664
	průměr směrodatná odchylka %	1930320 0,665473	39927,17 2,229905	14592,17 1,016772	21480,17 3,49173	44602,17 3,999281	43469045 0,309276
VZ2	1	1849413	43062	14770	22370	44515	44032357
	2	1865571	43504	14582	24778	45660	44079298
	3	1852067	41887	14190	24004	44868	43947111
	4	1863052	42587	14247	23588	44857	44119500
	5	1858146	43469	14912	22634	45059	43891298
	6	1861124	42818	13407	22398	45325	44062673
	průměr směrodatná odchylka %	1858228,8 0,3414128	42887,833 1,4162989	14351,333 3,7801161	23295,333 4,2430404	45047,333 0,890372	44022040 0,196048
VZ3	1	1873201	42120	15070	23009	45162	43709570
	2	1876933	42154	14456	21515	44989	43867841
	3	1863337	40662	15070	22070	45206	43702436
	4	1877388	41683	14775	22226	44339	43798740
	5	1878086	41466	14504	22953	45160	43784523
	6	1876539	42590	14587	23500	45092	43704631
	průměr směrodatná odchylka %	1874247,3 0,2991616	41779,167 1,6125768	14743,667 1,8666384	22545,5 3,2485544	44991,333 0,7299877	43761290 0,153782
VZ4	1	1725725	41132	14299	22895	43143	44206622
	2	1726985	40813	14127	23395	42565	44025198
	3	1725013	41362	14033	22657	42158	44125983
	4	1724987	41750	15109	24055	42594	44207775
	5	1723616	41088	14857	23788	42109	43958103
	6	1717643	40559	15232	22486	42181	43986740
	průměr směrodatná odchylka %	1723994,8 0,191407	41117,333 1,0119021	14609,5 3,5696217	23212,667 2,7324368	42458,333 0,9348293	44085070 0,250299

VZ5	1	1880196	41282	14387	23052	45151	43549726
	2	1886183	41109	15125	23064	43989	43660573
	3	1885321	41748	14084	22611	43702	43598403
	4	1882626	40958	14628	24085	43531	43509072
	5	1881160	41368	14900	23908	42921	43474815
	6	1873916	42154	15144	23710	44479	43447882
	průměr směrodatná odchylka %	1881567	41436,5	14711,333	23405	43962,167	43540079
	0,2342152	1,0665829	2,8832847	2,4764523	1,7674686	0,182975	
VZ6	1	1818492	39222	14189	23087	45440	43395907
	2	1821897	38483	13701	21231	43861	43363413
	3	1815814	41702	14061	21709	44101	43471800
	4	1822318	39890	14030	22031	41639	43358611
	5	1822812	40606	14633	22913	43236	43293901
	6	1812598	40556	14262	21398	45082	43241322
	průměr směrodatná odchylka %	1818988,5	40076,5	14146	22061,5	43893,167	43354159
	0,2271052	2,8355134	2,1700751	3,5296685	3,1177011	0,184674	

Tab. č. 23: Plochy pod píkem a vypočítané relativní směrodatné odchylky

Vzorek	∅ AUC D	∅ AUC F	∅ AUC A	∅ AUC B	∅ AUC G	∅ AUC DOX
1	1930320	39927,17	14592,17	21480,17	44602,17	43469045
2	1858229	42887,83	14351,33	23295,33	45047,33	44022040
3	1874247	41779,17	14743,67	22545,5	44991,33	43761290
4	1723995	41117,33	14609,5	23212,67	42458,33	44085070
5	1881567	41436,5	14711,33	23405	43962,17	43540079
6	1818989	40076,5	14146	22061,5	43893,17	43354159
průměr průměrů směrodatná odchylka %	1847891	41204,08	14525,67	22666,69	44159,08	43705280
	3,820102	2,687064	1,593802	3,432771	2,190874	0,689535

Tab. č. 24: Průměrné plochy pod píkem a vypočítané relativní směrodatné odchylky

MEZIDENNÍ PŘESNOST

Mezidenní přesností byla ověřena spolehlivost měření v téže laboratoři ve dvou různých dnech. Opět bylo připraveno 5 směsných vzorků doxazosinu a jeho nečistot. Koncentrace doxazosinu byla 0,5 mg/ml, koncentrace všech nečistot 0,5 µg/ml. Analýza každého vzorku byla provedena 2x (Tab. č. 25). Výsledné průměry ploch pod píkem jednotlivých látek byly zprůměrovány a následně vypočtena směrodatná odchylka (Tab. č. 26)

	Nástřík	AUC D	AUC F	AUC A	AUC B	AUC G	AUC DOX
VZ1	1	1897435	41624	18828	22531	44304	43169471
	2	1882131	39432	18030	22294	44951	43132510
	průměr	1889783	40528	18429	22412,5	44627,5	43150991
	směrodatná odchylka %	0,572635	3,824462	3,061866	0,747727	1,025148	0,060567
VZ2	1	1902477	41066	18061	24042	48239	43382425
	2	1909214	41496	18654	24454	48142	43411713
	průměr	1905846	41281	18357,5	24248	48190,5	43397069
	směrodatná odchylka %	0,249956	0,736552	2,284158	1,201452	0,14233	0,047722
VZ3	1	1873817	40430	18390	23845	45479	43073794
	2	1874235	41491	18066	23906	43597	43186126
	průměr	1874026	40960,5	18228	23875,5	44538	43129960
	směrodatná odchylka %	0,015772	1,831619	1,256872	0,18066	2,987954	0,184166
VZ4	1	1884119	40197	18210	23753	46272	43716198
	2	1884888	41087	18998	23570	46138	43714388
	průměr	1884504	40642	18604	23661,5	46205	43715293
	směrodatná odchylka %	0,028855	1,54846	2,995056	0,546882	0,205069	0,002928
VZ5	1	1874857	40483	18416	24041	45920	43634494
	2	1873585	41589	18328	23246	46966	43634184
	průměr	1874221	41036	18372	23643,5	46443	43634339
	směrodatná odchylka %	0,04799	1,90579	0,338697	2,377609	1,592562	0,000502

Tab. č. 25: Plochy pod píkem a vypočítané relativní směrodatné odchylky

Vzorek	∅ AUC D	∅ AUC F	∅ AUC A	∅ AUC B	∅ AUC G	∅ AUC DOX
1	1889783	40528	18429	22412,5	44627,5	43150991
2	1905846	41281	18357,5	24248	48190,5	43397069
3	1891797	41280	18527	23381	46837	43623907
4	1884504	40642	18604	23661,5	46205	43715293
5	1874221	41036	18372	23643,5	46443	43634339
průměr průměrů	1889230	40953,4	18457,9	23469,3	46460,6	43504320
směrodatná odchylka %	0,609629	0,862224	0,570885	2,856926	2,756394	0,529257

Tab. č. 26: Průměrné plochy pod píkem a vypočítané relativní směrodatné odchylky

MEZILEHLÁ PŘESNOST

Mezilehlá přesnost předpokládá vyhodnocení totožného měřicího postupu, prováděného ve stejné laboratoři po delší, nespecifikované časové období. Během tohoto časového intervalu se předpokládá možná změna kalibrace, a /nebo kalibrátoru.

Lze ji vypočítat ze vzorce $100 - A/B \times 100$, kde A představuje průměr průměrů hodnot ploch pod píkem doxazosinu a jeho nečistot při měření přesnosti, B potom průměr průměrů hodnot ploch pod píkem doxazosinu a jeho nečistot při měření přesnosti mezidenní. Výsledky jsou shrnuty v tabulce č. 27.

	D	F	A	B	G	DOX
přesnost obden	1847891	41204,08	14525,67	22666,69	44159,08	43705280
přesnost	1813897	41174,33	14715,08	24101,33	46597,25	43425772
průměr	1830894	41189,21	14620,38	23384,01	45378,17	43565526
směr.odchylka	1,31289	0,051073	0,916104	4,33819	3,799281	0,453667
mezilehlá přesnost	1,839629	0,072202	-1,30401	-6,32928	-5,52133	0,63953

Tab. č. 27: Průměrné plochy pod píkem a vypočítaná mezilehlá přesnost

ODEZVOVÝ FAKTOR

Jedná se o faktor citlivosti detektoru. Stanoven byl výpočtem poměru ploch pod píkem jednotlivých nečistot k ploše pod píkem doxazosinu (viz. Tab. č. 28). Koncentrace všech zmiňovaných látek byla 50 µl/ml. Výpočet byl prováděn při třech vlnových délkách (viz Tab. č. 29).

	210nm	250nm	274nm
D	240655	72686	24843
F	3889430	6773221	1291693
A	1165423	35837	293261
B	2637528	103799	346241
G	1990279	5708708	1587221
DOX	2364400	4600705	1464467

Tab. č. 28: Hodnoty plochy pod píkem při vlnových délkách 210, 250 a 274 nm

	210nm	250nm	274nm
D/DOX	0,101783	0,015799	0,016964
F/DOX	1,644997	1,472214	0,882023
A/DOX	0,492904	0,007789	0,200251
B/DOX	1,115517	0,022562	0,236428
G/DOX	0,841769	1,240833	1,083822

Tab. č. 29: Vypočtené hodnoty Response factor

6 ZÁVĚR

Cílem rigorózní práce bylo navrhnutí vhodných chromatografických podmínek pro kvalitativní a kvantitativní analýzu doxazosinu a jeho pěti nečistot s využitím HPLC se spektrofotometrickou detekcí.

Na základě zkušeností a s ohledem na vlastnosti analytů byly pro naši práci zvoleny zirkoniové stacionární fáze s povrchovou úpravou uhlíkovou, polybutadienovou a polystyrenovou. U mobilní fáze se měnila eluční síla organické složky (acetonitrilu), dále typ pufru (fosfát, acetát, fluorid) a jeho pH. Při optimalizaci výsledných podmínek byla volena nejvhodnější teplota kolony (30, 40, 50, 60, 70°C) a měnila se i rychlost průtoku mobilní fáze (1,3; 1,5; 1,7; 1,9; 2,1; 2,3; 2,5 ml/min).

Jako nejvhodnější výsledná stacionární fáze byla vybrána zirkoniová kolona modifikovaná polystyrenem. Optimální separace jsme dosáhli při použití gradientové eluce, kdy se od 3. do 5. minuty plynule zvyšovala koncentrace acetonitrilu z 10% na 20%. Anorganická fáze byla tvořena 20 mM fosforečnanem diamonným, pH bylo upraveno na 9. Rychlost průtoku mobilní fáze byla 1,7 ml/min, přičemž kolona byla temperována na 60 °C. Jako poslední se na chromatogramu eloval doxazosin s retenčním časem do 9. minuty. Celková doba analýzy včetně re-ekvilibrace základní linie byla 16 minut.

Výsledné chromatografické podmínky byly následně validovány. Účinnost metody, spolehlivost a reprodukovatelnost analytických výsledků byla experimentálně doložena linearitou, přičemž lineární regrese ukázala, že v rámci všech látek hodnota druhé mocniny korelačního koeficientu je vyšší nebo rovna 0,990, a přesností, kdy relativní směrodatná odchylka nepřekročila hodnotu 4%.

7 ABSTRAKT

Rigorózní práce

Využití alternativních stacionárních fází v HPLC analýze léčiv

Mgr. Petra Holásková

Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmaceutické chemie a kontroly léčiv

Rozpustnost silikagelu při vyšším pH mobilní fáze vedlo k vývoji alternativních HPLC kolon na bázi oxidů kovů (oxidu titaničitého, oxidu hlinitého), zejména pak oxidu zirkoničitého. Jeho vlastnosti, především chemická odolnost a separační účinnost, byly vyzkoušeny v naší práci, kdy jsme studovali alternativní stacionární fáze pro kvalitativní a kvantitativní analýzu doxazosinu a jeho pěti nečistot. Vzhledem k nízké retenci a dostatečné selektivitě se jako nejvhodnější jevil oxid zirkoničitý modifikovaný polystyrenem. Doba separace trvala do 16-ti minut. Výsledné chromatografické podmínky byly následně validovány.

8 ABSTRACT

Rigorous thesis

The Alternative HPLC Phases for Analysis of Pharmaceuticals

Mgr. Petra Holásková

Charles University in Prague, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové,
Department of Pharmaceutical Chemistry and Drug Control

The solubility of silica gel at high pH is the cause for developing alternative HPLC columns based on metal oxides, such as titanium oxide, aluminium oxide, and zirconium oxide. Advantages of these columns are particularly high chemical stability and separation efficiency. In our project, zirconia-based stationary phases were tested in qualitative and quantitative analysis of doxazosine and its five impurities. Polystyrene-coated zirconia was chosen because of its low retention and appropriate selectivity. The separation was done within 16 min. Subsequently, chromatographic conditions were validated.

9 POUŽITÁ LITERATURA

-
- ¹ J. Duchoň a kol., Lékařská chemie a biochemie: učebnice pro lékařské fakulty, Avicenum, Praha, 1985
- ² J. Churáček, P. Jandera, Separace látek: Kapalinná vysokoúčinná kolonová chromatografie, SNTL, Praha 1981
- ³ D. Harvey, Modern analytical chemistry, McGraw-Hill, Dubuque, IA, 2000
- ⁴ A. V. Kisselev, J. I. Jašin, Adsorpční plynová a kapalinová chromatografie, SNTL, Praha 1988
- ⁵ J. Dai, X. Yang, P. W. Carr, J. Chromatogr. A 2003, 1005, 63-82
- ⁶ I.N. Acworth, P. H. Gamache, The Coulometric Electrode Array For Use in HPLC Analysis, Part 1: Theory, American Lab., 1996
- ⁷ X. Yang, J. Dai, P. W. Carr, J. Chromatogr. A 2003, 996, 13-31
- ⁸ J. Nawrocki, M.P. Rigney, A. McCornick, P.W. Carr, J. Chromatogr. 2003, 657, 229-282
- ⁹ Y. Hu, X. Yang, P. W. Carr, J. Chromatogr. A 2002, 968, 17 - 29
- ¹⁰ B.C. Trammell, M.A. Hillmyer, P.W. Carr, Anal. Chem. 2001, 73, 3323 - 3331
- ¹¹ J. Zhao, P. W. Carr, Anal. Chem. 2000, 72, 302 - 309
- ¹² Z. G. Shi, Y. Q. Feng, L. Xu, M. Zhang, S. L. Da, Talanta 2004, 63, 593 - 598
- ¹³ S. M. Fields, C. Q. Ye, D.D. Zhang, B.R. Branch, X.J. Zhang, N. Okafo, J. Chromatogr. A 2001, 913, 197 - 204
- ¹⁴ J. Zhao, P.W. Carr, Anal. Chem. 2000, 72, 4413 - 4419
- ¹⁵ C. McNeff, Q.H. Zhao, P.W. Carr, J. Chromatogr. 1994, 684, 201 - 211
- ¹⁶ J. Zhao, P.W. Carr, Anal. Chem. 1999, 72, 5217 - 5224
- ¹⁷ C. McNeff, P.W. Carr, Anal. Chem. 1995, 67, 3886 - 3892
- ¹⁸ J.W. Li, P.W. Carr, Anal. Chem. 1996, 68, 2857 - 2868
- ¹⁹ L. Sun, A.V. McCormick, P.W. Carr, J. Chromatogr. A 1994, 658, 465 - 473
- ²⁰ J. Suchopár, R. Šimek, Š. Valentová, J. Bursík, Remedia compendium, Nakladatelství a vydavatelství Panax, Praha 2 1997
- ²¹ J. Churáček et al., Nové trendy v teorii a instrumentaci vybraných analytických metod, Academica, Praha 1993
- ²² Z. Deyl, K. Macek, Liquid Column Chromatography, Elsevier, Amsterdam 1975, str. 126
- ²³ Český lékopis 2009, Grada publishing, Praha 2009
- ²⁴ R. Karlíček a kol., Analytická chemie pro farmaceuty, Karolinum, Praha 2005
- ²⁵ J. Klimeš a kol., Kontrola léčiv I., Karolinum, Praha, 2002
- ²⁶ D. V. McCalley, J. Chromatogr. A 902 (2000) 311

-
- ²⁷ J. Narowcki, *J. Chromatogr. A* 779 (1997) 29
- ²⁸ J.J. Kirkland, J.L. Glajch, J. Kohler, *J. Chromatogr. A* 384 (1987) 81
- ²⁹ A. Berthod, *J. Chromatogr.* 549 (1991) 1
- ³⁰ Rissler K.: *J. Chromatogr. B* 665 (1995) 233-270
- ³¹ Štulík K., Pacáková V., Suchánková J., Claessens H. A.: *Anal. Chim. Acta* 352(1997) 1-12
- ³² H. Engelhardt, *Chemically Modified Surface*, Elsevier, Amsterdam, 1992
- ³³ J. Blackwell, P.W. Carr, *J. Chromatogr.* 549 (1991) 43
- ³⁴ J. Blackwell, P.W. Carr, *J. Chromatogr.* 549 (1991) 59
- ³⁵ J.A. Blackwell, P.W. Carr, *J. Chromatogr.* 596 (1992) 27
- ³⁶ J. Narowcki, M.P. Rigney, A. McCormick, P.W. Carr, *J. Chromatogr. A* 657 (1993) 229
- ³⁷ N.E. Tret'yakov, V.N. Filimonov, *Kin. Katal.* 13 (1972) 815
- ³⁸ J.E. Haky, A.R. Raghani, B.M. Dunn, L.F. Wieserman, *Chromatographia* 32 (1-2) (1991) 49
- ³⁹ J.E. Haky, S. Vermulapalli, L.F. Wieserman, *J. Chromatogr.* 505 (1990) 307
- ⁴⁰ D. Xiang, L.Y. Tang, J.A. Blackwell, *J. Chromatogr. A* 935 (2002) 67
- ⁴¹ M.P. Rigney, Ph.D. Thesis, University of Minneapolis, 1988
- ⁴² Y. Mao, B.M. Fung, *J. Colloid Interf. Sci.* 191 (1997) 216
- ⁴³ Y. Mao, B.M. Fung, *Chem. Mater.* 10 (1998) 509.
- ⁴⁴ J. Nawrocki et al., *J. Chromatogr. A* 1028 (2004) 34
- ⁴⁵ W.A. Schafer, P.W. Carr, E.F. Funkenbush, K.A. Parson, *J. Chromatogr.* 587 (1991) 137
- ⁴⁶ J. Blackwell, P.W. Carr, *J. Liq. Chromatogr.* 15 (9) (1992) 1487
- ⁴⁷ J. Nawrocki et al., *J. Chromatogr. A* 1028 (2004) 35
- ⁴⁸ A.M. Clausen, A. Subramanian, P.W. Carr, *J. Chromatogr. A* 831 (1999) 63
- ⁴⁹ A.M. Clausen, P.W. Carr, *Anal. Chem.* 70 (1998) 378
- ⁵⁰ C.G. Horvath, B.A. Preiss, S.R. Lipsky, *Anal. Chem.* 39 (1967) 1422
- ⁵¹ A. Kurganov, V. Davankov, T. Isaeva, K. Unger, F. Eisenbeiss, *J. Chromatogr. A* 660 (1994) 217
- ⁵² U. Bien-Vogelsang, A. Deege, H. Figge, J. Koehler, G. Schomburg, *Chromatographia* 19 (1984) 170
- ⁵³ M. Petro, D. Berek, *Chromatographia* 37 (1993) 549
- ⁵⁴ J. Narowcki et al., *J. Chromatogr. A* 1028 (2004) 36
- ⁵⁵ G. Huhn, H. Muller, *J. Chromatogr.* 640 (1993) 57
- ⁵⁶ L. Sun, P.W. Carr, *Anal. Chem.* 67 (1995) 2517

-
- ⁵⁷ L. Sun, P.W. Carr, *Anal. Chem.* 67 (1995) 3717
- ⁵⁸ M.P. Rigney, T.P. Weber, P.W. Carr, *J. Chromatogr.* 484 (1989) 273
- ⁵⁹ J. Li, Y. Hu, P.W. Carr, *Anal. Chem.* 69 (1997) 3884
- ⁶⁰ J. Zhao, P.W. Carr, *Anal. Chem.* 72 (2000) 302
- ⁶¹ J. Zhao, P.W. Carr, *Anal. Chem.* 71 (1999) 5217
- ⁶² J.H. Knox, P. Ross, *Adv. Chromatogr.* 37 (1997) 73
- ⁶³ K.K. Unger, *Anal. Chem.* 59 (1983) 361A
- ⁶⁴ J.H. Knox, B. Kaur, in: P.R. Brown, R.A. Hartwick (Eds.), *High Performance Liquid Chromatography*, Wiley, New York, 1989 (Chapter 4)
- ⁶⁵ T.P. Weber, P.W. Carr, E.F. Funkenbush, *J. Chromatogr.* 519 (1990) 31
- ⁶⁶ T.P. Weber, P.T. Jackson, P.W. Carr, *Anal. Chem.* 67 (17) (1995) 3042
- ⁶⁷ L.R. Snyder, J.J. Kirkland, J.L. Glajch, *Practical HPLC Method Development*, John Wiley & sons, Inc., 605 Third Avenue, NY 1997
- ⁶⁸ The European Pharmacopoeia fifth ed., Suppl. 5.5 (2009) Council of Europe, Directorate for Quality of Medicines, France
- ⁶⁹ The United States Pharmacopeia XXXI (2007) The United States Pharmacopeial convention, USA
- ⁷⁰ Cowlishaw MG, Sharman JR (1985) *J Chromatogr A* 344:403–407
- ⁷¹ Jackman GP, Colagrande F, Louis WJ (1991) *J Chromatogr A* 566:234–238.
- ⁷² Rubin PC, Brunton J, Meredith P (1980) *J Chromatogr A* 221:193–195
- ⁷³ Sripalakit P, Nermhom P, Saraphanchotiwitthaya A (2006) *Biomed Chromatogr* 20:729–735.
- ⁷⁴ Fouda HG, Twomey TM, Schneider RP (1988) *J Chromatogr Sci* 26:570–573
- ⁷⁵ Altiokka G, Tunçel M (1997) *Pharmazie* 52:879–881
- ⁷⁶ Altiokka G, Tuncel M (1998) *J Pharm Biomed Anal* 17:169–175
- ⁷⁷ Fernandez de Betono S, Moreda JM, Arranz A, Arranz JF (1996) *Anal Chim Acta* 329:25–31
- ⁷⁸ Fernandez de Betono S, Arranz Garcia A, Arranz Valentin JF (1999) *J Pharm Biomed Anal* 20:621–630
- ⁷⁹ Altiokka G (2001) *J Pharm Biomed Anal* 25:387–391
- ⁸⁰ Sane RT, Francis M, Hijli PS, Pawar S, Pathak AR (2002) *JPC-J Planar Chromat* 15:34–37
- ⁸¹ Altiokka G, Atkosar Z (2002) *J Pharm Biomed Anal* 27:841–844

⁸² Yang G, Liu H, Zhang Y, Wang S, Yin J, Yin B, Chen Y (2006) *J Chromatogr A* 1129:231–235

⁸³ Ma N, Liu W, Li H, Chen B, Zhu Y, Liu X, Wang F, Xiang D, Zhang B (2007) *J Pharm Biomed Anal* 43:1049–1056

⁸⁴ Chassaing C, Luckwell J, Macrae P, Saunders K, Wright P, Venn R (2001) *Chromatographia* 53:122–130