

**UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE**

**Farmaceutická fakulta v Hradci Králové**

**Katedra farmaceutické chemie a kontroly léčiv**

Využití HPLC v analýze léčiv III

**DIPLOMOVÁ PRÁCE**

Vedoucí diplomové práce: PharmDr. Radim Kučera, Ph.D.

Hradec Králové 2009

Jana Václavková

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

V Hradci Králové, dne 1.8.2009

.....

podpis

Chtěla bych poděkovat PharmDr. Radimu Kučerovi, Ph.D. a Mgr. Václavu Žižkovskému, Ph.D. za odborné vedení a poskytnutí cenných rad při zpracování mé diplomové práce. Dále děkuji ostatním zaměstnancům katedry farmaceutické chemie a kontroly léčiv za jejich vstřícnost a ochotu.

# OBSAH

<b>1. ÚVOD</b> .....	<b>5</b>
<b>2. TEORETICKÁ ČÁST</b> .....	<b>7</b>
2.1. Chromatografické metody.....	8
2.2. Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC).....	9
2.2.1. <i>Kapalinový chromatograf</i> .....	9
2.2.2. <i>Mobilní fáze</i> .....	13
2.2.3. <i>Stacionární fáze</i> .....	13
2.2.4. <i>Oxid zirkoničitý</i> .....	17
2.2.5. <i>Analytické hodnocení látek pomocí HPLC</i> .....	21
2.3. Ondansetron a jeho nečistoty.....	22
<b>3. CÍL PRÁCE</b> .....	<b>26</b>
<b>4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST</b> .....	<b>28</b>
4.1. Použité látky a přístroje.....	29
4.2. Příprava roztoků vzorků a mobilní fáze.....	30
4.3. Chromatografické podmínky.....	31
<b>5. VÝSLEDKY A DISKUSE</b> .....	<b>32</b>
5.1. Optimalizace chromatografických podmínek.....	33
5.1.1. <i>Kolona Zirchrom<sup>®</sup>-PBD</i> .....	33
5.1.2. <i>Kolona Zirchrom<sup>®</sup>-MS</i> .....	34
<b>6. ZÁVĚR</b> .....	<b>45</b>
<b>7. ABSTRAKT</b> .....	<b>47</b>
<b>8. LITERATURA</b> .....	<b>50</b>

# **1. ÚVOD**

Vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií lze v současnosti považovat za jednu z nejpoužívanějších analytických a separačních technik. Hlavními výhodami jsou plná automatizace procesu, nízká spotřeba vzorku a možnost kvantitativního i kvalitativního hodnocení. Metoda se neustále rozvíjí. Dochází k minimalizaci rozměrů chromatografických kolon, vznikají nové typy stacionárních fází a tím i nové možnosti chemické analýzy.

Výhodnou alternativou ke stacionárním fázím založených na oxidu křemičitém (silikagel) se staly fáze na bázi oxidu zirkoničitého (Zr-fáze). Tyto fáze jsou narozdíl od silikagelových stabilní v celém rozmezí hodnot pH (v závislosti na typu chemicky navázané reverzní fáze) a zároveň vykazují vysokou tepelnou stabilitu (až 200°C - za použití speciálního hardwaru).

Pro ondansetron a jeho pět nečistot byla vyvinuta HPLC metoda na koloně ZirChrom<sup>®</sup>-PBD (Zr-PBD). Aby mohl být použit při analýze hmotnostní detektor (vyšší detekce), musel být nahrazen netěkavý pufr za těkavý, chromatografická kolona byla změněna na kolonu ZirChrom<sup>®</sup>-MS (Zr-MS) s odstíněným povrchem a podmínky separace optimalizovány.

## **2. TEORETICKÁ ČÁST**

## 2.1. Chromatografické metody

Chromatografie patří mezi nejpoužívanější separační metody. Umožňuje jak kvalitativní, tak kvantitativní analýzu. K separaci analyzovaných látek dochází na základě dělení mezi dvěma vzájemně nemísitelnými fázemi. Jedná se o nepohyblivou (stacionární) fázi a pohyblivou (mobilní) fázi. Látky jsou podle afinity k dané fázi různou měrou buď zadržovány stacionární fází nebo unášeny mobilní fází chromatografickou kolonou. [1,2]

Chromatografii rozdělujeme:

a) podle charakteru mobilní fáze:

- kapalina (*kapalinová chromatografie*)
- inertní plyn (*plynová chromatografie*)

b) podle uspořádání stacionární fáze:

- *kolonová chromatografie* (stacionární fáze je součástí kolony)
- *tenkovrstvá chromatografie* (na hliníkové folii, skleněné desce apod.)
- *papírová chromatografie* (na chromatografickém papíru)

c) podle děje převládajícího při separaci:

- *adsorpční chromatografie* (k dělení dochází vlivem rozdílné schopnosti látek adsorbovat se na povrch stacionární fáze)
- *rozdělovací chromatografie* (analyzované látky se rozdělují podle různé rozpustnosti ve dvou vzájemně nemísitelných fázích – stacionární fázi představuje kapalina zakotvená na vhodném nosiči, mobilní fází je kapalina nebo plyn)
- *iontově-výměnná chromatografie* (stacionární fází jsou iontoměniče – katexy nebo anexy, separace probíhá podle síly přitažlivosti mezi elektrostatickými silami funkčních skupin stacionární fáze a ionty stanovovaných látek obsaženými v mobilní fází, retence je řízena změnou pH)
- *gelová chromatografie* (analyty se rozdělují podle molekulární velikosti při průchodu kolonou naplněnou gelovou stacionární fází s určitou velikostí pórů –



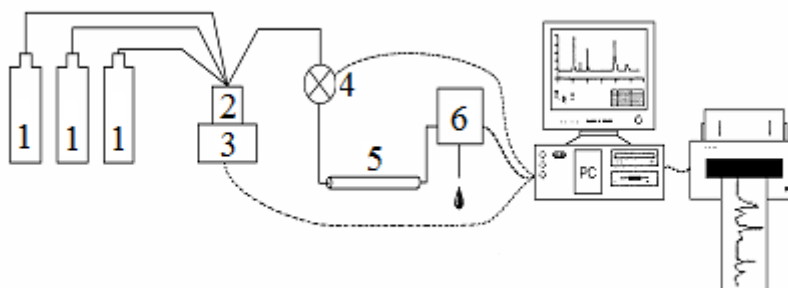
první vystupují z kolony velké molekuly, malé vstupují do pórů a eluovány jsou později)

- *afinitní chromatografie* (separace probíhá na základě afinity stacionární fáze k separovaným látkám) [1,2]

## 2.2. Vysokoučinná kapalinová chromatografie (HPLC)

Vysokoučinná kapalinová chromatografie patří v současnosti k nejprogreďentnějším analytickým metodám. Její vznik umožnil analýzu tepelně nestálých a netěkavých látek, což plynová chromatografie bez vhodné derivatizace nedovoluje. [1,3]

### 2.2.1. Kapalinový chromatograf



Obr. 1 – Kapalinový chromatograf:

1 – zásobníky mobilní fáze, 2 – vysokotlaké čerpadlo, 3 – programovací jednotka, 4 – dávkovací zařízení, 5 – chromatografická kolona, 6 – detektor, PC – počítač [1]

#### **Jednotlivé části kapalinového chromatografu:**

- **Zásobníky mobilní fáze**

Zásobníky bývají nejčastěji zhotoveny ze skla, kovu nebo plastu. Zpravidla se používají jeden až čtyři zásobníky mobilní fáze.

- **Degaser**

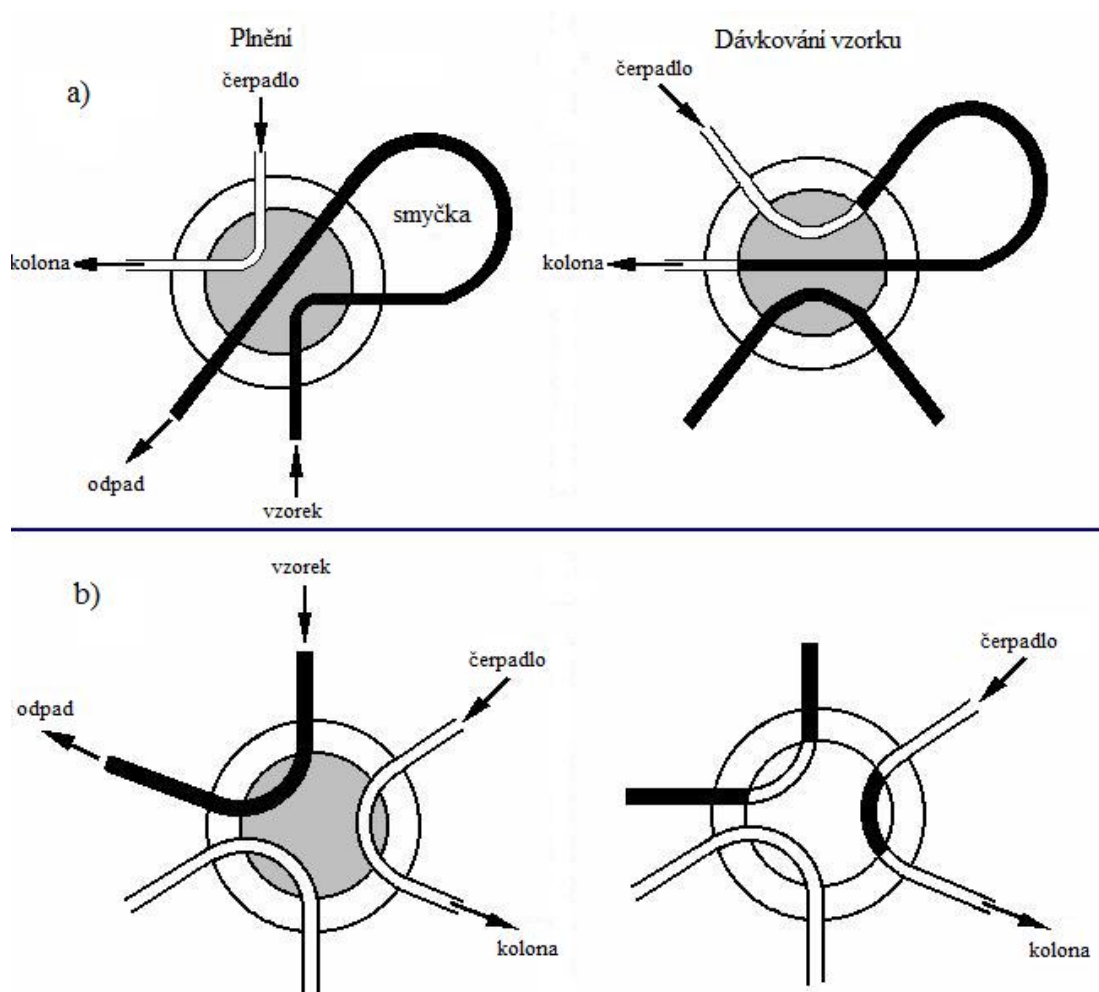
Slouží k odplynění mobilní fáze (pomocí vakua). Většinou je součástí HPLC sestavy. Jinou možností odstranění plynů z mobilní fáze je použití helia nebo ultrazvuku. [3]

- **Čerpadla**

Čerpadla vedou mobilní fázi ze zásobníku na kolonu. Důležité je dosažení konstantní průtokové rychlosti. Na kolonu lze přivádět mobilní fázi s konstantním složením (izokratická eluce) nebo se může složení, v závislosti na nastavení programu, měnit (gradientová eluce). Používají se bezpulsní čerpadla pístová, jedno-, dvoj- nebo čtyřhlavé. V případě pulzujícího toku by se zvýšil šum, došlo by ke snížení citlivosti detekce a snížila by se účinnost kolony. [4]

- **Dávkovací zařízení**

Dávkuje roztok analyzované látky na kolonu. Nejpoužívanější je smyčkový, šesticestný kohout (viz obr. 2). Skládá se z otočného jádra a pláště ventilu. V současnosti se používají automatizované dávkovače, tzv. autosamplery, které využívají také šesticestné ventily.



Obr. 2 – Schéma vysokotlakých dávkovacích ventilů [5]

- **Chromatografické kolony**

Kolony se vyrábí z nerezové oceli, skla, příp. titanu. Délka kolony souvisí s velikostí zrn stacionární fáze, čím jsou částičky sorbentu menší (nejpoužívanější rozměr: 3 – 5  $\mu\text{m}$ ), tím je kolona kratší. Současnou tendencí je minimalizace velikosti zrn, délky a vnitřního průměru kolony (mikrokolony). Výhodou je pak menší spotřeba mobilní fáze a zároveň se dosáhne užších píků daných analytů.

Rozdělení:

- podle použití:
  - analytické kolony (délka 10 – 25 cm, vnitřní průměr 2,1 – 4,6 mm)
  - preparativní kolony (délka 25 – 50 a více cm a průměr 8 – 10 mm)
- podle stacionární fáze:
  - klasické – plněny sorbentem složeného z jednotlivých částiček, nevýhodou je možná komprese stacionární fázi
  - monolitické – náplň tvoří jediný kus sorbentu, např. polymer, stlačení v tomto případě nehrozí a lze pracovat i za vyššího tlaku [1,5]

- **Detektory**

U detektorů je důležitá univerzálnost, vysoká citlivost, reprodukovatelnost a linearita odezvy v co nejširším koncentračním rozmezí.

- rozlišujeme:
  - univerzální – signál je závislý na celkové vlastnosti eluentu
  - selektivní – signál je závislý pouze na koncentraci analyzované látky
- rozdělení:
  - *spektrofotometrické* – nejpoužívanější detektory, selektivní a citlivé (minimální zjištěitelné množství vzorku:  $10^{-9}$  až  $10^{-10}$  g/ml). Proměřují absorpční elektromagnetického záření určité vlnové délky složkami eluátu protékajícího celou detektoru. Nejcitlivější detekce je v maximu absorpční křivky. Pracuje se hlavně s vlnovými délkami v UV oblasti spektra. Rozdělujeme:
    - detektor s proměnnou vlnovou délkou

- diode array detektor (DAD, poskytuje soubor chromatogramů při různých vlnových délkách během jedné analýzy, umožňuje tak získat více informací o složení vzorku. UV spektrum každého píku je důležitým nástrojem při výběru vhodné vlnové délky pro HPLC metodu.) [6]
  - scanning UV detektor (snímající během několika sekund absorpční spektrum v maximu píku hodnocené látky)
  - detektor s fixní vlnovou délkou (nejčastěji 254 nebo 280 nm, dnes již nepoužívá)
- *fluorimetrické (fluorescenční)* – selektivní, vysoce citlivé (až  $10^{-12}$  g/ml). Lze je použít u látek fluoreskujících nebo u látek, které lze vhodnou derivační reakcí převést na fluoreskující produkty. Analyty po absorbování excitačního UV záření emitují záření o vyšší vlnové délce – fluorescenční.
  - *refraktometrické* – univerzální, ale málo citlivé ( $10^{-6}$  g/ml). Je třeba pracovat za konstantní teploty a pouze při izokratické eluci. Analyzovanou látku detekují stanovením rozdílného indexu lomu samotné mobilní fáze a eluátu.
  - *elektrochemické* – vysoce citlivé ( $10^{-9}$  až  $10^{-12}$  g/ml). Využívají se k detekci látek schopných elektrochemické reakce, která probíhá na fázovém rozhraní elektroda – mobilní fáze. [1,2]
  - *hmotnostní (MS detektory)* – vysoce selektivní a citlivé ( $10^{-10}$  až  $10^{-12}$  g/ml). Na začátku je třeba odstranit mobilní fázi. Vzorek je pak převeden do plynné fáze a ionizován. Nejčastější ionizační technikou užívanou ve spojení s HPLC je ionizace elektrosprejem. Jedná se o šetrnou techniku, probíhající za atmosferického tlaku. Dalšími možnými technikami jsou: chemická ionizace za atmosferického tlaku, fotoionizace za atmosferického tlaku nebo ionizace laserem za účasti matrice. Vzniklé molekulární a fragmentární ionty jsou v akcelerační komoře urychleny. V magnetickém nebo vysokofrekvenčním poli jsou poté separovány podle různého poměru hmotnosti a náboje a zaznamenáno hmotnostní spektrum. [1,2,7]

- **Vyhodnocovací zařízení**

Zpracovává signál přicházející z detektoru. Jedná se o počítač s příslušným chromatografickým softwarem, který rovněž ovládá celý chromatograf. Výsledný záznam chromatografické analýzy představuje chromatogram složený z elučních křivek, tzv. píků. [1]

### **2.2.2. Mobilní fáze**

Na složení mobilní fáze závisí chromatografické charakteristiky jako je například retenční čas, účinnost kolony, citlivost nebo rozlišení. V případě normální fázové chromatografie se používají nepolární mobilní fáze (např. hexan, heptan, chloroform, methylenchlorid). Mobilní fáze u reverzních fází jsou látky polární. Používají se směsi vody nebo vodného pufru a organických rozpouštědel. Nejčastějšími rozpouštědly jsou acetonitril, methanol a tetrahydrofuran, dále lze využít i propan-2-ol. Molekuly rozpouštědla pokrývají povrch stacionární fáze, se kterou spolu s rozpuštěnou analyzovanou látkou interagují.

### **2.2.3. Stacionární fáze**

#### **Normální vs. obrácené fáze**

V současné době se v chromatografii více využívají tzv. obrácené neboli reverzní fáze (RP – reverse phase). Jedná se o nepolární stacionární fáze. Zpočátku používaný polární nemodifikovaný silikagel (oxid křemičitý) nebo oxid hlinitý, jenž má větší afinitu ke stejně nabitým látkám, byl chápán jako „normální“. Zatímco reverzní fáze s kovalentně vázanými alkylovými řetězci více zadržují nepolární látky a pořadí eluce je tak obrácené. [1]

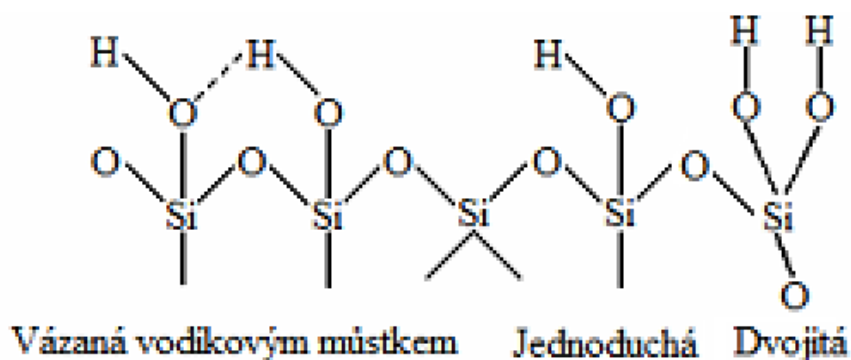
#### ***Porézní stacionární fáze***

Porézní stacionární fáze mají v HPLC stále podstatné místo. Zpočátku se používal pouze čistý silikagel. Později byly vyvinuty chemicky modifikované fáze a nepravidelný tvar částec silikagelu byl změněn ve sférický, čímž se zlepšily chromatografické vlastnosti kolony (např. separační účinnost). Zvýšení separační

účinnosti se dosáhlo i zmenšením zrn sorbentu. Difúze mobilní fáze póry stacionární fáze se tak zrychlila. [8]

Základním materiálem pro výrobu stacionárních fází je silikagel. Nejčastěji se používá jeho porézní amorfnní forma s velikostí částic 3 – 5  $\mu\text{m}$ . Molekula silikagelu se skládá z atomů křemíku spojených s kyslíkem siloxanovými vazbami. Dále obsahuje hydroxylové skupiny (z původní polymerní kyseliny křemičité). Tyto skupiny přidělují sorbentu polární vlastnosti. Zároveň se účastní reakce při přípravě chemicky vázaných fází. Rozlišujeme několik typů silanolových skupin (viz obr. 3):

- vázané vodíkovým můstkem
- jednoduché – vicinální (k atomu křemíku je připevněna pouze jedna hydroxylová skupina)
- dvojité – geminální (dvě jednoduché silanolové skupiny napojené na společný atom křemíku)



Obr. 3 – Druhy silanolových skupin

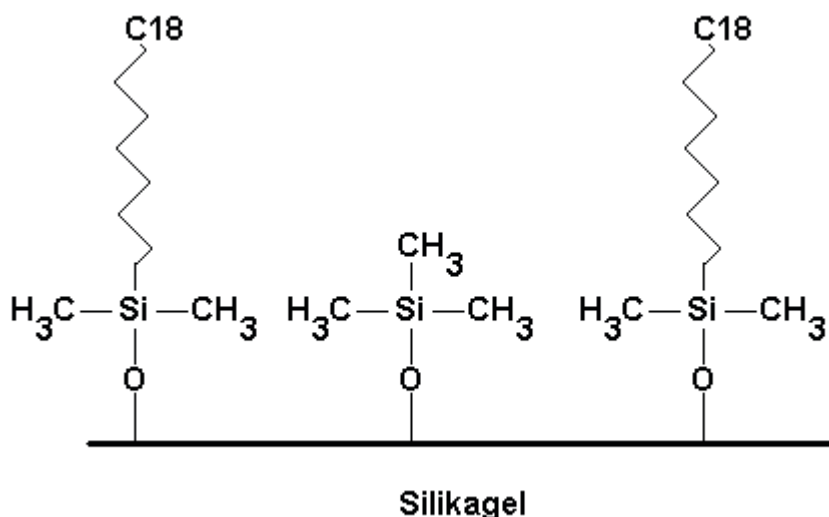
Silikagel má charakter měniče kationtů. Tato vlastnost je dána přítomností silanolových skupin. V prostředí pufrů jsou protony těchto skupin vyměňovány za kationty analytů a to především v závislosti na pH mobilní fáze a pKa silanolových skupin (vykazují různou kyselost). [8]

Chemicky vázané stacionární fáze vznikají většinou reakcí daného organosilanu (např. ethoxydi(methyl)oktadecylsilanu) se silikagelem. Na hydroxylové skupiny na povrchu silikagelových zrn jsou vhodnou chemickou reakcí navázány různé radikály. Jedná se buď o alkylový zbytek hydrofobního charakteru (tzv. reverzní fáze), nejčastěji oktyl (C8) nebo oktadecyl (C18) nebo kratší uhlíkatý řetězec C2 – 3 s navázanou

polární funkční skupinou -CN, -OH, -NH<sub>2</sub>, -COOH (středně polární fáze). Při této reakci (silanizace) zreaguje pouze asi poloviční množství silanolových skupin. [1,8]

Zbylé silanoly jsou příčinou nežádoucích interakcí během separace. A to převážně u látek bazické povahy. Ty mohou být protonizovány a zadrženy elektrostatickou interakcí na deprotonovaných silanolových skupinách. V důsledku těchto iontovýměnných interakcí dochází ke snížení separační účinnosti a k chvostování píků. Protonizaci bází lze snížit zvýšením pH. Silikagel se však za těchto podmínek rozpouští a kolona ztrácí separační vlastnosti. Stejně tak je nestabilní při pH menším než 3. V tomto případě dochází k hydrolyze chemicky vázaného organického ligandu. V současnosti se pro výrobu modifikovaných reverzních fází používají velmi čisté silikagely, tzv. bazicky deaktivované fáze, které lze použít i u bazických látek při kyselém nebo neutrálním pH. Silikagel je nestabilní i za vysoké teploty (max. 60 °C). Zvyšováním teploty dochází k rychlejší degradaci sorbentu. Tento jev se projeví především při extrémních hodnotách pH. Nejvýhodnější je proto pracovat pouze v rozmezí pH 3 až 9.

Počet volných silanolových skupin lze snížit dodatečnou modifikující chemickou reakcí s organosilanem malých rozměrů. Používá se například trialkylchlorsilan, který díky své velikosti snáze proniká k povrchu silikagelu. Zvyšuje se tak stabilita sorbentu v alkalickém prostředí. Tento fyzikálně – chemický děj se nazývá endcapping (viz obr. 4). [8]



Obr. 4 - Grafické znázornění endcappingu [9]

### ***Neporézní stacionární fáze***

Skládají se pevného jádra a velmi tenké povrchové vrstvy, kterou tvoří interakční stacionární fáze. Částice, založené na oxidu křemičitém nebo polymeru, měří v průměru 1,5 – 2,5  $\mu\text{m}$ . Tyto fáze byly vyvinuty k urychlení přenosu hmoty nepohyblivou fází. Na druhou stranu mají ale malou sorpční kapacitu a lehce se přetíží. Nelze je použít pro preparativní separaci. [6,8]

### ***Povrchově porézní stacionární fáze***

Narozdíl od neporézních sorbentů mají větší průměr jádra (5  $\mu\text{m}$ ) i sorpční kapacitu. Tlak na koloně je nižší. Ve srovnání s plně porézními sorbenty jsou účinnější. [8]

### ***Perfuzní stacionární fáze***

Byly vyvinuty koncem 80. let 20. století. Jedná se o polymerní sorbenty s velikostí částic nad 12  $\mu\text{m}$ . Vyznačují se vysokou separační účinností a slouží hlavně k dělení biomakromolekul (např. proteiny). Dobrou sorpční kapacitu poskytují difuzní póry, tvořící větší část povrchu stacionární fáze. Zbylou část vyplňují tzv. „through pores“, které jsou rozměrově větší. [6,8]

### ***Monolitické stacionární fáze***

Jsou tvořeny jedním kusem porézní hmoty. Obsahují stejně jako perfuzní sorbenty dva druhy pórů (průtočné a mezopóry) s odlišnou velikostí, jimiž ale prostupuje všechna mobilní fáze. Proto jsou separace pomocí monolitů rychlejší. [8]

Výhodou monolitických fází oproti klasickým plněným kolonám je možnost měnit a optimalizovat vnitřní strukturu monolitů, tj. velikost průtočných pórů a mezopórů a tím ovlivnit chromatografickou separaci. [21]

### ***Reverzní fáze založené na oxidech hliníku, zirkonia a titanu***

K vyvinutí těchto fází vedly nestabilní vlastnosti silikagelu. Oxidy hliníku, zirkonia a titanu jsou narozdíl od silikagelu stabilní v silně alkalickém prostředí a to i za vysokých teplot. Vyšší teplota má za následek nižší poklesy tlaku, užší píky, rychlejší analýzy, různou selektivitu a vyšší efektivitu. Sníží se i viskozita mobilní fáze. Je tak možné pracovat za vyšší rychlosti toku. [10]

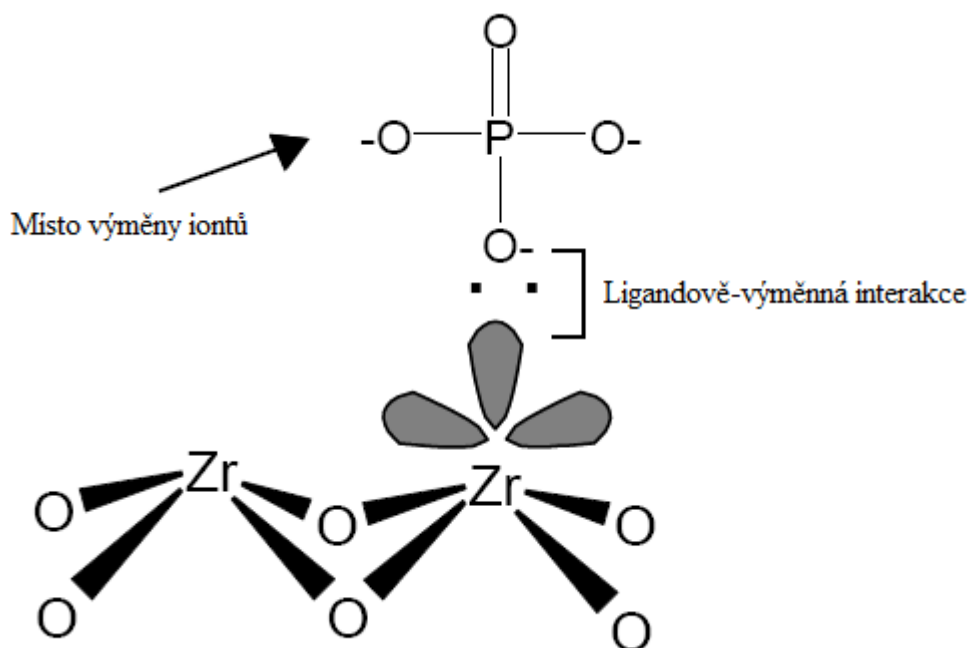


Oxid zirkoničitý je odolný v celém rozsahu pH (1 – 14) a může být použit při teplotách až 200 °C (za použití speciálního hardwaru). Oxid hlinitý se v kyselém prostředí rozpouští. Mechanická odolnost vůči tlaku je srovnatelná nebo lepší než u silikagelu. Narozdíl od silikagelu mají i jiné chemické vlastnosti. Kyselý povrch uděluje silikagelu vlastnosti katexu. Výše uvedené anorganické oxidy mají amfoterní charakter, proto mohou být využity jako měniče kationtů i aniontů. Děje se tak v závislosti na pH mobilní fáze. Na jejich povrchu se nachází místa s vlastnostmi Lewisových kyselin. Pomocí nich se uskutečňují interakce na bázi ligandové výměny. [9,11,12]

#### **2.2.4. Oxid zirkoničitý**

Oxid zirkoničitý má v porovnání se silikagelem řadu pozitivních vlastností. S výhodou se může použít k separaci silně bazických nebo kyselých látek, které se na reverzních fázích lépe zadržují, pokud nejsou ionizovány. Ionizovaný stav je ovlivnitelný hodnotou pH mobilní fáze. Oxid zirkoničitý je stabilní v celém rozmezí hodnot pH. Tato vlastnost závisí na druhu reverzní fáze.

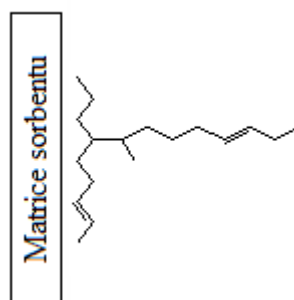
Lze jej použít i za vysokých teplot. Částice oxidu zirkoničitého nebobtnají, nedochází ani k jejich kompresi narozdíl od polymerních stacionárních fází. Využívají se sférické, porézní částice o rozměrech 3 nebo 5  $\mu\text{m}$ . Kromě reverzně-fázového módu se uplatňuje i iontově-výměnný. Na povrchu oxidu zirkoničitého se nachází místa charakteru silných Lewisových kyselin (viz obr. 5). Proto se do mobilní fáze přidávají pufrů charakteru Lewisových bazí (fluorid, fosforečnan, acetát), které kompenzují silné interakce těchto míst s hydroxylovými, fosfátovými nebo karboxylovými skupinami analyzovaných látek. Lewisovy baze podstupují s Lewisově kyselými místy na povrchu oxidu zirkoničitého ligand-výměnné reakce. Prostřednictvím naadsorbovaných iontů pufru se na sorbentu uskutečňují iontově-výměnné reakce s ionty analytů. [8,9,11]



Obr. 5 – Oxid zirkoničitý jako silná Lewisova kyselina [11]

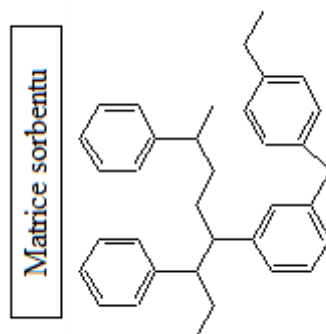
Oxid zirkoničitý se jako sorbent používá ve formě chemicky vázaných stacionárních fází:

- **Zr-PBD**, na povrchu oxidu zirkoničitého je navázán polybutadien (viz obr. 6). Separáčními vlastnostmi je Zr-PBD velmi podobný oktadecylovým vázaným fázím se silikagelovou maticí, není ale tak hydrofobní. Navíc je tento sorbent odolný při extrémních hodnotách pH (1-14) a za vysokých teplot. Při speciálním technickém vybavení lze pracovat i při 100 až 150 °C. Používá se při separaci bází (aminů). Pracuje na základě reverzně-fázového i iontově-výměnného mechanismu. Různé ionty pufrů dávají velmi různou selektivitu. Při hodnotě pH pod  $pK_a$  bazického analytu dochází k výměně kationtu baze s anionem pufru navázaným na povrchu sorbentu. Tím dochází k zadržení prostřednictvím iontových interakcí. Pokud je pH nastavené pod hodnotu  $pK_a$ , za retenci jsou zodpovědné reverzní fázové interakce. [11, 13]



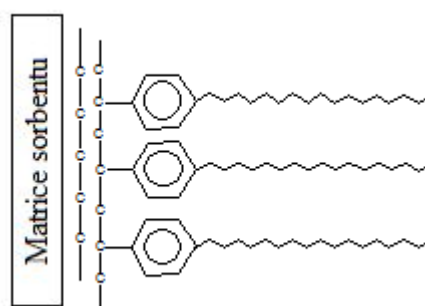
Obr. 6 – Zr-PBD

- **Zr-MS**, modifikace Zr-PBD – deaktivovaný povrch. Je specificky určený pro kapalinovou chromatografii spojenou s hmotnostním detektorem (LC-MS), zvláště při chromatografii bazických směsí. V porovnání s reverzními fázemi založenými na oxidu křemičitém jsou bazické látky ve větší míře na koloně zadržovány. Vykazuje chemickou stabilitu v rozmezí hodnot pH 1 – 10. Teplotní stabilita této fáze je omezena na 50 °C. Je vhodná pro analýzu kyselých, neutrálních i bazických látek a to i ve směsi. [14]
- **Zr-PS**, povrch oxidu zirkoničitého je pokryt zesíťovaným polystyrenem (viz obr. 7). Využívá se spolu s mobilními fázemi obsahujícími menší množství organického rozpouštědla. Zr-PS lze použít k separaci hydrofobních a bazických látek (aminy). Jedná se o alternativu oktadecylových sorbentů. Funguje prostřednictvím obráceně-fázového mechanismu, ale s menší retencí. Při použití speciálního hardwaru lze provést analýzu při teplotách 100 až 200 °C. [11]



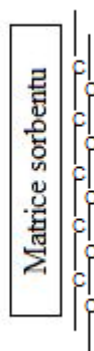
Obr. 7 – Zr-PS

- **Zr-CarbonC18**, částice oxidu zirkoničitého jsou pokryty vrstvou uhlíku, která je dodatečně modifikována kovalentně vázanými oktadecylovými ligandy (viz obr. 8). Může být použit při teplotách do 100 °C, při speciální úpravě i v rozmezí teplot 100 až 200 °C. Selektivitou se zcela odlišuje od oktadecylových fází se silikagelovou matricí. Vyniká svojí univerzálností, může být využit k separaci látek kyselých, neutrálních i bazických. Při separaci se uplatňuje rozdělovací mechanismus. Jednou z výhod částic uhlíku jako nosiče je jeho schopnost rozlišovat molekulové tvary, narozdíl od řetězců C18, které se přizpůsobí tvaru molekuly, uhlíkový povrch je rigidní. [11]



Obr. 8 – Zr-CarbonC18

- **Zr-Carbon**, matrice oxidu zirkoničitého je pokryta souvislou vrstvou uhlíku (viz obr. 9). Povrch je velmi hydrofobní. Zr-Carbon lze použít pro separaci geometrických izomerů a diastereomerů. Není vhodný k dělení aromatických sloučenin s planární strukturou (jsou velmi silně zadržovány). Při speciální úpravě zvládne teploty v rozmezí 100 až 200 °C. [11]



Obr. 9 – Zr-Carbon

Podobně jako u kolon založených na silikagelu existují i kolony na bázi oxidu zirkoničitého pro separaci chirálních látek (např. *ZirChrom<sup>®</sup>-Chiral*). Chirální zirkoničité stacionární fáze mají podobnou rozlišovací schopnost pro enantiomery jako sorbenty na bázi oxidu křemičitého. Chirální selektory mohou být zcela odstraněny promytím silně zásaditým roztokem (nad hodnotu pH 12) a jsou snadno regenerovatelné. [14]

Ve fázi výzkumu se nachází monolitické stacionární fáze založené na oxidu zirkoničitém. Spojují výhody tepelné a chemické odolnosti oxidu zirkoničitého a nízkého protitlaku monolitických fází.

### 2.2.5. Analytické hodnocení látek pomocí HPLC

Pomocí chromatografie lze provést kvalitativní i kvantitativní analýzu separovaných složek směsi. Chromatografický záznam – chromatogram umožňuje určit identitu, obsah a čistotu analyzovaných látek.

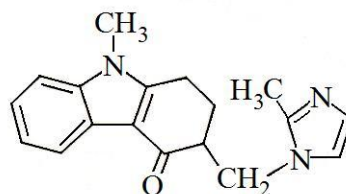
Při kvantitativní analýze se využívá plocha, případně výška chromatografického píku. Existuje několik metod:

- *Metoda vnějšího standardu* – nejdřív se na kolonu nastříkuje roztok stanovovaného vzorku, poté roztok vnějšího standardu. Koncentrace látek se vypočítá z poměru ploch, příp. výšek píků analyzovaných látek a vnějšího standardu. [1]
- *Metoda vnitřního standardu* – je přesnější, protože není zatížena chybou dvojího nástřiku. Určitý objem roztoku vzorku se smíchá se známým objemem roztoku vnitřního standardu. Vnitřní standard musí být chemicky inertní, musí mít podobnou koncentraci jako analyzované látky a eluovat se v blízkosti jejich píků. Koncentrace analyzovaných látek se rovněž vypočítá z poměru ploch, příp. výšek píků analytu a vnitřního standardu. Obsah látek lze vypočítat z chromatogramů opakovaných nástřiků. [2]
- *Metoda normalizace* – množství analyzovaných látek v procentech se vypočítá z ploch jako procento celkové plochy všech píků (kromě píků rozpouštědel, reakčních činidel a píků, které se nachází v limitu zanedbatelnosti).

- *Kalibrační postup* – nejdříve se vypočítá kalibrační funkce prostřednictvím vztahu mezi měřeným nebo vyhodnoceným signálem a množstvím (koncentrace, hmotnost apod.) analyzované látky. Množství dané látky se získá výpočtem ze změřeného nebo vyhodnoceného signálu pomocí inverzní funkce. [4]

Ke kvalitativní analýze se používají eluční parametry látky. Nejčastěji se při identifikaci srovnávají retenční (eluční) časy analyzovaných látek s časy standardních látek. Retenční čas  $t_R$  je doba od nástřiku analytu na kolonu do maxima píku. Problém nastává u strukturně podobných látek, které mají velmi podobné retenční časy. Z tohoto důvodu je potřeba k ověření totožnosti dané látky použít více chromatografických podmínek (např. změna stacionární fáze). K potvrzení je možné použít i hmotnostní detektor. Stejně tak lze využít i tzv. retenční (eluční) objem  $V_R$ . Jedná se o objem mobilní fáze, který proteče kolonou během eluce dané látky. Retenční čas a retenční objem jsou si při konstantní rychlosti mobilní fáze úměrné:  $V_R = t_R \cdot F_m$ . [2,3]

### 2.3. Ondansetron a jeho nečistoty



Obr. 11 – Ondansetron

Ondansetron – chemickým názvem (RS)-2,3-dihydro-9-methyl-3-[(2-methylimidazol-1-yl)methyl]karbazol-4(1H)-on ( $C_{18}H_{19}N_3O$ , Mr = 293,36 g/mol) – obsahuje ne méně než 98,0 % a ne více jak 102,0 %  $C_{18}H_{19}N_3O$ . [15,16,19]

Používá ve formě hydrochloridu. Jedná se o bílý až šedobílý prášek bez zápachu s teplotou tání 178 – 180 °C. Je špatně rozpustný ve vodě a lihu, rozpustný v methanolu. [15]

Patří do skupiny antagonistů serotoninových 5-HT<sub>3</sub> receptorů působících v periférii i v chemorecepční spouštěcí zóně. Je vysoce specifický, proto nevyvolává

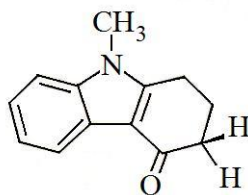
sedaci. Používá se k profylaxi i terapii nauzey a zvracení, především vyvolaných cytostatiky, radioterapií nebo po operaci. Není účinný u kinetóz. Lze jej aplikovat parenterálně (intravenózně, intramuskulárně), perorálně nebo rektálně. Účinek zvyšuje kombinace s kortikosteroidy (methylprednison, dexamethason). Ondansetron má krátký biologický poločas (3 – 4 hodiny). Metabolizuje se v játrech. [17, 18]

V Americkém lékopisu (United States Pharmacopoeia, USP) byl ondansetron poprvé uveden ve 24. vydání, v Evropském lékopisu (European Pharmacopoeia, Ph. Eur.) o několik let později (5. vydání). Ke chromatografickému hodnocení ondansetronu používají (USP a Ph. Eur.) mobilní fázi složenou z acetonitrilu a 0,02 M fosforečnanového pufru (pH 5,4 – přidáním 1 M nebo 0,5 M hydroxidu sodného) (48:52, V/V) a stacionární fázi založenou na silikagelu (kolona 4,6 mm x 25 cm). Analýza probíhá při 30 °C. Rychlost průtoku mobilní fáze kolonou je nastavena na 1,5 ml/min. Výsledek analýzy je detekován UV detektorem při vlnové délce 216 nm. Hodnotí se jak totožnost ondansetronu, tak přítomnost jemu podobných nežádoucích látek. Využívají se při tom roztoky standardních referenčních látek. [19,20]

Ve vědeckých studiích jsou zkoušeny k separaci ondansetronu a jeho lékopisných nečistot (viz obr. 12 – 16) různé chromatografické kolony se stacionárními fázemi založenými na silikagelu nebo s fázemi na bázi oxidu kovů (ZrO<sub>2</sub>, TiO<sub>2</sub>). Kolony Zorbax SB-Aq a Supelco-CN (modifikované silikagelové fáze – CN a C18) se ukázaly jako nevhodné pro separaci výše uvedených látek (nedostatečné rozdělení píků nečistot, dlouhá doba analýzy). Podobně dopadla separace na kolonách DiamondBond<sup>®</sup>-C18 (Zr-CarbonC18) a Discovery<sup>®</sup>Zr-PS (Zr-PS). Celková doba analýzy trvala okolo 88 a 32 minut a byly získány nevhodné tvary některých píků. [10]

Lepších výsledků bylo dosaženo na kolonách Sachtopore<sup>®</sup>-RP (TiO<sub>2</sub>-PE) a ZirChrom<sup>®</sup>-PBD (Zr-PBD). Optimální podmínky pro separaci ondansetronu a jeho nečistot na koloně TiO<sub>2</sub>-PE byly získány následující: mobilní fáze – acetonitril : fosforečnanový pufr (25 mM, pH 6) (18 : 82, V/V), teplota – 50 °C, rychlost průtoku – 1,5 ml/min. Detekce proběhla při vlnové délce 216 nm na DAD. Celková doba separace 9,5 min. Optimální chromatografické podmínky pro analýzu na koloně Zr-PBD se liší pouze v hodnotě pH – 7 a průtoku mobilní fáze – 2,7 ml/min. Celková doba separace je kratší – 7,5 min. Kolony Zr-PBD a TiO<sub>2</sub>-PE jsou si navzájem vhodnými alternativami. [10,22]

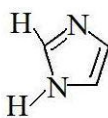
Ostatní studie se zabývají chromatografickou analýzou ondansetronu v lidské plazmě. (viz tab. 1).



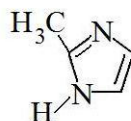
Obr. 12 – Nečistota C (9-methyl-1,2,3,9-tetrahydro-4H-carbazol-4-on)



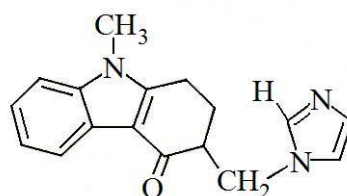
Obr. 13 – Nečistota D (9-methyl-3-methylen-1,2,3,9-tetrahydro-4H-karbazol-4-on)



Obr. 14 – Nečistota E (1H-imidazol)



Obr. 15 – Nečistota F (2-methyl-1H-imidazol)



Obr. 16 – Nečistota G ((RS)-2,3-dihydro-9-methyl-3-[(imidazol-1-yl)methyl]karbazol-4(1H)-on)



Tab. 1 – HPLC analýza ondansetronu v lidské plazmě

Úprava vzorku	Chromatografická kolona	Složení mobilní fáze	Rychlost toku	Detekce	Limit kvantifikace	Retenční čas	Citace
Extrakce rozpouštědlem (LE)	Ultron ES-OVM s chirální stacionární fází (150 mm x 4,6 mm; 5 µm) (20 °C)	Methanol : 5 mM amoniak : kyselina octová (20:80:0,02; V/V/V)	0,4 ml/min	MS detektor API 4000 s trojitým kvadrupólem (m/z 294 → 170)	0,1 ng/ml	8,1 min. R-(–)- a 9,6 min. S-(+)-ondansetron	[23]
Extrakce kapalina-kapalina (LLE)	Phenomenex Luna C18(2) (250 mm x 4,6 mm; 5 µm)	Acetonitril : 0,05 M hydrogenfosforečnan sodný (pH 5) (20:80, V/V)	1,5 ml/min	UV detektor (305 nm)	0,6 ng/ml	11,3 min. (ondansetron)	[24]
Extrakce tuhou fází (SPE)	Chiracel OD-R (250 mm x 4,6 mm; 10 µm)	Acetonitril : 0,7 M chloristan sodný (35:65, V/V)	0,5 ml/min	UV detektor (210 nm)	15,0 ng/ml	22,05 min. R-(–)- a 19,13 min. S-(+)-ondansetron	[25]
SPE	Chiracel OD (250 mm x 4,6 mm; 10 µm) (23 °C)	Hexan : 95 % ethanol : propan-2-ol : acetonitril (65:25:10:1, V/V)	1 ml/min	UV detektor (216 nm)	10,0 ng/ml	9,9 min. R-(–)- a 11,5 min. S-(+)-ondansetron	[26]
LLE	Sperisorb (100 mm x 4,6 mm; 10 µm) (20-24 °C)	Acetonitril : 0,02 M fosforečnan sodný (pH 3) (60:40, V/V)	1,5 ml/min	UV detektor (305 nm)	0,5 ng/ml	3,9 min. (ondansetron)	[27]

### **3. CÍL PRÁCE**

Cílem této diplomové práce byla optimalizace chromatografických podmínek separace ondansetronu a jeho pěti nečistot z kolony Zr-PBD na kolonu Zr-MS (modifikovaná kolona Zr-PBD).

Hydrogenfosforečnan amonný použitý jako pufr při separaci na koloně Zr-PBD musel být kvůli nekompatibilitě s hmotnostním detektorem vyměněn za těkavý octan amonný. Změna pufru a chromatografické kolony vedla k nutnosti optimalizovat podmínky separace analyzovaných látek.

## **4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST**

## 4.1. Použité látky a přístroje

### Látky a chemikálie

- ondansetron (Zentiva a.s., ČR)
- nečistota C (Zentiva a.s., ČR)
- nečistota D (Zentiva a.s., ČR)
- nečistota E (Zentiva a.s., ČR)
- nečistota F (Zentiva a.s., ČR)
- nečistota G (Zentiva a.s., ČR)
- hydrogenfosforečnan amonný (Lach – Ner, ČR)
- octan amonný (Lach – Ner, ČR)
- aceton (Penta, ČR)
- acetonitril (Merck, ČR)
- methanol (Merck, ČR)
- deionizovaná voda čištěná pomocí Milli-Q systému, Millipore (Bedford, MA, USA)

### Přístroje

- digitální váhy HR-120, Helago spol. s.r.o., ČR
- acidimetr 333, Druopta, ČR
- ultrazvuková lázeň KLN Ultraschall, K10, SRN
- vodní vývěva

### Chromatografické kolony (Anoka, USA)

- ZirChrom<sup>®</sup>-PBD, 150 mm x 4,6 mm, velikost částic: 5 μm
- ZirChrom<sup>®</sup>-MS, 150 mm x 4,6 mm, velikost částic: 5 μm

### HPLC sestava (Shimadzu, Japonsko)

- čerpadlo LC-20AD
- degaser DGU-20A<sub>3</sub>
- autosampler SIL-20AC
- termostat CTO-20AC

- detektor DAD SPD-M20A
- komunikační jednotka CMB 20A
- software LC Solution ver. 1.21 SP1

## **4.2. Příprava roztoků vzorků a mobilní fáze**

### **Příprava roztoků vzorků**

Zásobní roztoky ondansetronu a jeho pěti nečistot byly připraveny rozpuštěním pevných látek v methanolu na koncentraci 1mg/ml.

Standardní roztoky vzorků byly připraveny naředěním zásobních roztoků pomocí methanolu na koncentraci 20 µg/ml.

### **Příprava mobilní fáze**

Mobilní fáze byla připravena smísením roztoku pufru (hydrogenfosforečnan amonný nebo octan amonný) a organické složky (acetonitril (ACN) nebo methanol (MeOH)) v příslušném poměru.

### **Příprava roztoku pufru**

Nejprve byla navážena příslušná pevná látka (octan amonný nebo hydrogenfosforečnan amonný). Navážka byla rozpuštěna v příslušné odměrné baňce vodou. Pomocí acidimetru a roztoků amoniaku nebo kyseliny octové nebo fosforečné bylo nastaveno pH 7. Poté byla baňka doplněna vodou po rysku. Připraveny byly 5, 10 a 25 mM roztoky pufrů. Nakonec byl roztok pufru zfiltrován přes nylonový filtr Agilent (0,45 µm, 47 mm, HTPS, ČR) prostřednictvím vodní vývěvy.

### 4.3. Chromatografické podmínky

- **Průtoková rychlost** mobilní fáze byla nastavena na hodnotu 1,5 ml/min a 0,5 ml/min.
- **Injekovaný objem vzorku** byl 5  $\mu$ l.
- **Teplota** nastavená na hodnotu 40 °C.
- **Detekce** probíhala při vlnové délce 216 nm.
- **Mrtvý objem** byl stanoven pomocí acetonu (1 mg/ml).

## **5. VÝSLEDKY A DISKUSE**

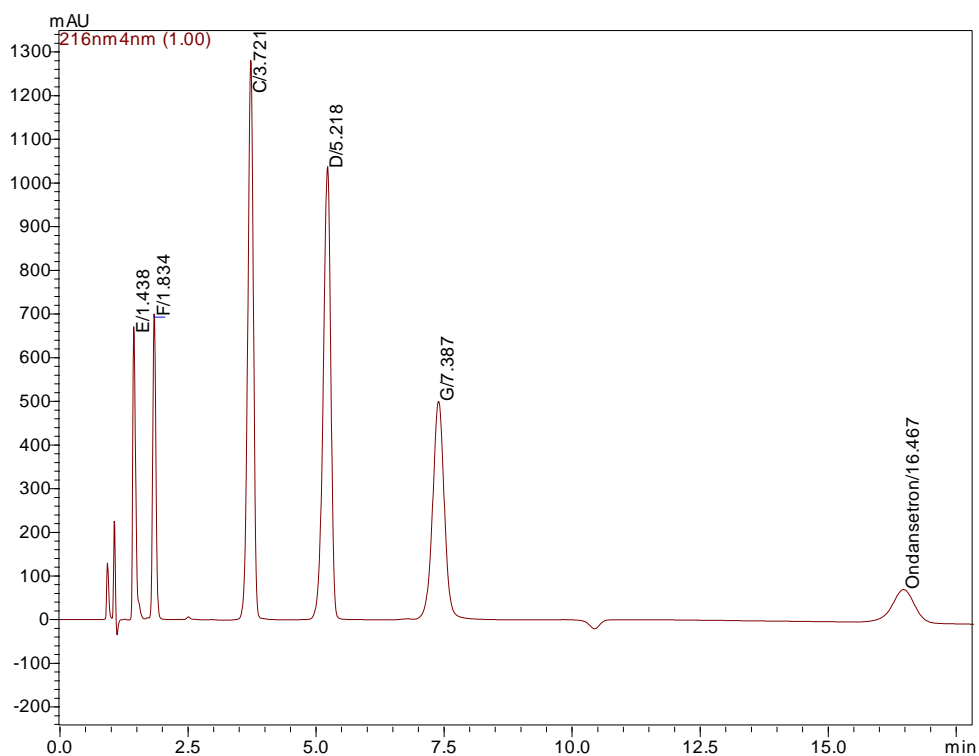


## 5.1. Optimalizace chromatografických podmínek

### 5.1.1. Kolona Zirchrom<sup>®</sup>-PBD

Separace ondansetronu a jeho pěti nečistot (C, D, E, F, G) na koloně Zr-PBD je optimální za následujících podmínek (viz obr. 17):

- mobilní fáze – acetonitril : fosforečnanový pufr (25 mM, pH 7) (18 : 82, V/V)
- průtoková rychlost – 1,5 ml/min
- teplota – 40 °C



Obr. 17 – Optimální chromatogram ondansetronu a jeho nečistot na koloně Zr-PBD

Za těchto chromatografických podmínek jsou píky jednotlivých nečistot zcela oddělené a pík ondansetronu dosahuje maxima v 16,5 min.

## 5.1.2. Kolona Zirchrom<sup>®</sup>-MS

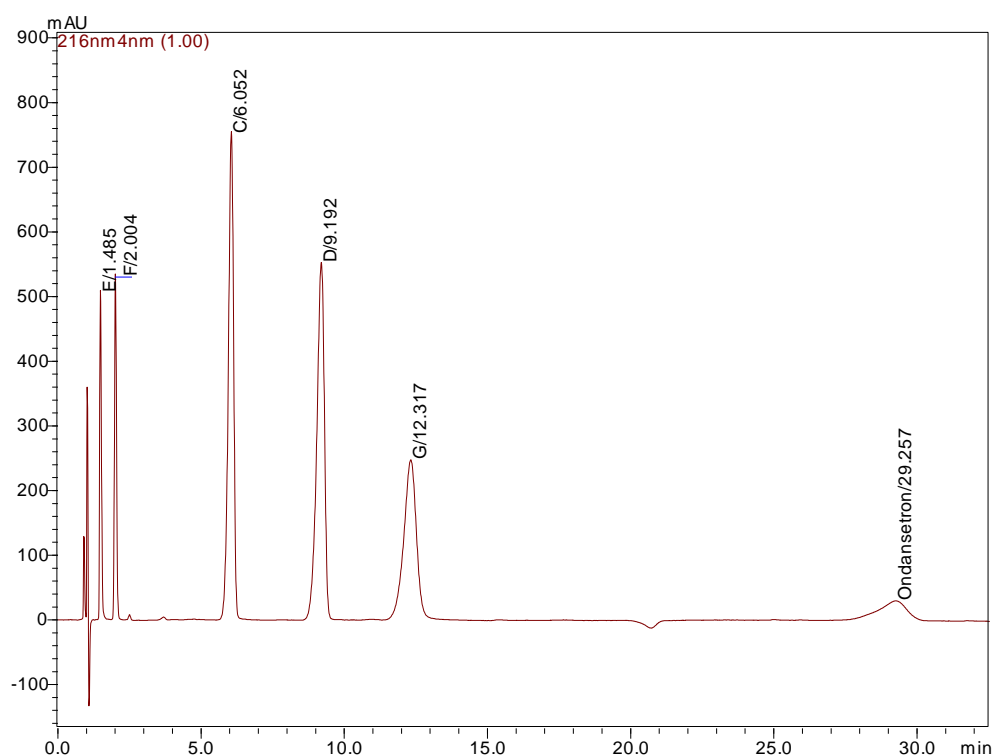
Změna kolony ze Zr-PBD na kolonu Zr-MS a výměna fosforečnanového pufru za těkavý octan amonný si vyžádala optimalizaci podmínek separace analyzovaných látek. Cílem bylo získání ostrých píků jednotlivých látek, oddělených až na základní linii, a vhodné doby celé analýzy. Byly zkoušeny různé koncentrace pufru (25 mM, 10 mM a 5 mM), různé organické složky (acetonitril, methanol) a poměry složek mobilní fáze:

- ACN : pufr – 18 : 82, 25 : 75, 30 : 70, 35 : 65, 40 : 60 (V/V) (viz tab. 2)
- MeOH : pufr – 50 : 50, 55 : 45 (V/V) (viz tab. 3).

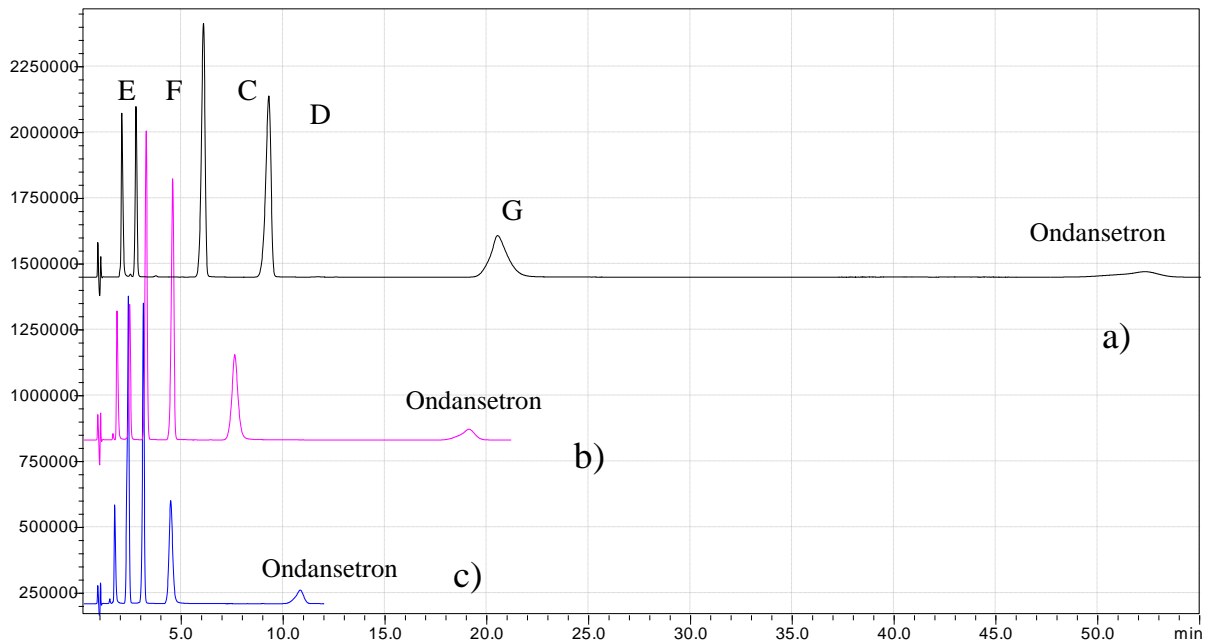
Tab. 2 - Optimalizace podmínek separace ondansetronu a jeho nečistot na koloně Zr-MS při rychlosti průtoku mobilní fáze 1,5 ml/min (acetonitril : pufr)

Mobilní fáze	Retenční časy jednotlivých látek (min)		Výsledek
Acetonitril : <b>fosforečnanový pufr</b> (25 mM) 18 : 82 (V/V)	C	6,052	Oproti separaci za stejných podmínek na koloně Zr-PBD se prodloužila délka analýzy (viz obr. 18).
	D	9,192	
	E	1,485	
	F	2,004	
	G	12,317	
	Ondansetron	29,257	
Acetonitril : <b>octanový pufr (25 mM)</b> 18 : 82 (V/V)	C	6,082	Změnou pufru se délka separace prodloužila až na 52 min. (viz obr. 19).
	D	9,290	
	E	2,073	
	F	2,770	
	G	20,525	
	Ondansetron	52,309	
Acetonitril : octanový pufr (25 mM) 25 : 75 (V/V)	C	3,268	Délka analýzy se zvýšením podílu acetonitrilu zkrátila na 19 min., nečistoty jsou od sebe odděleny (viz obr. 19).
	D	4,571	
	E	1,835	
	F	2,458	
	G	7,617	
	Ondansetron	19,116	
Acetonitril : octanový pufr (25 mM) 30 : 70 (V/V)	C	2,389	Dalším zvýšením koncentrace acetonitrilu v mobilní fázi došlo ke koeluci píků nečistot F a C, ondansetron dosáhl maxima píku v 10,8 min. (viz obr. 19).
	D	3,130	
	E	1,722	
	F	2,389	
	G	4,474	
	Ondansetron	10,835	
Acetonitril : octanový pufr ( <b>10 mM</b> ) 25 : 75 (V/V)	C	4,123	Snížením koncentrace pufru se oproti separaci za stejného poměru složek mobilní fáze prodloužily retenční časy látek, ondansetron dosáhl maxima píku až ve 35,6 min. (viz obr. 20).
	D	4,471	
	E	2,631	
	F	3,213	
	G	11,478	
	Ondansetron	35,653	

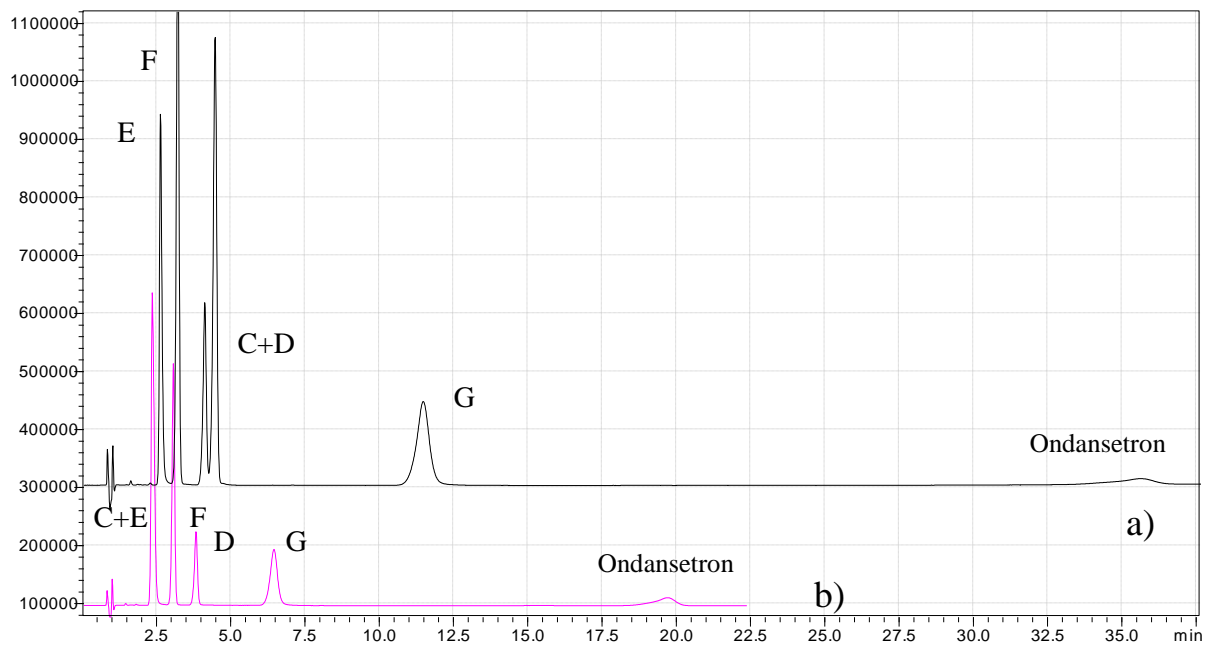
Acetonitril : octanový pufr (10 mM) 30 : 70 (V/V)	C	2,356	Zvýšením koncentrace organické složky v mobilní fázi došlo ke zkrácení retenčních časů látek, píky nečistot C a E koeluovaly (viz obr. 20).
	D	3,827	
	E	2,356	
	F	3,066	
	G	6,452	
	Ondansetron	19,701	
Acetonitril : octanový pufr (5 mM) 30 : 70 (V/V)	C	2,411	Snížením koncentrace pufru se protáhl retenční čas ondansetronu až na 37 min. (viz obr. 21).
	D	3,158	
	E	3,422	
	F	6,415	
	G	10,241	
	Ondansetron	37,432	
Acetonitril : octanový pufr (5 mM) 35 : 65 (V/V)	C	1,922	Zvýšením podílu acetonitrilu v mobilní fázi se retenční časy snížily (viz obr. 21).
	D	2,373	
	E	3,196	
	F	5,849	
	G	6,571	
	Ondansetron	22,700	
Acetonitril : octanový pufr (5 mM) 40 : 60 (V/V)	C	1,641	<b>Za těchto podmínek byla získána optimální separace všech látek a krátká doba celé analýzy (viz obr. 21).</b>
	D	1,922	
	E	3,059	
	F	5,512	
	G	4,395	
	Ondansetron	13,829	



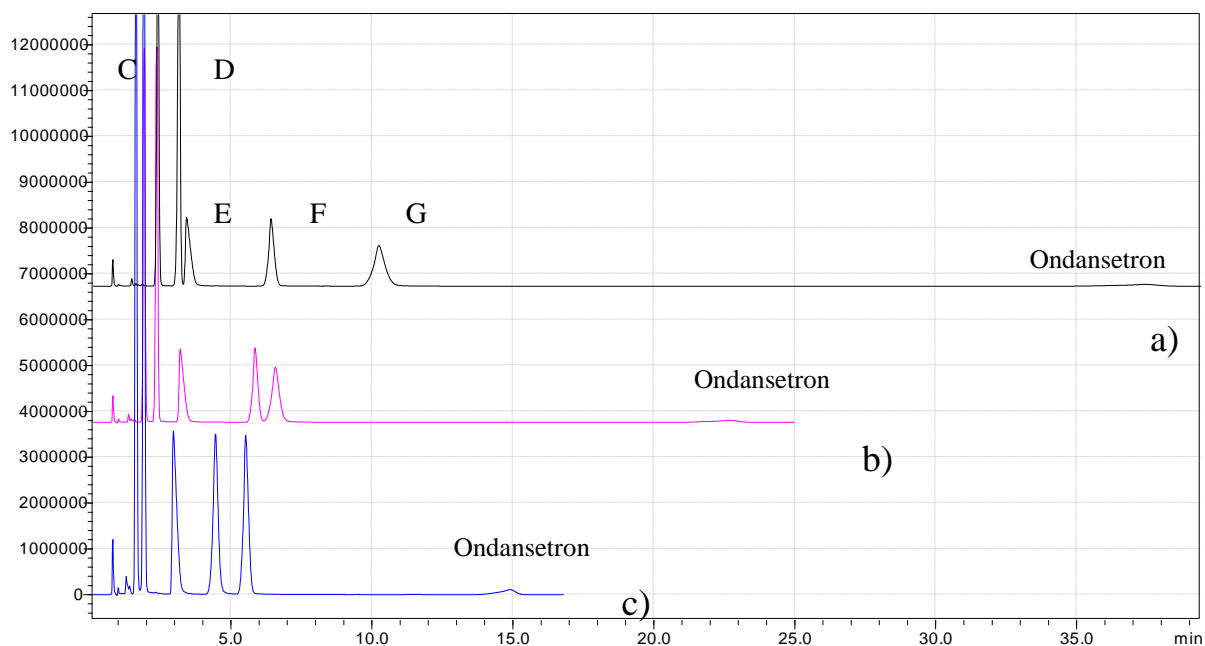
Obr. 18 – Chromatogram separace ondansetronu a jeho nečistot na koloně Zr-MS, podmínky: 40°C; 1,5 ml/min; acetonitril : fosforečnan amonný (25 mM, pH 7) (18 : 82, V/V)



Obr. 19 - Chromatogram separace ondansetronu a jeho nečistot na koloně Zr-MS, podmínky: 40°C; 1,5 ml/min; acetonitril : octanový pufr (25mM, pH 7), **a)** 18 : 82 (V/V), **b)** 25 : 75 (V/V), **c)** 30 : 70 (V/V) – koeluce píků nečistot C a F



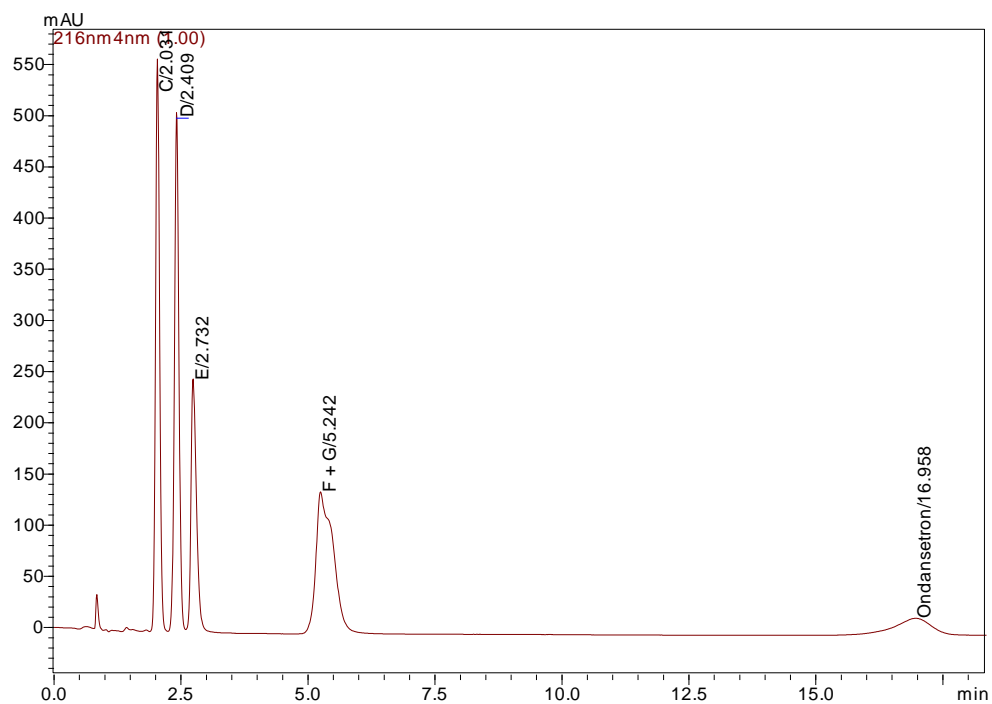
Obr. 20 - Chromatogram separace ondansetronu a jeho nečistot na koloně Zr-MS, podmínky: 40°C; 1,5 ml/min; acetonitril : octanový pufr (10 mM, pH 7), **a)** 25 : 75 (V/V), **b)** 30 : 70 (V/V)



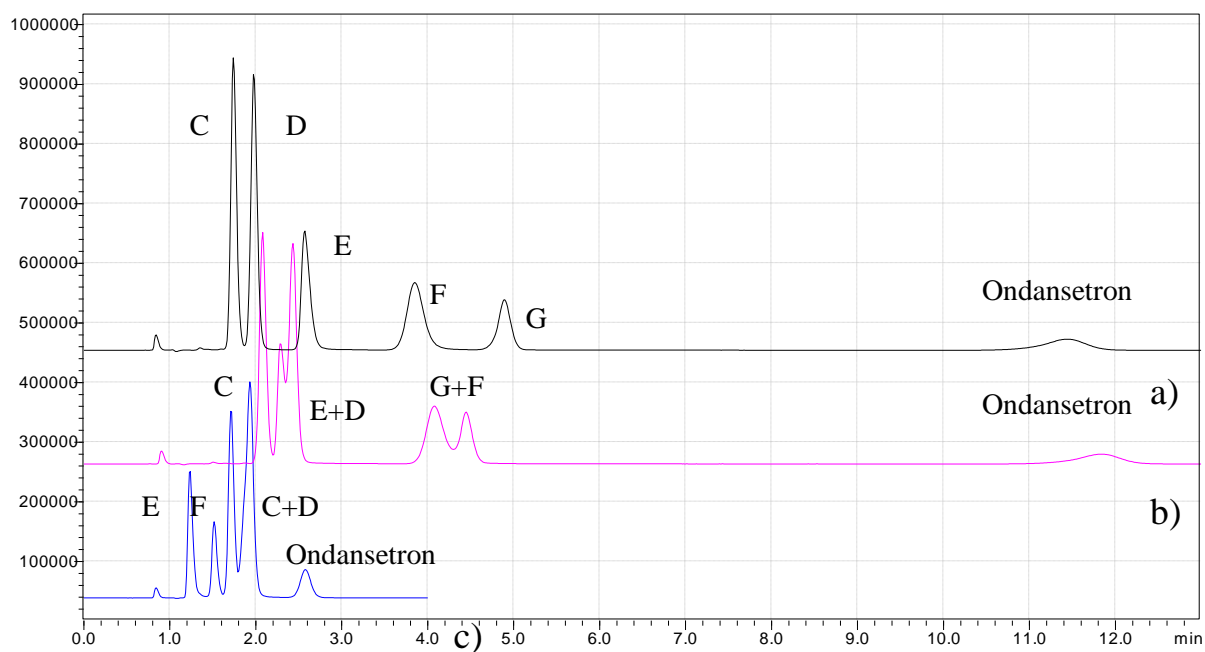
Obr. 21 - Chromatogram separace ondansetronu a jeho nečistot na koloně Zr-MS, podmínky: 40°C; 1,5 ml/min; acetonitril : octanový pufr (5 mM, pH 7), **a)** 30 : 70 (V/V), **b)** 35 : 65 (V/V), **c)** 40 : 60 (V/V) – změna pořadí píků nečistot F a G

Tab. 3 - Optimalizace podmínek separace ondansetronu a jeho nečistot na koloně Zr-MS při rychlosti průtoku mobilní fáze 1,5 ml/min (methanol : pufr)

Mobilní fáze	Retenční časy jednotlivých látek (min)		Výsledek
Methanol : octanový pufr (5 mM) 50 : 50 (V/V)	C	2,031	Při použití methanolu místo acetonitrilu došlo ke koeluci píků nečistot F a G, doba analýzy se prodloužila (viz obr. 22).
	D	2,409	
	E	2,732	
	F	5,242	
	G	5,242	
	Ondansetron	16,958	
Methanol : octanový pufr (5 mM) 55 : 45 (V/V), <b>pH 7</b>	C	1,734	Zvýšení podílu methanolu v mobilní fázi vedlo ke snížení retenčních časů, píky nečistot C a D jsou nedostatečně odděleny (viz obr. 23).
	D	1,971	
	E	2,563	
	F	3,844	
	G	4,886	
	Ondansetron	11,433	
Methanol : octanový pufr (5 mM) 55 : 45 (V/V), <b>pH 8</b>	C	2,074	Změnou pH na hodnotu 8 došlo ke koeluci všech píků nečistot (viz obr. 23).
	D	2,425	
	E	2,282	
	F	4,440	
	G	4,072	
	Ondansetron	11,832	
Methanol : octanový pufr (5 mM) 55 : 45 (V/V), <b>pH 9</b>	C	1,706	Hodnota pH 9 vedla k výraznému zkrácení doby analýzy až na 2,5 min., všechny píky nečistot jsou koeluovány (viz obr. 23).
	D	1,927	
	E	1,227	
	F	1,510	
	G	1,927	
	Ondansetron	2,571	



Obr. 22 - Chromatogram separace ondansetronu a jeho nečistot na koloně Zr-MS, podmínky: 40°C; 1,5 ml/min; methanol : octanový pufr (5 mM, pH 7) (50 : 50, V/V)

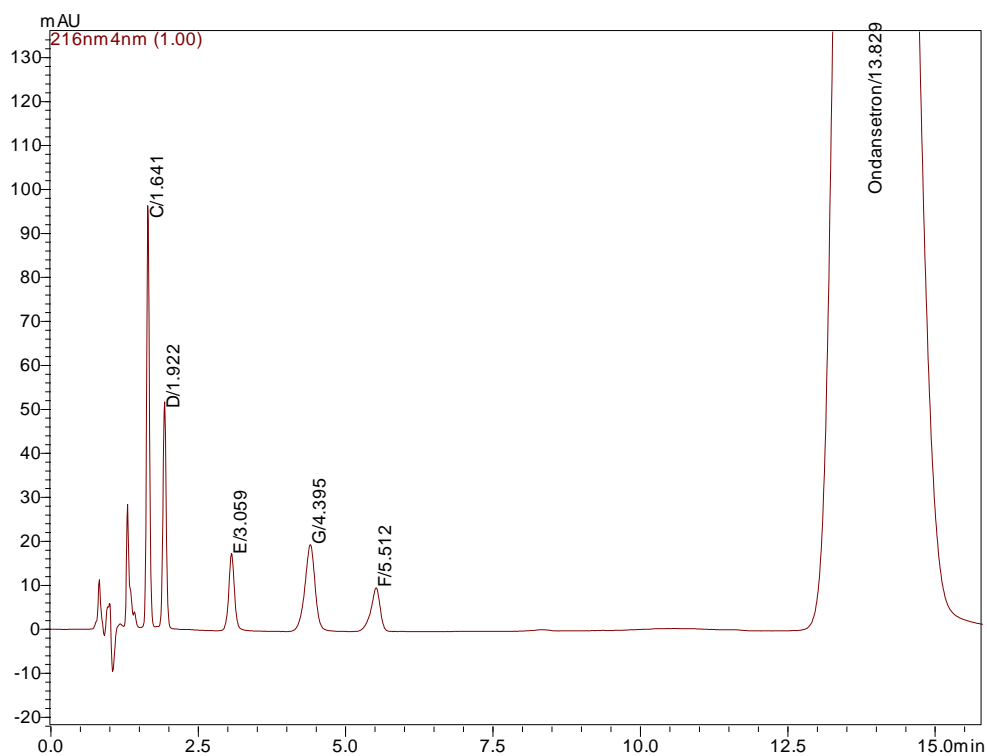


Obr. 23 - Chromatogram separace ondansetronu a jeho nečistot na koloně Zr-MS, podmínky: 40°C; 1,5 ml/min; methanol : octanový pufr (5 mM) (55 : 45, V/V), a) pH 7, b) pH 8, c) pH 9

Při použití methanolu jako organického činidla místo acetonitrilu sice celková doba analýzy nepřekračovala 17 min., došlo ale ke koeluci jednotlivých píků. Zvyšováním hodnoty pH ze 7 na 9 se koeluce prohlubovala.

Optimální podmínky pro separaci ondansetronu a jeho pěti nečistot (C, D, E, F, G) na koloně Zr-MS při rychlosti průtoku 1,5 ml/min (viz obr. 24):

- acetonitril : octanový pufr (5 mM, pH 7) – 40 : 60 (V/V)
- teplota – 40 °C



Obr. 24 – Optimální chromatogram separace ondansetronu a jeho nečistot na koloně Zr-MS při průtoku 1,5 ml/min, podmínky: 40 °C; acetonitril : octanový pufr (5 mM, pH 7) (40 : 60, V/V)

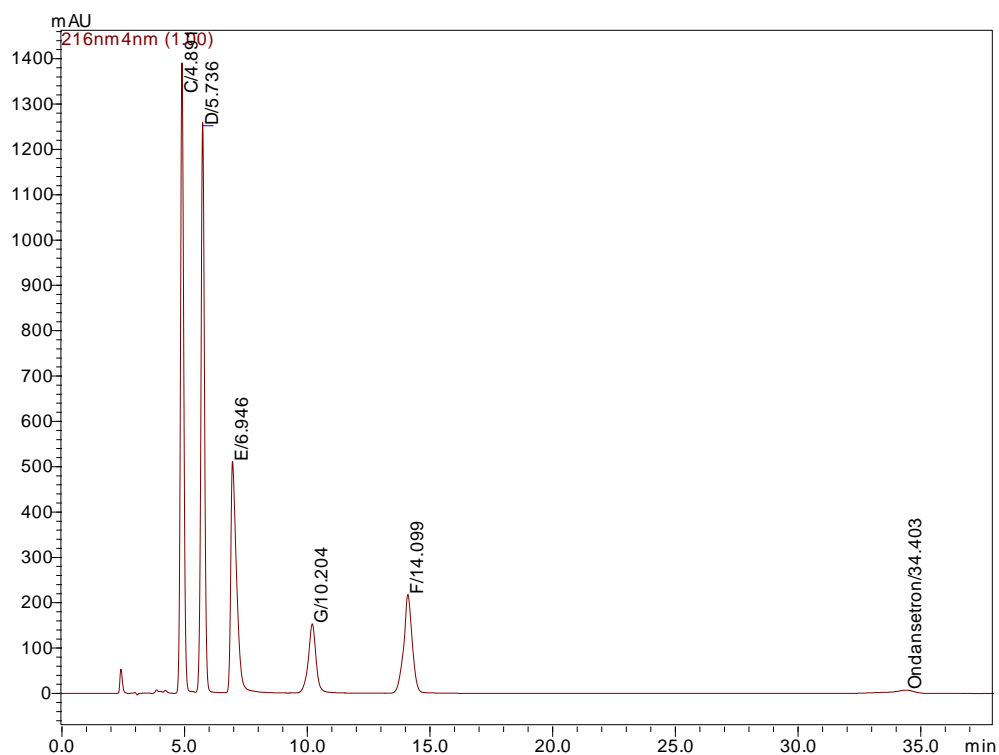
Pro detekci analýzy ondansetronu a jeho nečistot na hmotnostním detektoru je nutný nejen těkavý pufr, ale i nižší rychlost průtoku mobilní fáze. Proto byla rychlost snížena na **0,5 ml/min** a chromatografické podmínky byly optimalizovány prostřednictvím gradientová eluce (viz tab. 4).

Tab. 4 – Optimalizace podmínek separace ondansetronu a jeho nečistot na koloně Zr-MS při rychlosti průtoku mobilní fáze 0,5 ml/min (acetonitril : pufr)

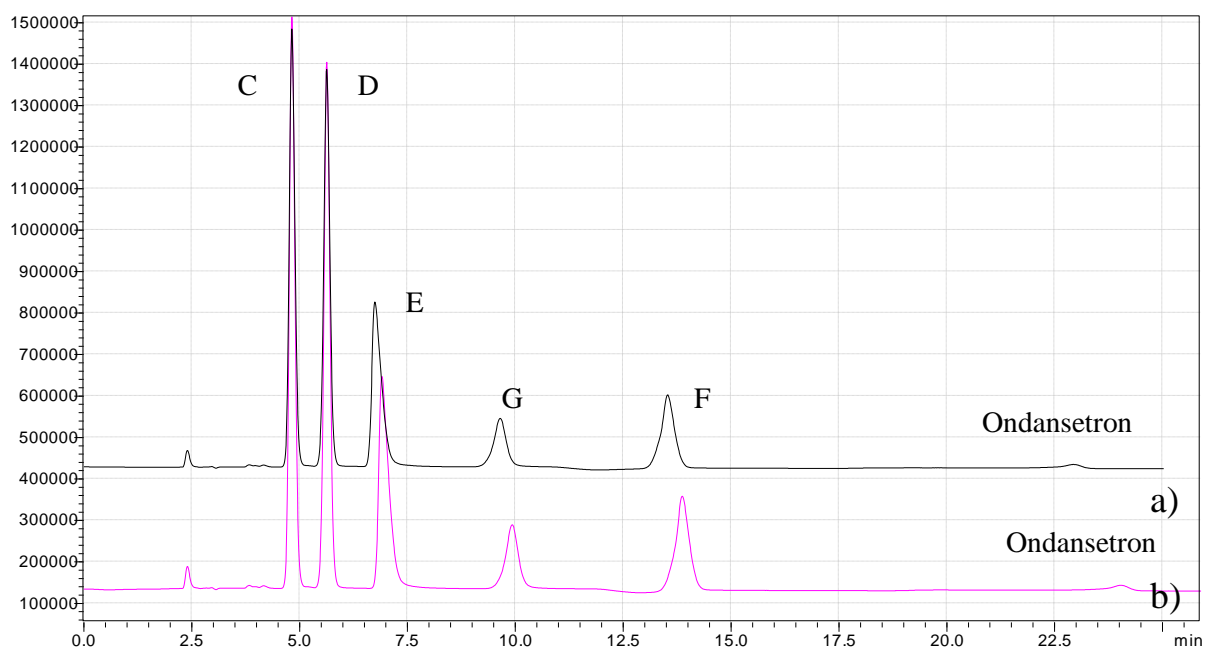
Mobilní fáze	Retenční časy jednotlivých látek (min)		Výsledek
Acetonitril : octanový pufr (5 mM) 40 : 60 (V/V)	C	4,891	Snížením průtokové rychlosti došlo ke zvýšení retenčního času ondansetronu ze 13,8 na 34 min. (viz obr. 25).
	D	5,736	
	E	6,946	
	F	14,099	
	G	10,204	
	Ondansetron	34,403	
Acetonitril : octanový pufr (5 mM) 0–7 min. ( <b>40</b> : <b>60</b> , V/V), 7–8 min. (40→50 : 60→50, V/V), 8–25 min. ( <b>50</b> : <b>50</b> , V/V)	C	4,815	Píky jsou oddělené, celková doba analýzy se mírně snížila (viz obr. 26).
	D	5,623	
	E	6,739	
	F	13,524	
	G	9,643	
	Ondansetron	22,931	
Acetonitril : octanový pufr (5 mM) 0–8 min. ( <b>40</b> : <b>60</b> , V/V), 8–9 min. (40→50 : 60→50, V/V), 9–25 min. ( <b>50</b> : <b>50</b> , V/V)	C	4,816	Retenční časy látek se téměř nezměnily (viz obr. 26).
	D	5,625	
	E	6,901	
	F	13,863	
	G	9,921	
	Ondansetron	24,029	
Acetonitril : octanový pufr (5 mM) 0–6 min. ( <b>40</b> : <b>60</b> , V/V), 6–7 min. (40→60 : 60→40, V/V), 7–25 min. ( <b>60</b> : <b>40</b> , V/V)	C	4,898	Za těchto podmínek došlo ke snížení retenčního času ondansetronu na 17 min. (viz obr. 27).
	D	5,717	
	E	6,112	
	F	12,166	
	G	8,741	
	Ondansetron	17,044	
Acetonitril : octanový pufr (5 mM) 0–13 min. ( <b>40</b> : <b>60</b> , V/V), 13–14 min. (40→60 : 60→40, V/V), 14–25 min. ( <b>60</b> : <b>40</b> , V/V)	C	4,905	Gradient ve 13–14 min. prodloužil dobu analýzy (viz obr. 27).
	D	5,725	
	E	6,476	
	F	12,842	
	G	9,298	
	Ondansetron	22,464	
Acetonitril : octanový pufr (5 mM) 0–16,5 min. ( <b>40</b> : <b>60</b> , V/V), 16,5–17,5 min. (40→60 : 60→40, V/V), 17,5–25 min. ( <b>60</b> : <b>40</b> , V/V)	C	4,899	Retenční časy látek nebyly výrazně ovlivněny (viz obr. 27).
	D	5,719	
	E	6,158	
	F	12,243	
	G	8,820	
	Ondansetron	23,846	
Acetonitril : octanový pufr (5 mM) 0–11,5 min. ( <b>40</b> : <b>60</b> , V/V), 11,5–12,5 min. (40→65 : 60→35, V/V), 12,5–25 min. ( <b>65</b> : <b>35</b> , V/V)	C	4,924	Doba separace látek se snížila na 20 min. (viz obr. 28).
	D	5,749	
	E	6,340	
	F	12,483	
	G	9,021	
	Ondansetron	20,375	



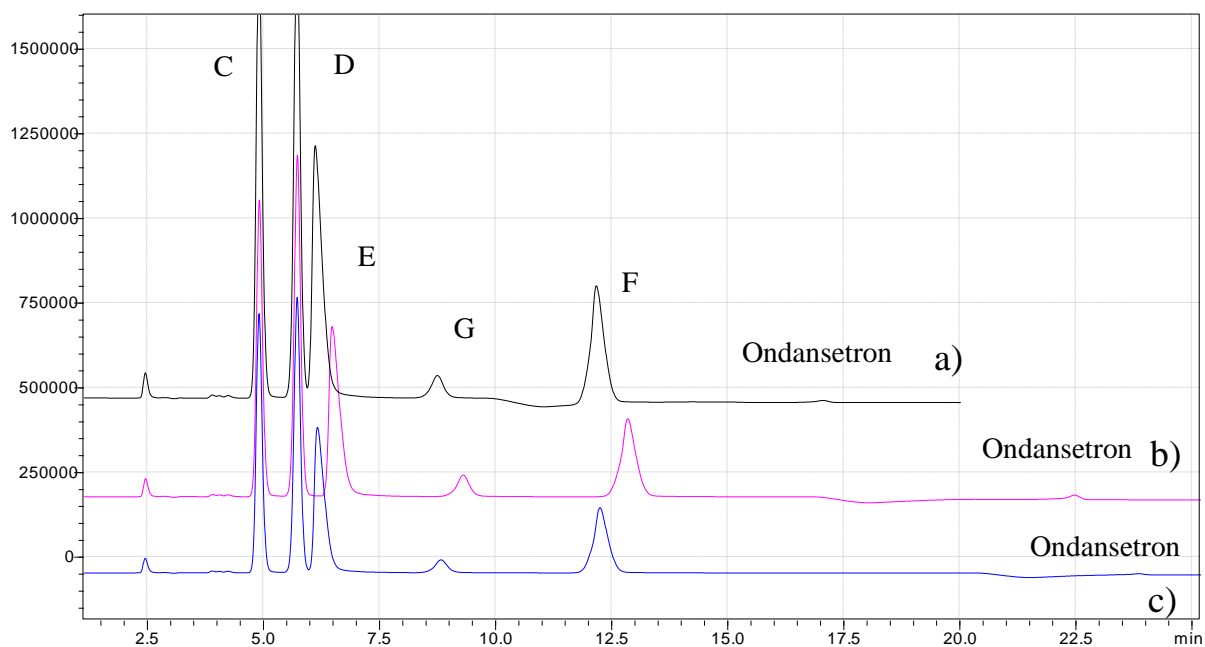
Acetonitril : octanový pufr (5 mM) 0–13 min. (40 : 60, V/V), 13–14 min. (40→65 : 60→35, V/V), 14–25 min. (65 : 35, V/V)	C	4,914	Výsledné retenční časy jsou podobné předchozím podmínkám (viz obr. 28).
	D	5,739	
	E	6,500	
	F	12,863	
	G	9,350	
	Ondansetron	21,898	
Acetonitril : octanový pufr (5 mM) 0–4 min. (40 : 60, V/V), 4–5 min. (40→50 : 60→50, V/V), 5–25 min. (50 : 50, V/V)	C	4,750	Všechny píky jsou oddělené, celkový čas analýzy 21 min. (viz obr. 29).
	D	5,516	
	E	6,720	
	F	13,227	
	G	9,188	
	Ondansetron	21,009	
Acetonitril : octanový pufr (5 mM) 0–4 min. (40 : 60, V/V), 4–5 min. (40→50 : 60→50, V/V), 5–21 min. (50 : 50, V/V), 21–25 min. (50→40 : 50→60, V/V)	C	<b>4,810</b>	Za těchto podmínek došlo k optimálnímu oddělení všech píků látek až na základní linii, analýza trvala 19,9 min. (viz obr. 30)
	D	<b>5,579</b>	
	E	<b>6,900</b>	
	F	<b>13,243</b>	
	G	<b>9,172</b>	
	Ondansetron	<b>19,959</b>	



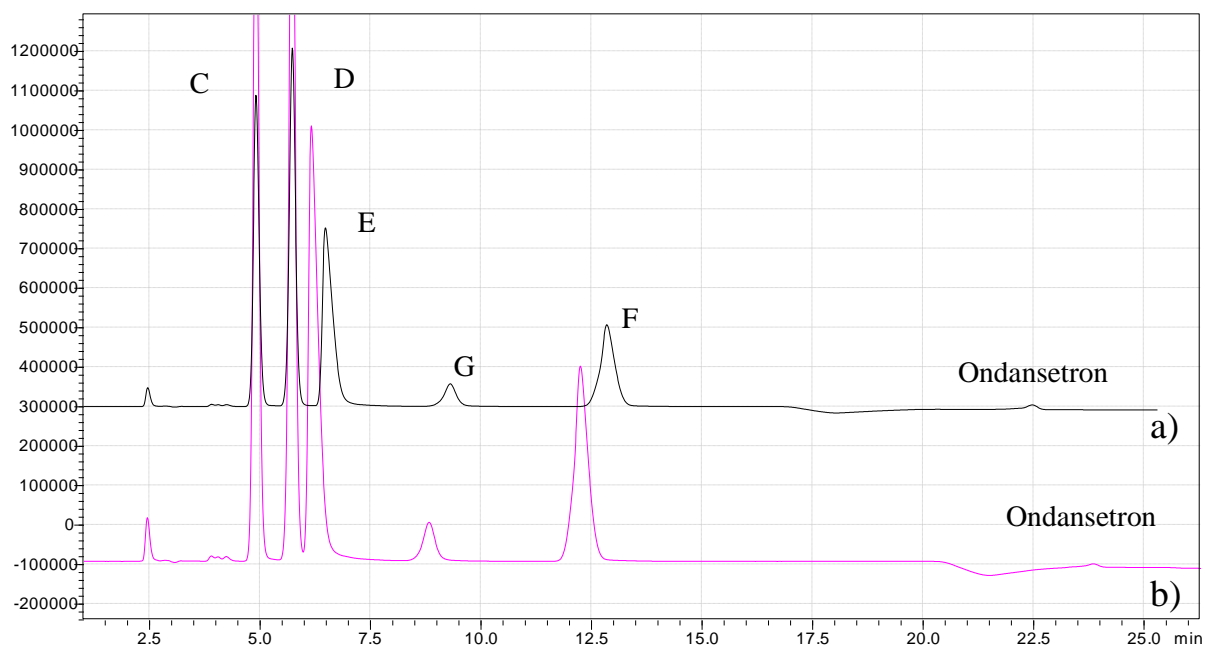
Obr. 25 - Chromatogram separace ondansetronu a jeho nečistot na koloně Zr-MS, podmínky: 40°C; 0,5 ml/min; acetonitril : fosforečnan amonný (5 mM, pH 7) (40 : 60, V/V)



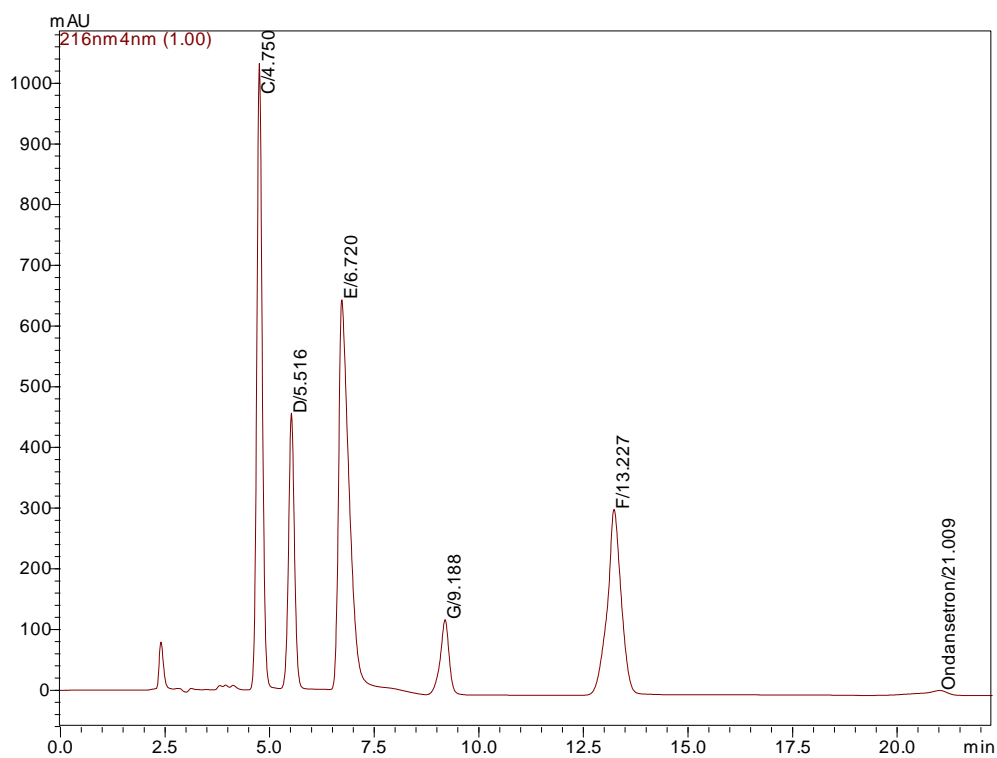
Obr. 26 – Chromatogram separace ondansetronu a jeho nečistot na koloně Zr-MS, podmínky: 40°C; 0,5 ml/min; acetonitril : octanový pufr (5 mM, pH 7), **a**) 0–7 min. (40 : 60, V/V), 7–8 min. (40→50 : 60→50, V/V), 8–25 min. (50 : 50, V/V), **b**) 0–8 min. (40 : 60, V/V), 8–9 min. (40→50 : 60→50, V/V), 9–25 min. (50 : 50, V/V)



Obr. 27 – Chromatogram separace ondansetronu a jeho nečistot na koloně Zr-MS, podmínky: 40°C; 0,5 ml/min; acetonitril : octanový pufr (5 mM, pH 7), **a**) 0–6 min. (40 : 60, V/V), 6–7 min. (40→60 : 60→40, V/V), 7–25 min. (60 : 40, V/V), **b**) 0–13 min. (40 : 60, V/V), 13–14 min. (40→60 : 60→40, V/V), 14–25 min. (60 : 40, V/V), **c**) 0–16,5 min. (40 : 60, V/V), 16,5–17,5 min. (40→60 : 60→40, V/V), 17,5–25 min. (60 : 40, V/V)



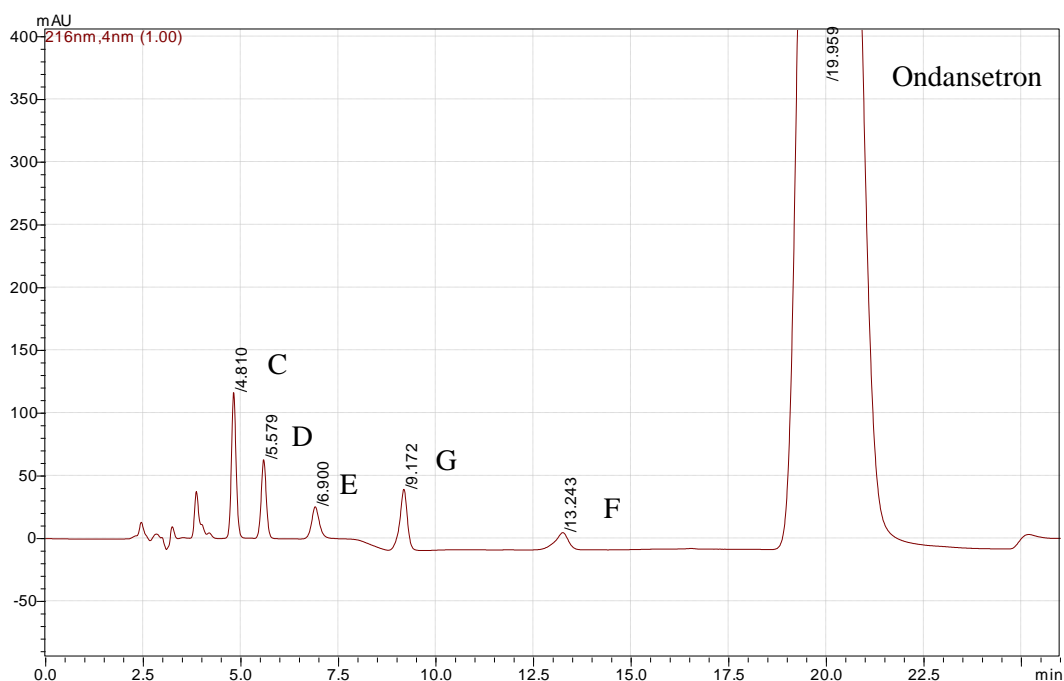
Obr. 28 - Chromatogram separace ondansetronu a jeho nečistot na koloně Zr-MS, podmínky: 40°C; 0,5 ml/min; acetonitril : octanový pufr (5 mM, pH 7), a) 0–11,5 min. (40 : 60, V/V), 11,5–12,5 min. (40→65 : 60→35, V/V), 12,5–25 min. (65 : 35, V/V), b) 0–13 min. (40 : 60, V/V), 13–14 min. (40→65 : 60→35, V/V), 14–25 min. (65 : 35, V/V)



Obr. 29 – Chromatogram separace ondansetronu a jeho nečistot na koloně Zr-MS, podmínky: 40°C; 0,5 ml/min; acetonitril : octanový pufr (5 mM, pH 7), 0–4 min. (40 : 60, V/V), 4–5 min. (40→50 : 60→50, V/V), 5–25 min. (50 : 50, V/V)

Optimální podmínky pro separaci ondansetronu a jeho pěti nečistot (C, D, E, F, G) na koloně Zr-MS při rychlosti průtoku 0,5 ml/min (viz obr. 30):

- acetonitril : octanový pufr (5 mM, pH 7), 0–4 min. (40 : 60, V/V), 4–5 min. (40→50 : 60→50, V/V), 5–21 min. (50 : 50, V/V), 21–25 min. (50→40 : 50→60, V/V)
- teplota – 40 °C



Obr. 30 – Optimální chromatogram separace ondansetronu a jeho nečistot na koloně Zr-MS při průtoku 0,5 ml/min, podmínky: 40 °C; acetonitril : octanový pufr (5 mM, pH 7), 0–4 min. (40 : 60, V/V), 4–5 min. (40→50 : 60→50, V/V), 5–21 min. (50 : 50, V/V), 21–25 min. (50→40 : 50→60, V/V)

## **6. ZÁVĚR**

Metoda separace ondansetronu a jeho pěti nečistot byla převedena z kolony ZirChrom<sup>®</sup>-PBD na kolonu Zirchrom<sup>®</sup>-MS. Současně byly změněny podmínky podstatné pro možnost využití hmotnostního detektoru: rychlost průtoku mobilní fáze z 1,5 ml/min na 0,5 ml/min, typ pufru z hydrogenfosforečnanu amonného na těkavý octan amonný.

V průběhu optimalizace chromatografických podmínek byly zkoušeny různé poměry organické složky (acetonitril, methanol) a octanového pufru:

- ACN : pufr – 18 : 82, 25 : 75, 30 : 70, 35 : 65, 40 : 60 (V/V)
- MeOH : pufr – 50 : 50, 55 : 45 (V/V)

Zároveň se měnila molarita octanového pufru. Snížením koncentrace pufru z 25 mM přes 10 mM na 5 mM vedlo k prodloužení doby analýzy. Zvýšením podílu acetonitrilu v mobilní fázi bylo dosaženo zkrácení retenčních časů analyzovaných látek.

Při použití methanolu jako organické složky v mobilní fázi byly získány chromatogramy s krátkými retenčními časy. Zvyšováním pH z hodnoty 7 až na hodnotu 9 došlo k postupné koeluci všech píků.

Metoda na koloně Zirchrom<sup>®</sup>-MS byla optimalizována. Nejlepší výsledky byly získány při následujících chromatografických podmínkách:

- *kolona* – Zirchrom<sup>®</sup>-MS
- *rychlost průtoku mobilní fáze* – 0,5 ml/min
- *teplota* – 40 °C
- *vlnová délka* – 216 nm
- *pufr* – 5 mM octan amonný, pH 7
- *mobilní fáze* – acetonitril : octanový pufr, 0–4 min. (40 : 60, V/V), 4–5 min. (40→50 : 60→50, V/V), 5–21 min. (50 : 50, V/V), 21–25 min. (50→40 : 50→60, V/V)

## **7. ABSTRAKT**

# **ABSTRAKT**

## **Diplomová práce**

### **Využití HPLC v analýze léčiv III**

**Jana Václavková**

Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové,

Katedra farmaceutické chemie a kontroly léčiv

Vysokoúčinná kapalinová chromatografie je jednou z nejprogresivnějších separačních a analytických metod. Alternativou ke klasickým stacionárním silikagelovým fázím jsou fáze založené na oxidu zirkoničitém s výhodnějšími chemickými vlastnostmi. Cílem této diplomové práce bylo převedení podmínek separace z kolony ZirChrom<sup>®</sup>-PBD na kolonu Zirchrom<sup>®</sup>-MS a umožnit tak propojení s hmotnostním detektorem. Během optimalizace bylo pracováno s různými typy pufru (hydrogenfosforečnan, octan amonný), koncentracemi pufru, se složením mobilní fáze (rozpouštědlo: acetonitril, methanol). Pro separaci ondansetronu a jeho pěti nečistot byly zjištěny tyto optimální podmínky: mobilní fáze složená z acetonitrilu a 5 mM octanového pufru (pH 7), 0–4 min. (40 : 60, V/V), 4–5 min. (40→50 : 60→50, V/V), 5–21 min. (50 : 50, V/V), 21–25 min. (50→40 : 50→60, V/V). Analýza probíhala při teplotě 40 °C a rychlosti průtoku 0,5 ml/min. Detekce byla provedena při vlnové délce 216 nm. Celková doba separace trvala 20 minut.



# **ABSTRACT**

## **Diploma thesis**

### **The use of HPLC in the analysis of drugs III**

**Jana Václavková**

Charles University in Prague, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové,

Department of Pharmaceutical Chemistry and Drug Control

High-performance liquid chromatography is one of the most progressive separative and analytical methods. Phases based on the oxide of zirconium with more advantageous chemical properties represent an alternative to classical stationary silica gel phases. The aim of this diploma thesis was to transfer the conditions of separation from the column ZirChrom<sup>®</sup>-PBD to the column Zirchrom<sup>®</sup>-MS and, thus, enable connection with the mass detector. During the separation, various types of buffer (diammonium hydrogen phosphate, ammonium acetate), concentrations of buffer, and constitutions of the mobile phase (solvents: acetonitrile, methanol) were used. For the separation of ondansetron and its five impurities, the following optimal conditions were found out: a mobile phase composed of acetonitrile and 5 mM ammonium acetate (pH 7), 0–4 min. (40 : 60, V/V), 4–5 min. (40→50 : 60→50, V/V), 5–21 min. (50 : 50, V/V), 21–25 min. (50→40 : 50→60, V/V). The analysis was carried out at the temperature of 40 °C and the flow rate of 0.5 mL min<sup>-1</sup>. The detection was performed at the wavelength of 216 nm. The separation lasted 20 minutes in total.

## **8. LITERATURA**

- [1] Klimeš, J. a kol.: Kontrola léčiv I, Praha, Karolinum 2006
- [2] Klouda, P.: Moderní analytické metody, Ostrava, Pavel Klouda 2003
- [3] Karlíček, R. a kol.: Analytická chemie pro farmaceuty, Praha, Karolinum 1998
- [4] Český lékopis 2002, Svazek I, Praha, Grada 2002
- [5] Churáček, J. a kol.: Analytická chemie, Praha, SNTL 1987
- [6] Snyder, L. R.: Practical HPLC method development, New York, John Wiley & Sons 1997
- [7] Kučera, R.: přednáška Monitorování lékových hladin, Hradec Králové, 2007
- [8] Sýkora, D., Tesařová, E., Vosmanská, M., Zvolánková, M.: Moderní stacionární fáze pro RP-HPLC, Chem. Listy, 101 (2007) 190–199
- [9] Douša, M., HPLC.CZ, [online] 2009 [cit. 2009-6-20] dostupné na <http://www.hplc.cz>
- [10] Žižkovský, V., Kučera, R., Klimeš, J.: Potential employment of non-silica-based stationary phases in pharmaceutical analysis, J. Pharm. Biomed. Anal., 44 (2007) 1048–1055
- [11] Sigma-Aldrich, Discovery HLPC kolony na bázi oxidu zirkoničitého, [online] 2009 [cit. 2009-6-30] dostupné na <http://www.sigmaaldrich.com/czech-republic/informace-o-produktech/chromatografie/hplc/zr-kolony.html>
- [12] Nawrocki, J., Dunlap, C., McCormick, A., Carr, P. W.: Part I. Chromatography using ultra-stable metal oxide-based stationary phases for HPLC, J. Chromatogr. A, 1028 (2004) 1–30
- [13] Nawrocki, J., Dunlap, C., Li, J., Zhao, J., McNeff, C. V., McCormick, A., Carr, P. W.: Part II. Chromatography using ultra-stable metal oxide-based stationary phases for HPLC, J. Chromatogr. A, 1028 (2004) 31–62
- [14] ZirChrom Separations, Inc., ZirChrom<sup>®</sup> ...For Peak Performance, [online] 2006 [cit. 2009-6-25] dostupné na <http://www.zirchrom.com>
- [15] Hartl, J. a kol.: Farmaceutická chemie III., Praha, Karolinum 2006
- [16] GlaxoSmithKline, Ondansetron-RL<sup>™</sup> injection, tablets, and Ondansetron-RL Zydis wafers, [online] 2006 [cit. 2009-7-7] dostupné na [http://www.gsk.com.au/resources.ashx/prescriptionmedicinesproductschilddataproinfo/281/FileName/5F35E0F70C8317EF2720DC094E98FD0A/PI\\_Ondansetron-RL.pdf](http://www.gsk.com.au/resources.ashx/prescriptionmedicinesproductschilddataproinfo/281/FileName/5F35E0F70C8317EF2720DC094E98FD0A/PI_Ondansetron-RL.pdf)
- [17] Fendrich, Z. a kol.: Farmakologie pro farmaceuty I, Praha, Karolinum 2002

- [18] Lincová, D., Farghali, H. et al.: *Základní a aplikovaná farmakologie*, Praha, Galén 2007
- [19] *The European Pharmacopoeia*, fifth ed., Council of Europe, Directorate for the Quality of Medicines, 2005
- [20] *The United States Pharmacopoeia XXIV*, The United States Pharmacopoeial Convention, Rockville, USA, 2000
- [21] Guiochon, G.: Monolithic columns in high-performance liquid chromatography, *J. Chromatogr. A*, 1168 (2007) 101–168
- [22] Žižkovský, V., Kučera R., Klimeš, J., Dohnal, J.: Titania-based stationary phase in separation of ondansetron and its related compounds, *J. Chromatogr. A*, 1189 (2008) 83–91
- [23] Liu, K., Dai, X., Zhong, D., Chen, X.: Quantitative determination of ondansetron in human plasma by enantioselective liquid chromatography-tandem mass spectrometry, *J. Chromatogr. B*, 864 (2008) 129–136
- [24] Bauer, S., Stormer, E., Kaiser, R., Trembla, P. B., Brockmoller, J., Roots, I.: Simultaneous determination of ondansetron and tropisetron in human plasma using HPLC with UV detection, *Biomed. Chromatogr.*, 16 (2002) 187–190
- [25] Liu, J., Stewart, J. T.: High-performance liquid chromatographic analysis of ondansetron enantiomers in human serum using a reversed-phase cellulose-based chiral stationary phase and solid-phase extraction, *J. Chromatogr. B*, 694 (1997) 179–184
- [26] Kelly, J. W., He, L., Stewart, J. T.: High-performance liquid chromatographic separation of ondansetron enantiomers in serum using a cellulose-derivatized stationary phase and solid-phase extraction, *J. Chromatogr., Biomed. App.*, 622 (1993) 291–295
- [27] Depot, M., Leroux, S., Caillé, G.: High-resolution liquid chromatographic method using ultraviolet detection for determination of ondansetron in human plasma, *J. Chromatogr. B*, 693 (1997) 399–406