

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

Katedra analytické chemie

**Vývoj a validace metody pro hodnocení tablet agomelatinu
pomocí UHPSFC a UHPLC**

Vedoucí diplomové práce: doc. PharmDr. Lucie Nováková, Ph.D.

Vedoucí katedry: Prof. RNDr. Petr Solich, CSc.

ABSTRAKT

Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra Analytické chemie

Kandidát: Kateřina Plachká

Školitel: doc. PharmDr. Lucie Nováková, Ph.D.

Název diplomové práce: Vývoj a validace metody pro hodnocení tablet agomelatinu pomocí UHPSFC a UHPLC

Agomelatin je jedním z nejnovějších antidepresiv. Vzhledem k odlišnému mechanismu účinku nabízí nový přístup k léčbě depresivních poruch. Byly vyvinuty dvě chromatografické metody pro stanovení agomelatinu a jeho nečistot. Separace na UHPSFC systému proběhly za použití stacionární fáze BEH 2-EP a gradientové eluce za využití CO₂ a MeOH obsahujícího 20mM mravenčan amonný a 5 % vody. Gradient se zvyšoval od 5 do 30 % organického modifikátoru během 3 minut. UHPLC separace proběhly na stacionární fázi BEH Shield RP 18. Jako mobilní fáze byla využita směs acetonitrilu a metanolu v poměru 1:1 a 10mM pufr octanu amonného pH 9,5. Obě vyvinuté metody byly náležitě zvalidovány dle doporučených postupů ICH v parametrech linearity, citlivosti (LOD, LOQ), přesnosti a správnosti. UHPSFC metoda byla lineární v rozmezí 0,25-70 µg/ml pro všechny analyty se správností $\geq 97,4$ % a ≥ 100 , 2 % a přesností RSD $\leq 2,4$ a $\leq 0,8$ pro nečistoty a API. UHPLC metoda byla lineární v rozmezí 0,1-10 µg/ml pro všechny analyty s výjimkou tří nečistot, jejichž lineární rozmezí bylo větší, a to 0,1 – 25 µg/ml. Byla potvrzena správnost metody $\geq 95,7$ % a $\geq 95,2$ % a přesnost metody s RSD $\leq 2,6$ a $\leq 1,5$ pro nečistoty a API.

Bylo provedeno měření vzorků tablet a metody byly porovnány ve vybraných parametrech. Bylo zjištěno, že obě metody jsou vhodné pro stanovení agomelatinu a jeho nečistot ve farmaceutické kontrole kvality, ačkoli UHPSFC metoda byla shledána jako výhodnější. Mezi výhody této nově vyvinuté UHPSFC-UV metody patří její ekologičnost vzhledem k používané mobilní fázi, dobré rozlišení, selektivita a vysoká rychlost analýzy (celkový čas analýzy je 4,1 minuty).

Klíčová slova: agomelatin; vývoj metody; UHPSFC; UHPLC; optimalizace; kontrola kvality

ABSTRACT

Charles University in Prague, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Analytical Chemistry

Candidate: Kateřina Plachká

Supervisor: doc. PharmDr. Lucie Nováková, Ph.D.

Title of Diploma Thesis: Development and validation of methods for the determination of agomelatine using UHPSFC and UHPLC

Agomelatine is one of the newest antidepressants. Due to a different mechanism of action it offers a completely new approach in the treatment of depressive disorders. Two chromatographic methods for determination of agomelatine and its impurities were developed. The separations on UHPSFC system were accomplished using stationary phase based on BEH 2-EP and gradient elution using CO₂ and MeOH containing 20mM ammonium formate and 5 % of water. The gradient was run from 5 - 30 % of organic modifier in 3 min. The UHPLC separations were performed on stationary phase BEH Shield RP18. The mixture of acetonitrile and methanol in ratio 1:1 and 10mM ammonium acetate buffer pH 9.5 were used as mobile phase. Both developed methods were properly validated in terms of linearity, sensitivity (LOD, LOQ), accuracy and precision according to ICH guidelines. The UHPSFC method was linear in the range 0.25-70 µg/ml for all analytes with method accuracy ≥ 97.4 % and ≥ 100.2 % and method precision RSD ≤ 2.4 and ≤ 0.8 for impurities and API, respectively. The UHPLC method was linear in the range 0.1-10 µg/ml for all analytes except three impurities for which the linear range was larger 0.1- 25 µg/ml. Method accuracy ≥ 95.7 % and ≥ 95.2 % and method precision RSD ≤ 2.6 and ≤ 1.5 were found out for impurities and API, respectively.

The measurement of tablet samples was performed and the methods were compared in the selected parameters. In conclusion, both methods were appropriate for the determination of agomelatine and its impurities in pharmaceutical quality control, although the UHPSFC method was found as slightly more convenient. The advantages of newly developed UHPSFC-UV method are its environmental friendliness due to mobile phase used, a good resolution, selectivity and high speed of analysis (total time of separation is 4.1 min).

Keywords: agomelatine; method development; UHPSFC; UHPLC; optimization; quality control

„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. Práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.“

V Hradci Králové dne 13. 5. 2016

.....

Kateřina Plachká

Děkuji doc. PharmDr. Lucii Novákové, Ph.D. za její odborné a obětavé vedení, trpělivost a cenné rady poskytnuté při zpracování diplomové práce. Dále děkuji pracovníkům Katedry analytické chemie za pomoc a vstřícné jednání a všem lidem, kteří mi byli během mé práce a studia cennou oporou.

Obsah

Seznam použitých zkratk.....	9
1. Úvod	11
2. Cíl.....	12
3. Teoretická část	13
3.1. Ultra-vysokoúčinná kapalinová chromatografie	13
3.1.1. Kapalinová chromatografie	13
3.1.2. Vysokoúčinná kapalinová chromatografie	14
3.1.3. Stacionární fáze pro UHPLC.....	16
3.1.4. Instrumentace	18
3.2. Superkritická fluidní chromatografie	19
3.2.1. Mobilní fáze.....	19
3.2.2. Stacionární fáze pro UHPSFC.....	20
3.2.3. Instrumentace pro SFC.....	22
3.3. Agomelatin.....	24
3.3.1. Potenciální nečistoty agomelatinu.....	28
3.3.2. Publikované metody zabývající se analýzou agomelatinu	31
4. Experimentální část.....	34
4.1. Použité chemikálie a přístroje.....	34
4.1.1. Standardní látky	34
4.1.2. Rozpouštědla.....	35
4.1.3. Další chemikálie.....	35
4.1.4. Přístrojové vybavení.....	36
4.2. Pracovní postup	37
4.2.1. Příprava standardů.....	37
4.2.1.1. Příprava standardů pro UHPSFC metodu.....	37
4.2.1.2. Příprava standardů pro UHPLC metodu	37
4.2.2. Příprava směsi standardů analyzovaných látek	37
4.2.3. Příprava vzorků z tabletového prášku.....	38
4.2.4. Příprava vzorků z tablety.....	39
4.2.5. Příprava mobilní fáze, aditiv a pufrů	39
4.2.5.1. Příprava mobilní fáze a aditiv pro UHPSFC.....	39
4.2.5.2. Příprava mobilní fáze a pufru pro UHPLC.....	39
4.2.6. Podmínky separace	40

4.2.6.1.	Podmínky UHPSFC separace	40
4.2.6.2.	Podmínky UHPLC separace	41
4.2.7.	Validace metod	41
4.2.7.1.	Test způsobilosti systému	41
4.2.7.2.	Linearita.....	42
4.2.7.3.	Určení přesnosti a správnosti UHPSFC metody	43
4.2.7.4.	Určení přesnosti a správnosti UHPLC metody	46
5.	Výsledky a diskuze.....	48
5.1.	Vývoj UHPSFC metody	48
5.1.1.	Optimalizace chromatografických podmínek	48
5.1.2.	Optimalizace přípravy vzorku tablet	54
5.1.3.	SST – Test způsobilosti systému pro UHPSFC metodu	54
5.1.4.	Validace UHPSFC metody.....	55
5.1.5.	Obsahová stejnoměrnost.....	57
5.2.	Vývoj UHPLC metody	58
5.2.1.	Volba optimální chromatografických podmínek.....	58
5.2.2.	Test způsobilosti systému SST.....	67
5.2.3.	Validace UHPLC metody.....	68
5.2.4.	Obsahová stejnoměrnost.....	69
5.3.	Srovnání UHPLC a UHPSFC metody.....	70
6.	Závěr.....	72
7.	PŘÍLOHY.....	77

Seznam použitých zkratek

ACN	acetonitril
AGO	agomelatin, N-(2-(7-methoxynaft-1-yl)ethyl)acetamid – citrónová kyselina co-crystal
amid	2-(7-methoxynaft-1-yl)acetamid
amin	N,N-bis[2-(7-methoxynaft-1-yl)-ethyl]amin
API	aktivní farmaceutická substance
BEH	hybridní stacionární fáze s ethylenovými můstky
BEH 2-EP	hybridní stacionární fáze s ethylenovými můstky modifikovaná 2-ethylpyridinem
BEH C18	hybridní stacionární fáze s ethylenovými můstky modifikovaná 18uhlíkatým řetězcem
BEH Phenyl	hybridní stacionární fáze s ethylenovými můstky zakončená fenylem
BEH Shield RP 18	hybridní stacionární fáze s ethylenovými můstky s C18 řetězcem a vloženou polární karbamátovou skupinou
BPR	regulátor zpětného tlaku
CSH C18	hybridní částice BEH s aplikovaným kontrolovaným povrchovým nábojem a následně modifikována pomocí 18uhlíkatého řetězce
CSH Fluoro- Phenyl	hybridní částice BEH s aplikovaným kontrolovaným povrchovým nábojem a následně modifikována pomocí pentafluorofenylu
CSH PFP	hybridní částice BEH s aplikovaným kontrolovaným povrchovým nábojem a následně modifikována pomocí pentafluorofenylu
dimer	N,N-bis[2-(7-methoxynaft-1-yl)-ethyl]acetamid
FD	fluorescenční detektor
GC	plynová chromatografie
HPLC	vysokoučinná kapalinová chromatografie
HSS C18	vysoce stabilní silikagel modifikovaný 18uhlíkatým řetězcem
ICH	The International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use, Mezinárodní konference pro harmonizaci
IMAO	inhibitory monoaminoxidáz
IMP	nečistota
kyselina	2-(7-methoxynaft-1-yl)acetic acid

LC	kapalinová chromatografie
MASSA	melatoninový agonista a selektivní serotoninový antagonist
MeOH	metanol
MIX	směs všech analytů
MS	hmotnostní spektrometrický detektor
MT1	podtyp melatoninového receptoru 1
MT2	podtyp melatoninového receptoru 2
nitril	2-(7-methoxynaft-1-yl)acetonitril
PDA	detektor diodového pole
PLV	tabletový prášek s obsahem agomelatinu
RIA	Radio Imuno Assay
RP-HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie na reverzních fázích
RT	retenční čas
RSD	relativní směrodatná odchylka
SFC	superkritická fluidní chromatografie
SNRI	Inhibitory zpětného vychytávání serotoninu a noradrenalinu
SSRI	selektivní inhibitor zpětného vychytávání serotoninu
SST	test způsobilosti systému
STAND	standard
sůl	2-(7-methoxynaft-1-yl)ethylamin hydrochlorid
THF	tetrahydrofuran
UHPLC	ultra-vysokoúčinná kapalinová chromatografie
UHPSFC	ultra-vysokoúčinná superkritická fluidní chromatografie
UV	spektrofotometrický detektor
w50	šířka píku v 5 % jeho výšky

1. Úvod

Agomelatin je název chemické sloučeniny N-(2-(7-methoxynaft-1-yl)ethyl)acetamidu. Jedná se o syntetický analog melatoninu a první léčivo z nové skupiny agonistů melatoninových receptorů MT₁ a MT₂ a selektivních serotoninových antagonistů používané v terapii depresivního onemocnění dospělých.

Společně s agomelatinem bylo analýze podrobena jeho šest potenciálních nečistot s chemickou strukturou odvozenou ze struktury agomelatinu, avšak s velmi rozdílnými fyzikálně-chemickými vlastnostmi.

Pro separaci a stanovení těchto látek byly zvoleny dva rozdílné chromatografické systémy. Prvním z nich byla superkritická fluidní chromatografie. Přestože se jedná o metodu, jejíž využití ve farmaceutickém průmyslu roste, nebyla doposud publikována žádná SFC metoda zabývající se analýzou agomelatinu. A jelikož se jedná o velice nové léčivo, bylo publikováno pouze několik metod stanovujících agomelatin pomocí kapalinové chromatografie. Pouze dvě z nich se pak zabývaly stanovením agomelatinu společně s jeho nečistotami. Všechny tyto separace využívaly stacionární fáze s částicemi většími než 2 μm a přes časovou náročnost u nich nebylo dosaženo dostatečné selektivity. Proto byla tato studie zaměřena na ultra-vysokoúčinnou kapalinovou chromatografii a ultra-vysokoúčinnou superkritickou fluidní chromatografii využívající částice menší než zmíněné 2 μm.

2. Cíl

Hlavním cílem této studie bylo vyvinout a zvalidovat UHPSFC a UHPLC metody pro separaci a stanovení agomelatinu a jeho šesti potenciálních nečistot. Po validaci byly metody taktéž aplikovány na reálné vzorky tablet. Vzhledem k rozdílným fyzikálně-chemickým vlastnostem separovaných látek, bylo jedním z cílů srovnání retence a selektivity nejen v systému superkritické fluidní chromatografie a kapalinové chromatografie, ale také na daném systému za odlišných separačních podmínek. Byl popsán vliv jednotlivých parametrů na selektivitu separací stejně jako rozdíly ve vývoji UHPSFC a UHPLC metod.

3. Teoretická část

3.1. Ultra-vysokoúčinná kapalinová chromatografie

3.1.1. Kapalinová chromatografie

Kapalinová chromatografie je separační metoda založená na rozdělování látek ve směsi mezi dvě nemísitelné fáze, tedy mezi fází mobilní a stacionární. Jak již vyplývá z názvu, mobilní fází je při této metodě kapalina, stacionární fází pak může být tuhá látka nebo kapalina upevněná na nosiči. V kapalinové chromatografii je však vždy stacionární fáze umístěna v chromatografické koloně ve formě sorbentu [1].

Látky směsi jsou následně děleny na základě svých rozdílných distribučních koeficientů, neboť mezi oběma zmíněnými fázemi existuje fázové rozhraní. Po nástřiku je vzorek unášen proudem mobilní fáze na kolonu, kde následně dochází k opakovanému ustalování rovnováhy dělených látek mezi stacionární a mobilní fází [1].

Separace jednotlivých složek směsi je tedy ovlivněna vlastnostmi obou těchto fází. Dle vzájemné polarit jednotlivých fází se rozlišuje chromatografie na normálních a reverzních fázích. O první typ se jedná ve chvíli, kdy jsou v sorbentu chromatografické kolony obsaženy polárnější skupiny (např. silikagel, CN, NH₂) a mobilní fáze je nepolárního charakteru (např. alifatické a aromatické uhlovodíky). Naopak v systému reverzních fází se jedná o polární roztoky složené z organického modifikátoru (např. metanolu, acetonitrilu, tetrahydrofuranu) a vodné složky. Charakter rozpouštědla ovlivňuje míru retence a selektivitu separace, kdy látky s vyšší polaritou jsou eluovány dříve, neboť vykazují vyšší afinitu k této polární mobilní fází než ke stacionární fází s nepolárními skupinami (např. C18, C8, fenyl) [1].

Eluce může proběhnout za konstantního složení mobilní fáze, tzv. izokratická eluce, nebo s využitím mobilní fáze, jejíž eluční síla je postupně dle zvoleného programu zvyšována (gradientová eluce), která byla využita i v této studii.

Vzhledem k tvorbě gradientu je pak rozlišován gradient nízkotlaký a vysokotlaký. Nízkotlaký gradient vzniká tak, že složky mobilní fáze jsou za atmosférického tlaku míseny v gradientovém ventilu a až poté vstupují do vysokotlakého čerpadla. Tím je

zajištěna vysoká přesnost, avšak dochází k určitému časovému zpoždění gradientu kvůli mrtvému objemu právě v gradientovém ventilu. Naopak při vysokotlakém gradientu je zpoždění gradientu malé. Zde je každá složka mobilní fáze dávkována vlastním vysokotlakým čerpadlem a mísena až ve směšovací komůrce před kolonou. Menší přesnost této tvorby gradientové MF pak vychází ze stlačitelnosti kapalin a objemových změn při jejich směšování [1][2].

3.1.2. Vysokoučinná kapalinová chromatografie

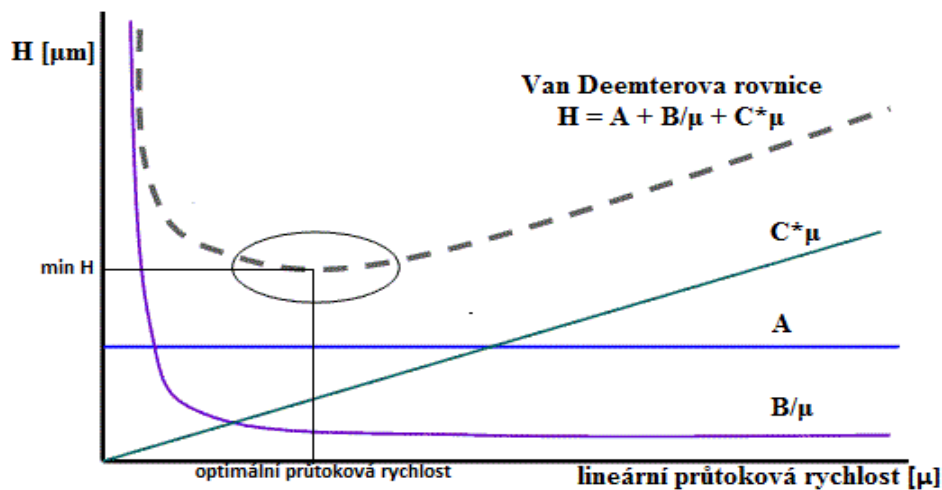
Vysokoučinná kapalinová chromatografie je dobře zavedená separační technika používaná k řešení mnoha analytických problémů [3]. Této chromatografie využívají oblasti environmentální, chemické či potravinové analýzy, bioanalýzy, farmacie a další. Proto je žádoucí, aby čas jednotlivých analýz byl zkrácen, a tím se zvýšila produktivita a bylo možno analyzovat větší množství vzorků [2].

Základním cílem HPLC metody je dosažení co nejlepšího rozdělení látek v co nejkratším čase. Ultra-vysokoučinná kapalinová chromatografie k dosažení účinných a rychlých separací využívá chromatografický sorbent, jehož částice jsou menší než 2 μm . Tyto částice mají nízký odpor proti převodu hmoty, takže jejich optimální separační účinnost je zachována v širším rozmezí průtokových rychlostí. Toto tvrzení vychází z dynamické van Deemterovy teorie. Ta umožňuje popsat děje přispívající k rozmývání elučních zón látek a tím ke snížení účinnosti separace [1].

Chromatografický záznam charakterizují křivky gaussovského tvaru nazývané píky. Doba od nástřiku do dosažení vrcholu píku se označuje jako retenční čas a kvalitativně charakterizuje danou látku. Pro kvantitativní hodnocení je pak využívána plocha píku zvolené látky. Optimální chromatografická separace se vyznačuje dokonale oddělenými píky s ostře ohraničenými zónami. Děje, které tento tvar píku nepříznivě ovlivňují, mají za následek snížení účinnosti separace [1].

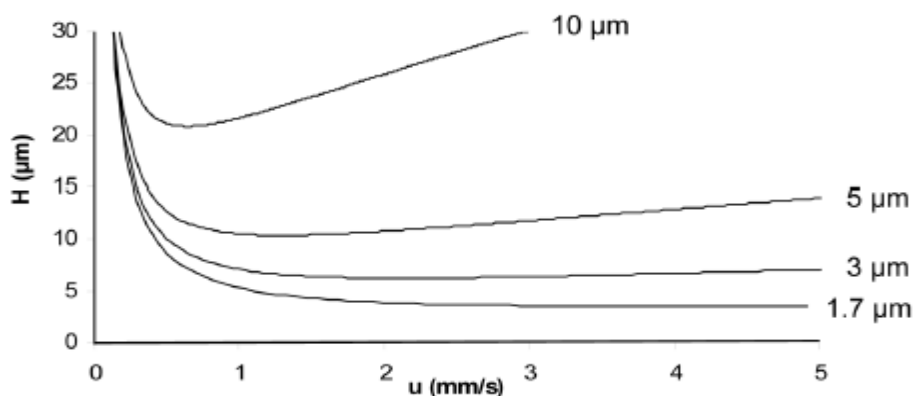
Rozmývání zón separovaných látek je ovlivněno třemi základními procesy: vířivou difuzí analytu v mobilní fázi při průchodu náplní kolony (člen A), podélnou molekulární difuzí analytu v mobilní fázi (člen B) a odporem proti převodu hmoty mezi mobilní a stacionární fází (člen C). Součet dílčích příspěvků těchto procesů následně vyjadřuje účinnost chromatografické separace označovanou jako výškový ekvivalent

teoretického patra (H). Ten má rozměr délky a je definován jako délka kolony připadající na jedno teoretické patro. Veličina počet teoretických pater (N) charakterizuje účinnost chromatografické kolony, avšak je závislá jak na retenčním faktoru složky, tak délce a historii kolony, viskozitě a rychlosti průtoku mobilní fáze a dalších. Právě pro porovnání kolon různých délek byl zaveden zmíněný výškový ekvivalent teoretického patra (H) rovnající se podílu délky kolony a počtu teoretických pater (N). Nejnižší hodnota H tedy odpovídá optimální účinnosti za daných podmínek a dá se vyčíst z van Deemterovy křivky vyjadřující závislost výškového ekvivalentu teoretického patra na rychlosti průtoku mobilní fáze (Obr. 1) [1].



Obr. 1 - Van Deemterova rovnice popisující vztah mezi rychlostí průtoku a účinností [4].

Vliv velikosti částic na tvar Van Deemterovy křivky pak ukazuje Obr. 2, z něhož lze vyčíst, že při velikosti částic $1,7 \mu\text{m}$ je dostatečná účinnost separace zachována v rozmezí průtokových rychlostí od 1 ml/min do $3,5 \text{ ml/min}$ a více [5].



Obr. 2 - Vliv velikosti částic stacionární fáze na průběh van Deemterovy křivky [5].

Vysoká účinnost UHPLC separací taktéž umožnila zkrácení analytických kolon a zmenšení jejich průměru, takže přes zvýšení lineární průtokové rychlosti jsou výsledné objemy průtoků velmi nízké, což snižuje spotřebu rozpouštědel.

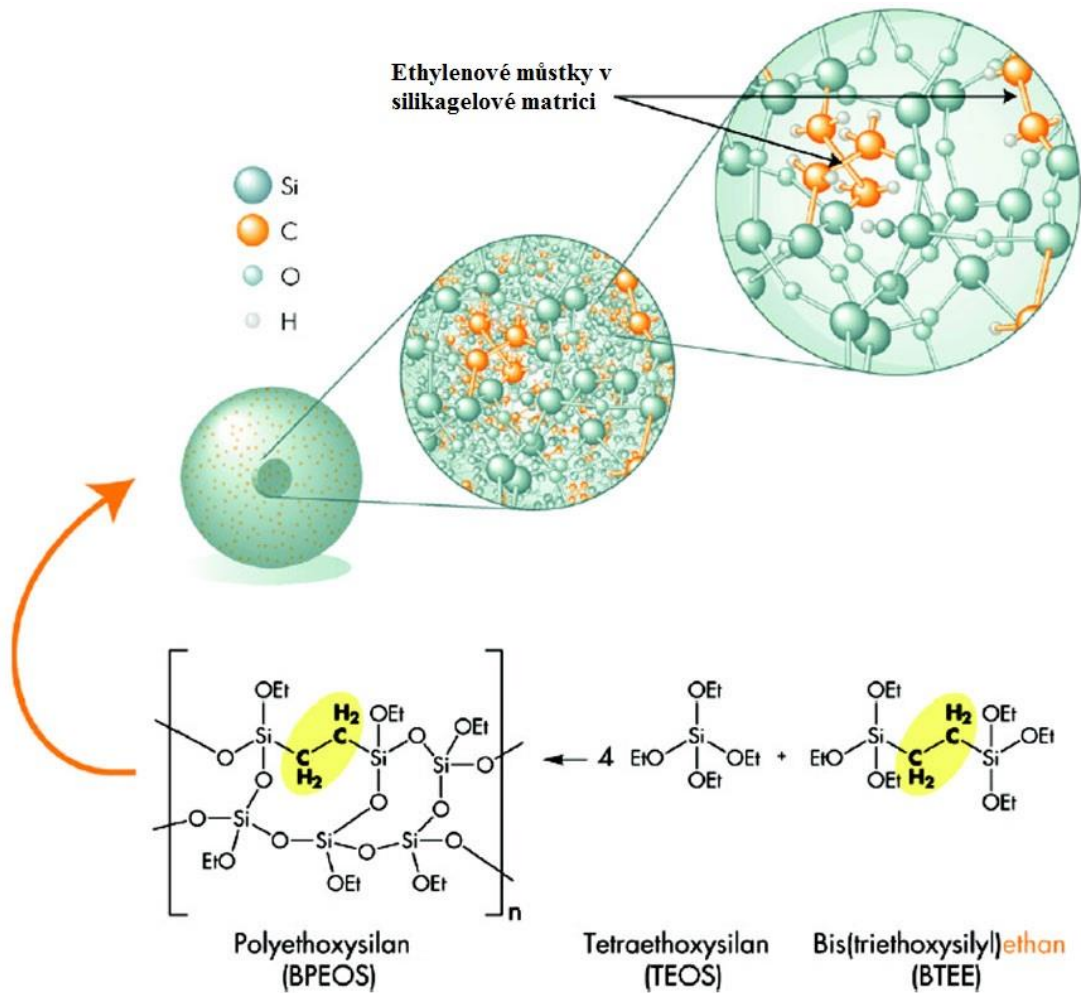
Kromě zmíněných kolonových příspěvků se na rozmývání elučních zón podílejí taktéž mimokolonové příspěvky. Ty jsou kritičtější u kolon s menším vnitřním průměrem než standardních 4,6 nebo 3 mm. Mimokolonové rozmytí píku je funkcí průtoku, difuzního koeficientu látky, viskozity mobilní fáze, teploty a dávkovaného objemu [6]. Rozšíření eluční zóny mimokolonovým příspěvkem je dáno celkovým objemem nástřikového zařízení, spojovacích kapilár a detektoru. Je nutné, aby objemy těchto částí byly co nejmenší, aby se zabránilo snížení účinnosti kolony [1][2].

Zmíněné zmenšení částic s sebou přineslo zvýšení zpětného tlaku, kdy dle Darcyho zákona je tento narůst tlaku nepřímo úměrný druhé nebo dokonce třetí mocnině velikosti částic, což prakticky znamená, že 1,7 μ m částice budou vytvářet až 25x vyšší zpětný tlak než částice 5 μ m[1][2]. UHPLC separace tedy probíhají za tlaku až kolem 1000 barů [3]. Instrumentální obtíže s tím spojené byly odstraněny v roce 2004 zavedením prvního komerčního UHPLC přístroje Acquity UPLC firmy Waters. Kromě schopnosti pracovat za vysokých tlaků musí být splněny také požadavky na robustní čerpadlo a přesný dávkovací systém, vysokou frekvenci sběru dat a minimální mimokolonové objemy, aby nedocházelo k výše zmíněnému rozmývání elučních zón [1].

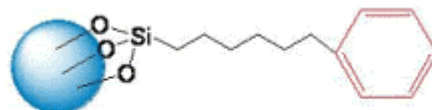
3.1.3. Stacionární fáze pro UHPLC

K dosažení rychlé a účinné separace za ultra-vysokého tlaku je nutné splnit taktéž podmínku kvalitní a stabilní stacionární fáze. Kolona tvoří základ chromatografického systému, jelikož na ní probíhá separace látek. V současnosti je nejčastěji využívaná kapalinová chromatografie na reverzních fázích, která umožňuje analýzu různorodých vzorků složených z nepolárních i polárních látek. V této diplomové práci byly použity hybridní stacionární fáze v analytických kolonách s rozměry jak 2,1 x 50 mm, tak 2,1 x 100 mm. Do první skupiny patřila kolona Acquity UPLC BEH Shield RP18 a také Acquity UPLC BEH Phenyl a UPLC BEH C18. Poslední zmíněné byly vyzkoušeny i v 100mm provedení, stejně jako kolony Acquity UPLC CSH C18 a Acquity CSH Fluoro-Phenyl.

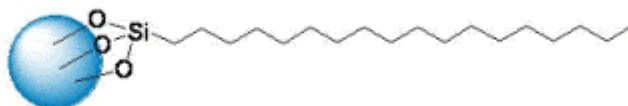
Hybridní částice s ethylenovými můstky BEH (Bridged Ethyl Hybrid) vzniklé reakcí tetraethoxysilanu a bis(triethoxysilyl)ethanu (Obr. 3) se vyznačují chemickou odolností, účinností a mechanickou stabilitou. Hybridní částice BEH byly v dalších kolonách modifikovány fenylem (Obr. 4) a 18 uhlíkatým řetězcem (Obr. 5).



Obr. 3 - Struktura hybridní částice BEH [7].

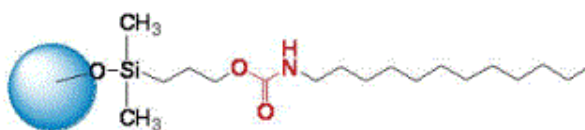


Obr. 4 - Struktura stacionární fáze BEH Phenyl [8].



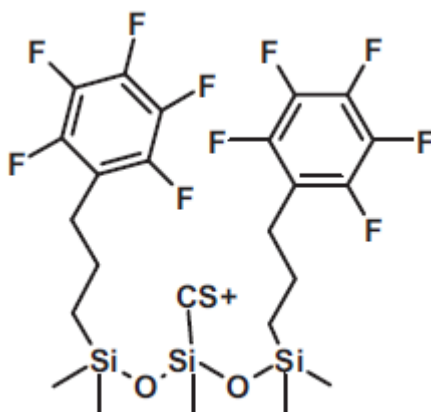
Obr. 5 - Struktura stacionární fáze BEH C18 [8].

Byla testována i kolona BEH Shield RP18 s obdobným uhlíkatým řetězcem a vloženou polární karbamátovou skupinou (Obr. 6).



Obr. 6 - Struktura stacionární fáze BEH Shield [8].

Použita byla i kolona CSH s již zmíněným C18 uhlíkatým řetězcem a taktéž modifikovaná pentafluorofenylem (CSH Fluoro-Phenyl). CSH kolony patří již do třetí generace hybridních sorbentů poskytujících naprosto odlišnou selektivitu separací. Na hybridní částici BEH je nejprve aplikován kontrolovaný povrchový náboj a následně je modifikována pomocí pentafluorofenylu (Obr. 7) či jiného řetězce.



Obr. 7 - Struktura stacionární fáze CSH PFP [12].

3.1.4. Instrumentace

Instrumentace kapalinového chromatografu se může mírně lišit, avšak vždy obsahuje několik základních částí. Jedná se o zásobníky mobilní fáze, vysokotlaké čerpadlo, automatický dávkovač, chromatografickou kolonu nejčastěji umístěnou v termostatu,

detektor a počítač se softwarem pro vyhodnocování získaných dat [1]. Detektory zaznamenávají rozdíl v signálu mezi průchodem čisté mobilní fáze a mobilní fáze obsahující analyt. Typ využitého detektoru se liší na základě jeho principu, citlivosti a samozřejmě na vlastnostech látek, jež mají být detekovány. Mezi detektory využívané v HPLC patří například detektory fluorescenční, elektrochemické, univerzální na bázi aerosolu, refraktometrické, vodivostní, chemiluminiscenční a hmotnostně spektrometrické. V této práci byl využit další z detektorů a to ten nejpoužívanější spektrofotometrický.

Spektrofotometrické detektory jsou založeny na principu absorpce záření v oblasti vlnových délek ve viditelném a ultrafialovém spektru, tedy od 190 do 800 nm [1]. Kvantitativní vyhodnocení je umožněno platností Lambert-Beerova zákona. Tento zákon pomíjí vliv vlnové délky, teploty a rozpouštědla na hodnotu absorbance. Proto je jeho platnost omezena pravými a zdánlivými odchylkami. Dojde-li v roztoku ke změně chemické rovnováhy způsobené měnící se koncentrací, je tato odchylka označena jako pravá. Tato změna koncentrace může být způsobena iontovými i molekulovými interakcemi, disociací, asociací, dimerizací, polymerací, tvorbou komplexu nebo hydrolýzou. Zdánlivé odchylky mají fyzikální charakter a jsou nejčastěji důsledkem nedostatečné monochromatickosti záření [1].

Zkratkou PDA (PhotoDiode Array) se označuje, v této práci využitý, detektor s diodovým polem. V něm záření ze zdroje prochází mřížkou tak, že na každou fotodiodu dopadá zářivý tok o určité vlnové délce zeslabený absorpcí v cele detektoru. Po dopadu na diodu vzniká fotoelektrický proud, který vybije kondenzátor spojený s touto diodou, který byl předem nabitý na určitou hodnotu. Následně je měřen proud potřebný na opětovné nabití daného kondenzátoru. Tímto principem je tedy možno detekovat látky při jakékoli zvolené vlnové délce [1].

3.2. Superkritická fluidní chromatografie

3.2.1. Mobilní fáze

Superkritická fluidní chromatografie je separační metoda využívající jako mobilní fázi kapalinu v jejím nadkritickém stavu. Jedná se o stav, kdy je látka pod takovým tlakem

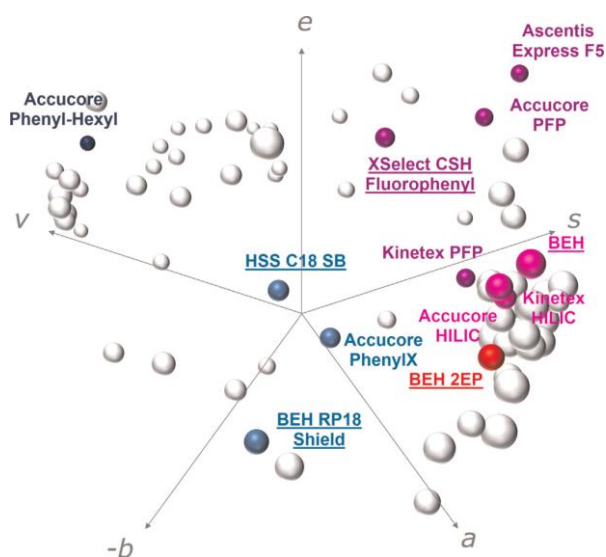
a teplotou, že mizí rozdíl mezi kapalinou a plynem a během chromatografie může být využito vlastností obou těchto skupenství. Difuzivita a viskozita odpovídá plynnému skupenství, kdežto hustota a schopnost solvatace kapalnému skupenství [9]. Pro účely této studie byl použit oxid uhličitý, který patří mezi nejčastější mobilní fáze používané v SFC. Jako mobilní fáze bylo v SFC vyzkoušeno více látek, nejběžněji se však využívá právě oxid uhličitý vzhledem k tomu, že je netoxický, nepolární, inertní a jeho nadkritický stav je snadno navoditelný, neboť nastává již při teplotě nad 31°C a tlaku nad 74 barů (1074 psi, 7,4 MPa) [10], což je například v porovnání s vodou snadněji dosažitelný stav. Podobně dobré podmínky nabízí i oxid dusný, ten má však silné oxidační vlastnosti, které jsou pro chromatografickou separaci nevhodné [9].

Přes snadnou dosažitelnost superkritických podmínek při použití CO₂ probíhají SFC separace často za subkritických podmínek. Dle zjištěných údajů však tato skutečnost na analýzy nemá vliv [11]. Proto v případech, kdy je oxid uhličitý využit jako mobilní fáze, ať již za super- nebo sub- kritických podmínek, je vždy používáno označení SFC [11]. Tento posun je dán využitím modifikátorů mobilní fáze, které se mísí s CO₂, a tím mění podmínky nutné k navození nadkritického stavu [9]. Mezi nejčastěji používané organické modifikátory patří metanol, etanol a acetonitril, které jsou přidávány do oxidu uhličitého, aby byla snížena jeho lipofilita a zvýšena polarita, a tím byla umožněna retence a separace rozmanitějšího množství látek [10][12]. Nejběžněji používaným modifikátorem je metanol díky jeho dobré mísitelnosti s CO₂. Bylo dokázáno, že již malé množství metanolu (2 %) zlepšuje tvary píků díky omezení jejich chvostování [13]. Jeho efekt však nemusí být dostatečný a proto jsou často do tohoto modifikátoru přidávána další aditiva ke zlepšení selektivity a symetrie píků [9].

3.2.2. Stacionární fáze pro UHPSFC

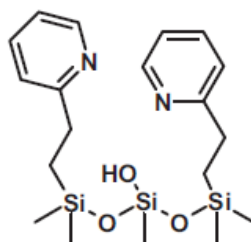
Jedinečnost SFC techniky spočívá taktéž v možnosti použít při separacích jak polárních, tak nepolárních stacionárních fází se stejnou mobilní fází [13][14]. Využití polárních stacionárních fází se pak vztahuje k normálním fázím v LC a naopak analýzy na nepolárních stacionárních fázích jsou svou retencí blízké chromatografii na reverzních fázích. Tato různorodost umožňuje srovnání vlastností jednotlivých stacionárních fází a větší možnost výběru vhodné kolony pro danou analýzu [13].

V této diplomové práci byly pro SFC separace využity tyto kolony: Acquity UPC² BEH, Acquity UPC² BEH 2-EP, Acquity UPC² CSH PFP a Acquity UPC² HSS C18. Jejich rozdílnost dokládá Obr. 8, kde jsou stacionární fáze rozděleny na základě 5 parametrů, jako je přenos náboje, disperze, interakce dipól-dipól a schopnost tvořit vodíkové vazby jako donor či akceptor. Nepolární stacionární fáze, jako je C18 či phenylhexyl, a polární stacionární fáze (s funkčními skupinami ethylpyridin, kyano, amino) jsou zde umístěny na opačných stranách grafu. Mezi nimi se nachází stacionární fáze s různorodým chováním [15].



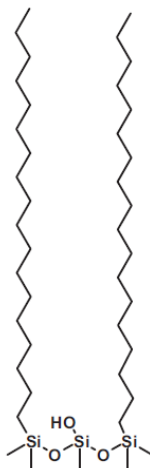
Obr. 8 - Diagram rozdělující SFC stacionární fáze dle separačních vlastností [14].

V této studii byly polární stacionární fáze zastoupeny hybridními fázemi BEH a BEH 2-EP. BEH je již výše zmíněná hybridní stacionární fáze s ethylenovými můstky. Druhá z těchto hybridních fází, BEH 2-EP určená přímo pro SFC analýzy, vychází z téže struktury, avšak je dále modifikována 2-ethylpyridinem (Obr. 9). Na koloně BEH dochází k větší retenci bazických sloučenin na rozdíl od kolony BEH 2-EP, jež vykazuje slabší interakce s bazickými látkami a tím zlepšuje tvar jejich píků [15].



Obr. 9 - Struktura stacionární fáze BEH 2-EP [14].

Z nepolárních stacionárních fází byla využita kolona HSS C18. Jedná se o speciální silikagelové částice, v tomto případě modifikované ligandem tvořeným 18 uhlíkatým řetězcem (Obr. 10).



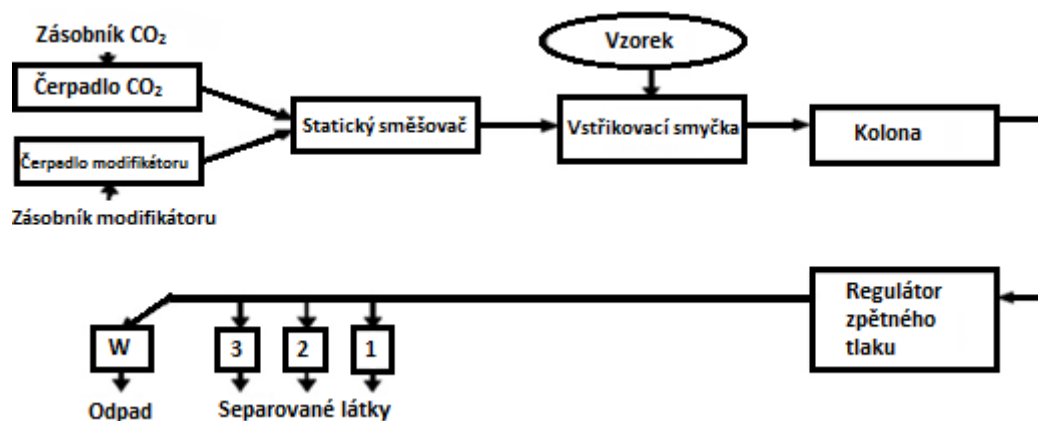
Obr. 10 - Struktura stacionární fáze HSS C18 [15].

Mezi těmito dvěma extrémy se se svými vlastnostmi nachází kolona CSH PFP popsaná již ve stati o kapalinové chromatografii.

V rámci této diplomové práce byly všechny zmíněné kolony použity v rozměrech 100 x 3,0 mm. Velikost částic byla 1,7 μm kromě kolony HSS C18, jejíž částice mají velikost 1,8 μm . Jednalo se tedy o superkritickou fluidní chromatografii na malých částicích a pro tuto metodu bylo, podobně jako v kapalinové chromatografii, zavedeno označení ultra-vysokoúčinná superkritická fluidní chromatografie – UHPSFC. Bylo zjištěno, že změna velikosti částic z 5 μm na 2 μm nemá vliv na interakce, avšak obdobně jako u UHPLC, umožňuje rychlejší a účinnější separace [10][16][17]. Tentýž efekt pak má v SFC separacích využívaná vyšší lineární průtoková rychlost mobilní fáze [13].

3.2.3. Instrumentace pro SFC

Instrumentace v superkritické fluidní chromatografii vychází nejčastěji z HPLC zařízení s několika podstatnými modifikacemi (Obr. 11).



Obr. 11 - Schéma SFC instrumentace.

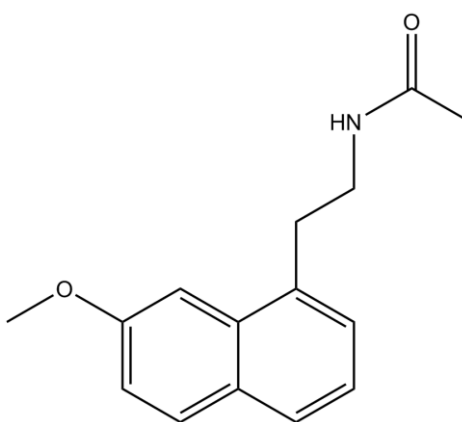
K zajištění spolehlivosti a reprodukovatelnosti SFC techniky je potřeba přesná regulace zpětného tlaku (BPR). V rámci diplomové práce využitý systém Acquity UPC² má tuto regulaci dvoustupňovou. První z těchto stupňů je pasivní, kdy statický regulátor zpětného tlaku udržuje tlak přibližně na 75 – 90 barech. Jemnější kontrolu zpětného tlaku pak zajišťuje dynamický regulátor. Toto uspořádání umožňuje reagovat na změny v generovaném tlaku, které se odvíjejí od použití gradientové eluce [9]. Tím je zajištěno, aby změny BPR během analýzy nepřesáhly 0,1 baru, což by vedlo ke zvýšení šumu základní linie při UV detekci [10]. Jelikož by mohlo dojít k vysrážení suchého ledu, je mezi tyto dva regulátory vložen termostat. Při využívání UV detektoru je třeba vysokotlaká cela a následný restriktor. Samozřejmostí jsou pak tlakové možnosti čerpadel až 600 barů, krátké a rovné spojovací kapiláry, nízký nastříkovaný objem a vysoká rychlost záznamu dat [10].

Hlavní oblast využití SFC spočívá převážně ve farmaceutickém průmyslu. Díky až 5x kratším analýzám v porovnání s HPLC je tato technika vhodná pro rychlá stanovení malých molekul léčiv v rámci kontroly kvality stejně jako pro chirální separace. Jedná se o techniku využitelnou ve vývoji léčiv, která je schopná ve srovnání s HPLC dosáhnout lepšího rozlišení píků a vyšší účinnosti [18]. SFC taktéž nabízí jedinečnou selektivitu, což je dáno možností využít stacionární fáze s rozmanitými vlastnostmi [11]. Nezanedbatelná je také šetrnost k životnímu prostředí, která vyplývá z použití CO₂ jako mobilní fáze a malého množství organických modifikátoru [18]. Tím je nejen minimalizováno použití toxických organických rozpouštědel, ale CO₂ může být navíc získán z atmosféry nebo jako vedlejší produkt fermentací [11]. Výhodné je taktéž

využití v preparativní chromatografii, kde je možné opětovné zkapalnění a recyklace mobilní fáze.

3.3. Agomelatin

Chemicky je agomelatin N-(2-(7-methoxynaft-1-yl)ethyl)acetamid a jeho strukturu zobrazuje Obr. 12. Jedná se o syntetický analog melatoninu a první léčivo z nové skupiny melatoninových agonistů a selektivních serotoninových antagonistů (MASA) využívané v léčbě deprese dospělých.



Obr. 12 - Struktura agomelatinu.

Deprese je závažné onemocnění, jehož dopady jsou jak osobní, sociální, tak ekonomické [19]. Jde o unipolární afektivní poruchu, jež je charakterizována patologickými změnami nálad. Pacient propadá pocitům beznaděje a zoufalství, které jsou často doprovázeny sebevražednými tendencemi. Toto komplexní onemocnění je pravděpodobně ovlivněno genetickými a environmentálními faktory a projevuje se na více úrovních. Vyskytují se u něj psychomotorické symptomy, poruchy spánku, somatické symptomy, bolesti, úzkosti a další [20]. Z toho vyplývá heterogenní obraz pacientů s rozdílnými, často neznámými patogenními mechanismy.

Tento stav je však zároveň vždy provázen nedostatečným množstvím noradrenalinu, serotoninu a dopaminu. Mechanismem účinku antidepresiv je tedy zvýšení hladiny těchto monoaminů a hustoty jejich receptorů v mozku. Dle způsobu, jakým je tohoto účinku dosaženo, jsou rozlišeny 2 základní skupiny těchto léčiv. Thymoleptika inhibují transportéry pro zpětné vychytávání biogenních aminů. Řadí se zde tricyklická

antidepresiva, která přenašeče ovlivňují neselektivně a jsou považována za 1. generaci těchto léčiv. Pozdější generace již působí na neuromediátory selektivněji a jejich zástupci jsou např. látky ze skupiny SSRI (Selective Serotonin Reuptake Inhibitor – selektivní inhibitor zpětného vychytávání serotoninu), SNRI (Serotonine-Norepinephrine Reuptake Inhibitor – Inhibitory zpětného vychytávání serotoninu a noradrenalinu) a další. Druhou ze zmíněných skupin tvoří inhibitory monoaminoxidáz označované zkratkou IMAO (MonoAmine Oxidase Inhibitors), neboť, jak naznačuje již název, se jedná o látky inhibující tyto enzymy a tím zpomalující biodegradaci aminů. I tato skupina se dále dělí do generací na základě selektivního či neselektivního a reverzibilního nebo ireverzibilního působení. V poslední době se také objevily látky s jinými mechanismy účinku, např. tianeptin zvyšující zpětné vychytávání především serotoninu [21].

Značná část populace se někdy během svého života potýká s depresí, ale přes rozmanitost výše uvedené farmakologické léčby, zůstává zvládnutí tohoto onemocnění i nadále výzvou. V roce 2000 proběhla studie, které se zúčastnilo přes 2800 pacientů s nemocemi zahrnujícími například bipolární poruchu, psychózy, obsedantně kompulzivní poruchu, poruchy příjmu potravy i záchvaty. Jejím závěrem bylo, že celkem dvě třetiny zúčastněných dosáhly remise díky postupné léčbě, z čehož jedna polovina se po prvotní léčbě antidepresivy navrátila k původnímu stavu bez příznaků. Avšak přes rozdílné terapie celá jedna třetina těchto pacientů zůstala léčena neefektivně [22]. Deprese je 4. nejčastější příčinou pracovní neschopnosti a předpokládá se, že v roce 2020 bude již na druhém místě. Avšak plnou remisi po léčbě vykáže celkově méně než 50 % pacientů [20]. Hledání nového přístupu k léčbě vyústilo ve výzkum nových antidepresiv, jedním z nichž je i agomelatin.

Agomelatin jako acetamidový naftalenový analog melatoninu [19] byl vyvinut evropskou farmaceutickou společností Sevier Laboratories Ltd a pro terapeutické využití byl schválen v únoru 2009 [23] pod obchodním názvem Valdoxan a Thymanax [22]. Agomelatin je, mimo tělu vlastní hormony, melatoninu nejvíce podobná látka vyvinutá pro terapii deprese [20]. Již z jeho zařazení do skupiny MASSA (Melatonin Agonists and Selective Serotonin Antagonists) lze vyvodit, že se jedná o agonistu melatoninových receptorů. Přesněji se jedná o receptory MT1 a MT2. Ty regulují cirkadiánní hodiny suprachiasmatického jádra a tímto mechanismem může dojít

k nápravě poruch v cyklu spánku a bdění [19]. Ty jsou možnou příčinou poruch nálad, což představuje příležitost pro nový přístup k léčbě onemocnění, které tyto symptomy vykazují, jako je právě deprese [24]. Druhá část zkratky názvu skupiny odkazuje na ovlivnění serotoninových receptorů. Tentokrát se jedná o receptor 5HT_{2C}, který inhibuje uvolňování noradrenalinu a dopaminu. Jelikož je agomelatin antagonistou tohoto receptoru, dochází jeho působením k potlačení této inhibice a zmíněné 2 monoaminy jsou uvolňovány [22]. Z uvedeného vyplývají 2 fáze účinku. V noci převažuje podpora spánku nad anti-hypnotickou blokadou receptoru 5HT_{2C} a během dne pak antidepressivní aktivita daná inhibicí právě tohoto receptoru [20]. Mimo to agomelatin reaguje taktéž s receptory 5HT_{2B}, ale ty nejsou v CNS četné a jejich funkce je neznámá [19]. Nedávný důkaz uváděl, že onemocnění depresí je spojeno s úbytkem novotvorby granulových buněk v hippokampu. Bylo zjištěno, že agomelatin proliferaci těchto buněk zlepšuje a zároveň prodlužuje jejich přežití [19].

Agomelatin je podáván perorálně ve formě kapslí nebo tablet [19] s obsahem 25 mg účinné látky. Optimálnost tohoto obsahu byla potvrzena studií srovnávající terapeutický efekt různých dávek [19]. Mnoha klinickými studiemi byl potvrzen pozitivní vliv melatoninu v léčbě poruch spánku, avšak jeho terapeutickému využití brání velmi nízká biodostupnost [25]. U jeho analogu agomelatinu ovšem tento problém nenastává. Ten je ze zažívacího traktu dobře vstřebávám, přestože celková biodostupnost je vzhledem k vysokému efektu prvního průchodu taktéž nižší [20] a byla pozorována vyšší u žen ve srovnání s muži [22][26]. 85 až 95 % léčiva je v plazmě vázáno na plazmatické proteiny [20] a metabolizace probíhá pomocí jaterních cytochromů z rodiny izoenzymů P450 [20][22]. Z toho vyplývá, že jeho vstřebávání je ovlivněno současným podáním látek, které s tímto cytochromem reagují ať již v kladném nebo záporném směru. Metabolizací vznikají látky s nižší aktivitou, především demethylovaná, hydroxylovaná a epoxidovaná forma agomelatinu [20]. Eliminace je rychlá [22], probíhá především močí (61-81 % dávky) a malé množství diolového metabolitu prochází fekální exkrecí [20]. Poločas rozpadu je 1 až 2,3 hodiny [19].

Počáteční dávka odpovídá 1 tabletě před spánkem, avšak v případě, že nedojde k očekávané odpovědi, může být dávka zvýšena na 50 mg agomelatinu, tedy 2 tablety denně [19][22].

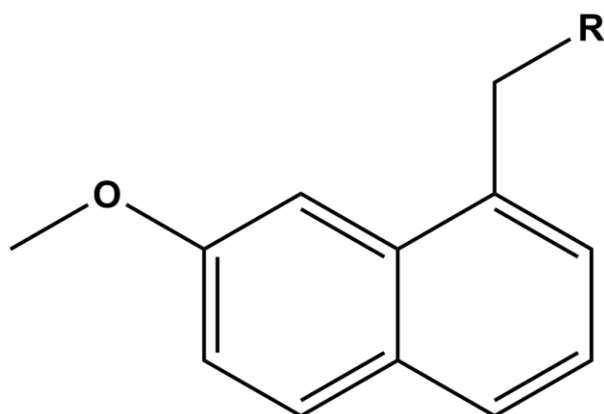
Častou součástí deprese jsou již zmíněné poruchy spánku. Agomelatin zlepšuje celkovou kvalitu spánku [27], což je dáno jeho vlivem na melatoninové receptory. Tím dochází k resynchronizaci cirkadiálního rytmu, a tak se ve srovnání s jinými antidepresivy při terapii agomelatinem nevyskytuje nežádoucí účinek v podobě denní sedace [19][22]. Na rozdíl od jiných léčiv z této skupiny, u léčby agomelatinem nedochází k výkyvům hmotnosti, podráždění žaludku a k symptomům z vysazení [20]. Může se však vyskytnout nauzea, nevolnost, nespavost, migréna, úzkost, zácpa, únava, bolest zad a další. Tyto nežádoucí účinky se nejčastěji vyskytují během prvních 2 týdnů léčby a jsou mírné a přechodné. Nejzávažnější nepříznivou odezvou na tuto terapii je až trojnásobné zvýšení obsahu jaterních transamináz v séru nad normální limit, které se objevilo u více než 1 % jedinců [22]. Z toho vyplývá požadavek na monitorování funkcí jater při začátku terapie a ve 3., 6., 12. a 24. týdnu léčby, aby se předešlo potencionálnímu vzniku toxické hepatitidy [23]. Podobně jako u dalších antidepresiv, i u agomelatinu existuje potenciální riziko výskytu sebevražd a mánií. Jelikož však agomelatin neovlivňuje hladiny serotoninu, nehrozí při jeho používání riziko serotoninového syndromu a abnormálního krvácení. Navíc agomelatin způsobuje minimální sexuální dysfunkce a nemá vliv na tělesnou hmotnost pacientů. Dostupné reporty uvádějí, že předávkování má za příčinu somnolenci, neklid, úzkost, napětí, nevolnost a malátnost [22]. Přesto je potřeba dalších studií zaměřených především na nežádoucí účinky při dlouhodobější léčbě [28].

Na zvířecích modelech byla prokázána schopnost desynchronizace cirkadiálního rytmu, stejně jako to, že agomelatin má na rozdíl od melatoninu i anxiolytické vlastnosti. Preklinické zkoušky ukázaly nejen antidepresivní účinek agomelatinu, ale také jeho užitek při léčbě spánkových onemocnění a resetování biologických hodin člověka [19]. Tato zjištěná chronobiotická aktivita je podobná té melatoninu [25] a byla prokázána i u lidí [27]. Klinickými studiemi bylo dokázáno, že účinnost agomelatinu je vyšší než u placebo [23] a srovnatelná s účinností mnoha běžně terapeuticky využívaných antidepresiv včetně venlafaxinu, paroxetinu a fluoxetinu [19][22][25][29]. Toto je velmi důležité zjištění vzhledem k jedinečnému mechanismu účinku a lepší tolerovatelnosti agomelatinu [23]. V doporučených postupech NICE je agomelatin uveden jako součást 3. generace antidepresiv, na něž je doporučeno přejít ve chvíli, kdy SSRI, SNRI nebo mirtazepin není tolerován či jsou tato léčiva kontraindikována

[23]. U pacientů podrobených léčbě agomelatinem během klinických studií se objevovaly odlišnosti v odezvě a účinnosti této terapie. Tato skutečnost však může být způsobena kolísající sekrecí melatoninu, která se mění s věkem [20]. Navíc se objevily také důkazy odůvodňující léčbu agomelatinem v kombinaci s lithnými ionty nebo valproátem u pacientů s bipolární poruchou, neboť při této terapii došlo k rychlému zvrácení bipolární deprese [19]. Agomelatin taktéž vykázal příznivý vliv v léčbě anhedonie, tedy neschopnosti příjemného prožívání [29]. Dalším onemocněním, jež má agomelatin potenciál léčit, je syndrom nočního jedení (NES). Ten je doprovázen změnami v cirkadiánním rytmu spánku a jídla s častým probouzením spojeným s nutkáním jíst. Vzhledem ke svému mechanismu účinku, je agomelatinu schopen tento rytmus resynchronizovat. Studie ukázala, že agomelatin byl schopen redukovat NES syndromy a výrazně zlepšit náladu pacientů bez nežádoucích vedlejších účinků [30]. Stejně tak je agomelatin podrobován dalšímu výzkumu s cílem stát se užitečným nástrojem v léčbě spánkových a přidružených poruch spojených s Parkinsonovou chorobou [31].

3.3.1. Potenciální nečistoty agomelatinu

Všechny v této práci separované nečistoty se vyznačují základním skeletem shodným s tím, který tvoří agomelatin. Analyty se většinou liší pouze substituentem, který je na naftalen vázán přes methylový můstek. Ten je na Obr. 13, označen písmenem R.



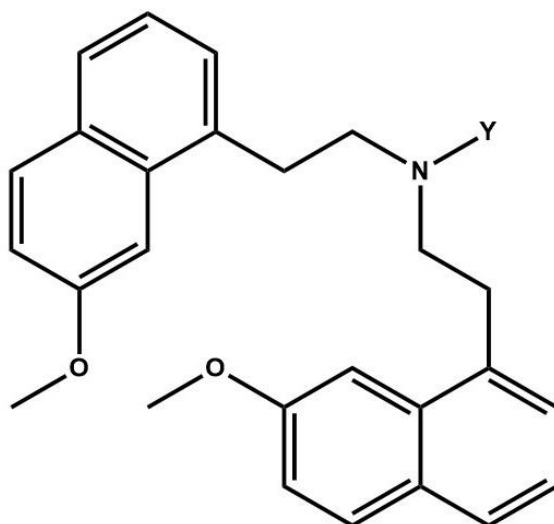
Obr. 13 - Základní struktura nečistot 1.

Tabulka 1 uvádí přehled skupiny analyzovaných nečistot. První z nich, 7-methoxynaft-1-yl)octová kyselina, byla pro zpřehlednění označena jako kyselina na základě karboxylové skupiny tvořící substituent. Podobně byly odvozeny zkráceniny pro (7-methoxynaft-1-yl)acetamid, tedy amid, (7-methoxynaft-1-yl)acetonitril – nitril, respektive sůl pro (7-methoxynaft-1-yl)ethylamin hydrochlorid. Pro porovnání jsou v tabulce uvedeny taktéž hodnoty pKa a log P všech látek včetně agomelatinu. Tyto fyzikálně-chemické veličiny byly zvoleny k popsání vlastností těchto analytů a zvýraznění jejich rozdílů. Hodnota pKa je rovna zápornému dekadickému logaritmu disociační konstanty látky, která popisuje sílu dané kyseliny či báze. Koeficient P pak popisuje poměr rovnovážných koncentrací ve dvou nemísitelných kapalinách, oktanolu a vodě, a lze z něj odvodit hydrofilitu či lipofilitu dané látky.

Tabulka 1 - Vlastnosti nečistot – první část.

	Substituent	logP	pKa	
			bazické	kyselé
Kyselina	-COOH	2,79	-	4,3
Amid	-CONH ₂	2,28	-0,7	16,1
Nitril	-CN	2,69	NA	NA
Sůl	-CH ₂ NH ₂ .HCl	2,89	NA	10,0
Agomelatin	-CH ₂ -NHCO-CH ₃	2,46	-0,5	16,2

Strukturně se poněkud liší látky bis[2-(7-methoxynaft-1-yl)-ethyl]amin, který byl označen pro lepší přehlednost jako amin, a N,N-bis(2-(7-methoxynaft-1-yl)ethyl)acetamid označený jako dimer. Jak již vyplývá z chemického názvu a Obr. 14, jedná se o molekuly, ve kterých jsou přes dusík spojena dvě substituovaná naftalenová jádra agomelatinu a která se liší třetím substituentem (na obrázku označený Y) tohoto dusíku.



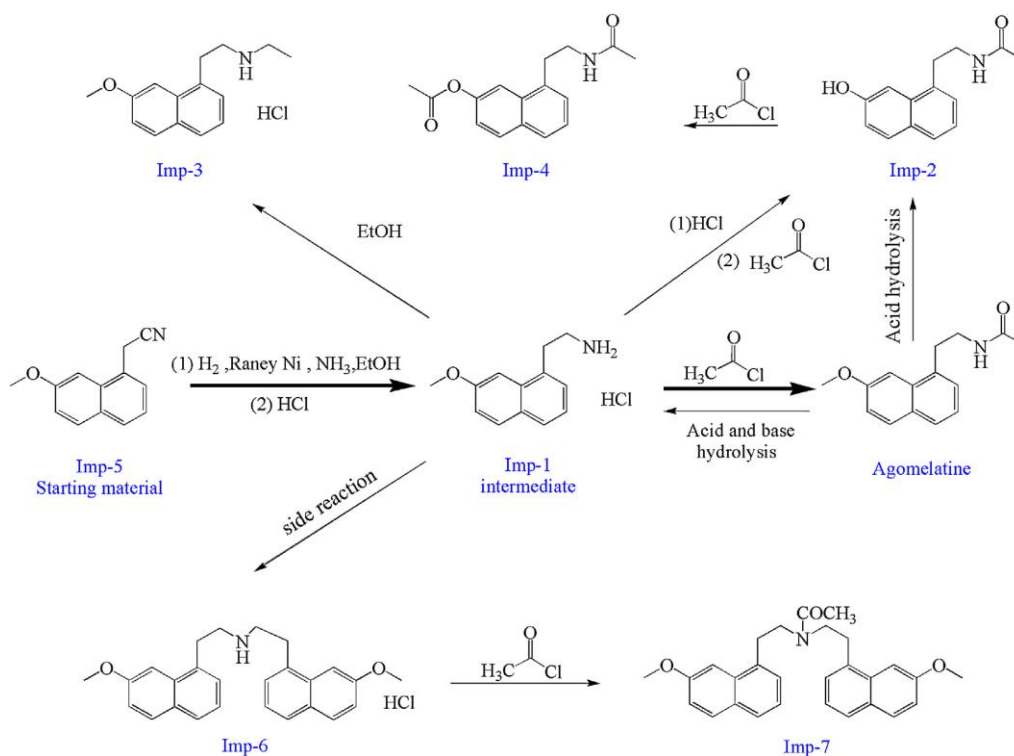
Obr. 14 - Základní struktura nečistot 2.

Dimer obsahuje methylkarbonylovou skupinu jako tento substituent, amin pak pouze vodík. Toto společně s jejich acidobazickými vlastnostmi a rozpustností shrnuje Tabulka 2.

Tabulka 2 - Vlastnosti nečistot – druhá část.

	Substituent	logP	pKa	
			bazické	kyselé
Amin	-H	6,96	9,7	-
Dimer	-COCH ₃	6,58	0,6	-

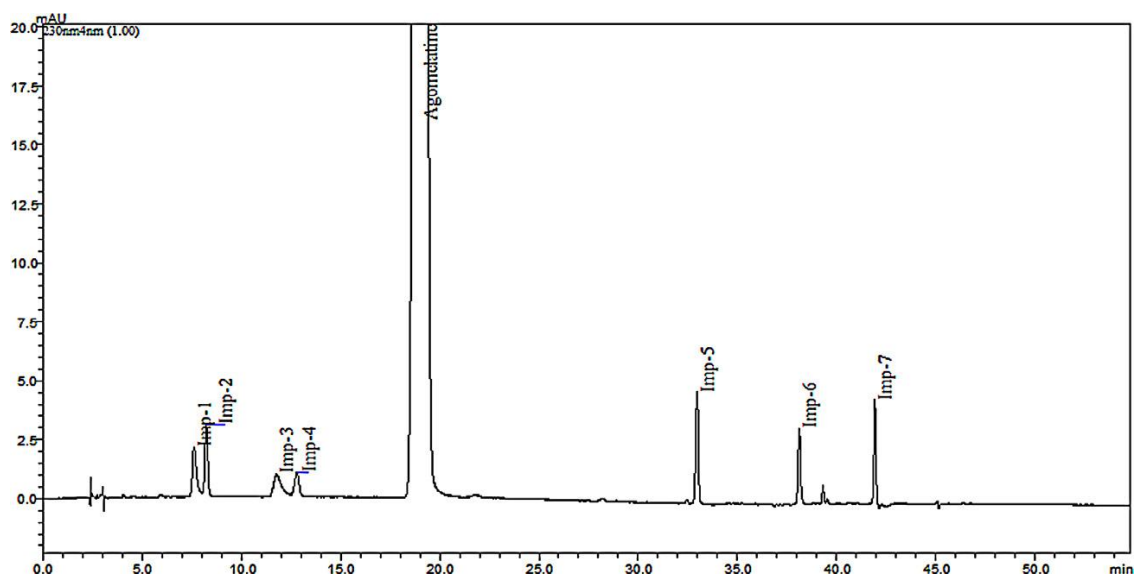
Všechny tyto látky jsou považovány za potenciální nečistoty agomelatinu, protože jejich tvorba během syntézy agomelatinu je velmi pravděpodobná a většina z nich vzniká některou z popsaných vedlejších reakcí (Obr. 15) [32]. Nečistota označená zde Imp-5 odpovídá nitrilu, z něhož hydrolýzou může vzniknout amid a z něj případně i kyselina. Imp-1 je strukturně shodná s látkou výše označenou jako sůl. Imp-6 je totožná s aminem a Imp-7 s dimerem.



Obr. 15 - Vznik některých analyzovaných nečistot agomelatínu [32].
 Imp-1 – sůl, Imp-5 – nitril, Imp-6 – amin, Imp-7 – dimer.

3.3.2. Publikované metody zabývající se analýzou agomelatínu

Těchto 7 výše uvedených nečistot označených Imp-1 až Imp-7 bylo v práci Y.Liu [32] separováno na kapalinovém chromatografu. Jednalo se u HPLC separaci na reverzních fázích za využití kolony Hypersil BDS C18 (250 mm x 4,6 mm, 5 μm) a gradientu s 15mM dihydrogenfosforečnanem draselným o pH 3,0 a acetonitrilem při průtoku 1,0 ml/min a PDA detekci při 230 nm [32]. Přesto, že délka této analýzy přesáhla 50 minut, nebylo dosaženo optimální selektivity a rozlišení (Obr. 16) především mezi Imp-1 a Imp-2. Lineární rozmezí této metody bylo stanoveno na 0,01 – 0,20 μg/ml.



Obr. 16 - Výsledný chromatogram publikované metody pro separaci agomelatinu a jeho nečistot [32].

Byla taktéž publikována práce zabývající se nucenou degradací agomelatinu [33]. Pro stanovení produktů degradace zde byla vyvinuta HPLC metoda s PDA detekcí (240 nm). Separace proběhla na koloně Hypersil BDS C18 (150 x 4,6 mm, 5,0 μ m) za využití gradientové eluce, kdy poměr acetonitrilu začínal na 5 % a stoupl během 10 minut na 90 %. Dále analýza probíhala izokraticky až do ukončení v 30. minutě [33].

Tabulka 3 - Porovnání publikovaných metod pro stanovení agomelatinu.

Autor	LC	SF	MF	detekce	lineární rozmezí
Liu [32]	HPLC	Hypersil BDS C18	ACN/15mM NaH ₂ PO ₄ pH 3,0	PDA	0,01-0,2 μ g/ml
Indumathi [33]	HPLC	C18	ACN/octan amonný	PDA	-
El- Shaheny [34]	HPLC	BDS Hypersil phenyl	MeOH/0,05M fosfátový pufr pH 2,5 (35:65)	FD	0,4-40 ng/ml
Harika [35]	HPLC	Phenomenax C18	voda/MeOH (20:80)	UV	10-50 μ g/ml
Saracino [36]	HPLC	Zorbax C8	ACN/50mM fosfátový pufr	FD	0,5-25 ng/ml
Patil [37]	HPLC	Belasil C18	MeOH/2mM octan amonný	MS/MS	0,05-8 μ g/ml
Simonin [38]	LC GC	C8 ultrasphere	voda/ACN	RIA MS	LOQ 15 pg/ml LOQ 1 pg/ml
Wang [39]	HPLC	Zorbax C8	MeOH/5mM octan amonný s 0,1% kys. mravenčí	MS/MS	0,05-10 ng/ml

Pro separaci a stanovení samotného agomelatinu bylo publikováno několik metod, všechny z nich za využití kapalinové chromatografie na reverzních fázích [34][35][36]

[37][38]. V RP-HPLC metodě vyvinuté pro stanovení agomelatinu v tabletovině a dávkovací formě byla využita UV detekce při 230 nm a linearity bylo dosaženo v koncentračním rozmezí 10-50 $\mu\text{g/ml}$ [35]. HPLC metoda pro stanovení agomelatinu v lidské plazmě, slinách a suchých krevních kapkách naopak využila přirozenou fluorescenci agomelatinu a byla provedena s fluorescenčním detektorem. Mezi nevýhody této metody však patřilo použití acetonitrilu s fosfátovým pufrům jako mobilní fáze, což vyústilo v potřebu dlouhotrvajícího promývání kolony po analýze. Stanovení obsahu bylo omezeno na koncentrace 0,5 – 25 ng/ml [36]. Další z HPLC metod aplikovaná na tablety agomelatinu a lidskou plazmu byla provedena se stejným detektorem i pufrům, avšak druhou část mobilní fáze tvořil metanol. Zde se lineární rozmezí nacházelo mezi 0,4 až 40 ng/ml [34].

Pro detekci agomelatinu byla rovněž vyzkoušena radioimunologická detekce (LC-RIA). Ta umožnila detekovat agomelatin již v koncentraci 15 pg/ml [38]. Ještě nižší mez detekce (1 pg/ml) poskytlo spojení GC-MS [38]. Pro stanovení agomelatinu v lidské plazmě byly taktéž publikovány dvě metody využívající spojení kapalinové chromatografie a hmotnostní spektrometrie [37][39]. První z nich využila ke stanovení obsahu vnitřní standard (fluoxetin) a dosáhla lineárního rozmezí 0,05 – 8 ng/ml [37]. Rozsah druhé zmíněné byl velmi podobný (0,05 – 10 ng/ml) [39].

Všechny zmíněné metody kapalinové chromatografie proběhly na kolonách s částicemi většími než 2 μm [34][35][36][37][38][39]. A přes široké využívání superkritické fluidní chromatografie, nebyla doposud vyvinuta metoda pro stanovení agomelatinu na tomto systému. Proto byla tato studie zaměřena na analýzy probíhající na stacionárních fázích s částicemi menšími než 2 μm a to nejen na kapalinovém (UHPLC) ale také na superkritickém fluidním chromatografickém systému (UHPSFC) za účelem dosažení potřebné selektivity a kratšího času analýzy v porovnání k již publikovaným studiím.

4. Experimentální část

4.1. Použité chemikálie a přístroje

Níže jsou popsány veškeré standardy zkoušených látek, roztoky a přístroje, které byly během experimentů v rámci této diplomové práce využity. Zmíněné analytické standardy byly poskytnuty firmou Zentiva, k.s., Praha.

4.1.1. Standardní látky

- Agomelatin – nečistota „AgoM2 amine hydrochloride“ – Reference Standard
 $C_{13}H_{15}NO.HCl$, 2-(7-methoxynaft-1-yl)ethylamin hydrochlorid, Mr 237,26, čistota 100%
- Agomelatin – nečistota „AgoImpM2 – I“ – Reference Standard
 $C_{26}H_{27}NO_2$, N,N-bis[2-(7-methoxynaft-1-yl)-ethyl]amin, Mr 385,50, čistota 97,7%
- Agomelatin – nečistota „AgoImpM2 – II“ – Reference standard
 $C_{28}H_{29}NO_3$, N,N-bis[2-(7-methoxynaft-1-yl)-ethyl]acetamid, Mr 427,53, čistota 99,8%
- Agomelatin – nečistota „AgoM3 nitrile“ – Reference Standard
 $C_{13}H_{11}NO$, 2-(7-methoxynaft-1-yl)acetonitril, Mr 197,23, čistota 99,4%
- Agomelatin – nečistota „AgoM4 amide“ – Reference Standard
 $C_{13}H_{13}NO_2$, 2-(7-methoxynaft-1-yl)acetamid, Mr 215, 25, čistota 99,2%
- Agomelatin – nečistota „AgoM5 acid“ – Reference Standard
 $C_{13}H_{12}O_3$, 2-(7-methoxynaft-1-yl)acetic acid, Mr 216,23, čistota 99,9%
- Agomelatin-kyselina citrónová co-crystal – Primary Reference Standard
 $C_{15}H_{17}NO_2 + C_6H_8O_7$, N-(2-(7-methoxynaft-1-yl)ethyl)acetamid – citric acid co-crystal, Mr 435,44 (243,31 + 192,13), čistota 99,9%

4.1.2. Rozpouštědla

- Acetonitril, Acetonitrile LC-MS Chromasolv[®], Fluka Analytical (Riedel-deHaën), 2,5 l, C₂H₃N, Mr 41,05, čistota ≥ 99,9%
- Metanol, Methanol LC-MS Chromasolv[®], Fluka Analytical (Riedel-deHaën), 2,5 l, CH₄O, Mr 32,04, čistota ≥ 99%
- Tetrahydrofuran, Tetrahydrofuran G. R., lach:ner, 1 l, C₄H₈O, Mr 72,11, čistota ≥ 99,86%
- Ultračistá voda

Destilace vody pomocí přístroje Milli-Q RG proběhla na Katedře analytické chemie. K filtraci před každým připravením mobilní fáze či pufru určených pro UHPLC byla využita vakuové čerpadlo a filtr 0,45 μm.

4.1.3. Další chemikálie

- Amoniak, Ammonium hydroxide solution ≥ 25%, Fluka Analytical, 100 ml, NH₃, Mr 35,05
- Kyselina mravenčí, Formic acid, Sigma-Aldrich, 100 ml, HCOOH, Mr 46,03, čistota ≥ 95 %
- Kyselina octová, Acetic acid, Sigma-Aldrich, 500 ml, C₂H₄O₂, Mr 60,05, čistota ≥ 99,7 %
- Mravenčan amonný, Ammonium formate, Sigma-Aldrich, 1 kg, CH₅NO₂, Mr 63,06, čistota ≥ 98%
- Octan amonný, Ammonium acetate, Sigma-Aldrich, 1 kg, C₂H₇NO₂, Mr 77,08, čistota ≥ 98 %
- Puftr pH 4,01 pro kalibraci pH metru, Technical Buffer pH 4,01, WTW
- Puftr pH 7,00 pro kalibraci pH metru, Technical Buffer pH 7,00, WTW
- Puftr pH 10,01 pro kalibraci pH metru, Technical Buffer pH 10,01, WTW

4.1.4. Přístrojové vybavení

- UHPLC chromatografický systém Acquity UPC² (Waters, Milford, USA)
- UHPSFC chromatografický systém Acquity UPLC (Waters, Milford, USA)
- Analytické kolony (Waters, Milford, USA)
 - Acquity UPC² BEH, 100 x 3,0 mm x 1,7 μm
 - Acquity UPC² BEH 2-EP, 100 x 3,0 mm x 1,7 μm
 - Acquity UPC² CSH PFP, 100 x 3,0 mm x 1,7 μm
 - Acquity UPC² HSS C18, 100 x 3,0 mm x 1,8 μm
 - Acquity UPLC CSH C18, 100 x 2,1 mm x 1,7 μm
 - Acquity UPLC CSH Fluoro-Phenyl, 100 x 2,1 mm x 1,7 μm
 - Acquity UPLC BEH Shield RP18, 50 x 2,1 mm x 1,7 μm
 - Acquity UPLC BEH Phenyl, 100 x 2,1 mm x 1,7 μm
 - Acquity UPLC BEH C18, 100 x 2,1 mm x 1,7 μm
 - Acquity UPLC BEH Phenyl, 50 x 2,1 mm x 1,7 μm
 - Acquity UPLC BEH C18, 50 x 2,1 mm x 1,7 μm
- Analytické váhy, Sartorius, ČR
- Automatické mikropipety se špičkami, Biohit, ČR
- Injekční stříkačka, Hamilton-Bonaduz, CHE
- Magnetická míchačka, RCT basic IKAMAG, IKA®Werke GmbH & Co. KG, DE
- Membránové filtry, Albet, Chromservis, ČR
- pH metr, HANNA instruments, pH 212, Microprocessor pH Metr, USA
- Šroubovací vialky s uzávěry, Vitrum, ČR
- Vakuová pumpa, Vacc-space, Chromservis, ČR

4.2. Pracovní postup

4.2.1. Příprava standardů

4.2.1.1. Příprava standardů pro UHPSFC metodu

K optimalizaci metody byly použity roztoky analytických standardů nečistot a účinné látky naředěné na různé koncentrace.

Do vialek byl navážen přibližně přesně 1 mg daného sypkého krystalického standardu. Poté bylo přidáno 100 μ l metanolu. Tetrahydrofuranem (THF) byl objem doplněn na 1 ml a vialka byla řádně protřepána. Rozpouštění bylo podpořeno krátkým vystavením (5 min) vialky ultrazvuku. Vzniklé zásobní roztoky standardů o koncentraci 1 mg/ml byly podle potřeby dále ředěny směsí metanolu a tetrahydrofuranu tak, aby byl zachován poměr těchto rozpouštědel 1:9.

4.2.1.2. Příprava standardů pro UHPLC metodu

Pro optimalizaci UHPLC metody byly opět připraveny zásobní roztoky těchto standardů v koncentraci 1 mg/ml tak, že do vialek byl navážen přibližně přesně 1 mg standardu a ten byl následně rozpuštěn v 1 ml metanolu.

Potřebných nižších koncentrací bylo dosaženo ředěním pomocí metanolu nejčastěji v rámci desetinné řady. Do vialky bylo pipetou přeneseno 100 μ l zásobního roztoku a ta byla následně doplněna metanolem na 1 ml. Tím bylo dosaženo koncentrace 0,1 mg/ml a obdobným postupem vycházejícím z této vialky i koncentrací nižších.

4.2.2. Příprava směsi standardů analyzovaných látek

Při vývoji separačních metod byly použity také roztoky směsi standardů agomelatinu a nečistot. Tyto směsi byly připraveny dle stejného postupu pro oba typy chromatografických systémů. Ze zásobních roztoků standardů připravených dle 4.2.1. o koncentraci 1 mg/ml určených pro danou separační metodu bylo odpipetováno 100

μl do společné vialky. Přidáním 30 μl metanolu a 270 μl THF byl vytvořen zásobní roztok směsi analyzovaných látek určený pro UHPSFC v koncentraci 0,1 mg/ml. Pokud bylo namísto směsi metanolu a THF přidáno pouze 300 μl metanolu, vznikl zásobní roztok směsi analyzovaných látek pro separaci na UHPLC, jak ukazuje Tabulka 4. Následným ředěním pomocí daných rozpouštědel byly získány i nižší koncentrace těchto směsí.

Tabulka 4 - Příprava vzorku obsahujícího směs analyzovaných standardů

		Roztok směsi pro UHPSFC	Roztok směsi pro UHPLC
Roztok standardu (koncentrace 1 mg/ml)	NITRIL	100 μl	100 μl
	DIMER	100 μl	100 μl
	AMID	100 μl	100 μl
	KYSELINA	100 μl	100 μl
	AMIN	100 μl	100 μl
	AGOMELATIN	100 μl	100 μl
	SŮL	100 μl	100 μl
Rozpouštědla	MeOH	30 μl	300 μl
	THF	270 μl	0 μl

4.2.3. Příprava vzorků z tabletového prášku

Dvacet tablet s deklarovaným obsahem 25 mg agomelatinu bylo rozmělněno a zhomogenizováno ve třecí misce. Prášek o hmotnosti jedné tablety (určen jako podíl z hmotnosti 20 tablet), byl rozpuštěn v 50 ml metanolu a na 20 minut podroben ultrazvuku. Vzniklý roztok byl přefiltrován za použití 0,2μm PTFE membránového filtru. Konečné koncentrace 50 μg/ml bylo dosaženo odpipetováním 100 μl filtrátu do vialky a následným doplněním na 1 ml. U vzorku určeného pro UHPSFC separaci byl jako rozpouštědlo použit tetrahydrofuran, aby zůstal zachován poměr metanolu a THF 1:9. Vzorek měřený na UHPLC byl ředěn metanolem.

4.2.4. Příprava vzorků z tablety

Do 50 ml odměrné baňky byla vložena jedna tableta a baňka byla doplněna po rysku metanolem. Po 20 minutách v ultrazvuku byl roztok přefiltrován přes membránový filtr a zředěn stejným postupem jako při přípravě vzorků z tabletového prášku (4.2.3.).

4.2.5. Příprava mobilní fáze, aditiv a pufrů

4.2.5.1. Příprava mobilní fáze a aditiv pro UHPSFC

Jako organický modifikátor v mobilní fázi byl použit metanol, jenž byl dále upraven přidáním aditivem.

Rozpuštěním 0,6306 g mravenčanu amonného v metanolu, převedením tohoto roztoku do 500 ml odměrné baňky a jeho doplněním po rysku byl připraven 20mM roztok mravenčanu amonného v metanolu.

Druhým z použitých aditiv byl 20mM roztok octanu amonného, připravený obdobným způsobem jako první ze zmíněných roztoků, avšak s tím rozdílem, že v metanolu bylo rozpuštěno 0,7708 g octanu amonného.

Posledním byl 20mM roztok mravenčanu amonného v metanolu s přidavkem 5 % vody. 500 ml tohoto roztoku bylo připraveno navážením 0,6306 g mravenčanu amonného, který byl rozpuštěn v metanolu a kvantitativně přenesen do 500 ml odměrné baňky, do níž bylo následně přidáno 25 ml ultračisté vody. Odměrná baňka byla metanolem doplněna po rysku.

4.2.5.2. Příprava mobilní fáze a pufru pro UHPLC

Jako organická část mobilní fáze pro separaci na UHPLC byl použit metanol, acetonitril, anebo směs metanolu a acetonitrilu v poměru 1:1, která byla připravena následujícím postupem. Do 500 ml odměrné baňky bylo napipetováno 250 ml acetonitrilu a tato baňka byla následně pomocí metanolu doplněna po rysku.

Vodnou složku mobilní fáze tvořil pufr s pH 2, 3, 7, 9, 9,5 nebo 10. 10mM pufr s pH 3,0 byl připraven rozpuštěním 3,15 g mravenčanu amonného v 225 ml vody. K tomuto roztoku bylo přidáno 6,25 ml kyseliny mravenčí, čímž vznikl zásobní roztok, jenž byl těsně před použitím 20krát zředěn a to tak, že bylo do 200 ml odměrné baňky odpipetováno 10 ml tohoto roztoku a následně byla baňka doplněna po rysku a roztok byl zfiltrován. Ze stejného zásobního roztoku byl taktéž připraven 10mM pufr o pH 2,0, když bylo pH zásobního roztoku upraveno pomocí pH metru a kyseliny mravenčí na hodnotu 2,0.

Obdobným ředěním jako první z uvedených pufrů byl připravován i 10mM pufr o pH 9,0. Zásobní roztok pro tento pufr vznikl rozpuštěním 3,85 g octanu amonného v 225 ml vody a přidáním 20 ml 25% roztoku hydroxidu amonného.

Pufr o pH 9,5 byl připraven přidáním 187 μ l hydroxidu amonného do přefiltrované vody tak, aby konečný objem roztoku byl 250 ml. Pomocí pH metru a kyseliny octové bylo následně pH upraveno na 9,5. Pufr o pH 10 byl připraven podobným postupem, avšak kyselina octová byla přidávána, až dokud nebylo dosaženo zvoleného pH.

Konečné roztoky všech pufrů byly před použitím přefiltrovány za využití vakuového čerpadla a 0,45 μ m filtru.

4.2.6. Podmínky separace

4.2.6.1. Podmínky UHPSFC separace

Pro separace byl použit superkritický fluidní chromatografický systém Acquity UPC² (Waters, Milford, MA, USA) a 4 rozdílné stacionární fáze. Všechny z nich byly v rozměrech 100 x 3,0 mm a s velikostí částic 1,7 μ m (Acquity UPC² BEH, Acquity UPC² BEH 2-EP, Acquity UPC² CSH PFP) nebo 1,8 μ m (Acquity UPC² HSS C18). Ke gradientové eluci byl využit modifikovaný CO₂ (> 99,995%, LindeGas, Česká Republika). Gradientový program začínal na 5 % modifikátoru a končil na 30 % ve 3. minutě. Jako modifikátor byl využit metanol s aditivem (20mM mravenčan amonný, 20mM octan amonný, 20mM mravenčan amonný s přídatkem 5 % vody). Průtok byl nastaven na 2 ml/min, teplota na 40°C a BPR na 2000 psi. Teplota v automatickém dávkovači byla nastavena na 10°C. Tím byla zajištěna stálost teploty a zamezení odpařování organického

rozpouštědla. Nastříkovaný objem odpovídal 2 μ l. UV detekce byla zajištěna detektorem Acquity UPC² PDA při 225 nm.

4.2.6.2. Podmínky UHPLC separace

UHPLC analýzy byly provedeny na ultra-vysokoúčinném kapalinovém chromatografickém systému Acquity UPLC (Waters, Milford, MA, USA). Testované stacionární fáze zahrnovaly kolony s průměrem 2,1 mm a částicemi ve velikosti 1,7 μ m, avšak s rozdílnými délkami: 100 mm Acquity UPLC CSH C18 a Acquity CSH Fluoro-Phenyl, 50 mm Acquity UPLC BEH Shield RP18 a Acquity UPLC BEH Phenyl a Acquity UPLC BEH C18 v 50mm i 10mm provedení. Metanol, acetonitril a směs metanolu a acetonitrilu v poměru 1:1 byly vyzkoušeny jako organická část mobilní fáze za využití různých nastavení gradientu, gradientových křivek a pufrů (pH 2,0 a 3,0 – 10mM pufrů mravenčanu amonného, 9,0, 9,5 a 10,0 – 10mM pufrů octanu amonného). Teplota kolony byla nastavena na 30°C, nastříkovaný objem 2 μ l a PDA detekce proběhla při 225 nm.

4.2.7. Validace metod

4.2.7.1. Test způsobilosti systému

Před samotnou validací byl proveden Test způsobilosti systému (SST), aby byla potvrzena vhodnost určených separačních podmínek. Tato měření byla provedena na 3 koncentračních hladinách pro každou z metod. Na UHPSFC se jednalo o koncentrace 25 μ g/ml, 50 μ g/ml a 70 μ g/ml, na UHPLC systému pak byly měřeny koncentrace 0,7 μ g/ml, 2,5 μ g/ml a 10 μ g/ml.

V rámci validace byly určeny parametry linearity, limitu detekce, limitu kvantifikace, přesnosti a správnosti.

4.2.7.2. Linearita

Dle směrnic ICH by mělo být při určování linearity připraveno a metodou analyzováno více než 6 kalibračních standardů, které svou koncentrací pokrývají celé předpokládané koncentrační rozmezí [40].

Tyto podmínky byly splněny, neboť pro UHPSFC metodu bylo připraveno 12 vzorků s koncentracemi od 0,1 µg/ml po 70 µg/ml. Byla připravena směs standardů analyzovaných látek. Ta obsahovala každou látku v koncentraci 0,1 mg/ml a následně z ní byly připraveny i koncentrace nižší (Tabulka 5 a Tabulka 6).

Tabulka 5 - Příprava vzorků pro měření linearity na SFC.

vzorek o koncentraci	10 µg/ml	25 µg/ml	50 µg/ml	70 µg/ml
roztok směsi standardů pro UHPSFC (0,1 mg/ml)	100 µl	250 µl	500 µl	700 µl
MeOH	90 µl	75 µl	50 µl	30 µl
THF	810 µl	675 µl	450 µl	270 µl

Tabulka 6 - Ředění dle desetinné řady pro přípravu vzorků na měření kalibračních křivek na UHPSFC.

vzorek o koncentraci	MeOH	THF	vzniklá konc.	MeOH	THF	vzniklá konc.		
10 µg/ml	100 µl	90 µl	810 µl	1 µg/ml	100 µl	90 µl	810 µl	0,1 µg/ml
25 µg/ml	100 µl	90 µl	810 µl	2,5 µg/ml	100 µl	90 µl	810 µl	0,25 µg/ml
50 µg/ml	100 µl	90 µl	810 µl	5 µg/ml	100 µl	90 µl	810 µl	0,5 µg/ml
70 µg/ml	100 µl	90 µl	810 µl	7 µg/ml	100 µl	90 µl	810 µl	0,7 µg/ml

Obdobně bylo připraveno 12 vzorků pro analýzy pomocí UHPLC metody. I ty pokrývaly koncentrace od 0,1 µg/ml po 70 µg/ml. Postup ředění byl proto stejný jako ten výše popsáný s jedinou výjimkou a to použitím pouze čistého metanolu jako rozpouštědla (Tabulka 7 a Tabulka 8).

Tabulka 7 – Základní ředění pro přípravu vzorků na měření kalibračních křivek na UHPLC.

vzorek o koncentraci	10 µg/ml	25 µg/ml	50 µg/ml	70 µg/ml
roztok směsi standardů pro UHPLC	100 µl	250 µl	500 µl	700 µl
MeOH	900 µl	750 µl	500 µl	300 µl

Tabulka 8 - Ředění dle desetinné řady pro přípravu vzorků na měření kalibračních křivek na UHPLC.

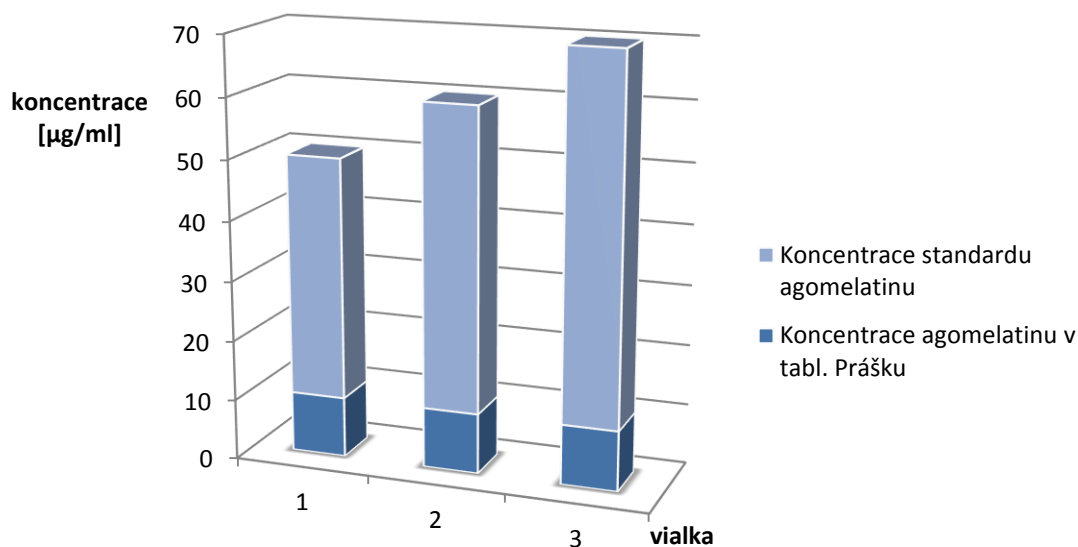
vzorek o koncentraci		MeOH	vzniklá konc.	MeOH	vzniklá konc.
10 µg/ml	100 µl	900 µl	1 µg/ml	100 µl	900 µl
25 µg/ml	100 µl	900 µl	2,5 µg/ml	100 µl	900 µl
50 µg/ml	100 µl	900 µl	5 µg/ml	100 µl	900 µl
70 µg/ml	100 µl	900 µl	7 µg/ml	100 µl	900 µl

Linearita metod byla následně u obou metod prokázána regresními rovnicemi a koeficienty determinace pro jednotlivé analyty.

4.2.7.3. Určení přesnosti a správnosti UHPSFC metody

Přesnost a právnost byly na UHPSFC systému hodnoceny na 3 koncentračních hladinách (40, 50 a 60 µg/ml) pro agomelatin jako účinnou látku a na 3 odlišných koncentračních hladinách (2, 2,5 a 3 µg/ml) pro nečistoty.

Jako výchozí 100% koncentrace agomelatinu byla brána koncentrace 50 µg/ml. Pro vzorky bylo ředění zvoleno tak, aby bylo dosaženo 3 koncentračních hladin odpovídajících 80, 100 a 120 % této základní koncentrace. Roztoky s těmito známými koncentracemi standardu agomelatinu byly přidány k desetkrát zředěným vzorkům připraveným z tabletového prášku dle popsaného postupu (4.2.3). Vialka podrobená analýze tedy nakonec obsahovala jak standard agomelatinu, tak agomelatin obsažený v tabletovém prášku (Obr. 17). Jednalo se tedy o metodu přidavku standardu, která byla využita, aby koncentrace jednotlivých vzorků byly ve validovaném rozmezí.



Obr. 17- Složení vzorků pro určení přesnosti a správnosti UHPSFC metody.

Tyto vzorky o třech různých koncentracích standardu agomelatinu byly připraveny ve třech provedeních a následně podrobeny analýze za vybraných podmínek. V sekvenci byly taktéž zanalyzovány vialky se vzorky sloužícími jako vnější standard. Ke každé koncentrační hladině byly připraveny 2 vialky vnějšího standardu (STANDARD A-C) obsahující pouze standard agomelatinu v dané koncentraci, tedy 40 µg/ml, 50 µg/ml a 60 µg/ml. Na začátek i konec sekvence bylo navíc vloženo měření vialek se zásobním roztokem z tabletového prášku (STANDARD PLV) o koncentraci 10 µg/ml. Složení analyzovaných vzorků, z nichž každý byl v sekvenci změřen 3x, ukazuje Tabulka 9.

Tabulka 9 - Ředění vzorků pro určení přesnosti a správnosti měření účinné látky na SFC.

			celková konc. [µg/ml]	zásobní roztok AGO 0,1mg/ml	zásobní roztok PLV 50 µg/ml	MeOH	THF
celková c	=	c AGO	+	c PLV			
50 µg/ml		40 µg/ml		10 µg/ml			
		STANDARD A					
			40	400 µl	0 µl	100 µl	500 µl
celková c	=	c AGO	+	c PLV			
60 µg/ml		50 µg/ml		10 µg/ml			
		STANDARD B					
			50	500 µl	0 µl	100 µl	400 µl

			celková konc. [µg/ml]	zásobní roztok AGO 0,1mg/ml	zásobní roztok PLV 50 µg/ml	MeOH	THF
celková c	=	c AGO					
70 µg/ml		60 µg/ml	70	600 µl	200 µl	80 µl	620 µl
	+	c PLV					
		10 µg/ml					
		STANDARD C	60	600 µl	0 µl	100 µl	300 µl
		STANDARD PLV	10	0 µl	200 µl	80 µl	720 µl

Doporučené postupy ICH [41] uvádějí, že mez stanovitelnosti nečistot vyplývá z maximální denní dávky daného léčiva. Ta je u agomelatinu 50 mg a proto zde platí, že hraniční koncentrace nečistot je rovna 0,5 % z maximální denní dávky léčiva, tedy 250 µg. Během přípravy vzorku tablety byla jedna 25mg tableta agomelatinu rozpuštěna v 50 ml rozpouštědla. Byla tak získána koncentrace 0,5 mg/ml. Tato koncentrace je 100krát nižší než zmíněná maximální denní dávka agomelatinu a proto byla koncentrační hladina nečistot zvolena taktéž stonásobně nižší než výše vypočtených 250 µg. Ředění bylo proto provedeno tak, aby 1 ml vzorku obsahoval 2,5 µg každé z nečistot. Ostatní hladiny odpovídají 80 a 120 % této koncentrace.

Pro určení správnosti a přesnosti při měření nečistot byly ke vzorkům z tabletového prášku přidány roztoky směsi standardů těchto nečistot o 3 různých koncentracích a to 2 µg/ml, 2,5 µg/ml a 3 µg/ml.

Dle postupu uvedeného v kapitole 4.2.2 byla připravena směs nečistot o koncentraci 0,1 mg/ml, která byla dle desetinné řady zředěna na koncentraci 10 µg/ml. Odebráním 400 µl, 500 µl, respektive 600 µl, a jejich doplněním na objem 1 ml tetrahydrofuranem byly připraveny zásobní roztoky nečistot (zásobní roztok IMP) s koncentracemi 4 µg/ml, 5 µg/ml, resp. 6 µg/ml. Dle postupu uvedeného v Tabulka 10 z nich byly následně připraveny vždy 3 vialky a 2 vnější standardy pro každou koncentrační hladinu nečistot a také 2 standardy z tabletového prášku.

Tabulka 10 - Ředění vzorků pro určení přesnosti a správnosti měření nečistot na SFC.

číslo vialky	konc. nečistot [μg/ml]	konc. PLV [μg/ml]	zásobní roztok IMP [μg/ml]	zásobní roztok IMP	zásobní roztok PLV 50 μg/ml	THF
1	2	25		500 μl	500 μl	0 μl
STANDARD A	2	0	4	500 μl	0 μl	500 μl
2	2,5	25		500 μl	500 μl	0 μl
STANDARD B	2,5	0	5	500 μl	0 μl	500 μl
3	3	25		500 μl	500 μl	0 μl
STANDARD C	3	0	6	500 μl	0 μl	500 μl
STAND PLV	0	25		0 μl	500 μl	500 μl

4.2.7.4. Určení přesnosti a správnosti UHPLC metody

Aby byla zachována podmínka, že se základní stoprocentní koncentrace nachází přibližně uprostřed kalibračního rozmezí, byla pro měření na kapalinové chromatografii zvolena základní koncentrace agomelatinu na 5 μg/ml, tedy 10x nižší než u SFC.

V každé vialce byl opět agomelatin z tabletového prášku, tentokrát v koncentraci 1 μg/ml. K němu bylo přidáno množství zásobního roztoku standardu agomelatinu, aby bylo dosaženo koncentrací 5 μg/ml, 6 μg/ml a 7 μg/ml. Ty odpovídají opět 80 %, 100% a 120 % ze zvolené základní koncentrace. Každá z těchto koncentračních hladin byla připravena 3x a tyto byly zároveň s vnějšími standardy podrobeny analýze za vybraných podmínek. Ke každé trojici vialek byly připraveny 2 standardy agomelatinu (STANDARD A-C), které obsahovaly standard agomelatinu v příslušné koncentraci, tedy 4 μg/ml, 5 μg/ml a 6 μg/ml. Zároveň byly zanalyzovány i standardy z tabletového prášku (STANDARD PLV). Přípravu jednotlivých vzorků, z nichž každý byly v sekvenci zanalyzován 3x, ukazuje Tabulka 11.

Tabulka 11 - Ředění vzorků pro určení přesnosti a správnosti měření účinné látky na UHPLC.

			celková konc.	zásobní roztok AGO 10 μg/ml	zásobní roztok PLV 5 μg/ml	MeOH
celková c	c AGO	c PLV				
5 μg/ml	= 4 μg/ml	+ 1 μg/ml	5 μg/ml	400 μl	200 μl	400 μl
	STANDARD A		4 μg/ml	400 μl	0 μl	600 μl
celková c	c AGO	c PLV				
6 μg/ml	= 5 μg/ml	+ 1 μg/ml	6 μg/ml	500 μl	200 μl	300 μl
	STANDARD C		5 μg/ml	500 μl	0 μl	500 μl

			celková konc.	zásobní roztok AGO 10 µg/ml	zásobní roztok PLV 5 µg/ml	MeOH
celková c	c AGO	c PLV				
7 µg/ml	= 6 µg/ml	+ 1 µg/ml	7 µg/ml	600 µl	200 µl	200 µl
	STANDARD E		6 µg/ml	600 µl	0 µl	400 µl
	STANDARD PLV		1 µg/ml	0 µl	200 µl	800 µl

Vzorky pro určení přesnosti a správnosti měření nečistot pomocí UHPLC systému byly připraveny obdobným postupem jako ty určené pro SFC, avšak s tím rozdílem, že požadované koncentrace byly opět 10x nižší, tzn. 0,2 µg/ml, 0,25 µg/ml a 0,3 µg/ml. Tím byla dodržena podmínka, aby 100% koncentrace nečistot odpovídala 0,5 % ze základní koncentrace účinné látky, která je zde určena na 5 µg/ml.

Směs nečistot připravená dle 4.2.2 byla zředěna tak, aby bylo dosaženo koncentrací 0,4, 0,5 a 0,6 µg/ml (zásobní roztok IMP). Roztok z tabletového prášku byl připraven dle 4.2.3 a 100x zředěn (zásobní roztok PLV). Z těchto zásobních roztoků byly připraveny vždy 3 vzorky pro každou z koncentračních hladin nečistot. Aby bylo možno následně vypočítat výtěžnost jednotlivých měření, byly rovněž vždy ve dvou provedeních připraveny standardy. A to jak standardy z tabletového prášku o koncentraci 0,25 µg/ml (STAND PLV), tak standardy A až C, tzn. vnější standard pro každou koncentrační hladinu nečistot. Přípravu jednotlivých vialek shrnuje Tabulka 12.

Tabulka 12 - Ředění vzorků pro určení přesnosti a správnosti měření nečistot na UHPLC

číslo vialky	konc. nečistot [µg/ml]	konc. PLV [µg/ml]	zásobní roztok IMP [µg/ml]	zásobní roztok IMP	zásobní roztok PLV 50 µg/ml	THF
1	0,2	25		500 µl	500 µl	0 µl
STANDARD A	0,2	0	0,4	500 µl	0 µl	500 µl
2	0,25	25		500 µl	500 µl	0 µl
STANDARD B	0,25	0	0,5	500 µl	0 µl	500 µl
3	0,3	25		500 µl	500 µl	0 µl
STANDARD C	0,3	0	0,6	500 µl	0 µl	500 µl
STAND PLV	0	25		0 µl	500 µl	500 µl

5. Výsledky a diskuze

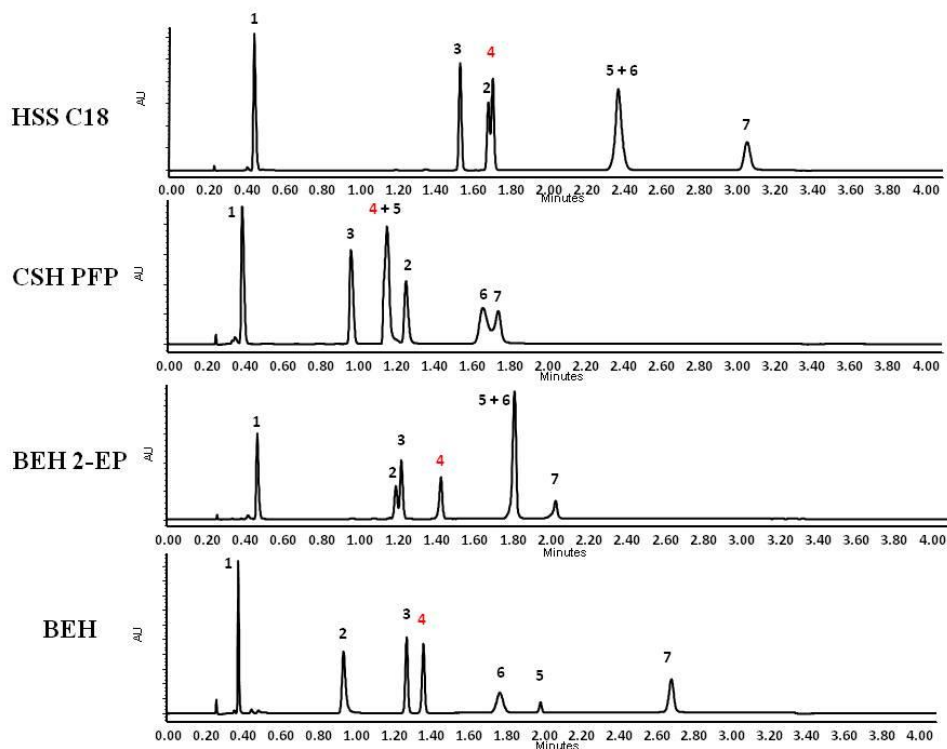
5.1. Vývoj UHPSFC metody

5.1.1. Optimalizace chromatografických podmínek

Vzhledem k rozdílným fyzikálně-chemickým vlastnostem nečistot agomelatinu, které byly zmíněny v kapitole 3.3.1., byl jedním z cílů a prvním krokem screening a srovnání separací na 4 různých kolonách. Všechny testované kolony obsahovaly částice menší než 2 μm , avšak lišily se svou selektivitou a polaritou. Polární stacionární fáze zahrnovaly hybridní stacionární fázi s ethylenovými můstky (BEH) a stejnou fázi modifikovanou 2-ethylpyridinovou skupinou (BEH 2-EP). Naopak, vícemodální hybridní fáze s nábojem modifikovaná pentafluorofenylovou skupinou (CSH PFP) a silikagelová fáze s 18 uhlíkatým řetězcem patří mezi stacionární fáze se smíšenými vlastnosti, respektive nepolární stacionární fáze.

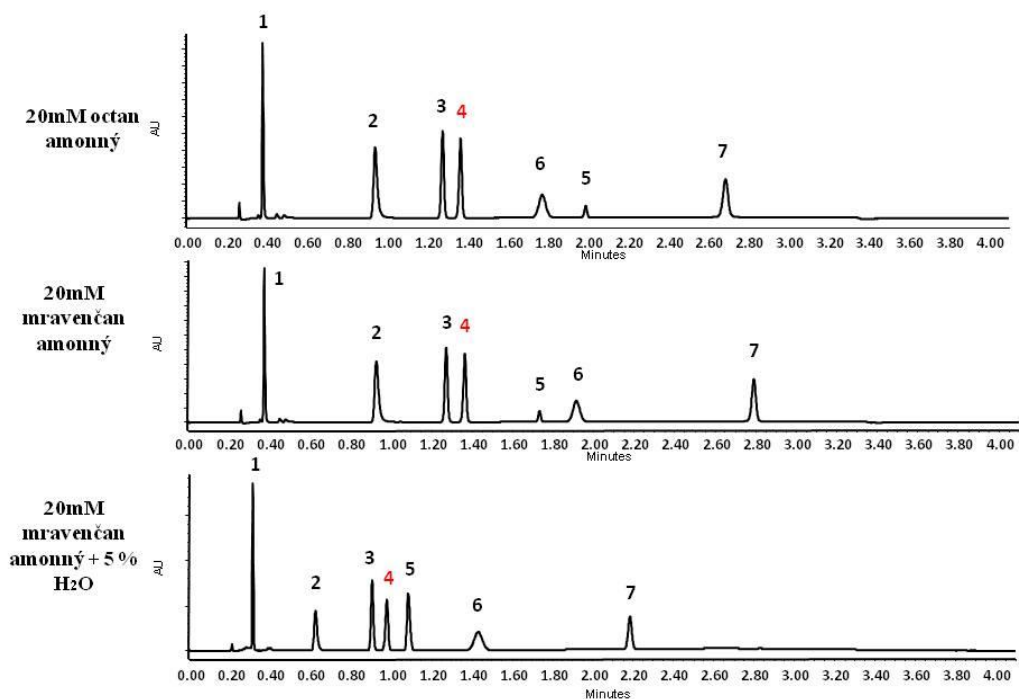
Analýzy na všech kolonách proběhly za těchto chromatografických podmínek: gradientová eluce z 5 na 30 % metanolu jako organického modifikátoru s přidavkem 20mM octanu amonného, průtok 2 ml/min, 40°C a 2000 psi. Přestože bylo možno pozorovat významné změny v retenci nečistot a jejich selektivitě, na všech 4 testovaných stacionárních fázích byly všechny látky eluovány.

Dostatečného rozlišení všech analytů bylo dosaženo pouze na hybridní fázi s ethylenovými můstky (BEH). Pík 6-amin zde byl však značně rozmytý. Eluční pořadí látek se lišilo na všech ostatních kolonách (Obr. 18). Nejmenší rozdíl bylo možno pozorovat mezi stacionární fází BEH a 2-ethylpyridinem modifikovanou hybridní kolonou, kde eluční pořadí zůstalo stejné, avšak píky 5-kyselina a 6-amin koeluovaly. Naprosto odlišné pořadí nabídla separace na HSS C18, kde pík 2-dimer eluoval po píku 3-amidu a blízko píku 4-agomelatinu a kde se opět objevila koeluace kyseliny a aminu (píky 5 a 6). Separace na CSH PFP byla charakteristická dřívější elucí píku 5-kyseliny, která měla stejný retenční čas jako agomelatin, a nízkým rozlišením mezi píky 6-amin a 7-sůl. Proto byl v dalším kroku na všech kolonách vyzkoušen vliv změny aditiva.

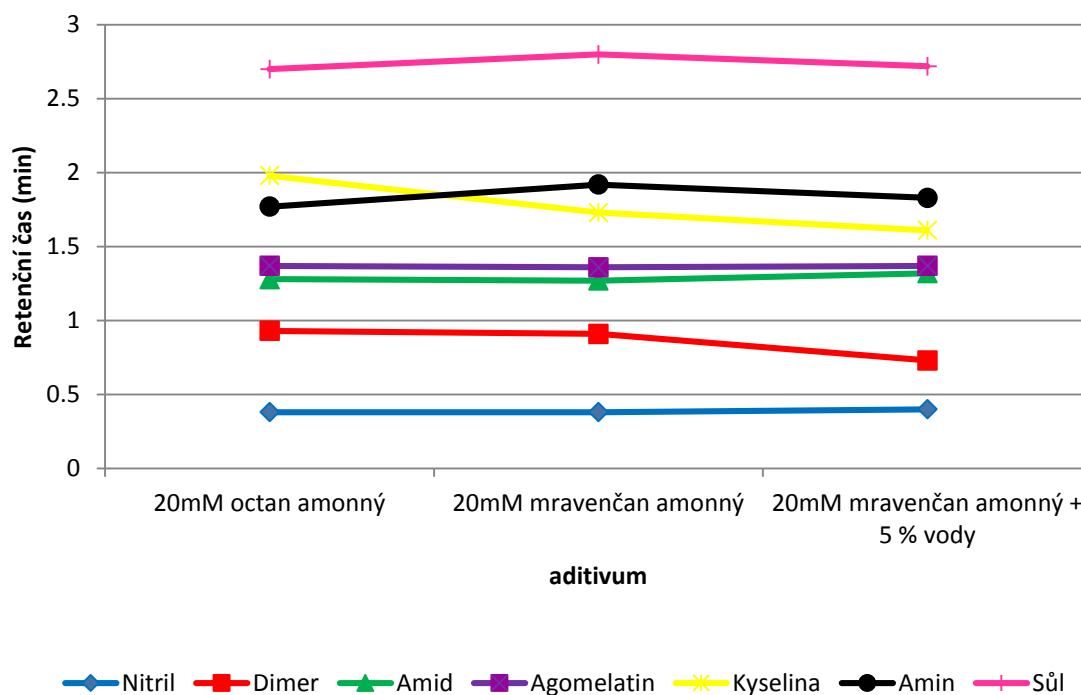


Obr. 18 - Srovnání UHPSFC separací na kolonách BEH, BEH 2-EP, HSS C18 a CSH PFP za využití 20mM octanu amonného v metanolu jako aditiva. (1) nitril (2) dimer (3) amid (4) agomelatin (5) kyselina (6) amin (7) sůl

Výměna z octanu na mravenčan vedla na koloně BEH ke změně pořadí v eluci píku 5-kyselina a 6-amin, avšak ten zůstal stále rozmytý. A stejně tomu zůstalo i po přidavku 5 % vody, který vedl pouze k dřívější eluci nečistoty kyseliny (Obr.19). Posuny v retenčních časech jednotlivých látek shrnuje Obr. 20.

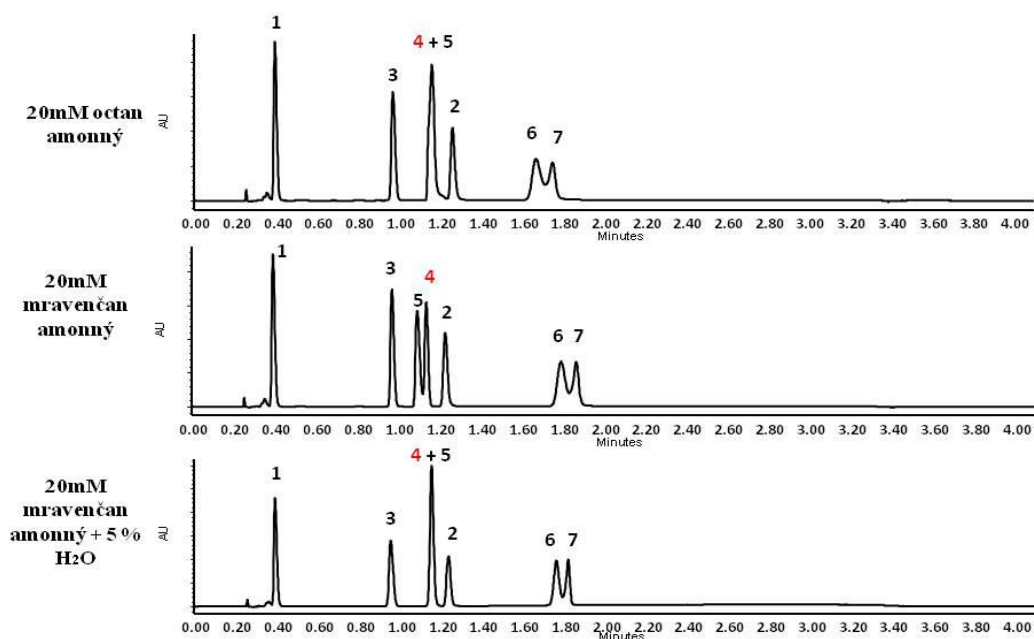


Obr. 19 - Srovnání UHPSFC separací na koloně BEH za využití různých aditiv. (1) nitril (2) dimer (3) amid (4) agomelatin (5) kyselina (6) amin (7) sůl.

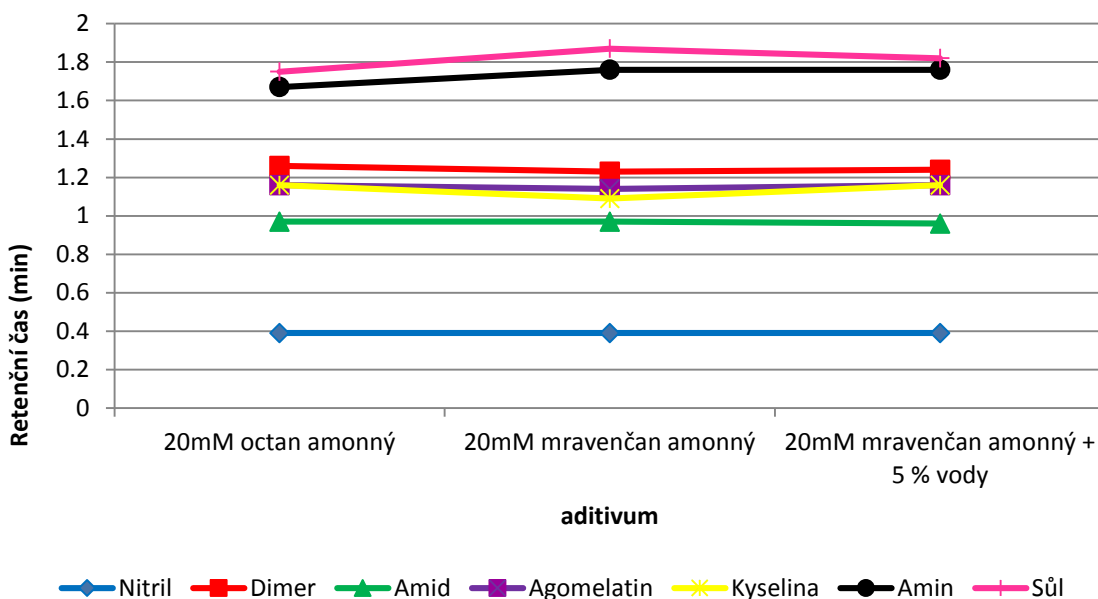


Obr. 20 - Posuny v retenčních časech analytů na koloně BEH vlivem změny aditiva.

Podobný posun v retenčním čase kyseliny jako na koloně BEH byl pozorován také na koloně CSH PFP, což vedlo k rozseparování píků 5-kyselina a 4-agomelatin. K obdobnému posunu došlo po přidavku vody jak u kyseliny tak agomelatinu, což vedlo k jejich zpětné koeluci (Obr. 21, Obr. 22).

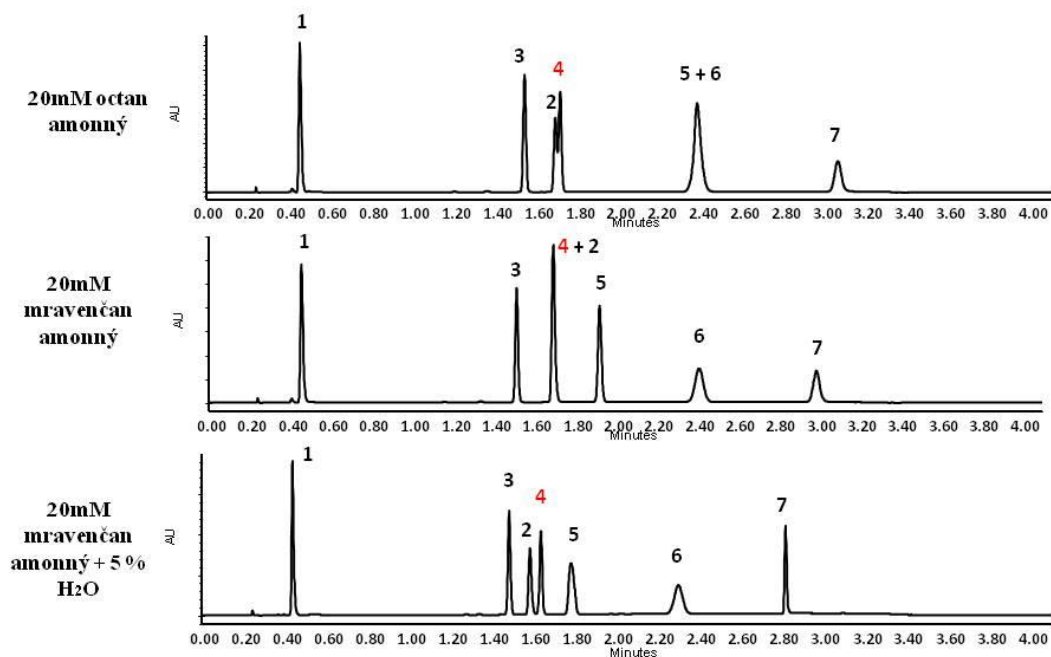


Obr. 21 - Srovnání UHPSFC separací na koloně CSH PFP za využití různých aditiv. (1) nitril (2) dimer (3) amid (4) agomelatin (5) kyselina (6) amin (7) sůl.

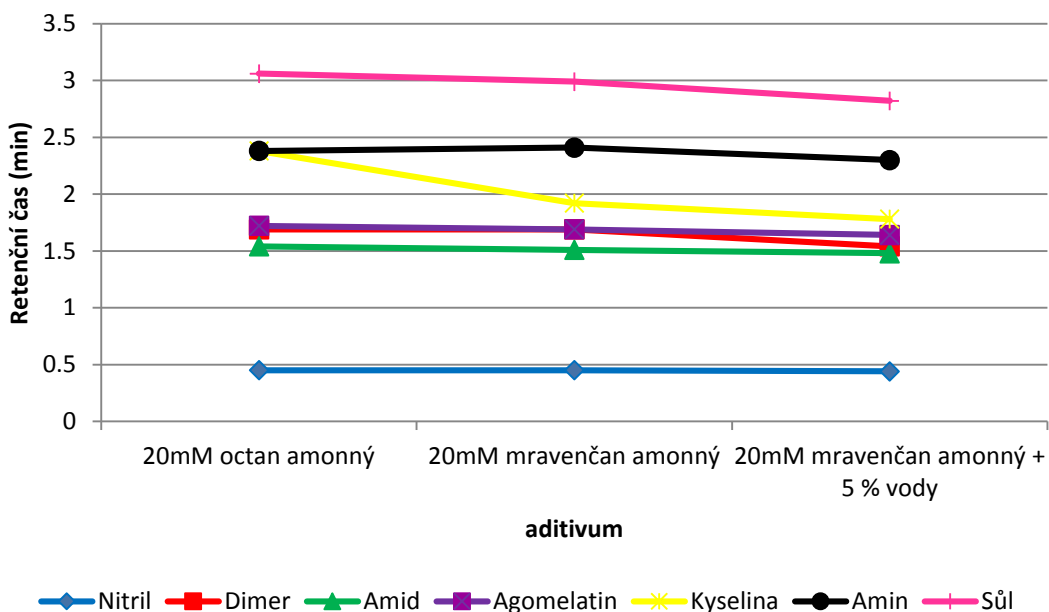


Obr. 22 - Posuny v retenčních časech analytů na koloně CSH PFP vlivem změny aditiva.

Taktéž na koloně HSS C18 došlo při výměně octanu za mravenčan k posunu v retenčních časech. Kyselina a amin byly eluovány ve stejném retenčním čase při separaci s octanem amonným, avšak při využití mravenčanu amonného byla retence kyseliny nižší. Stejně tak tomu bylo při analýze s přidavkem vody. Vliv aditiva se projevil také při separaci analytů 2 a 4, tedy dimeru a agomelatinu. Při použití octanu se na chromatogramu objevily píky sice separované, ale s velmi malým rozlišením. Využitím mravenčanu došlo ještě ke zhoršení separace, neboť došlo ke smytí píků těchto dvou analytů. Naopak po přidání vody do aditiva se tyto píky oddělily a látky byly z kolony vymyty s rozdílnými retenčními časy. Poslední zmíněné aditivum také zlepšilo účinnost separace soli při zachování stejné délky analýzy (Obr. 23, Obr. 24).



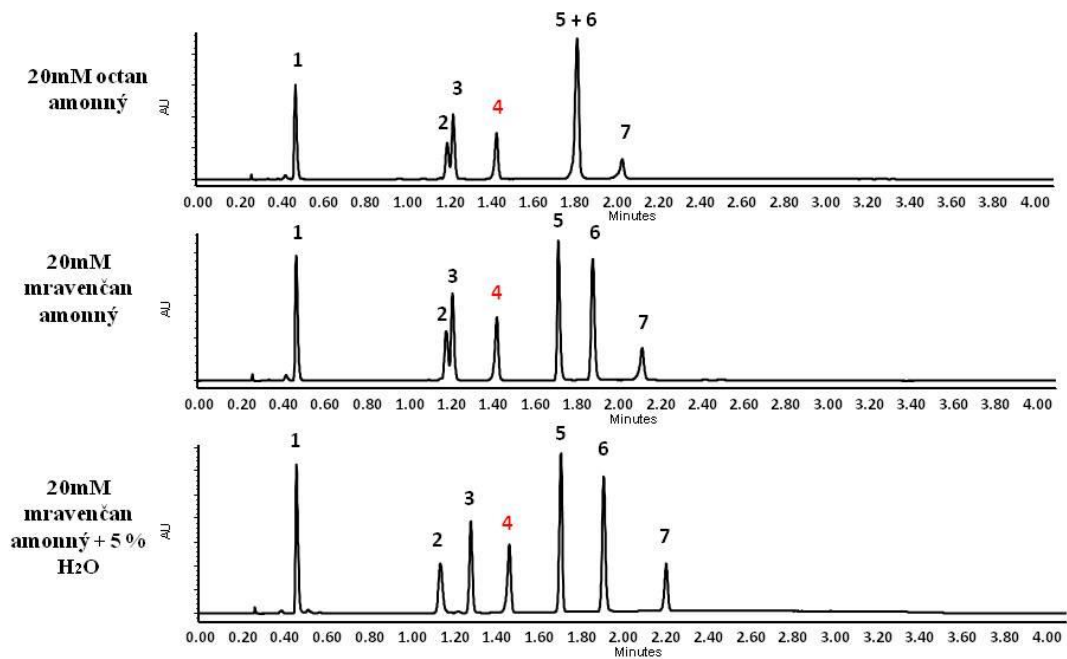
Obr. 23 - Srovnání UHPSFC separací na koloně HSS C18 za využití různých aditiv. (1) nitril (2) dimer (3) amid (4) agomelatin (5) kyselina (6) amin (7) sůl



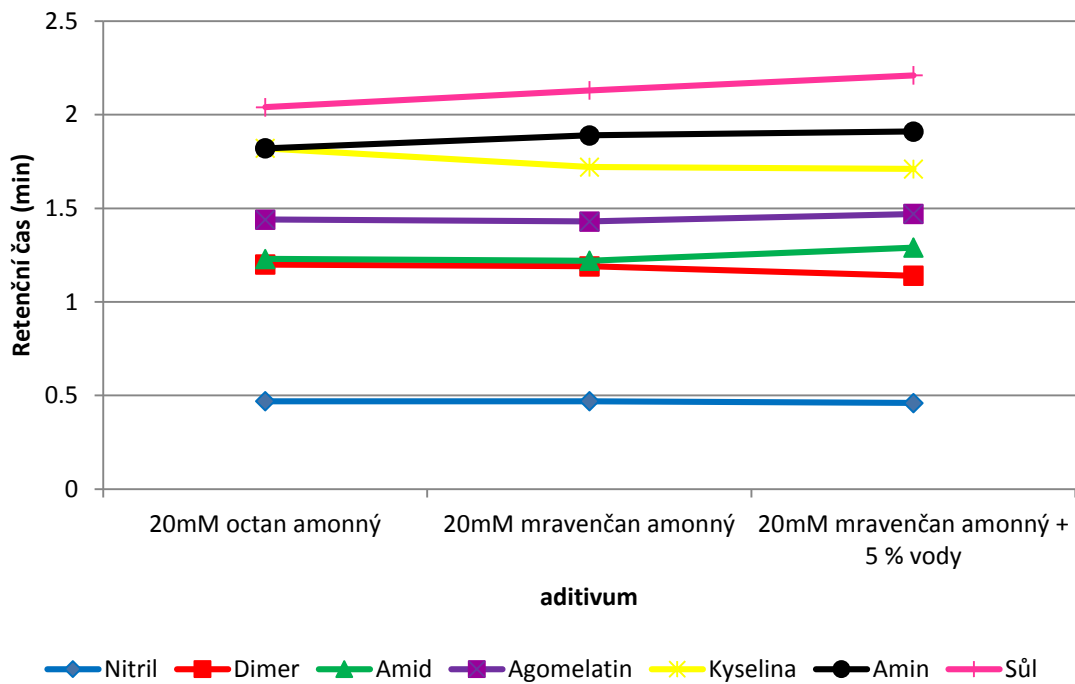
Obr. 24 - Posuny v retenčních časech analytů na koloně HSS C18 vlivem změny aditiva.

Po výměně octanu za mravenčan byly na koloně BEH 2-EP separovány píky 5-kyselina a 6-amin, které za využití octanu koeluovaly. Došlo k tomu změnou retenčního času kyseliny z 1,97 na 1,7 min. Přídavek vody měl na separaci na této stacionární fázi malý,

avšak významný vliv. Nezměnilo se eluční pořadí, avšak přidavek vody vedl k většímu rozlišení mezi píky 2-dimer a 3-amid (Obr. 25, Obr. 26).



Obr. 25 - Srovnání UHPSFC separací na koloně BEH 2-EP za využití různých aditiv. (1) nitril (2) dimer (3) amid (4) agomelatin (5) kyselina (6) amin (7) sůl.



Obr. 26 - Posuny v retenčních časech analytů na koloně BEH 2-EP vlivem změny aditiva.

Vzhledem k předloženým chromatogramům získaným během vývoje metody, kdy byly vyzkoušeny kombinace čtyř zmíněných kolon se všemi 3 aditivami, bylo zjištěno, že nejvhodnější selektivitu poskytuje hybridní stacionární fáze BEH modifikovaná 2-ethylpyridinem. Výsledkem separace na této koloně za využití 20mM mravenčanu amonného s 5 % vody jako aditiva do metanolu byly úzké symetrické píky. Došlo také ke stabilizaci retenčních časů a separaci všech látek na základní linii. Vhodnost těchto separačních podmínek byla potvrzena testem způsobilosti systému a výsledky validačních měření, viz kap. 5.1.3 a 5.1.4.

5.1.2. Optimalizace přípravy vzorku tablet

Pro přípravu vzorků tablet byla vyzkoušena 3 různá rozpouštědla. Jednalo se o čistý metanol a směs metanolu a vody v poměrech 3:1 a 1:1. 20 tablet s obsahem 25 mg agomelatinu bylo rozmělněno a zhomogenizováno. Hmotnost prášku odpovídající 1 tabletě byla rozpuštěna v 50 ml zkoušeného rozpouštědla a následně 10x zředěna tetrahydrofuranem, aby byl vzorek slučitelný s mobilní fází UHPSFC. Tímto bylo dosaženo koncentrace 50 µg/ml účinné látky ve vzorku. Nejvyšší průměrná procentuální výtěžnost z 8 měření a nejmenší relativní směrodatná odchylka ukázaly, že nejvýhodnější je použití čistého metanolu (Tabulka 13).

Tabulka 13 – Procentuální výtěžnost a relativní směrodatná odchylka při optimalizaci přípravy vzorku.

Rozpouštědlo	Výtěžnost [%]	RSD [%]
MeOH	99,7	4,8
MeOH : H ₂ O = 3:1	86,4	8,6
MeOH : H ₂ O = 1:1	77,5	20,0

5.1.3. SST – Test způsobilosti systému pro UHPSFC metodu

Vhodnost chromatografického systému s vybranou kolonou BEH 2-EP za využití 20mM mravenčanu amonného v metanolu s přidavkem 5 % vody jako aditiva do mobilní fáze

CO₂ byla potvrzena testem způsobilosti systému porovnávajícím několik vybraných parametrů: retenční čas, plocha píků, faktor symetrie, rozlišení a účinnost.

Dle postupů uvedených v Experimentální části byly připraveny vzorky látek ve 3 různých koncentracích, a to 25 µg/ml, 50 µg/ml a 70 µg/ml, aby bylo co nejlépe pokryto celé kalibrační rozmezí. Každá vialka s takto připraveným vzorkem byla v sekvenci 10x zanalyzována za zmíněných optimalizovaných podmínek a získané hodnoty byly porovnány (Tabulka 14).

Tabulka 14 - Výsledky měření SST pro UHPSFC metodu.

		RT		Plocha	Rozlišení	Faktor symetrie	w50	Kapacita separace
		∅	RSD	RSD	∅	∅	∅	∅
25 µg/ml	Kyselina	1,65	0,03	1,27	8,05	1,31	0,010	177
	Dimer	1,16	0,08	1,3	25,25	1,91	0,019	94
	Amin	1,89	0,03	1,32	14,87	1,36	0,014	127
	Sůl	2,17	0,03	0,68	9,32	1,25	0,018	99
	Ago	1,44	0,05	1,17	6,34	0,77	0,016	111
	Amid	1,27	0,09	1,36	3,66	1,28	0,023	78
	Nitril	0,49	0,10	0,65	-	1,41	0,016	111
50 µg/ml	Kyselina	1,65	0,09	0,92	8,15	1,3	0,010	177
	Dimer	1,16	0,03	0,91	25,44	1,93	0,018	99
	Amin	1,89	0,04	1,1	7,94	1,33	0,014	127
	Sůl	2,16	0,04	0,88	9,44	1,25	0,016	111
	Ago	1,44	0,03	0,56	6,39	0,77	0,015	119
	Amid	1,27	0,04	0,92	3,73	1,26	0,020	89
	Nitril	0,49	0,09	0,48	-	1,41	0,015	119
70 µg/ml	Kyselina	1,65	0,06	0,67	8,16	1,28	0,010	177
	Dimer	1,15	0,13	0,98	25,09	1,88	0,019	94
	Amin	1,89	0,05	0,6	8,00	1,32	0,014	127
	Sůl	2,16	0,04	0,59	9,47	1,25	0,018	99
	Ago	1,43	0,07	0,95	6,45	0,78	0,018	99
	Amid	1,27	0,12	0,92	3,78	1,38	0,024	75
	Nitril	0,49	0,10	0,66	-	1,41	0,020	89

5.1.4. Validace UHPSFC metody

Linearita analytické metody je schopnost této metody v daném rozmezí získat výsledky, které jsou přímo úměrné koncentraci analytu ve vzorku [42]. Linearita

metody byla potvrzena kvantitativním hodnocením účinné látky i všech nečistot. Pro tato měření byly připraveny vzorky nečistot na 12 koncentračních hladinách v rozmezí 0,1 až 70 µg/ml dle postupu uvedeného v Experimentální části 4.2.2.

Tyto vzorky byly analyzovány výše popsanou metodou a následně byla integrací určena velikost plochy jednotlivých píků. Lineární závislost odezvy, tedy plochy píku, na koncentraci byla pozorována u 11 ze vzorků, a to těch v rozmezí koncentrací od 0,25 do 70 µg/ml. Z grafů kalibračních křivek byly rovněž určeny rovnice regrese a hodnoty spolehlivosti R. Linearita byla potvrzena determinačními koeficienty většími než 0,9990 u všech analyzovaných látek (Tabulka 15). Navíc byly určeny meze detekce (LOD) a stanovitelnosti (LOQ). Mez stanovitelnosti byla určena jako nejnižší koncentrace lineárního rozmezí, jejíž poměr signálu k šumu byl větší než 10 a která splňovala podmínky přesnosti a správnosti.

Tabulka 15 - UHPSFC - Koeficienty determinace, LLOQ, ULOQ pro všechny separované látky.

	R ²	Rovnice regrese	LLOQ µg/ml	LOD µg/ml	ULOQ µg/ml
Nitril	0,9992	$y = 13\,955\,963\,866x + 6950$	0,25	0,08	70
Dimer	0,9993	$y = 7\,902\,639\,893x + 2589$	0,25	0,08	70
Amid	0,9993	$y = 5\,557\,451\,255x + 2348$	0,25	0,08	70
Agomelatin	0,9993	$y = 8\,508\,747\,207x + 4002$	0,25	0,08	70
Kyselina	0,9993	$y = 9\,531\,457\,345x + 3183$	0,25	0,08	70
Amin	0,9993	$y = 7\,951\,884\,658x + 2442$	0,25	0,08	70
Sůl	0,9993	$y = 9\,019\,294\,231x + 2817$	0,25	0,08	70

Přesnost a právnost byly na UHPSFC systému hodnoceny na 3 koncentračních hladinách (40, 50 a 60 µg/ml) pro agomelatin jako účinnou látku (API) a na 3 odlišných koncentračních hladinách (2, 2,5 a 3 µg/ml) pro nečistoty.

Přesnost analytické metody vyjadřuje míru rozptylu neboli těsnost shody mezi jednotlivými měřeními téhož vzorku [42]. Proto byly připraveny vždy 3 vzorky na každé ze 3 zvolených koncentračních hladin a každý z nich byl v sekvenci 3x změřen. Směrodatné odchylky výsledků, tedy ploch píků získaných integrací chromatogramů, jež byly menší než 2,4 % pro nečistoty a 0,8 % pro API, potvrdily přesnost metody.

Správnost metody udává míru shody mezi hodnotou, která byla přijata jako referenční, a hodnotou, jež byla získána jako výsledek měření pomocí dané metody [42]. Z tohoto důvodu byly ke každé ze zmíněných 3 koncentračních hladin připraveny 2 vzorky

obsahující standardy analyzovaných látek se stejnou koncentrací. Vzhledem k těmto standardům byla následně vypočítána procentuální výtěžnost z jednotlivých vzorků. Tím byla potvrzena správnost metody, protože tato výtěžnost se pohybovala mezi 97,4 – 102,7 % pro nečistoty a mezi 100,2 – 100,8 % pro agomelatin jako API. Výsledky shrnuje Tabulka 16.

Tabulka 16 - Potvrzení přesnosti a správnosti UHPSFC metody

konc. hladina [µg/ml]		Nitril	Dimer	Amid	Ago	Kyselina	Amin	Sůl	konc. hladina [µg/ml]		API
2	[%]	99,8	98,2	98,5	98,7	98,0	98,5	101,5	40	[%]	100,7
	RSD	1,0	0,8	0,9	1,7	1,6	1,6	1,5		RSD	0,8
2,5	[%]	99,8	98,1	97,4	101,3	100,0	99,2	99,9	50	[%]	100,8
	RSD	0,4	0,9	1,1	0,2	0,7	0,2	1,7		RSD	0,2
3	[%]	99,3	101,0	99,3	102,7	97,5	98,1	102,6	60	[%]	100,2
	RSD	1,0	1,6	1,5	0,3	2,4	1,4	2,3		RSD	0,8

5.1.5. Obsahová stejnoměrnost

Vyvinutou optimalizovanou metodou byla nakonec ověřena obsahová stejnoměrnost tablet. Jak uvádí Český lékopis 2009, každá jednotka přípravku musí obsahovat účinnou látku v koncentraci 85 až 115 % průměrného obsahu [43]. K ověření byla provedena analýza 10 vzorků jak z tabletového prášku (kapitola 4.2.3) tak přímo z tablet (kapitola 4.2.4). Tabulka 17 ukazuje, že všechna měření podmínce Českého lékopisu vyhovovala, neboť u vzorků z tabletového prášku bylo dosaženo 99,9% a u vzorků z tablety 98,8% výtěžnosti, a relativní směrodatná odchylka se pohybovala pod 1,1 %.

Tabulka 17 – Obsahová stejnoměrnost tablet určená pomocí UHPSFC.

Vzorek č.	Prášek	Tableta
1	101,0	98,9
2	100,8	97,5
3	100,3	100,3
4	99,8	98,4
5	98,9	97,6
6	100,1	97,5
7	99,3	98,8
8	100,2	100,2
9	98,5	100,1
10	100,1	98,6
% výtěžnosti	99,9	98,8
RSD[%]	0,8	1,1

5.2. Vývoj UHPLC metody

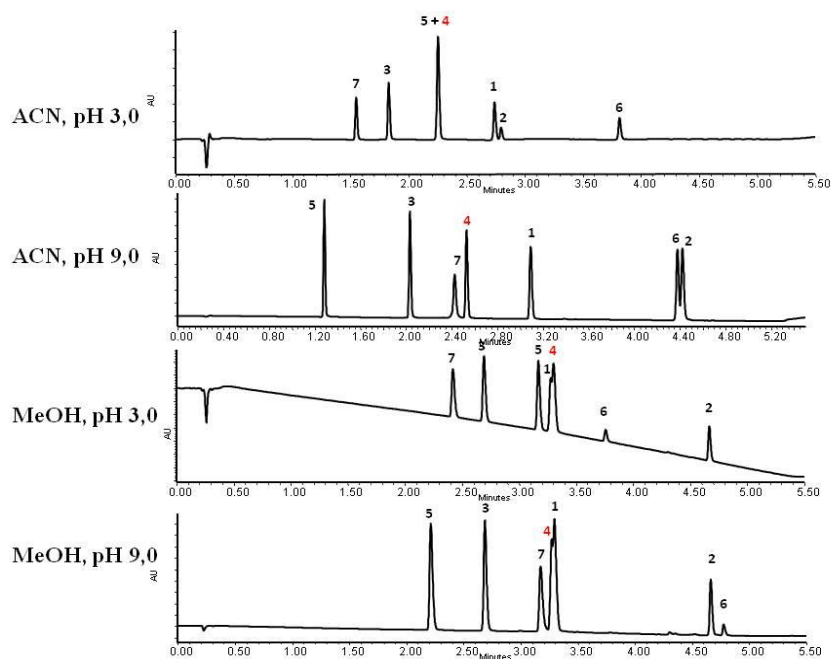
5.2.1. Volba optimálních chromatografických podmínek

V kapalinové chromatografii je mnoho parametrů, které mohou být ovlivněny, aby bylo dosaženo optimálních separačních podmínek. U stacionární fáze jsou to např. funkční skupiny a typ silikagelu, u mobilní fáze pak její složení a sklon gradientu, gradientová křivka, pH, složení pufru, rychlost průtoku a teplota. Vliv na separaci má však také složení rozpouštědla vzorku, nastříkovaný objem a také rychlost sběru dat [44].

Vzhledem k již zmíněným rozdílům ve fyzikálně-chemických vlastnostech separovaných látek, bylo prvním krokem při optimalizaci podmínek separace na UHPLC srovnání výsledků analýzy za využití různých stacionárních fází a mobilních fází tvořených odlišnými organickými modifikátory a pufrů. Vybrány byly 50mm kolony BEH C18, BEH Shield a BEH Phenyl. Organickou část mobilní fáze tvořil acetonitril nebo metanol, vodnou složku pak 10mM pufr mravenčanu amonného o pH 3,0 nebo 10mM pufr octanu amonného o pH 9,0. Tyto tři faktory, tedy kolona, organická fáze a pufr, byly zkombinovány tak, že vzniklo 12 jednotlivých separačních podmínek. Všechny tyto analýzy dlouhé 5 min proběhly při průtoku 0,6 ml/min, teplotě kolony 30°C, UV detekci

při 225 nm a základním gradientu začínajícím na poměru 95/5 vodné a organické složky a končící v 5. minutě na poměru 5/95 při využití gradientové křivky 6.

Obr. 27 shrnuje chromatogramy získané za těchto podmínek na koloně BEH C18. Jako vhodnější organický modifikátor se jevil acetonitril, neboť metanol poskytoval vyšší retenci a docházelo ke koeluci API a nečistoty (pík 1-nitril). Lepší selektivity bylo dosaženo při bazickém pH, kdy došlo k posunům retenčních časů tak, že API eluovala dostatečně před následující nečistotou. Problémem však byla eluce dimeru a aminu (pík 2 a 6) v blízkém retenčním čase s malým rozlišením.

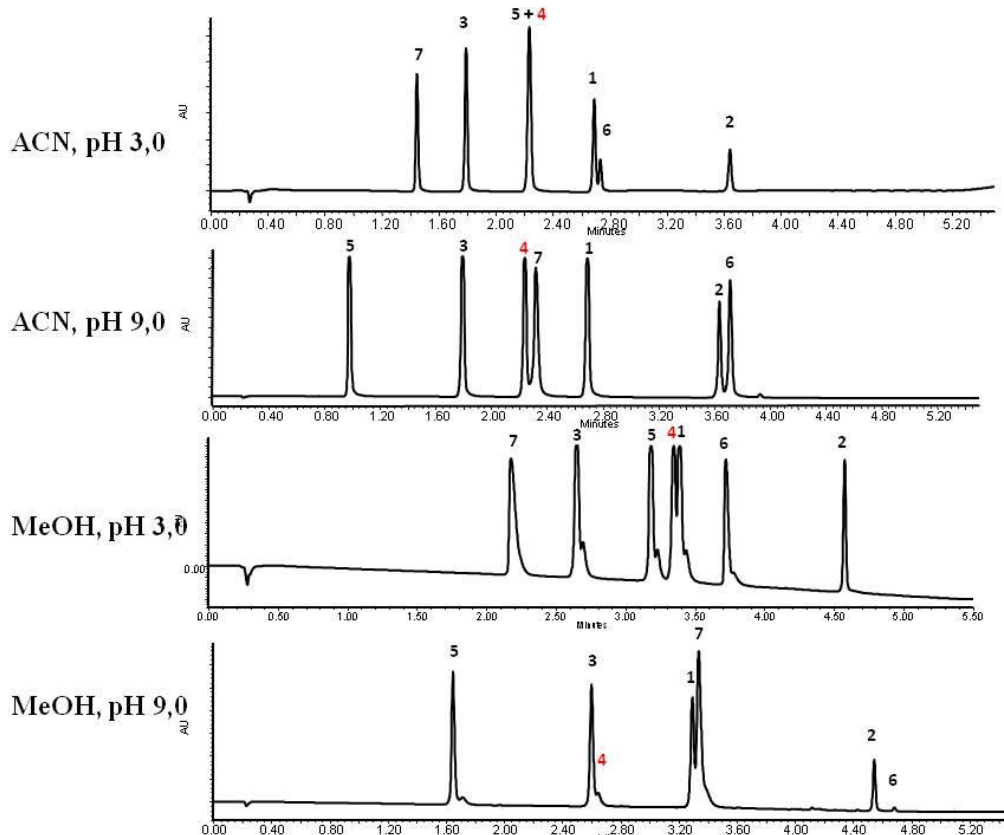


Obr. 27 - Screening UHPLC separačních podmínek na koloně BEH C18. (1) nitril (2) dimer (3) amid (4) agomelatin (5) kyselina (6) amin (7) sůl.

Na koloně BEH Phenyl bylo viditelné velké rozmytí jednotlivých elučních zón a nedostatečné rozlišení za všech zvolených podmínek, proto zde chromatogramy nejsou prezentovány.

Porovnání analýz na koloně BEH Shield RP18 je uvedeno na Obr. 28. Změnami v mobilní fázi bylo možno pozorovat obdobné posuny v retenčních časech jako u výše zmíněné kolony BEH C18. Ať již organickou část mobilní fáze tvořil acetonitril nebo metanol, změnou pH z 3,0 na 9,0 došlo k dřívější eluci kyseliny a naopak silnějšímu zadržení soli a aminu. Vzhledem k příliš vysoké retenci při analýzách s metanolem a lepší selektivitě při vyšším pH, se jako nejslibnější jeví podmínky s acetonitrilem

a pufrém octanu amonného o pH 9. Zde však eluovala nečistota 7-sůl velmi blízko API, což taktéž nebylo vhodné.

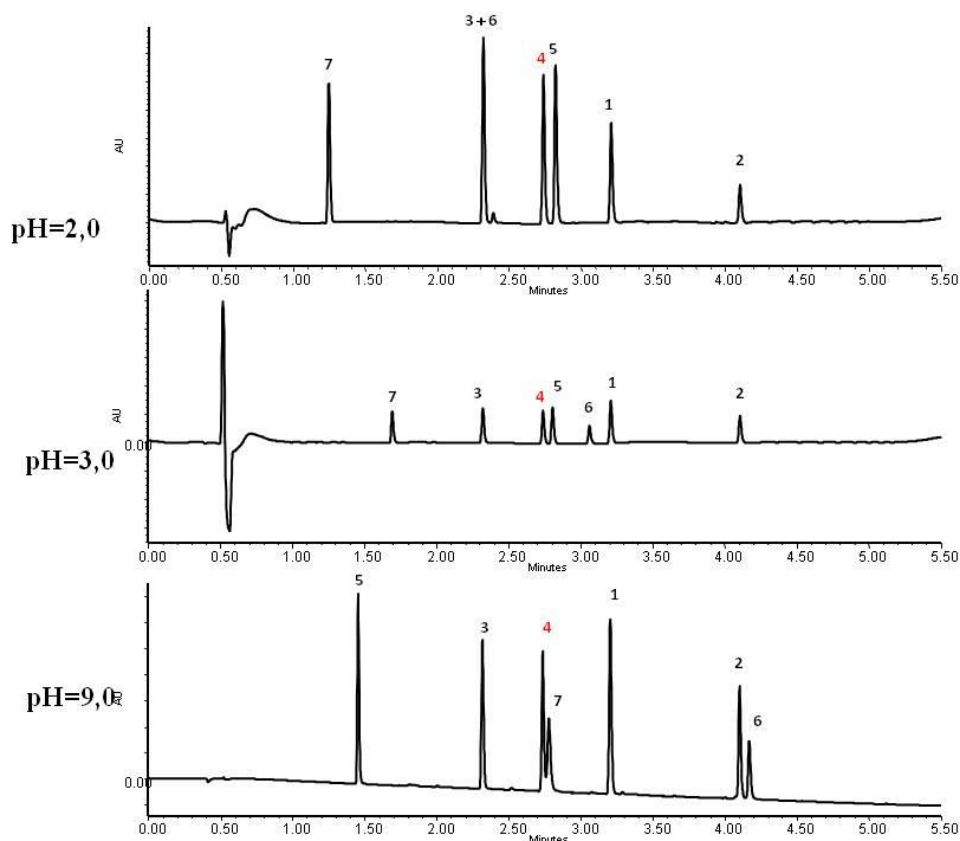


Obr. 28 - Screening UHPLC separačních podmínek na koloně BEH Shield RP18. (1) nitril (2) dimer (3) amid (4) agomelatin (5) kyselina (6) amin (7) sůl.

Jelikož ani jedna ze zmíněných kombinací podmínek nezaručovala potřebnou selektivitu a rozlišení, byly vyzkoušeny další 2 stacionární fáze CSH PHE a CSH C18 v délce 100mm, aby byla zvýšena separační účinnost. Jedná se o vícemodální hybridní fáze obsahující jak nepolární tak iontově výměnnou skupinu, a tím zaručující odlišnou selektivitu. Na obou z nich byly provedeny 3 separace, jak ukazuje Obr. 29 a Obr. 30. Každá z nich proběhla za již zmíněných standardních podmínek za využití acetonitrilu jako organické části mobilní fáze. Jedinou provedenou změnou bylo vždy pH pufru, které bylo určeno na 2,0 a 3,0 u pufru s 10mM mravenčanem amonným a pH 9,0 u 10mM octanu amonného.

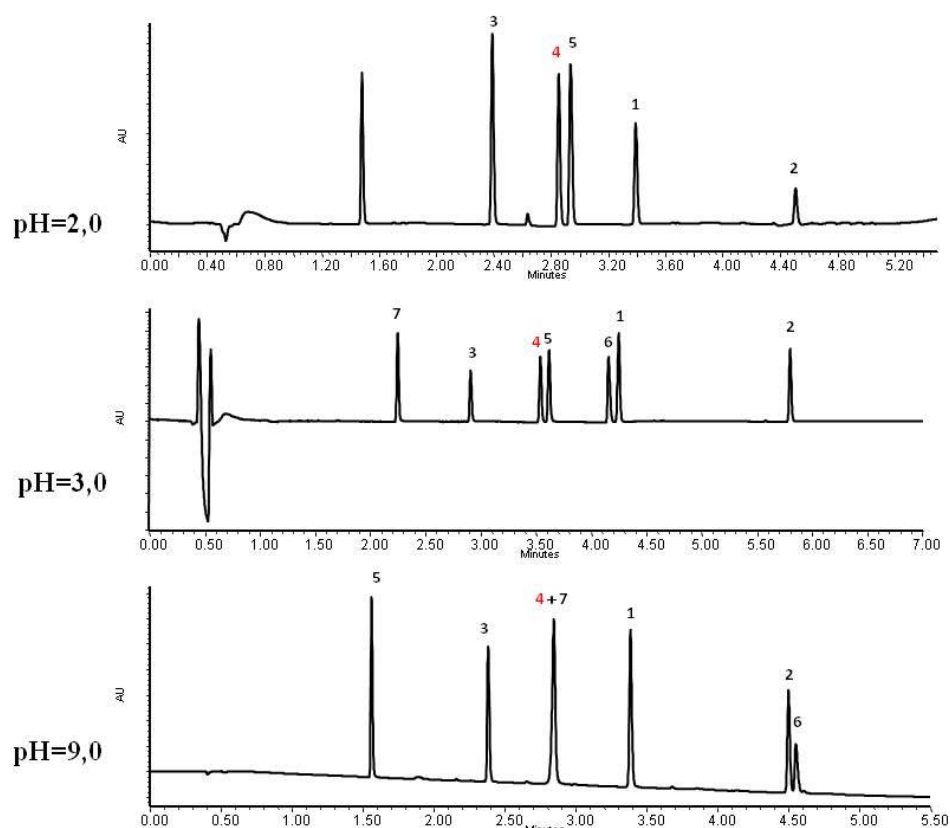
Na koloně CSH PHE při pH 2,0 koeluoval amin a amid (píky 3 a 6) a ve velmi blízkých retenčních časech byly eluovány taktéž látky 4-agomelatin a 5-kyselina. Blízká byla eluce těchto látek i za využití pufru s pH 3,0. Obdobná situace nastala při využití pufru

s pH 9,0 s tím rozdílem, že s agomelatinem koeluovala sůl. Analýza při pH 3,0 vykazoval dobrou retenci a selektivitu, avšak nečistota 5-kyselina eluovala blízko za agomelatinem jako API, což by při analýzách reálných koncentrací nebylo vhodné, neboť předpokládaná koncentrace agomelatinu v tabletě je o několik řádu vyšší než zmíněné nečistoty, takže by kvůli rozmývání píku mohlo docházet ke smytí těchto dvou píků a obtížné kvantifikaci nečistoty.



Obr. 29 – UHPLC separace na koloně CSH Phenyl za využití acetonitrilu jako organického modifikátoru mobilní fáze. (1) nitril (2) dimer (3) amid (4) agomelatin (5) kyselina (6) amin (7) sůl.

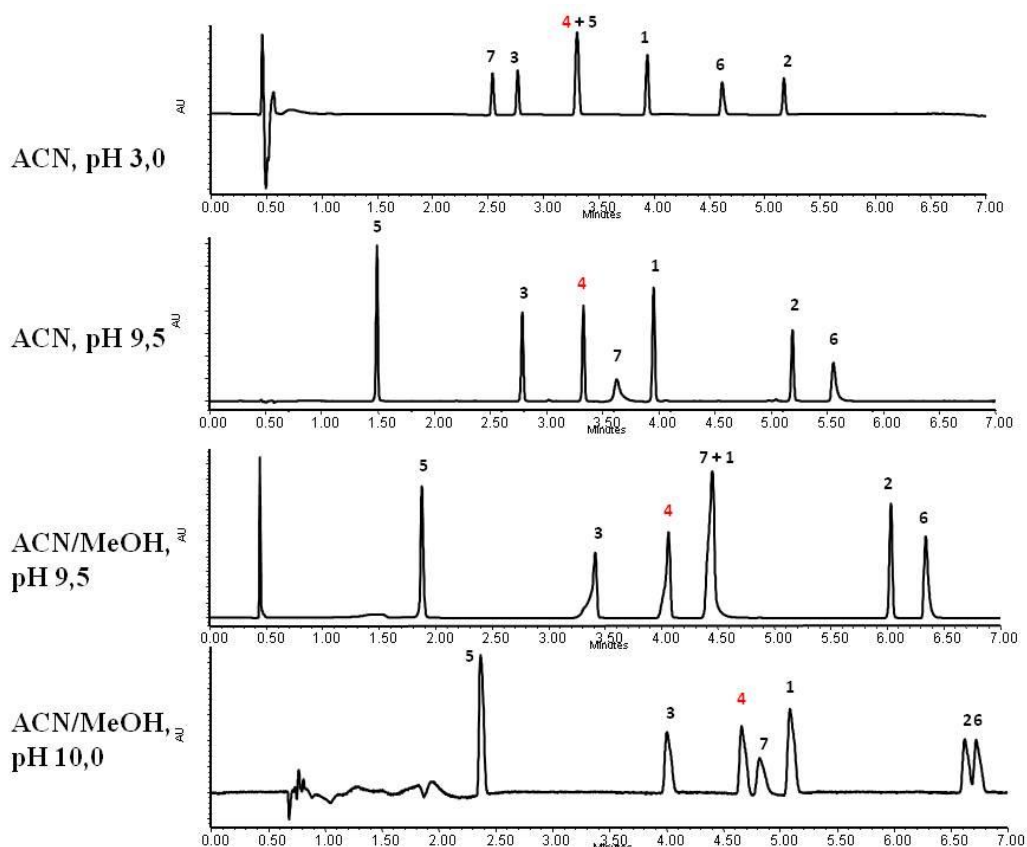
Kolona CSH C18 při pH 2,0 vykazovala příliš silnou retenci, neboť 2 ze separovaných látek nebyly z kolony vymyty (amin a sůl). Naopak při pH 9,0 došlo ke koeluci soli s agomelatinem a píky dimeru a aminu vykazovaly nedostatečné rozlišení stejně jako píky agomelatinu a kyseliny a aminu s nitrilem při separaci s pufrem o pH 3,0.



Obr. 30 – UHPLC separace na koloně CSH C18 za využití acetonitrilu jako organického modifikátoru MF. (1) nitril (2) dimer (3) amid (4) agomelatin (5) kyselina (6) amin (7) sůl.

Ani na těchto kolonách nebylo dosaženo optimální separace všech analyzovaných látek, a proto byla pozornost zaměřena na změnu podmínek na předchozích stacionárních fázích poskytujících slibné výsledky, a tím zvýšení rozlišení mezi API a nečistotou eluovanou za ní, což se jevílo jako hlavní problém většiny analýz. Prvním krokem bylo opakování separací na koloně BEH Phenyl, neboť pozorované rozmytí píků a široké eluční zóny mohly být způsobeny nastříknutím příliš velkého objemu vzorku na kolonu nebo částečnou degradací kolony. Aby byla zvýšena separační kapacita, proběhly následující analýzy na 100mm koloně namísto 50mm a délka separace byla prodloužena na 7,5 minuty. Jak ukazuje Obr. 31, první z analýz proběhla s acetonitrem jako organickou složkou mobilní fáze a pufr s pH 3,0. Bylo dosaženo dostatečné retence a symetrických píků, avšak agomelatin a kyselina (píky 4 a 5) koeluovaly. Při druhé separaci byl využit pufr o pH 9,5. Selektivita analýzy za těchto podmínek byla dobrá a byly získány úzké symetrické píky u všech látek až na sůl, jejíž pík byl nízký a rozmytý, což při nižších koncentracích ztěžovalo její kvantifikaci. Jako další změna byl

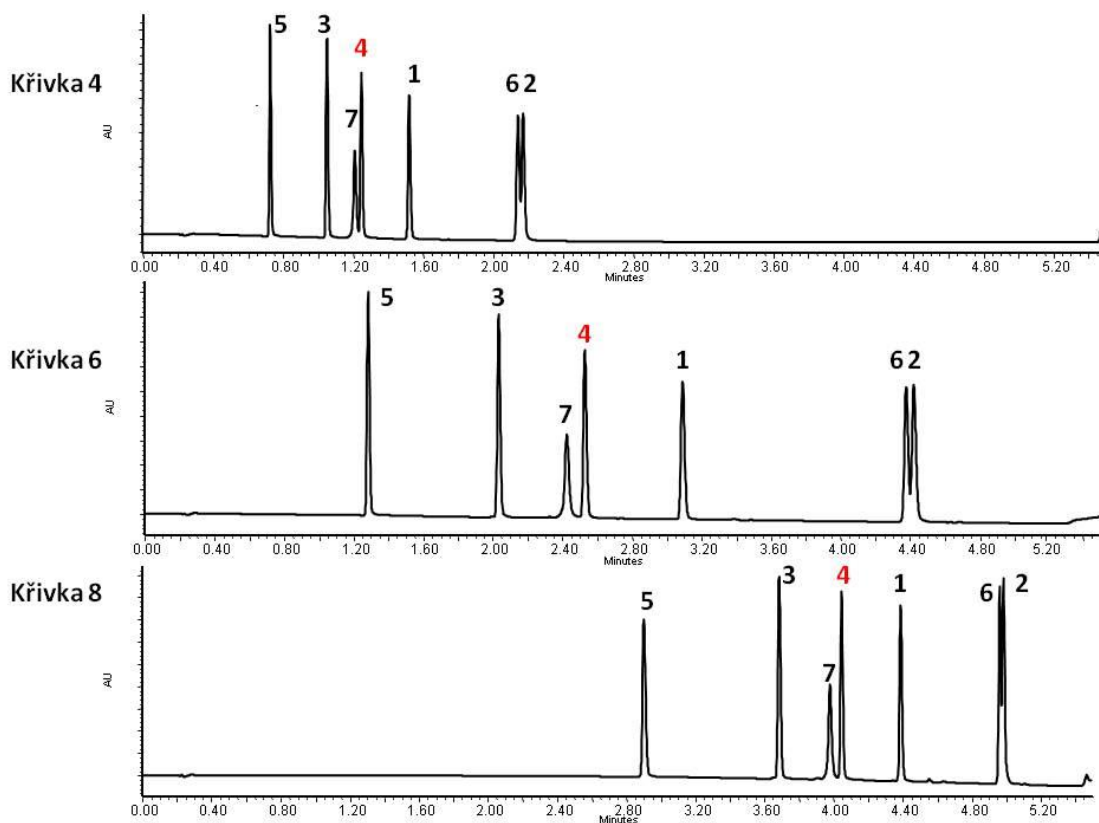
místo acetonitrilu jako organické části mobilní fáze vyzkoušen roztok acetonitrilu a metanolu v poměru 1:1. Přestože byl využit stejný pufr, došlo k rozšíření jednotlivých elučních zón a píky ztratily svou symetričnost. Sůl navíc koeluovala s nitrilem (píky 7 a 1). Jako poslední bylo vyzkoušeno pH 10,0 při použití stejné organické složky, což se sice projevilo rozseparováním těchto dvou látek, ale rovněž ještě větším rozmytím píků jednotlivých analytů.



Obr. 31 – UHPLC separace na 100mm koloně BEH Phenyl. (1) nitril (2) dimer (3) amid (4) agomelatin (5) kyselina (6) amin (7) sůl.

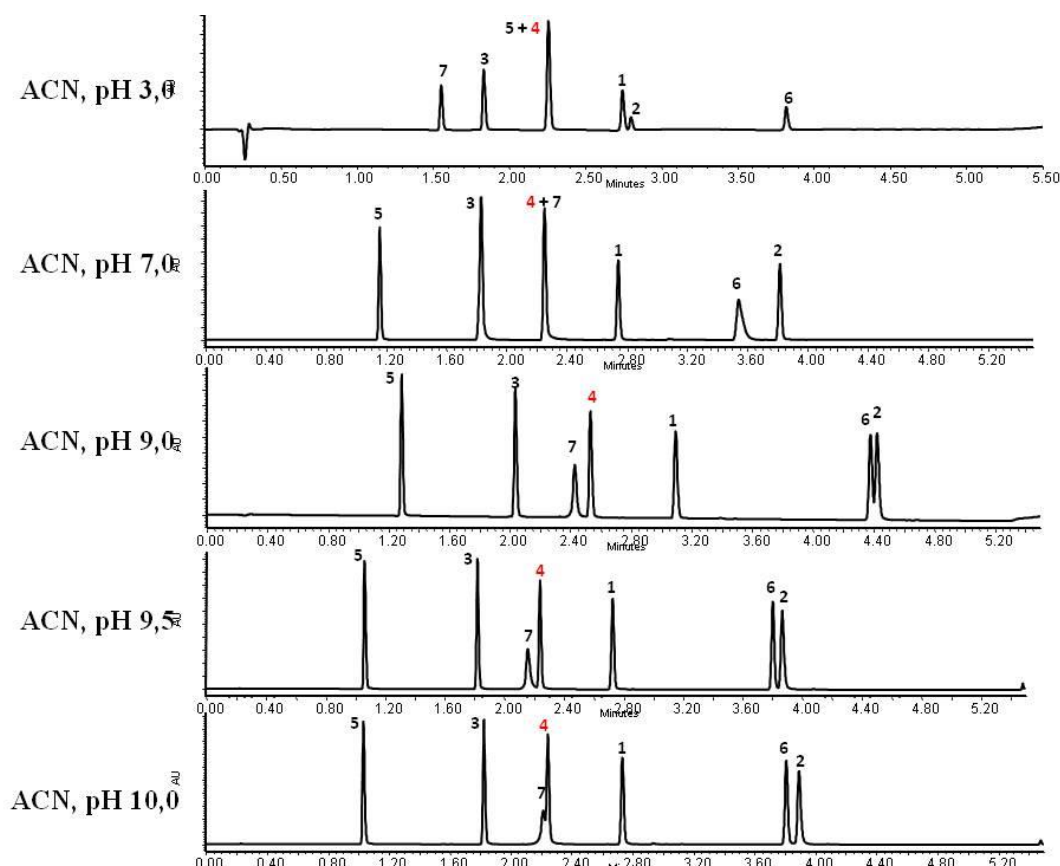
Jelikož ani tyto úpravy podmínek nevedly k optimálním výsledkům, pozornost byla zaměřena na analýzy na kolonách BEH C18 a BEH Shield RP18.

Následující úpravy vycházely z výše uvedených podmínek separací na koloně BEH C18, kdy bylo potvrzeno, že vhodnější mobilní fází tvoří pufr s bazickým pH a acetonitril jako organický modifikátor. Byl sledován vliv gradientové křivky a konečného poměru organické fáze a pufru. Avšak bylo možno pozorovat, že ani jeden z těchto faktorů nezlepšil rozlišení kritického páru nečistot a to aminu a dimeru (píky 2 a 6) (Obr.32).



Obr. 32 - Vliv nastavení gradientové křivky na UHPLC separaci na koloně BEH C18.

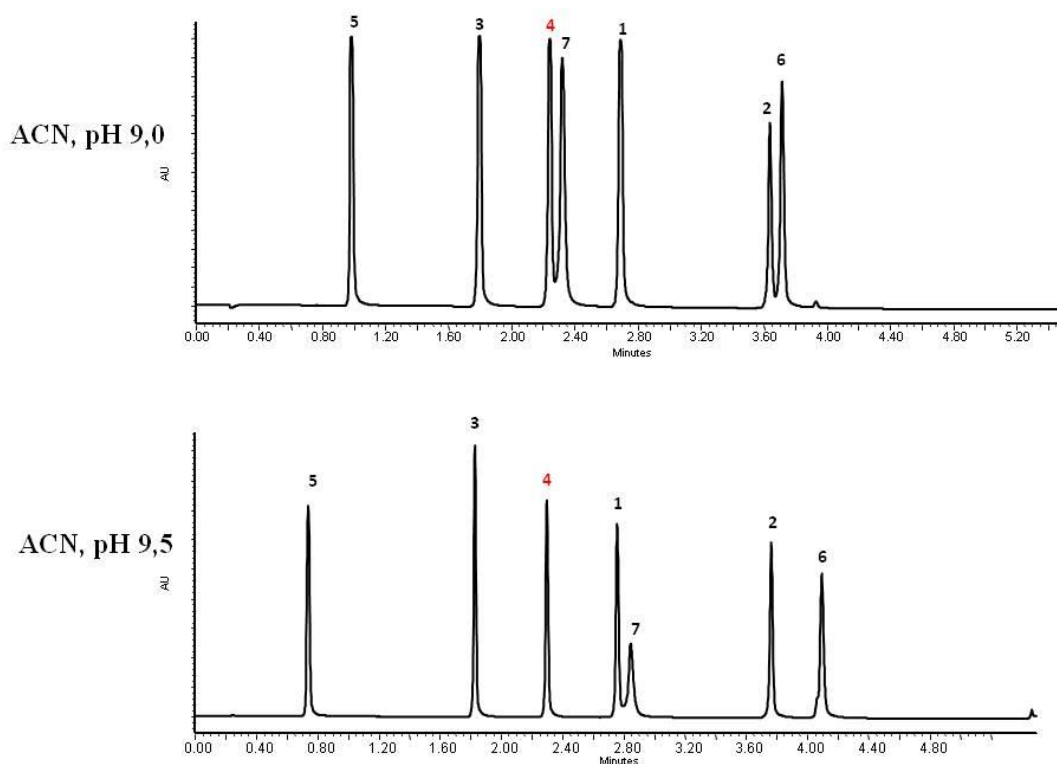
Proto bylo dále sledováno ovlivnění separace pomocí pH vodné složky mobilní fáze. S již použitými pufrů s pH 3,0 a 9,0 byly porovnány separace při pH 7,0, 9,5 a 10,0 (Obr. 33). Bylo možno odvodit, že pH nižší než 9,0 nejsou pro tuto analýzu vhodná, neboť jak u pH 3,0 tak pH 7,0 docházelo k úplné koeluci API s kyselinou, respektive solí. Zvýšení pH na 9,5 vedlo ke zlepšení rozlišení mezi aminem a dimerem (píky 2 a 6), které při pH 9,0 koeluovaly. Přestože další zvýšení na 10,0 mělo tentýž pozitivní efekt, došlo také k posunu v retenčním čase soli, což zapříčinilo eluci této látky velmi blízko agomelatinu a tím velmi nízké rozlišení těchto dvou píků. Závěrem tedy bylo určeno optimální pH separace na koloně BEH C18 na 9,5.



Obr. 33 - Vliv pH na UHPLC separaci na koloně BEH C18 za využití acetonitrilu jako organické složky mobilní fáze. (1) nitril (2) dimer (3) amid (4) agomelatin (5) kyselina (6) amin (7) sůl.

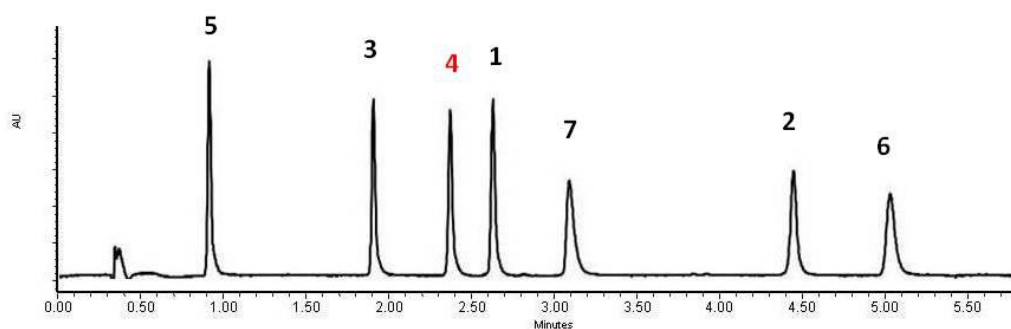
Jelikož píky soli s agomelatinem a dimeru s aminem stále vykazovaly nízké rozlišení, jako další úprava byla zvolena výměna 50mm kolony za 100mm a prodloužení analýzy na 7 minut. Na této delší koloně bylo provedeno několik separací. Měnitelnými faktory byl opět konečný poměr mobilní fáze a pufru a gradientová křivka. Ze srovnání výsledných chromatogramů při různých konečných poměrech mobilní fáze a pufru při gradientové křivce 6 vyplynulo, že nejvhodnější gradient začíná na poměru 95/5 a končí 20/80. S tímto gradientem byly následně provedeny separace s odlišnými gradientovými křivkami. Bylo zjištěno, že optimální podmínky separace by měly nastat při využití acetonitrilu, pufru o pH 9,5, gradientu z 95/5 na 20/80 při křivce 6 a délce separace 7,5 minuty. Avšak byl-li za těchto podmínek změřen vzorek s koncentracemi látek napodobujícími reálnou situaci (tedy 100x menší koncentrace nečistot oproti koncentraci agomelatinu jako účinné látky), došlo k nedostatečnému rozseparování nečistoty soli a agomelatinu. Z tohoto důvodu následoval pokus optimalizovat podmínky separace na koloně BEH Shield RP18.

Za výchozí podmínky byl zvolen základní gradient s acetonitrilem a pufrům o pH 9,0. Avšak optimálních podmínek nebylo dosaženo ani změnou gradientové křivky, počátečního nebo konečného poměru organické složky mobilní fáze a pufru či prodloužením doby separace. Přestože některé z těchto separací vykazovaly dobrou selektivitu a rozlišení, po podrobení daných podmínek zkoušce se vzorkem s reálnými koncentracemi podobně jako u kolony BEH C18 opět došlo ke smytí píku soli s píkem agomelatinu. To ukázalo, že faktory analýzy je třeba dále upravit. Proto byl zvolen obdobný postup jako u kolony BEH C18. Zde bylo jako optimální určeno pH 9,5. Tato skutečnost se potvrdila i na koloně BEH Shield, jak ukazuje Obr. 34 porovnávající chromatogramy získané s pufrů o pH 9,0 a 9,5. Rozlišení mezi píky 2 a 6 je při tomto pH mnohonásobně větší. Stejně tak byla vyřešena blízká eluce API a soli, neboť retenční čas tohoto píku se posunul natolik, že již nehrozilo jejich smytí při analýze vzorku s reálnými koncentracemi analytů. Bohužel tento posun byl natolik výrazný, že došlo k nižšímu rozlišení soli a nitrilu (píky 7 a 1).



Obr. 34 - Vliv pH na UHPLC separaci na koloně BEH Shield. (1) nitril (2) dimer (3) amid (4) agomelatin (5) kyselina (6) amin (7) sůl.

Po nalezení optimálního pH vodné složky mobilní fáze byl zkoumán také vliv organické složky. Mimo již zmíněný acetonitril a metanol byla vyzkoušena směs acetonitrilu a metanolu v poměru 1:1. Společně se snížením průtoku na 0,4 ml/min, úpravou gradientu a gradientové křivky došlo k optimální separaci látek. Těmito změnami bylo dosaženo podmínek, kdy kolona vykazovala dostatečnou retenci a selektivitu a píky ostrost a symetričnost. Po složité a zdlouhavé optimalizaci byly za konečné zvoleny tyto podmínky: stacionární fáze BEH Shield RP18, mobilní fáze tvořená acetonitrilem a metanolem v poměru 1:1 a pufrům s pH 9,5, gradient s křivkou 4 začínající na 95/5 a končící v 5. minutě na 30/70, průtok 0,4 ml/min, teplota kolony 30°C, UV detekce při 225 nm.



Obr. 35 - Separace za optimálních podmínek. (1) nitril (2) dimer (3) amid (4) agomelatin (5) kyselina (6) amin (7) sůl.

5.2.2. Test způsobilosti systému SST

Vhodnost analýzy na vybrané koloně BEH Shield RP18 za využití směsi acetonitrilu a metanolu v poměru 1:1 jako organické složky mobilní fáze, pufru o pH 9,5 jako vodné části MF a výše zmíněného gradientu, byla potvrzena testem způsobilosti systému. Porovnávány byly stejné parametry jako u UHPSFC metody.

Tabulka 18 uvádí hodnoty získané, když byly vialky obsahující roztok směsi látek v koncentraci 0,7 µg/ml, 2,5 µg/ml a 10 µg/ml v sekvenci 10x zanalyzovány za zmíněných podmínek.

Tabulka 18 - Výsledky měření SST pro UHPLC metodu.

	RT		Plocha	Rozlišení	Faktor symetrie	w50	Kapacita píku	
	∅	RSD	RSD	∅	∅	∅		
0,7 µg/ml	Kyselina	0,94	0,12	5,03	-	0,70	0,022	135
	Dimer	4,36	0,05	2,38	15,05	1,12	0,015	197
	Amin	5,06	0,08	4,23	7,77	1,23	0,021	141
	Sůl	3,20	0,19	2,82	9,59	1,49	0,024	124
	Ago	2,35	0,05	1,74	11,84	1,34	0,022	135
	Amid	1,90	0,04	3,74	26,34	1,24	0,058	52
	Nitril	2,59	0,05	1,00	5,83	0,84	0,050	60
2,5 µg/ml	Kyselina	0,94	0,04	0,77	-	1,37	0,023	129
	Dimer	4,36	0,01	1,48	16,53	1,06	0,015	197
	Amin	5,06	0,07	1,35	8,68	1,18	0,021	141
	Sůl	3,21	0,11	3,42	10,81	1,34	0,024	124
	Ago	2,35	0,02	1,33	12,33	1,33	0,022	135
	Amid	1,90	0,05	0,91	27,35	1,38	0,062	48
	Nitril	2,59	0,03	0,83	6,12	1,34	0,051	59
10 µg/ml	Kyselina	0,94	0,09	0,67	-	1,46	0,023	129
	Dimer	4,36	0,01	0,96	14,53	1,15	0,017	174
	Amin	5,07	0,05	0,84	8,48	1,35	0,021	141
	Sůl	3,21	0,10	1,02	9,47	1,96	0,024	124
	Ago	2,35	0,02	0,65	12,07	1,42	0,024	124
	Amid	1,90	0,02	0,90	26,73	1,50	0,062	48
	Nitril	2,59	0,03	0,70	6,00	1,40	0,055	54

5.2.3. Validace UHPLC metody

Kvantitativním hodnocením účinné látky i nečistot byla potvrzena linearita optimalizované metody. Připravené vzorky obsahovaly analyzované látky ve 12 různých koncentračních hladinách od 0,1 µg/ml po 70 µg/ml. Lineární závislost odezvy, tedy plochy píku, na koncentraci byla pozorována u 9 ze vzorků, a to těch v rozmezí koncentrací od 0,1 do 10 µg/ml. Nečistoty dimer, amin a sůl vykázaly lineární závislost až do koncentrace 25 µg/ml. Toto pak zobrazují jednotlivé grafy kalibračních křivek, ze kterých je rovněž určena rovnice regrese a hodnota spolehlivosti R. Tyto hodnoty shrnuje Tabulka 19, kde je rovněž uveden limit detekce i stanovitelnosti pro jednotlivé látky.

Tabulka 19 - UHPLC - Koeficient spolehlivosti, LOD, LOQ pro všechny separované látky.

	R ²	Rovnice regrese	LLOQ µg/ml	LOD µg/ml	ULOQ µg/ml
Nitril	0,9998	$y = 87\,469x + 2952$	0,1	0,03	10
Dimer	0,9995	$y = 73\,368x - 1764$	0,1	0,03	25
Amid	0,9997	$y = 76\,643x + 2815$	0,1	0,03	10
Agomelatin	0,9994	$y = 70\,986x + 6162$	0,1	0,03	10
Kyselina	0,9998	$y = 60\,828x - 4942$	0,1	0,03	10
Amin	0,9993	$y = 81\,753x + 1029$	0,1	0,03	25
Sůl	0,9990	$y = 69\,975x - 8575$	0,1	0,03	25

Přesnost a správnost byly na UHPLC systému hodnoceny na 3 koncentračních hladinách (4, 5 a 6 µg/ml) pro agomelatin jako účinnou látku a na 3 odlišných koncentračních hladinách (0,2, 0,25 a 0,3 µg/ml) pro nečistoty.

Obdobně jako u UHPSFC metody, byla správnost určena jako míra shody mezi koncentrací vzorku a daného standardu, přesnost pak jako míra rozptylu jednotlivých měření. Postup výpočtů byl shodný s tím výše popsaným u UHPSCF metody, výsledky shrnuje Tabulka 20. Správnost byla potvrzená výtěžností pohybující se v rozmezí 97,1 až 102,7 % pro nečistoty a 96,5 – 98,3 % pro API. Přesnost pak směrodatnou odchylkou menší než 2,6 % pro nečistoty, respektive 1,5 % pro API.

Tabulka 20 - Potvrzení přesnosti a správnosti UHPLC metody.

konc. hladina [µg/ml]		Nitril	Dimer	Amid	Ago	Kyselina	Amin	Sůl	konc. hladina [µg/ml]	API	
0,2	[%]	102,7	99,5	100,9	100,9	97,1	97,3	98,4	4	[%]	98,3
	RSD	1,9	2,3	0,4	2,0	1,2	0,7	1,0		RSD	1,5
0,25	[%]	100,9	96,8	97	97,5	100,2	97,0	96,6	5	[%]	98,0
	RSD	1,6	1,2	0,7	1,3	1,1	0,6	0,6		RSD	1,4
0,3	[%]	100,4	98,5	95,7	102,6	97,7	97,3	98,6	6	[%]	96,5
	RSD	0,7	1,2	0,8	1,0	2,6	0,1	0,7		RSD	0,3

5.2.4. Obsahová stejnoměrnost

Na závěr byla UHPLC metodou otestována obsahová stejnoměrnost tablet, neboť dle Českého lékopisu 2009, musí každá tableta obsahovat účinnou látku v koncentraci, která není menší než 85 % a větší než 115 % průměrného deklarovaného obsahu, tzn. v tomto případě 25 mg agomelatinu. K ověření byla provedena analýza 10 vzorků jak

z tabletového prášku (4.2.3) tak přímo z tablet (4.2.4). Integrací chromatogramů byly získány plochy píků agomelatinu v jednotlivých vzorcích. Ty byly porovnány s plochou píku standardu agomelatinu, jenž byl připraven ve stejné koncentraci jako vzorky z tablet a tabletového prášku, tedy 50 µg/ml. Jak uvádí Tabulka 21, všechna měření podměnce Českého lékopisu vyhovovala, neboť u vzorku z tabletového prášku bylo dosaženo 96,4% a u vzorku z tablety 97,7% výtěžnosti, a relativní směrodatná odchylka se pohybovala pod 1 %.

Tabulka 21 - Obsahová stejnoměrnost tablet a tabletového prášku určená pomocí UHPLC metody.

Vzorek č.	Prášek	Tableta
1	98,1	98,4
2	97,9	96,5
3	97,3	99,3
4	96,3	98,0
5	96,2	97,4
6	96,3	97,6
7	96,0	97,0
8	95,5	97,9
9	95,5	97,6
10	95,4	97,1
% výtěžnost	96,4	97,7
RSD [%]	1,0	0,8

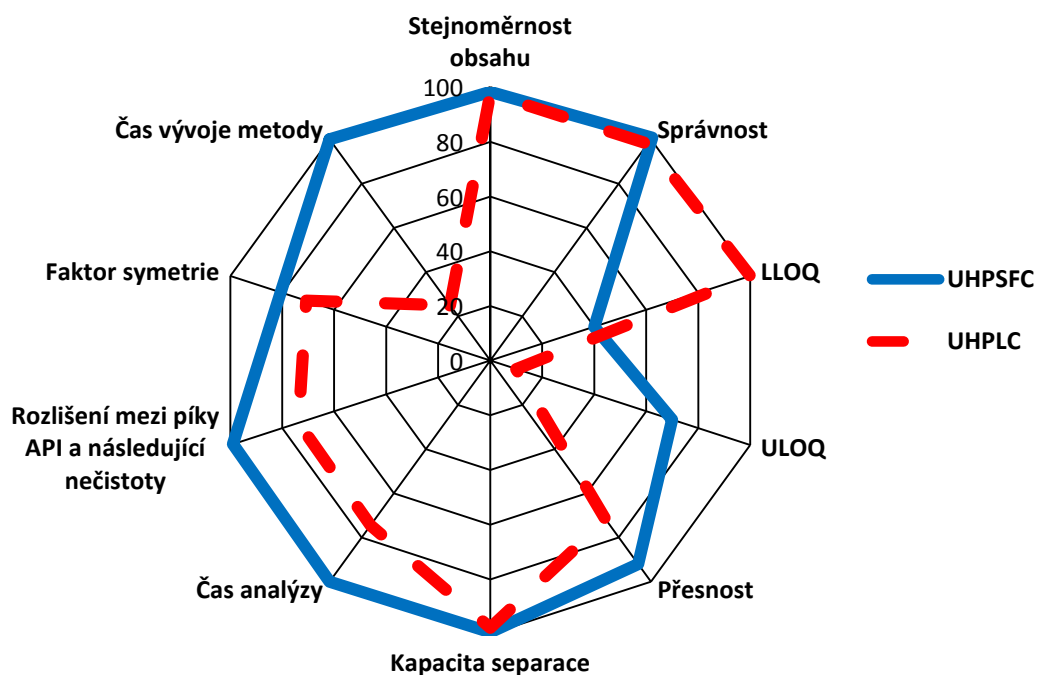
5.3. Srovnání UHPLC a UHPSFC metody

Jak ukazují kapitoly 5.1.4 a 5.2.3 v parametrech opakovatelnosti, linearity, přesnosti a správnosti vykazaly obě metody velmi dobré výsledky. To umožnilo srovnání těchto dvou chromatografických metod v několika zvolených parametrech. Obě metody splnily kritéria validace, přestože UHPSFC metoda poskytla mírně lepší výsledky pro přesnost (RSD 0,2 ku 1,4 %) a rozlišení mezi píky API a následující nečistoty (8,21 ku 5,54). Taktéž celkový čas analýzy byl kratší (4,1 min ku 5,5 min). Na rozdíl od UHPLC analýz, kde píky aminu a soli byly širší, všechny píky získané UHPSFC metodou byly úzké a symetrické. Průměrná kapacita separace byla pro obě metody prakticky srovnatelná. Výhodou UHPLC metody byla větší citlivost na spodní hranici lineárního rozmezí (LLOQ

0,1 ku 0,25 mg/ml na UHPSFC) (Tabulka 22). Nicméně bylo nutné zvážit také množství experimentů a čas nutný pro optimalizaci této metody, který byl pro UHPLC metodu znatelně delší. Popsané rozdíly shrnuje Obr. 36.

Tabulka 22 - Porovnání linearity, LLOQ a ULOQ jednotlivých metod.

UHPSFC (225 nm) vs. UHPLC (225 nm)				
	R ²	LLOQ µg/ml	LOD µg/ml	ULOQ µg/ml
Nitril	0,9992	0,25	0,08	70
	0,9998	0,1	0,03	10
Dimer	0,9993	0,25	0,08	70
	0,9995	0,1	0,03	25
Amid	0,9993	0,25	0,08	70
	0,9997	0,1	0,03	10
Ago	0,9993	0,25	0,08	70
	0,9994	0,1	0,03	10
Kyselina	0,9993	0,25	0,08	70
	0,9998	0,1	0,03	10
Amin	0,9993	0,25	0,08	70
	0,9993	0,1	0,03	25
Sůl	0,9993	0,25	0,08	70
	0,9990	0,1	0,03	25



Obr. 36 - Srovnání vyvinutých metod ve vybraných parametrech.

6. Závěr

Byly vyvinuty 2 chromatografické metody pro stanovení agomelatinu a jeho 6 potenciálních nečistot v tabletách. Byla porovnána selektivita různých aditiv mobilní fáze SFC, z čehož vyplynul pozitivní efekt přidavku malého množství vody do mravenčanu amonného na tvar píku a rozlišení. Vývoj UHPLC metody byl náročnější a komplexnější, neboť bylo nutné optimalizovat i jemnější parametry. Z porovnání vlivu pufrů na selektivitu vyplynula nutnost použití bazického pH. Organická část mobilní fáze selektivitu taktéž silně ovlivnila a bylo nutné využít směs metanolu a acetonitrilu v poměru 1:1, aby bylo dosaženo dostatečné selektivity a rozlišení. Byl sledován taktéž vliv nastavení gradientu a strmosti gradientové křivky.

Obě metody byly optimalizovány tak, aby bylo dosaženo co nejlepší selektivity a citlivosti, a následně validovány dle doporučených postupů ICH a porovnány ve zvolených parametrech (čas analýzy, rozlišení mezi píky API a následující nečistoty, kapacita separace a další). Jak UHPLC tak UHPSFC metoda vykazaly dobrou účinnost a rychlost, což umožňuje jejich využití ve farmaceutické kontrole léčiv. Vzhledem k výše uvedenému srovnání, byla jako mírně vhodnější zvolena metoda na UHPSFC systému.

Citovaná literatura

- [1] L. Nováková a M. Douša, *Moderní HPLC separace v teorii a praxi I.*, Praha, ISBN 978-80-260-4243-3, 2013.
- [2] S. Fekete, I. Kohler, S. Rudaz a D. Guillarme, Importance of instrumentation for fast liquid chromatography in pharmaceutical analysis, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 87 (2014), 105-119.
- [3] D. Guillarme, J. Ruta, S. Rudaz a J.-L. Veuthey, New trends in fast and high-resolution liquid chromatography: a critical comparison of existing approaches, *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 397 (2010), 1069-1082.
- [4] R. Lake, „RESTEK,“ [Online]. Available: http://www.restek.com/Technical-Resources/Technical-Library/Pharmaceutical/pharm_A016. [Přístup získán 20. srpna 2015].
- [5] D. T. T. Nguyen, D. Guillarme, S. Rudaz, J.-L. Veuthey, Fast analysis in liquid chromatography using small particle size and high pressure, *Journal of Separation Science* 29(2006), 1836-1848.
- [6] D. Guillarme, J.-L. Veuthey, R. M. Smith, UHPLC in Life Sciences, *Royal Society of Chemistry*, 2012.
- [7] Waters, „Waters analytical HPLC columns,“ [Online]. Available: <http://iss-store.co.uk/catalog/waters-analytical-hplc-prep-columns/waters-acquity-uplc-columns/waters-acquity-uplc-beh-shield-rp18-column-130-1-72-1-mm-x-50-mm-186002853>. [Přístup získán 30. června 2014].
- [8] J. Danda, P. Rao, P. R. Bharathi, B. Madhavi, T. Swath a S. L. Balla, „Pharmatutor, Pharmacy Infopédie: Ultra performance liquid chromatography,“ 21 11 2013. [Online]. Available: <http://www.pharmatutor.org/articles/ultra-performance-liquid-chromatography>. [Přístup získán 15. ledna 2016].
- [9] L. Nováková, A. Grand-Guillaume Perrenoud, I. Francois, C. West, E. Lesellier, D. Guillarme, Modern analytical supercritical fluid chromatography using columns packed with sub-2- μ m particles: A tutorial, *Analytica chimica acta* 824 (2014), 18-35.
- [10] A. Grand-Guillaume Perrenoud, J.-L. Veuthey, D. Guillarme, The use of columns packed with sub-2- μ m particles in supercritical fluid chromatography, *Trends in Analytical Chemistry* 63 (2014), 44-54.
- [11] P. Sandra, A. Pereira, M. Dunkle, C. Brunell, F. David, Green chromatography (part 2): The role of GC and SFC, *LC-GC Europe* 23 (2010), 396-405.

- [12] L. Nováková, P. Chocholouš, P. Solich, Ultra-fast separation of estrogen steroids using subcritical fluid chromatography on sub-2-micron particles, *Talanta* 121 (2014), 178-186.
- [13] E. Lesellier, Retention mechanisms in super/subcritical fluid chromatography on packed columns, *Journal of Chromatography A* 1216 (2009), 1881-1890.
- [14] E. Lesellier, Overview of the retention in subcritical fluid chromatography with varied polarity stationary phases, *Journal of Separation Sciences* 31 (2008), 1238-1251.
- [15] S. Khater, C. West, E. Lesellier, Characterization of five chemistries and three particle sizes of stationary phases used in supercritical fluid chromatography, *Journal of Chromatography A* 1319 (2013), 148-159.
- [16] A. Grand-Guillaume Perrenoud, J.-L. Veuthey, D. Guillarme, Comparison of ultra-high performance supercritical fluid chromatography and ultra-high performance liquid chromatography for the analysis of pharmaceutical compounds, *Journal of Chromatography A* 1266 (2012), 158-167.
- [17] C. Gourmel, G.-G. Perrenoud, L. Waller, E. Reginato, J. Verne, B. Dulery, L. Veuthey, S. Rudaz, J. Schappler, D. Guillarme, Evaluation and comparison of various separation techniques for the analysis of closely-related compounds of pharmaceutical interest, *Journal of Chromatography A* 1282 (2013), 172-177.
- [18] T. Q. Yan, C. Orihuela, J. P. Preston, F. Xia, Supercritical Fluid Chromatography and Steady-State Recycling: Phase Appropriate Technologies for the Resolutions of Pharmaceutical Intermediates in the Early Drug Development Stage, *Chirality* 22 (2010), 922-928.
- [19] S. H. Kennedy, B. S. Eisfeld, Agomelatine and its therapeutical potential in the depressed patient, *Neuropsychiatric Disease and Treatment* 3 (2007), 423-428.
- [20] M. Fornaro, D. Prestia, S. Colicchio, G. Perugi, A systematic, update review on the antidepressant agomelatine focusing on its melatonergic modulation, *Current Neuropharmacology* 8 (2010), 287-304.
- [21] M. Doležal a kolektiv, Farmaceutická chemie léčiv působících na centrální nervový systém, Praha: Karolinum, 2013.
- [22] R. A. M. Sansone, L. A. M. Sansone, Agomelatine: A novel antidepressant, *Innovations in Clinical Neuroscience* 8 (2011), 10-14.
- [23] D. Taylor, A. Sparshatt, S. Varma, O. Olofinjana, Antidepressant efficacy of agomelatine: meta-analysis of published and unpublished studies, *BMJ* 348 (2014), g1888.
- [24] P. Boyce, E. Barriball, Circadian rhythms and depression, *Australian Family Physician* 39 (2010), 307-310.
- [25] D. Eser, T. C. Baghai, H.-J. Möller, Agomelatine: The evidence for its place in the treatment

- of depression, *Core Evidence* 4 (2009), 171-179.
- [26] B. Perović, J. Marija, B. V. S. Miljković, Getting the balance right: Established and emerging therapies for major depressive disorders, *Neuropsychiatric Disease and Treatment* 6 (2010), 343-364.
- [27] Q. M. Salva, S. Hartley, Mood disorders, circadian rhythms, melatonin and melatonin agonists, *Journal of Central Nervous System Disease* 4 (2012), 15-26.
- [28] R. Hardeland, New approaches in the management of insomnia: weighing the advantages of prolonged-release melatonin and synthetic melatonergic agonists, *Neuropsychiatric Disease and Treatment* 5 (2009), 341-354.
- [29] D. d. Bererdis, S. Marini, M. Fornaro, V. Srinivasan, I. Felice, C. Tomasetti, A. Valchera, G. Perna, M.-A. Quera-Salva, G. Martinotti, M. d. Giannantonio, The melatonergic system in mood and anxiety disorders and the role of agomelatine: Implications for clinical practice, *International Journal of molecular sciences* 14 (2013), 12458-12483.
- [30] W. Milano, M. D. Rosa, L. Milano a A. Capasso, Agomelatine efficacy in the night eating syndrome, *Case Reports in Medicine* 2013 (2013), 867650.
- [31] V. Srinivasan, D. P. Cardinali, U. S. Srinivasan, C. Kaur, G. M. Brown, W. D. H. R. Spence, S. R. Pandi-Perumal, Therapeutic potential of melatonin and its analogs in Parkinson's disease: focus on sleep and neuroprotection, *Therapeutic Advances in Neurological Disorders* 4 (2011), 297-317.
- [32] Y. Liu, L. Chen, Y. Ji, Quantification and structural elucidation of potential impurities in agomelatine active pharmaceutical ingredient, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 81-82 (2013), 193-201.
- [33] K. Indumathi, N. Someswara Rao, B. Rao, Forced Degradation, Identification and Characterization of Impurities of Agomelatine Using Chromatographic and Spectroscopic Techniques, *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences* 6 (2015), 1112-1126.
- [34] R. N. El-Shaheny, Evaluation of agomelatine stability under different stress conditions using an HPLC method with fluorescence detection: application to the analysis of tablets and human plasma, *The Journal of Biological and Chemical Luminescence*, 2014.
- [35] B. Harika, V. Srikalyani, B. N. Nalluri, V. Lakshmi, Development and validation of RP-HPLC method for the estimation of agomelatine in bulk drug and pharmaceutical dosage forms, *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research* 5 (2013), 1162-1167.
- [36] M. A. Saracino, L. Mercolini, G. Carbini, V. Volterra, A. L. Quarta, M. Amore, M. A. Raggi, Multi-matrix assay of the first melatonergic antidepressant agomelatine by combined liquid chromatography-fluorimetric detection and microextraction by packed sorbent,

Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 95 (2014), 61-67.

- [37] S. R. Patil, K. K. Nerurkar, A. M. Kalamkar, V. Pukale, K. V. Mangaonkar, S. G. Pingale, Validated LC-MS/MS method for quantification of agomelatine in human plasma and its application in a pharmacokinetic study, *Journal of Mass Spectrometry* 47 (2012), 23-28.
- [38] G. Simonin, L. Bru, E. Lelièvre, J.-P. Jeannot, N. Bromet, B. Walther, C. Boursier-Neyret, Determination of melatonin in biological fluids in the presence of the melatonin agonist S 20098: comparison of immunological techniques and GC-MS methods, *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis* (1999), 591-601.
- [39] X. Wang, D. Zhang, M. Liu, H. Zhao, A. Du, L. Meng a H. Liu, LC-MS/MS method for the determination of agomelatine in human plasma and its application to a pharmacokinetic study, *Biomedical chromatography* (2014), 218-222.
- [40] M. Thompson, S. L. R. Ellison a R. Wood, Harmonized guidelines for single laboratory (IUPAC Technical Report), *Pure and Applied Chemistry* 2002, 835-85.
- [41] US Department of Health and Human Services, FDA, CDER a CBER, Guidance for Industry Q3B(R2) Impurities in New Drug Products, *ICH* 2016, 1-7.
- [42] ICH Expert Working Group, Validation of analytical procedures: Text and methodology, *ICH HARMONISED TRIPARTITE GUIDELINE*, 2005.
- [43] Ministerstvo zdravotnictví ČR, Český lékopis 2009, Praha: Grada, 2009.
- [44] B. Debrus, D. Guillarme, S. Rudaz, Improved quality-by-design compliant methodology for method development in reversed-phase liquid chromatography, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 84 (2013), 15-223.

7. PŘÍLOHY

XXII. Studentská vědecká konference, Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, 16. 4. 2014

Development and validation of SFC-UV method for the determination of agomelatine and its impurities

Plachká K¹, Chrenková L¹, Douša M², Nováková L¹

¹ Department of Analytical Chemistry, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové, Charles University in Prague, Czech Republic

²Zentiva, k.s. Praha, U Kabelovny 130, 102 37 Praha 10, Czech Republic

e-mail: plachkka@faf.cuni.cz

Agomelatine is the first antidepressant from a new group of melatonin agonists and selective serotonin antagonists. Agomelatine is a synthetic analogue of hormone melatonin, which regulates circadian rhythms and is indicated for the treatment of depression disorders in adults. The aim of this study was to develop and validate a new analytical method for the determination of agomelatine and its six potential impurities: (7-methoxynaphth-1-yl)ethylamine hydrochloride, (7-methoxynaphth-1-yl)acetonitrile, bis[2-(7-methoxynaphthalen-1-yl)-ethyl]amine, (7-methoxynaphth-1-yl)acetamide, (7-methoxynaphth-1-yl)acetonitrile, (7-methoxynaphth-1-yl)acetic acid. Their separation and quantification was accomplished by supercritical fluid chromatography with PDA detection.

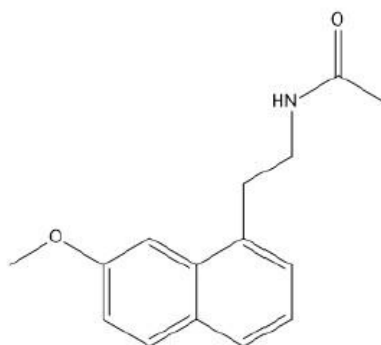


Fig. 1: The structure of agomelatine.

The impurities of agomelatine include compounds with basic, acidic and also neutral properties. Therefore, one of the main goals was to compare the retention and selectivity on different stationary phases (BEH, BEH-2-EP, CSH PFP and HSS C18). Using additives such as, 20 mM ammonium acetate, 20 mM ammonium formate and 20 mM ammonium formate

with 5% of water, to CO₂/MeOH based mobile phase was necessary to ensure symmetrical peak shapes. These separations were performed at following conditions: flow rate 2ml/min, column temperature 40°C, UV detection at 275 nm and BPR 2000psi. The gradient program started at 5% of MeOH with 20mM additive and was increased up-to 30% within 3 minutes. The column BEH-2-EP and gradient elution with 20 mM ammonium formate with the addition of 5% of water were chosen due to the best selectivity and resolution results.

During method development the solubility of tablets and the recovery of agomelatine in pure methanol and in mixtures of methanol and water in the ratio 1:1 and 1:3 was tested. The samples of the tablets or tablet's powder were dissolved in one of these solvents, and then diluted 10x with tetrahydrofuran to guarantee the compatibility of solvent and SFC mobile phase. Based on recovery results (99.7% for pure MeOH, 86.4% for ratio 3:1 and 77.5% for ratio 1:1) and RSD (4.8% for pure MeOH, 8.6% for ratio 3:1 and 20% for ratio 1:1) the pure methanol was finally chosen.

The developed method was validated in terms of linearity, limit of detection, limit of quantification, accuracy and precision. The method demonstrated good linearity with correlation coefficient values > 0.9992. Detection limit for impurities was 0.25 µg/ml – 0.36 µg/ml, quantification limit 0.83 µg/ml – 1 µg/ml. The accuracy and precision were measured at four concentration levels: 10, 40, 50 and 60 µg/ml for agomelatine and 1, 2, 2.5 and 3 µg/ml for impurities. The results of accuracy were between 97.6% and 100.4% for agomelatine and 90.5% - 103.5% for impurities, respectively. Method precision demonstrated RSD < 0.77% for agomelatine and < 3.44% for impurities. Subsequently the measurement of real samples was performed. The advantages of newly developed SFC-UV method are its environmental friendliness due to mobile phase used, a good resolution, selectivity and high speed of analysis (total time of separation is 4.1 min). In conclusion this allows for the widespread use of this method in quality control in pharmacy.

The study was supported by SVV/2014/260063.

O Cenu Karla Štulíka 2015, Ostravská Univerzita v Ostravě, Přírodovědecká fakulta, 4.-5.2. 2015

OPTIMALIZACE, VALIDACE A SROVNÁNÍ UHPSFC A UHPLC METOD PRO STANOVENÍ AGOMELATINU A JEHO NEČISTOT V TABLETÁCH

KATEŘINA PLACHKÁ¹, LUCIA CHRENKOVÁ¹, MICHAL DOUŠA², LUCIE NOVÁKOVÁ¹

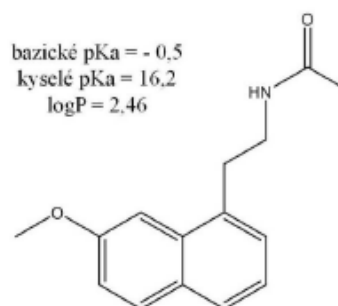
¹Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Katedra analytické chemie, Heyrovského 1203, 500 05 Hradec Králové

²Zentiva k.s., U Kabelovny 130, 102 37 Praha 10

plachkka@faf.cuni.cz

Úvod

Agomelatin je syntetická sloučenina s chemickou strukturou N-(2-(7-methoxynaft-1-yl)ethyl)acetamidu (Obr. 1). Jedná se o analog epifyzárního hormonu melatoninu a první léčivo z nové skupiny melatoninových agonistů a selektivních serotoninových antagonistů (MASSA) využívané v léčbě deprese dospělých.



Obr. 1: Struktura agomelatinu

Agomelatin byl vyvinut evropskou farmaceutickou společností Sevier Laboratories Ltd a pro terapeutické využití byl schválen v únoru 2009¹ pod obchodním názvem Valdoxan a Thymanax². Mimo terapii deprese se objevily také důkazy odůvodňující použití agomelatinu v léčbě anhedonie, syndromu nočního jení³ a také u pacientů s bipolární poruchou⁴.

Důležitost kontroly kvality léčiv spočívá v nutnosti zajistit jejich správné složení a čistotu a tím i bezpečnost. V kontrolně analytických laboratořích jsou široce využívány zejména chromatografické metody vzhledem k možnosti nejen separace jednotlivých látek, ale taktéž jejich kvantitativního hodnocení. Nejvyužívanější je vzhledem k chemické povaze léčiv kapalinová chromatografie, která je jednou z nejčastějších lékopisných metod. V moderních laboratořích je používána její varianta UHPLC. Naproti tomu, využití vysokoúčinné superkritické fluidní chromatografie (SFC) je minimální, přestože se jedná o progresivní metodu, která nabízí nový přístup a mnoho výhod⁵.

Během vývoje léčiva jsou identifikovány jeho potenciální nečistoty, jejichž obsah se následně sleduje v konečných produktech. V této práci byly společně s agomelatinem sledovány také následující nečistoty: 2-(7-methoxynaft-1-yl)ethylamin hydrochlorid (sůl), 2-(7-methoxynaft-

1-yl)acetonitril (nitril), N,N-bis[2-(7-methoxynaft-1-yl)-ethyl]amin (amin), 2-(7-methoxynaft-1-yl)acetamid (amid), 2-(7-methoxynaft-1-yl)octová kyselina (kyselina), N,N-bis(2-(7-methoxynaft-1-yl)-ethyl)acetamid (dimer).

Hlavním cílem této studie bylo vyvinout a validovat UHPSFC a UHPLC metodu s UV detekcí pro separaci a stanovení agomelatinu a 6 nečistot. Vzhledem k rozdílným fyzikálně-chemickým vlastnostem separovaných látek (log P, pKa), bylo jedním z cílů srovnání retence a selektivity nejen UHPSFC a UHPLC obecně, ale také na daných systémech za odlišných separačních podmínek. Byl popsán vliv jednotlivých parametrů na selektivitu separací.

Experimentální část

K práci použité standardy látek byly poskytnuty firmou Zentiva, Praha. Rozpouštědla byla v čistotě LC-MS grade: metanol, acetonitril a tetrahydrofuran (HPLC grade, lach.ner). Jako aditiva byly použity: roztok hydroxidu amonného ($\geq 25\%$), mravenčan amonný, octan amonný, kyselina octová (Sigma Aldrich).

UHPSFC separace proběhly na chromatografickém systému Acquity UPC² (Waters, Milford, USA). Pro separaci byly použity stacionární fáze: Acquity UPC² BEH, Acquity UPC² BEH 2-EP, Acquity UPC² CSH PFP a Acquity UPC² HSS C18 v kolonách s rozměry 100 x 3,0 mm a velikostí částic 1,7 μm . Byla aplikována gradientová eluce s modifikovaným CO₂ (> 99.995%, Messer). UV detekce pomocí Acquity UPC² PDA detektoru proběhla při 275 nm. Podmínky všech separací byly následující: průtok 2 ml/min, teplota kolony 40 °C, BPR 2000 psi a gradientový program začínající na 5 % metanolu s aditivem a vzrůstající na 30 % během 3 minut.

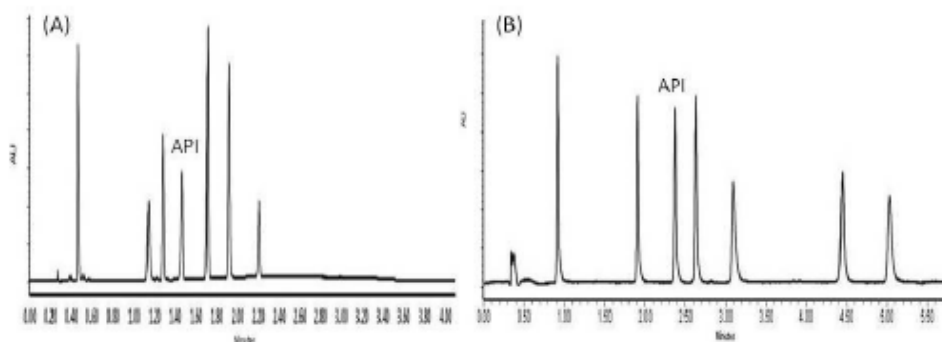
UHPLC separace byly provedeny na chromatografickém systému Acquity UPLC (Waters, Milford, USA). Stacionární fáze s částicemi o velikosti 1,7 μm zahrnovaly: Acquity UPLC CSH C18, Acquity CSH Fluoro-Phenyl, Acquity UPLC BEH Shield RP18, Acquity UPLC BEH Phenyl a Acquity UPLC BEH C18 (průměr 2,1 mm, délka 50-100 mm). Opět byla použita gradientová eluce a UV detekce při 275 nm.

Výsledky a diskuze

Optimalizace UHPSFC metody

UHPSFC separace byly provedeny na 4 kolonách dle kap. 2. K zajištění symetrických píků bylo vyzkoušeno několik aditiv: metanolický roztok 20mM octanu amonného, 20mM mravenčanu amonného a 20mM mravenčanu amonného s přísadkou 5 % vody.

Nejllepší selektivitu vykazovaly stacionární fáze BEH a BEH 2-EP. Hybridní stacionární fáze BEH modifikovaná 2-ethylpyridinem za využití 20mM mravenčanu amonného s přidavkem vody poskytovala úzké symetrické píky a separaci všech látek na základní linii (Obr. 2A). Vhodnost těchto separačních podmínek byla potvrzena testem způsobilosti systému (SST) a výsledky validačních měření, které jsou uvedeny v kapitole 3.3.



Obr. 2: Optimalizovaná UHPSEC separace na koloně BEH 2-EP (A) a UHPLC separace na koloně BEH Shield RT 18 (B)

Optimalizace UHPLC metody

Při UHPLC separacích byly využity stacionární fáze uvedené v kap. 2. Jako organická část mobilní fáze byl testován acetonitril, metanol a směs acetonitrilu a metanolu v poměru 1:1. Jako vodná fáze byly vyzkoušeny pufrы o rozdílných pH (3,0; 9,0; 9,5). Během vývoje této metody byly postupně měněny parametry chromatografického systému včetně gradientu, gradientových křivek a času analýzy. Obr. 2B ukazuje chromatogram získaný na koloně BEH Shield RP 18, kde bylo dosaženo dostatečné retence, selektivity a symetrických píků (následně potvrzeno SST). Za optimální podmínky byly zvoleny tyto: průtok 0,4 ml/min, teplota kolony 30°C, gradientová křivka číslo 4 a následující gradientový program. Počáteční složení MF: směs metanolu a acetonitrilu (poměr 1:1) a pufr o pH 9,5 v poměru 95/5, konečné složení MF 30/70 v 5 min.

Validace metody

Za daných podmínek byly obě chromatografické metody validovány s využitím metody vnějšího standardu. Hodnoceny byly parametry linearita, limit detekce a kvantifikace, správnost a přesnost.

Obě metody vykazovaly dobrou lineární závislost s korelačním koeficientem větším než 0,9990 v rozmezí 0,7 až 70 µg/ml pro UHPSEC a v rozmezí 0,1 µg/ml po 10 µg/ml pro

UHPLC. Správnost a přesnost byly měřeny na 4 koncentračních hladinách: 10, 40, 50 (zvoleno jako 100 % API) a 60 µg/ml pro agomelatin a 1, 2, 2,5 a 3 µg/ml pro nečistoty na UHPSFC (0,5 % ze zvolené 100% koncentrace API) a s 10x méně koncentrovanými roztoky na UHPLC. Výsledky validace vyhovovaly požadavkům ICH (Tab. 1).

Tabulka I

Hodnocení přesnosti a správnosti UHPSFC a UHPLC metod

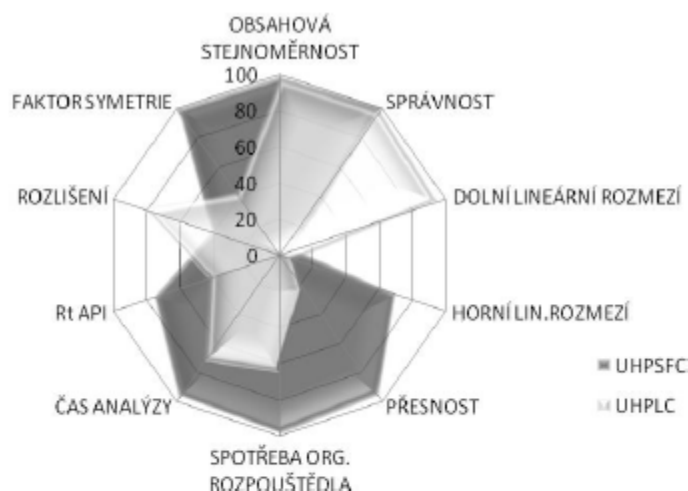
UHPSFC											
konc. hladina		NITRIL	DIMER	AMID	AGO	KYSELINA	AMIN	SŮL	konc. hladina	API	
1 µg/ml	[%]	97,4	98,8	100,1	100,0	90,5	97,0	98,5	10 µg/ml	[%]	97,6
	RSD	2,4	1,4	1,1	1,6	3,2	1,4	2,4		RSD	0,7
2 µg/ml	[%]	98,5	100,1	97,0	100,7	96,0	98,2	98,3	40 µg/ml	[%]	100,4
	RSD	1,6	1,3	1,4	2,8	2,2	3,2	3,0		RSD	0,7
2,5 µg/ml	[%]	97,5	98,5	100,1	101,2	99,3	99,5	97,8	50 µg/ml	[%]	100,1
	RSD	1,6	1,2	1,0	0,5	1,5	1,1	1,0		RSD	0,3
3 µg/ml	[%]	99,3	95,6	101,9	101,6	96,1	96,1	103,5	60 µg/ml	[%]	100,0
	RSD	0,6	3,4	2,1	0,6	2,2	1,3	2,1		RSD	0,9
UHPLC											
0,1 µg/ml	[%]	99,3	101,2	101,9	104,0	100,4	99,0	100,2	1 µg/ml	[%]	95,2
	RSD	1,3	1,5	0,7	0,7	1,1	2,5	1,5		RSD	1,0
0,2 µg/ml	[%]	102,7	99,5	100,9	100,9	97,1	97,3	98,4	4 µg/ml	[%]	98,3
	RSD	1,9	2,3	0,4	2,0	1,2	0,7	1,0		RSD	1,5
0,25 µg/ml	[%]	100,9	96,8	97,0	97,5	100,2	97,0	96,6	5 µg/ml	[%]	98,0
	RSD	1,6	1,2	0,7	1,3	1,1	0,6	0,6		RSD	1,4
0,3 µg/ml	[%]	100,4	98,5	95,7	102,6	97,7	97,3	98,6	6 µg/ml	[%]	96,5
	RSD	0,7	1,2	0,8	1,0	2,6	0,1	0,7		RSD	0,3

Aplikace metod – analýza tablet

Obě vyvinuté metody byly následně použity pro hodnocení obsahové stejnoměrnosti tablet. Všechna měření vyhovovala podmínce Českého lékopisu 2009, neboť u vzorku z tabletového prášku bylo UHPSFC metodou dosaženo 99,7% a u vzorku z tablety 98,3% výtěžnosti s RSD pohybující se kolem 2 %. UHPLC metoda dosáhla u tabletového prášku výtěžnosti 96,44 %, u tablety 97,68 % s RSD < 1 %.

Posledním krokem bylo porovnání obou vyvinutých metod (Obr. 3). Největší rozdíly bylo možno pozorovat u dolního lineárního rozmezí, kdy na UHPLC systému, který poskytoval lepší rozlišení piků, bylo možno detekovat i vzorky obsahující pouze 0,1 µg/ml agomelatinu. Pro vzorky s koncentrací vyšší než 7 µg/ml se naopak jevílo vhodnější UHPSFC, které poskytlo i další výhody: vyšší přesnost, lepší symetrie piků, rychlejší eluci

API, kratší čas analýzy a ekologičnost, neboť při jeho využití je spotřebováno zdatelně menší množství organických rozpouštědel.



Obr. 3: Srovnání vyvinutých UHPSEC a UHPLC metod v uvedených parametrech pro API

Závěr

Byla vyvinuta analytická metoda pro stanovení agomelatinu a jeho 6 nečistot v tabletách s využitím superkritické fluidní i kapalinové chromatografie. U obou byly optimalizovány podmínky tak, aby bylo dosaženo co nejlepší selektivity, dobrého rozlišení, symetrických píků a separace na základní linii. Následně byla provedena validace těchto metod a jejich srovnání. Obě metody však byly rychlé a poskytovaly přesné a správné výsledky.

LITERATURA

1. Taylor D., Sparshatt A., Varma S., Olofinjana O., *BMJ* 348, g1888 (2014).
2. Sansone R. A. M., Sansone L. A. M., *Innovations in clinical neuroscience* 8(11), 10 (2011).
3. Milano W., Rosa M. D., Milano L., Capasso A., *Case reports in medicine* 2013, 867650 (2013).
4. Kennedy S. H., Eisfeld B. S., *Neuropsychiatr. Dis. Treat.* 3(4), 423 (2007).
5. Nováková L., Grand-Guillaume Perrenoud A., Francou I., West C., Lesellier E., Guillaume D., *Anal. Chim. Acta* 824, 18 (2014).



Přírodovědecká fakulta Ostravské univerzity v Ostravě
Odborná skupina analytické chemie České společnosti chemické

Kateřina Plachká

získala za práci

Optimalizace, validace a srovnání UHPSFC a UHPLC metod
pro stanovení agomelatinu a jeho nečistot v tabletách

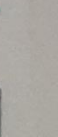
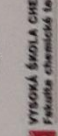
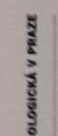
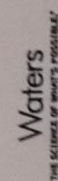
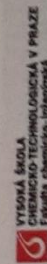
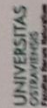
3. místo

v celostátní soutěži o nejlepší studentskou vědeckou práci v oboru analytická chemie
„O cenu Karla Štulíka 2015“

Doc. Ing. Zuzana Navrátilová, CSc.
předsedkyně odborné poroty

Prof. RNDr. Jiří Barek, CSc.
předseda odborné skupiny analytické chemie
Česká společnost chemická

V Ostravě 5. února 2015



XXIII. Studentská vědecká konference, Univerzita Karlova v Praze,
Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, 22. -23.4.2015

OPTIMIZATION, VALIDATION AND COMPARISON OF UHPSEC
AND UHPLC METHODS FOR THE DETERMINATION OF
AGOMELATINE AND ITS IMPURITIES

Plachká K¹, Chrenková L¹, Douša M², Nováková L¹

¹ Department of Analytical Chemistry, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové, Charles University in Prague,
Czech Republic

²Zentiva, k.s. Praha, U Kabelovny 130, 102 37 Praha 10, Czech Republic

e-mail: plachkka@faf.cuni.cz

Agomelatine is a synthetic compound with chemical structure N-(2-(7-methoxynaphth-1-yl)ethyl)acetamide (Fig.1). It is an analogue of epiphysis hormone melatonin and the first antidepressant from a new group of melatonin agonists and selective serotonin antagonists (MASSA). By influencing MT₁, MT₂ and 5-HT_{2C} receptors agomelatine regulates circadian rhythms and the release of noradrenaline and dopamine. This effect allows its indication for treatment of depression disorders in adults.

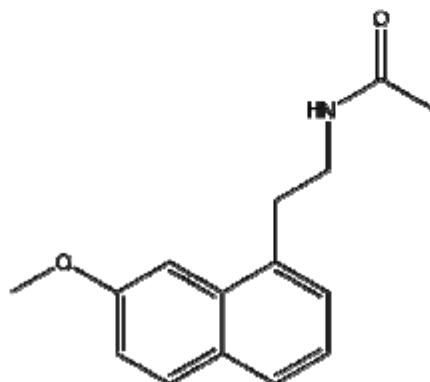


Fig.1: The structure of agomelatine

The aim of this study was to develop and validate UHPSFC and UHPLC methods with UV detection for the separation and the determination of the group of structurally similar substances, agomelatine and its six impurities: (7-methoxynapht-1-yl)ethylamine hydrochloride, (7-methoxynapht-1-yl)acetonitrile, bis[2-(7-methoxynaphtalen-1-yl)-ethyl]amine, (7-methoxynapht-1-yl)acetamide, (7-methoxynapht-1-yl)acetonitrile, (7-methoxynapht-1-yl)acetic acid.

Although these substances are structurally close to agomelatine, their physicochemical properties differ substantially. Therefore, one of the main goals was to compare the retention and selectivity not only in supercritical fluid chromatography system and liquid chromatography system but also under different separation conditions. The UHPSFC separations were accomplished using four different stationary phases (Acquity UPC² BEH, Acquity UPC² BEH 2-EP, Acquity UPC² CSH PFP and Acquity UPC² HSS C18), all of them with 100 x 3.0 mm dimension and with particles sizes 1.7 µm. Gradient elution was performed using modified CO₂ with gradient program started at 5 % of modifier and ended at 30 % in 3 minutes. Methanol with different additives including 20mM ammonium acetate, 20mM ammonium formate and 20mM ammonium formate with addition of 5 % of water was used. Flow rate was set at 2 ml/min, the temperature at 40°C and BPR at 2000 psi. The UV detection was performed by Acquity UPC² PDA detector at 275 nm. The column BEH 2-EP and gradient elution with 20mM ammonium formate with the addition of 5 % of water were chosen due to the best selectivity and resolution results.

The stationary phases for UHPLC system included Acquity UPLC CSH C18, Acquity CSH Fluoro-Phenyl, Acquity UPLC BEH Shield RP18, Acquity UPLC BEH Phenyl and Acquity UPLC BEH C18 with column dimension 2.1 x 50 mm X 1.7 µm or 2.1 x 100 mm x 1.7 µm. Methanol, acetonitrile and a mixture of acetonitrile and methanol in the ratio 1:1 were tested as a organic component of mobile phase using gradient elution with different gradient slopes, gradient curves and buffers (pH 2.0, 3.0, 9.0, 9.5 and 10.0). The column temperature was 30°C and the UV detection was performed at 275 nm. The final conditions were chosen as follows: column BEH Shield RP18, gradient elution with a mixture of methanol and acetonitrile (ratio 1:1) and buffer with pH 9.5 started at 5 % and increased up-to 70 % within 5 minutes under gradient curve number 4.

Both developed methods were properly validated according to ICH guidelines. The methods were validated in terms of linearity, sensitivity (LOD, LOQ), accuracy and precision. The

UHPSFC method was linear in the range 0.7-70 $\mu\text{g/ml}$ for all analytes with accuracy and precision $\geq 95.5\%$ and $\text{RSD} \leq 2.4$ for impurities and $\geq 97.6\%$ and $\text{RSD} \leq 0.9$ for API. The UHPLC method was linear in the range 0.1-10 $\mu\text{g/ml}$ with accuracy $\geq 95.7\%$ and $\text{RSD} \leq 2.6$ for impurities and $\geq 95.2\%$ and $\text{RSD} \leq 1.5$ for API.

The measurement of real samples of agomelatine tablets was performed and the methods were compared in the selected parameters as shown in Fig. 2.

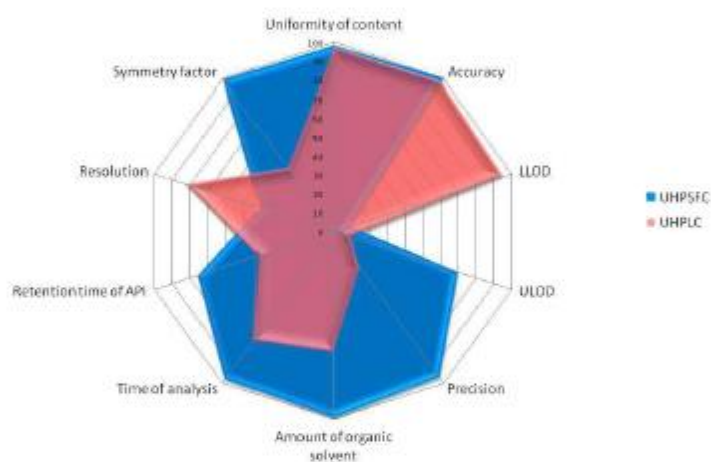


Fig. 2: The comparison of UHPSFC and UHPLC methods in selected parameters

The study was supported by SVV/2015/260184.

Univerzita Karlova v Praze,
Farmaceutická fakulta v Hradci Králové
a
Spolek českých studentů farmacie

XXIII. STUDENTSKÁ VĚDECKÁ KONFERENCE

Diplom

za 3. místo

Katerina Plachká

Sekce chemických věd

Doc.

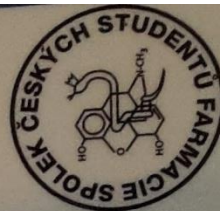
doc. PharmDr. Tomáš Šimůnek, Ph.D.
děkan Farmaceutické fakulty

Prof.

prof. Ing. Vladimír Wsól, Ph.D.
proděkan pro vědeckou činnost,
doktorské studium a akademické kvalifikace

Eliska

Eliška Röslerová
prezident Spolku českých studentů farmacie



Hradec Králové,
22. - 23. dubna 2015

Česká chromatografická škola HPLC 2015

3. - 6. 5. 2015 v Rožnov pod Radhoštěm

ZA PODPORY GENERÁLNÍHO SPONZORA:

Čes Waters
THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.®

Organizační výbor

Mgr. Michal Douša, Ph.D.

doc. PharmDr. Lucie Nováková, Ph.D.

doc. Mgr. Jan Havliš, Dr.

Ing. Vít Vacenovský

škola

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

Plachká K.¹, Chrenková L.¹, Douša M.², Nováková L.¹

¹ *Department of Analytical Chemistry, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové, Charles University in Prague, Heyrovského 1203, 500 05 Hradec Králové, Czech Republic*

² *Zentiva, k.s. Praha, U Kabelovny 130, 102 37 Praha 10, Czech Republic*

e-mail: plachkka@faf.cuni.cz

Keywords: *agomelatine; UHPSFC; UHPLC; method development*

Agomelatine is a synthetic compound with chemical structure N-(2-(7-methoxynaphth-1-yl)ethyl)acetamide. It is an analogue of epiphysis hormone melatonin and the first antidepressant from a new group of melatonin agonist and selective serotonin antagonists (MASSA). Due to effect to MT₁, MT₂ and 5-HT_{2C} receptors agomelatine regulates circadian rhythms and the release of noradrenaline and dopamine. This influence allows its indication for treatment of depression disorders in adults.

Two chromatographic methods for determination of agomelatine and its impurities ((7-methoxynaphth-1-yl)ethylamine hydrochloride, (7-methoxynaphth-1-yl)acetonitrile, bis[2-(7-methoxynaphth-1-yl)ethyl]amine, (7-methoxynaphth-1-yl)acetamide, (7-methoxynaphth-1-yl)acetonitrile, (7-methoxynaphth-1-yl)acetic acid) were developed. The separations on UHPSFC system were accomplished using stationary phase Acquity UPC² BEH 2-EP (3.0 x 100 mm, 1.7 µm) and gradient elution using 20mM ammonium formate in methanol with addition of 5 % of water to CO₂. The gradient started at 5 % of modifier and ended in 3. min at 30 % of modifier. The conditions of chromatographic system were set as follow: flow rate 2 ml/min, temperature 40°C, BPR 2000 psi, UV detection at 275 nm. The UHPLC separations were performed on stationary phase Acquity UPLC BEH Shield RP18 (2.1 x 50 mm, 1.7 µm). The mixture of acetonitrile and methanol in ratio 1:1 and buffer with pH 9.5 were used as mobile phase. The setting of conditions was following: the gradient started at 5 % of the organic component and increased up-to 70 % within 5.1 min, flow rate 0.4 ml/min, column temperature 30°C and UV detection at 275 nm.

Both developed methods were properly validated according to ICH guidelines including evaluation linearity, sensitivity (LOD, LOQ), accuracy and precision. The UHPSFC method was linear in the range 0.7-70 µg/ml for all analytes with accuracy $\geq 95.5\%$ and precision expressed as $RSD \leq 2.4$ for impurities and $\geq 97.6\%$ with $RSD \leq 0.9$ for API. The UHPLC method was linear in the range 0.1-10 µg/ml with accuracy $\geq 95.2\%$ and $RSD \leq 1.5$ for API and $\geq 95.7\%$ with $RSD \leq 1.5$ for impurities. The measurement of real samples was performed and the methods were compared in the selected parameters (Fig.1). In conclusion, the UHPSFC method was selected as more appropriate for the determination of agomelatine and its impurities. The advantages of newly developed UHPSFC-UV method are its environmental friendliness due to mobile phase used, a good resolution, selectivity and high speed of analysis (total time of separation is 4.1 min). In conclusion this allows for the widespread use of this method in quality control in pharmacy.

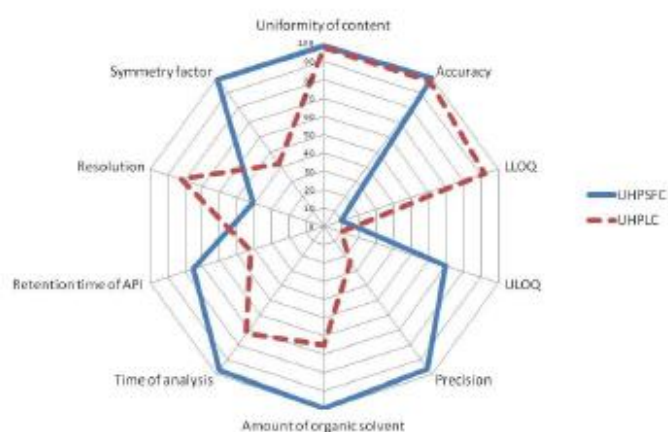


Fig.1: The comparison of UHPSFC and UHPLC methods in selected parameters

The study was supported by SVV/2014/260063.

K. Plachká, L. Chrenková, M. Douša, L. Nováková, Development, validation and comparison of UHPSFC and UHPLC methods for the determination of agomelatine and its impurities, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 125 (2016), 376–384.

Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 125 (2016) 376–384



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jpba



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



Kateřina Plachká^a, Lucia Chrenková^a, Michal Douša^b, Lucie Nováková^{a,*}

^a Department of Analytical Chemistry, Faculty of Pharmacy, Charles University in Prague, Heyrovského 1203, 500 05 Hrádec Králové, Czech Republic

^b Zentiva, i.s. Praha, a Sanofi Company, U Kabelovny 130, 102 37 Praha 10, Czech Republic

ARTICLE INFO

Article history:

Received 14 March 2016

Received in revised form 13 April 2016

Accepted 16 April 2016

Available online 19 April 2016

Keywords:

Agomelatine

UHPSFC

Ultra-high performance supercritical fluid chromatography

UHPLC

Ultra-high performance liquid chromatography

Method development

ABSTRACT

Agomelatine is one of the newest antidepressants. Due to a different mechanism of action it offers a completely new approach in the treatment of depressive disorders. Two chromatographic methods for determination of agomelatine and its impurities were developed. The separations on UHPSFC system were accomplished using stationary phase based on BEH 2-EP and gradient elution with CO₂ and methanol containing 20 mM ammonium formate and 5% of water. The UHPLC separations were performed on stationary phase BEH Shield RP18. The mixture of acetonitrile and methanol in ratio 1:1 and ammonium acetate buffer pH 9.5 were used as mobile phase.

Both developed methods were properly validated in terms of linearity, sensitivity (LOD, LOQ), accuracy and precision according to ICH guidelines. The UHPSFC method was linear in the range 0.25–70 µg/ml for all analytes with method accuracy ≥ 97.4% and ≥ 100.2% and method intra-day precision RSD ≤ 2.4 and ≤ 0.8 for impurities and API (active pharmaceutical ingredient), respectively. The UHPLC method was linear in the range 0.1–10 µg/ml for all analytes except three impurities for which the linear range was larger 0.1–25 µg/ml. Method accuracy ≥ 95.7% and ≥ 95.2% and method intra-day precision RSD ≤ 2.6 and ≤ 1.5 were found for impurities and API, respectively.

The measurement of tablet samples was performed and the selected parameters of the methods were compared. In conclusion, both methods were appropriate for the determination of agomelatine and its impurities in pharmaceutical quality control (QC), although the UHPSFC method was found as more convenient especially in the method development phase. The advantages of newly developed UHPSFC-PDA (photo diode array detector) method were its environmental friendliness due to the mobile phase used, a very good resolution, selectivity and high speed of analysis (total time of separation was 4.1 min).

© 2016 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Agomelatine is the first antidepressant from a new group of melatonin agonists and selective serotonin antagonists (MASSA). Chemically, it is *N*-(2-(7-methoxynaphthalen-1-yl)ethyl)acetamide (Fig. 1). Agomelatine is a synthetic analogue of epiphysis hormone melatonin, which regulates circadian rhythms and is indicated for the treatment of depression disorders in adults. The serotonin receptor 5-HT_{2C} inhibits the release of noradrenalin and dopamine. Agomelatine as an antagonist of this receptor counteracts this inhibition which leads to increasing levels of these monoamines [1]. Agomelatine regulates circadian rhythms due to positive affecting of melatonin receptors MT₁ and MT₂. It can also correct the

disorders of sleep-wake cycles [2]. The clinical trials proved that the efficiency of agomelatine is comparable with the efficiency of many antidepressants commonly used in clinical practice such as venlafaxine, paroxetine and fluoxetine [1–4]. This is important finding given the unique mechanism of action and better tolerability [5].

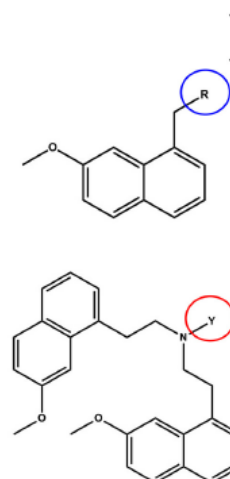
Six potential impurities of agomelatine have to be monitored simultaneously in pharmaceutical QC (quality control) analysis of the drug substance and/or the drug product: (2-(7-methoxynaphthalen-1-yl)ethan-1-amine hydrochloride (Ago Salt), bis[2-(7-methoxynaphthalen-1-yl)-ethyl]amine (amine), *N,N*-bis[2-(7-methoxynaphthalen-1-yl)-ethyl]acetamide (dimer), 2-(7-methoxynaphthalen-1-yl)acetonitrile (nitrile), 2-(7-methoxynaphthalen-1-yl)acetamide (amide), 2-(7-methoxynaphthalen-1-yl)acetic acid (acid). Although these substances are structurally quite close to agomelatine, their physicochemical properties differ (Fig. 1) including acidic,

* Corresponding author.

E-mail address: noi@email.cz (L. Nováková).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.jpba.2016.04.020>

0731-7085/© 2016 Elsevier B.V. All rights reserved.



	R	Mw	logP	pKa (acid)	pKa (basic)
Acid	-COOH	216.23	2.41	4.33	-
Amide	-CONH ₂	215.25	1.76	16.11	-0.67
Nitrile	-CN	197.23	2.69	NA	NA
Sal	-CH ₂ -NH ₂ · HCl	237.73	2.23	10.00	-
Agomelatine	-CH ₂ -NHCO-CH ₃	243.30	2.46	16.17	-0.53

	Y	Mw	logP	pKa (acid)	pKa (basic)
Amine	-H	385.50	6.96	-	9.73
Dimer	-COCH ₃	427.53	6.58	-	0.59

Fig. 1. The structures of agomelatine and its six potential impurities included in this study and their physicochemical properties.

basic and neutral molecules as well as a salt. Therefore, their simultaneous analysis remains challenging.

Agomelatine is relatively new drug. There are only two published methods dealing with the separation of agomelatine and its potential impurities [6,7]. Indumathi et al. [7] published a study dealing with the forced degradation of agomelatine where the degradation impurities were determined by HPLC method using Hypersil OD SC18 (150 × 4.6 mm, 5.0 μm) and gradient elution with acetonitrile and ammonium acetate. Total time of this analysis was 30 min. The second mentioned separation [6] was accomplished using RP-HPLC using Hypersil BDS C18 column (250 × 4.6 mm, 5 μm) and gradient elution with mobile phase formed by acetonitrile and potassium dihydrogen phosphate (15 mM, pH adjusted to 3.0). In spite of 50 min analysis, the optimal selectivity and resolution was not obtained [6] considering close elution of two critical pairs of impurities.

On the other hand, few methods for the determination of agomelatine itself using RP-HPLC have already been published [8–11]. RP-HPLC method with UV detection was developed for the determination of agomelatine in bulk and dosage forms [9]. Saracino et al. [10] published another HPLC method developed for the determination of agomelatine in human plasma, saliva and dried blood spots. This method took advantages of the natural fluorescence of agomelatine and used the fluorescence detection. However, using acetonitrile with phosphate buffer as a mobile phase resulted in the need of prolonged column washing cycles and incompatibility with MS detection. Similar method was developed by El-Shaheny [8] for agomelatine in tablets and human plasma. This separation was performed with the same detection and the buffer as in previous method, while the second part of the mobile phase was formed by methanol. Another approach included liquid chromatography technique with radioimmunoassay's detection (LC-RIA) [11]. Two LC-MS/MS methods [12,13] for determination of agomelatine in human plasma have also been described as well as the GC-MS method [11].

The separation and the determination of the group of structurally similar substances with different physicochemical properties, such as active pharmaceutical ingredient (API) and its impurities, are the basis of pharmaceutical QC. HPLC methods with various detection techniques are considered as gold standard in QC

of drug substances. In this chromatographic system, a wide range of parameters can be optimized (stationary phase type, composition of mobile phase, pH of buffers, gradient elution, gradient slopes, temperature) [14]. However, in some cases none of the modifications may allow the separation of all substances with adequate resolution. Therefore, a number of SFC separations in pharmaceutical industry has increased recently due to its different selectivity [14–16].

SFC is a unique separation technique allowing the use of columns with both polar and non-polar stationary phases [15,16]. Even though polarity profile of SFCs is basically the same as for normal phase chromatography, SFC can be used for separation of both, polar and non-polar, substances [14,17–19]. For analysis of polar compounds in pharmacy modification of the non-polar CO₂-based mobile phase is needed in order to extend the polarity range. Routinely, methanol, ethanol or acetonitrile, are used as organic modifiers to improve the solvent strength. Moreover, the peak shapes may be further improved by additives [20,19]. The term UHPSFC (ultra-high performance supercritical fluid chromatography) is used for supercritical fluid chromatography performed on stationary phase with sub-2 μm or superficially porous particles. According to Khater et al. [21] the change in particle size from 5 μm to 1.7 μm does not affect the interactions, but similarly to UHPLC, sub-2-μm particles enable ultra-fast and efficient separations [22,23].

The aim of this study was to develop and validate fast UHPSFC and UHPLC methods with UV detection for the separation and the determination of the group of structurally similar substances, agomelatine and its six impurities. Although these substances are structurally quite close, their physicochemical properties differ. Therefore, one of the main goals was to compare the retention and selectivity not only in supercritical fluid chromatography system and liquid chromatography system but also under different separation conditions. During method development different chromatographic conditions such as stationary phases, mobile phases, additives and buffers were tested. After the optimization of separation conditions complete separations were obtained in both systems. Both developed methods were properly validated according to ICH guidelines [24]. The measurement of tablet samples was performed and the methods were compared in the selected param-

eters. The benefits and drawbacks of both developed methods, UHPSFC and UHPLC, are discussed in detail.

2. Experimental

2.1. Chemicals and reagents

The reference standards of agomelatine (*N*-[2-(7-methoxynaphthalenyl)ethyl]acetamide-citric acid co-crystal—99.9%) and its six impurities (7-methoxy-1-naphthaleneethanamine hydrochloride) – 100.0% – Ago Salt, 7-methoxy-*N*-[2-(7-methoxy-1-naphthalenyl)ethyl]-1-naphthaleneethanamine – 91.8% – Amine, 7-methoxy-1-naphthaleneacetamide – 97.9% – Amide, 7-methoxy-1-naphthaleneacetonitrile – 99.5% – Nitrile, *N,N*-bis[2-(7-methoxy-1-naphthalenyl)ethyl]-acetamide – 98.8% – Dimer, 7-methoxy-1-naphthaleneacetic acid – 99.9% – Acid) as well as tablets containing 25 mg of agomelatine were used for this study. All of these substances were obtained from Zentiva, Czech Republic. Tetrahydrofuran in HPLC grade purity was obtained from Lach-Ner (Neratovice, Czech Republic). Methanol, acetonitrile (both in HPLC gradient grade purity), formic acid ($\geq 95\%$), acetic acid (for LC-MS), ammonium hydroxide solution ($\geq 25\%$), ammonium formate ($\geq 98\%$) and ammonium acetate ($\geq 98\%$) were obtained from Sigma-Aldrich (Czech Republic).

2.2. Ultra high performance supercritical fluid chromatography

The supercritical fluid chromatography system Acquity UPC² (Waters, Milford, MA, USA) was used. The separations were accomplished using four different stationary phases, all of them with 100×3.0 mm dimensions and with particles size of 1.7 μm (Acquity UPC² BEH, Acquity UPC² BEH 2-EP, Acquity UPC² CSH PFP) or 1.8 μm (Acquity UPC² HSS C18). Gradient elution was performed using modified CO₂ ($>99.995\%$ Linde Gas, Czech Republic) with gradient program from 5 to 30% of organic modifier in 3 min. Methanol with different additives including 20 mM ammonium acetate, 20 mM ammonium formate and 20 mM ammonium formate with the addition of 5% of water were used. Flow rate was set at 2 ml/min, the temperature at 40 °C and BPR (back-pressure regulator) pressure at 13.79 MPa. The auto-sampler temperature was set at 10 °C. The injected volume was 2 μl . The UV detection was performed by Acquity UPC² PDA detector at 225 nm.

2.3. Ultra high performance liquid chromatography

The analyses were accomplished by the ultra-high performance liquid chromatography system Acquity UPLC (Waters, Milford, MA, USA). The tested stationary phases included 1.7 μm columns with 2.1 mm I.D. with different column lengths: 100 mm Acquity UPLC CSH C18 and Acquity CSH Fluoro-Phenyl, 50 mm Acquity UPLC BEH Shield RP18, and finally Acquity UPLC BEH Phenyl and Acquity UPLC BEH C18 with both 50 and 100 mm column lengths. Methanol, acetonitrile and a mixture of acetonitrile and methanol in the ratio 1:1 were tested as organic modifiers using gradient elution with different gradient slopes, gradient curves and buffers (pH 2.0, 3.0–10 mM ammonium formate buffers, 9.0, 9.5, and 10.0–10 mM ammonium acetate buffers). The column temperature was 30 °C, injected volume 2 μl and the UV detection was performed at 225 nm.

2.4. Preparation of standard solutions and samples

The stock standard solutions of all reference substances were prepared by dissolving 1 mg of particular standard in 1 ml of methanol or in the mixture of tetrahydrofuran and methanol (9:1) for UHPLC and UHPSFC, respectively. The obtained concentration

1 mg/ml was further diluted with methanol or the above-mentioned mixture.

The agomelatine tablets were prepared in two ways for the determination of agomelatine, first for the determination in individual tablets and secondly in the tablet's powder. One tablet or the amount of tablet's powder corresponding to the weight of 1 tablet was dissolved in 50 ml of methanol and subjected to ultrasonic bath for 20 min. The resulting solution was filtered through 0.2 μm PTFE filter and further diluted with methanol or tetrahydrofuran for UHPLC and UHPSFC, respectively.

2.5. Method validation

Prior to method validation System suitability test (SST) was performed to confirm the suitability of the separation conditions. The developed methods were subsequently validated in terms of linearity, limits of detection, limits of quantification, accuracy and precision. Accuracy and precision were evaluated on UHPSFC system at three concentration levels (40, 50, 60 $\mu\text{g/ml}$) for agomelatine as an API. Method precision was evaluated as an intra- (within one day) and inter-day (within three days) precision. ICH guideline Q3B [25] states that the lower limit of quantification for impurities is based on a maximum daily dose. This corresponds to 50 mg for agomelatine. Therefore the validated concentration level for impurities was equal to 0.5% of the daily dose of API, corresponding to 2.5 $\mu\text{g/ml}$ if the concentration of API is equal to 50 $\mu\text{g/ml}$. The other validated concentration levels corresponded to 80 and 120% of this concentration. Therefore, three concentration levels (2, 2.5, 3 $\mu\text{g/ml}$) for impurities were evaluated. For the UHPLC method the samples were diluted ten times more, especially due to lower ULOQ (upper limit of quantitation, the highest concentration level of the calibration curve).

For the evaluation of method linearity and sensitivity 12 samples in the concentration range 0.1–100 $\mu\text{g/ml}$ for UHPSFC and UHPLC were prepared and injected in triplicates. LLOQ and ULOQ were determined and the method sensitivity was expressed as LOQ and LOD based on the values of method accuracy, precision and signal/noise ratio.

3. Results and discussion

3.1. The development of UHPSFC method

The tested stationary phases included UHPSFC stationary phases packed with sub-2 μm particles and were different in selectivity and polarity, as was recommended for starting experiments by Khater et al. [21]. The polar stationary phases included bridged ethyl hybrid phase (BEH) and the same hybrid phase modified with 2-ethylpyridine group (BEH 2-EP). Intermediate and non-polar stationary were represented by the charged hybrid phase modified with pentafluorophenyl group (CSH PFP) and the C18 modified silica (HSS C18), respectively [26]. The low polarity of CO₂ as a mobile phase in SFC limits its applicability. Therefore, methanol is the most commonly used organic modifier to enhance elutropic strength due to its complete miscibility with CO₂ over a wide range of temperatures and pressures [20]. Various acidic, basic or salt additives are also used due to positive impact on the peak shape and selectivity [20]. In this study the comparison of three different additives (20 mM ammonium acetate, 20 mM ammonium formate and 20 mM ammonium formate with addition of 5% of water in methanol) was made. Their effect on the retention and the selectivity was examined on all four tested stationary phases. These experiments were performed at generic chromatographic conditions using gradient elution from 5 to 30% of methanol as an organic

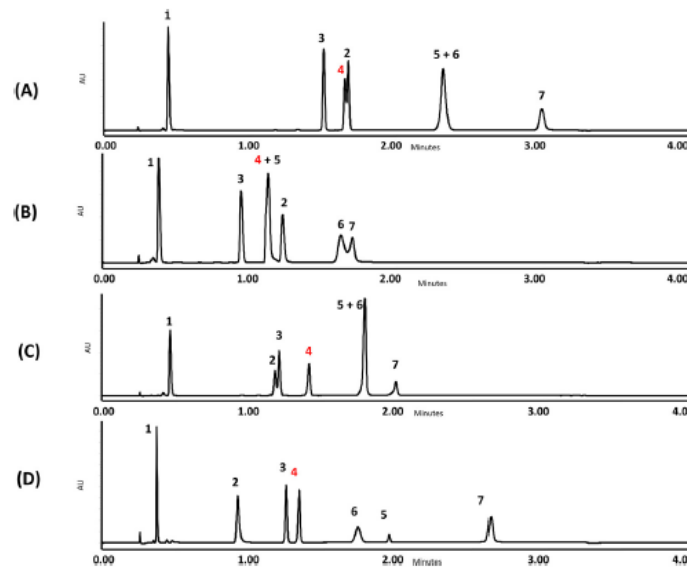


Fig. 2. The UHPLC chromatograms of agomelatine and its impurities on four tested stationary phases: (A) Acquity UPC² HSS C18 SB, (B) Acquity UPC² CSH FFP, (C) Acquity UPC² BEH 2-EP, (D) Acquity UPC² BEH using gradient elution with 5–30% of CO₂/methanol with 20 mM ammonium acetate in 3 min at 2.0 ml/min. The temperature 40 °C, BPR pressure 2000 psi. (1) nitrile, (2) dimer, (3) amide, (4) agomelatine (AR), (5) acid, (6) amine, (7) AgoSalt.

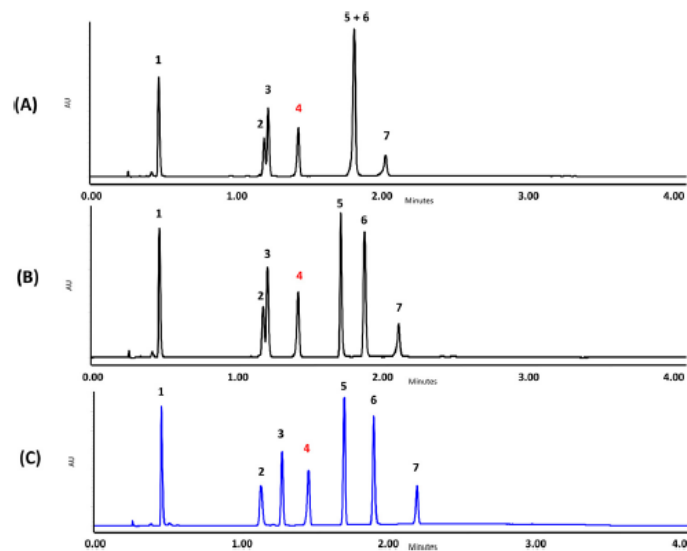


Fig. 3. The influence of additives on the separation of agomelatine and its impurities in UHPLC on column Acquity UPC² BEH 2-EP using gradient elution with 5–30% of CO₂/methanol with the additive being (A) 20 mM ammonium acetate, (B) 20 mM ammonium formate, (C) 20 mM ammonium formate with 5% of water in 3 min at 2.0 ml/min, temperature 40 °C, BPR pressure 2000 psi. Peak numbers correspond to Fig. 2.

modifier with various additives at 2.0 ml/min, 40 °C and BPR pressure at 13.79 MPa.

20 mM ammonium acetate in CO₂/methanol mobile phase was chosen for the first comparison. All analytes were eluted on all 4 tested stationary phases using above described generic conditions (Fig. 2). Among these stationary phases, significant changes in the

retention and selectivity were observed. Unfortunately, at these conditions a complete baseline resolution of all components was obtained only on BEH stationary phase. However, for a peak 6—amine significant broadening was observed (Fig. 2D), which was attributed to the interaction with remaining silanol groups of this stationary phase. The elution order was different on all other

stationary phases. The smallest difference in elution order was observed between BEH and 2-EP modified hybrid column. However, the selectivity was different resulting in the coelution of the peaks 5-acid and 6-amin and incomplete baseline resolution of the peaks 2-dimer and 3-amide. Completely different elution order was obtained on HSS C18 (Fig. 2A). In this case the peak 2-dimer eluted after the peak 3-amid, near to the peak 4-agomelatine and the coelution of peaks 5-acid and 6-amin appeared again. The separation results on CSH PFP were characterized by earlier elution of the peak 5-acid, which eluted at the same retention time like peak 4-agomelatine, and by a low resolution between peaks 6-amin and 7-AgoSalt. The most significant difference in retention was observed for the acidic impurity and for amide impurity.

The change of ammonium acetate to ammonium formate in CO₂/methanol mobile phase led to the largely positive effect on resolution and peak asymmetry. This change affected mainly elution of peak 5-acid. On BEH 2-EP stationary phases the peaks 5-acid and 6-amin were separated due to the shift of retention time of acid (from 1.97 to 1.7 min, Fig. 3B), while these two peaks were coeluted when using ammonium acetate. A similar shift (from 1.41 to 1.29 min) was observed on CSH PFP stationary phase which led to the separation of peaks 5-acid and 4-agomelatine. Also on HSS C18 column the change in retention time of peaks 5-acid (from 2.37 to 1.9 min) led to the separation of peaks 5-acid and 6-amine. On the other hand, a small shift of the retention time of agomelatine (from 1.72 to 1.69 min) occurred which caused a coelution of this peak 4 and peak 2-dimer (data not shown). The change of the additive changed also an elution order between amine and acid (peaks 5 and 6) on BEH column (data not shown).

In order to further increase the separation efficiency and selectivity a small addition (5%) of water to 20 mM ammonium formate in methanol/CO₂ was tested. Some peaks were influenced negatively—for example on CSH PFP column the shift of retention time of peak 5-acid (from 1.09 to 1.16 min) and peak 4-agomelatine (from 1.14 to 1.16 min) led to their coelution (data not shown). On

the other hand, on HSS C18 the shift of retention time of peak 2-dimer (from 1.69 to 1.54 min) caused the separation of this peak and peak 4-agomelatine, which co-eluted when using 20 mM ammonium formate (data not shown). Smaller shifts occurred also on BEH 2-EP stationary phase. There were no changes in the elution order. However, the addition of water to 20 mM ammonium formate in CO₂/methanol led to higher resolution between peaks 2-dimer and 3-amid, to narrow and symmetric peaks and to baseline resolution. Therefore, these conditions were chosen for further validation of UHPSFC method (Fig. 3C).

3.2. The development of UHPLC method

The first screening under UHPLC conditions was accomplished using BEH phase bonded with C18 ligand (BEH C18), BEH Shield RP C18 column with carbamate group inserted in the bonded phase ligand and BEH phase modified by phenyl group (BEH Phenyl). Acetonitrile or methanol in combination with 10 mM formate buffer pH 3.0 or 10 mM acetate buffer pH 9.0 were used as mobile phases. These three variables were combined to provide 12 different chromatographic conditions in a systematic screening approach. All of these separations were performed under generic gradient elution (from 5% of organic modifier to 95% within 5 min) and separation conditions described in Section 2.3.

Under all these conditions a coelution of at least one pair of analytes and/or close elution of API and one of the impurities was observed. Slightly better efficiency (based on *w*₅₀ evaluation) was obtained in separations with acetonitrile compared to methanol. All the tested columns provided better selectivity with acetonitrile and buffer pH 9.0 (Fig. 4). However, none of these stationary phases showed an optimal selectivity and resolution which required further optimization. In comparison with UHPSFC method, substantially more experiments and fine method tuning were necessary. Several more stationary phases were tested (CSH PHE and CSH C18) in order to obtain completely different selectivity as well

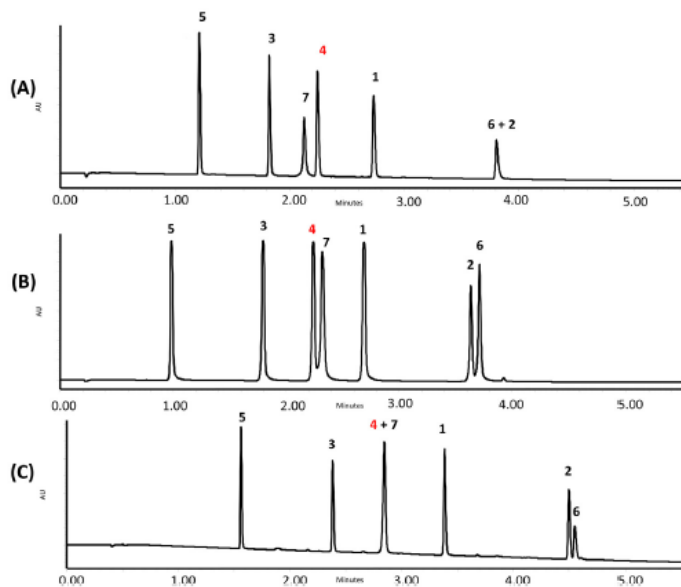


Fig. 4. The UHPLC chromatograms of agomelatine and its impurities on three tested stationary phases: (A) Acquity UPLC BEH C18, 50 mm, (B) Acquity UPLC BEH Shield RP18, 50 mm and (C) Acquity UPLC CSH C18, 100 mm using gradient elution with acetonitrile and ammonium acetate buffer pH 9.0, 5–95% within 5 min. Temperature 30 °C, flow-rate 0.6 ml/min. Peak numbers correspond to Fig. 2.

Table 1

The results of SST (retention time, area, resolution, symmetry factor, w_{50} , peak capacity) for optimized conditions on UHPSPC (first line) and UHPLC (second line) for concentration 25 $\mu\text{g/ml}$ and 2.5 $\mu\text{g/ml}$, respectively.

	UHPSPC (25 $\mu\text{g/ml}$) vs. UHPLC (2.5 $\mu\text{g/ml}$)		Retention time		Area		Resolution	Symmetry factor	w_{50}	Peak capacity
			average	% RSD	average	% RSD	average	average	average	average
Nitrile	0.488	0.10	232466	0.64	–	–	1.23	0.010	177.5	
	2.591	0.03	175974	0.77	6.12	1.24	0.023	128.9		
Dimer	1.158	0.09	145218	0.96	25.25	1.25	0.018	99.0		
	4.360	0.01	150871	0.98	16.53	1.06	0.015	192.0		
Amide	1.269	0.09	174644	1.00	3.66	1.14	0.014	127.1		
	1.900	0.05	160884	0.90	27.35	1.38	0.021	141.1		
Agomelatine	1.437	0.05	152197	0.97	6.34	0.82	0.016	111.3		
	2.351	0.02	175307	0.81	12.33	1.33	0.024	123.5		
Acid	1.655	0.03	226982	0.97	8.05	1.10	0.015	118.6		
	0.938	0.04	191213	0.77	–	–	0.022	134.7		
Amine	1.890	0.03	98624	1.00	14.87	1.07	0.020	89.2		
	5.064	0.07	150427	1.00	8.68	1.18	0.062	48.4		
AgoSalt	2.166	0.03	155571	0.68	9.32	1.17	0.015	118.6		
	3.209	0.11	130352	0.99	10.81	1.34	0.051	58.7		

Table 2

The results of method linearity (correlation coefficient, LLOQ, LOD, ULOQ) for optimized UHPSPC and UHPLC methods.

	UHPSPC (225 nm)				UHPLC (225 nm)			
	R^2	LLOQ [$\mu\text{g/ml}$]	LOD [$\mu\text{g/ml}$]	ULOQ [$\mu\text{g/ml}$]	R^2	LLOQ [$\mu\text{g/ml}$]	LOD [$\mu\text{g/ml}$]	ULOQ [$\mu\text{g/ml}$]
Nitrile	0.9992	0.25	0.08	70	0.9998	0.10	0.03	10
Dimer	0.9993	0.25	0.08	70	0.9995	0.10	0.03	25
Amide	0.9993	0.25	0.08	70	0.9997	0.10	0.03	10
Agomelatine	0.9993	0.25	0.08	70	0.9994	0.10	0.03	10
Acid	0.9993	0.25	0.08	70	0.9998	0.10	0.03	10
Amine	0.9993	0.25	0.08	70	0.9993	0.10	0.03	25
AgoSalt	0.9993	0.25	0.08	70	0.9990	0.10	0.03	25

Table 3

The results of method accuracy and precision in UHPSPC and UHPLC methods for API and impurities at three concentration levels.

UHPSPC									
Concentration level		Nitrile	Dimer	Amide	Agomelatine	Acid	Amine	AgoSalt	API
C1	[%]	99.8	98.2	98.5	98.7	98.0	98.5	101.5	100.7
	RSD-intra	1.0	0.8	0.9	1.7	1.6	1.6	1.5	0.8
	RSD-inter	7.1	6.6	6.8	4.9	8.3	4.4	6.0	2.2
C2	[%]	99.8	98.1	97.4	101.3	100.0	99.2	99.9	100.8
	RSD-intra	0.4	0.9	1.1	0.2	0.7	0.2	1.7	0.2
	RSD-inter	3.9	6.7	7.3	5.0	5.5	7.4	4.1	1.9
C3	[%]	99.3	101.0	99.3	102.7	97.5	98.1	102.6	100.2
	RSD-intra	1.0	1.6	1.5	0.3	2.4	1.4	2.3	0.8
	RSD-inter	3.7	3.7	5.0	1.0	4.3	5.7	5.8	1.1
UHPLC									
C4	[%]	102.7	99.5	100.9	100.9	97.1	97.3	98.4	98.3
	RSD-intra	1.9	2.3	0.4	2.0	1.2	0.7	1.0	1.5
	RSD-inter	8.0	8.2	7.9	6.3	5.3	7.0	5.7	2.8
C5	[%]	100.9	96.8	97.0	97.5	100.2	97.0	96.6	98.0
	RSD-intra	1.6	1.2	0.7	1.3	1.1	0.6	0.6	1.4
	RSD-inter	7.8	6.5	7.8	7.0	7.9	4.5	7.0	2.9
C6	[%]	100.4	98.5	95.7	102.6	97.7	97.3	98.6	96.5
	RSD-intra	0.7	1.2	0.8	1.0	2.6	0.1	0.7	1.3
	RSD-inter	3.5	4.3	8.3	4.4	3.8	6.7	8.5	2.5

Concentration levels for UHPSPC: C1 = 2 $\mu\text{g/ml}$, C2 = 2.5 $\mu\text{g/ml}$, C3 = 3 $\mu\text{g/ml}$ for impurities: C1 = 40 $\mu\text{g/ml}$, C2 = 50 $\mu\text{g/ml}$, C3 = 60 $\mu\text{g/ml}$ for API.
Concentration levels for UHPLC: C4 = 0.2 $\mu\text{g/ml}$, C5 = 0.25 $\mu\text{g/ml}$, C6 = 0.3 $\mu\text{g/ml}$ for impurities: C4 = 4 $\mu\text{g/ml}$, C5 = 5 $\mu\text{g/ml}$, C6 = 6 $\mu\text{g/ml}$ for API.

as other pH values, such as 2.0 and 9.5. Due to extensive amount of results and mostly negative findings, these data are not shown. The main problem of these experiments was close elution of agomelatine (API) and one of the impurities eluted right after API (acid or AgoSalt). This occurred under all tested conditions with the best resolution achieved when using buffer pH 9.5.

In the light of all these experiments, BEH C18 and BEH Shield RP18 seemed to be the most promising among all tested stationary phases. However, a co-elution of the critical pair of impurities (2-dimer and 6-amine) persisted under all tested conditions on BEH C18 despite a large number of optimization experiments. There-

fore, further optimization was performed on stationary phase BEH Shield RP18. An increase in buffer pH from 9 (Fig. 5A) to 9.5 led to a later elution of peaks 7-AgoSalt and 6-amine (Fig. 5B) and thus its separation from API. However, the resolution of peak 1-nitrile and peak 7-AgoSalt was still insufficient. Using a mixture of acetonitrile and methanol in the ratio 1:1 as an organic modifier of the mobile phase then caused an earlier elution of peak 1-nitrile (data not shown). Nevertheless, the sufficient selectivity and resolution were achieved only by relatively complex optimization. The fine parameters such as gradient slope, gradient curve and time of analysis were modified (Fig. 5C). Thus, the final conditions were chosen

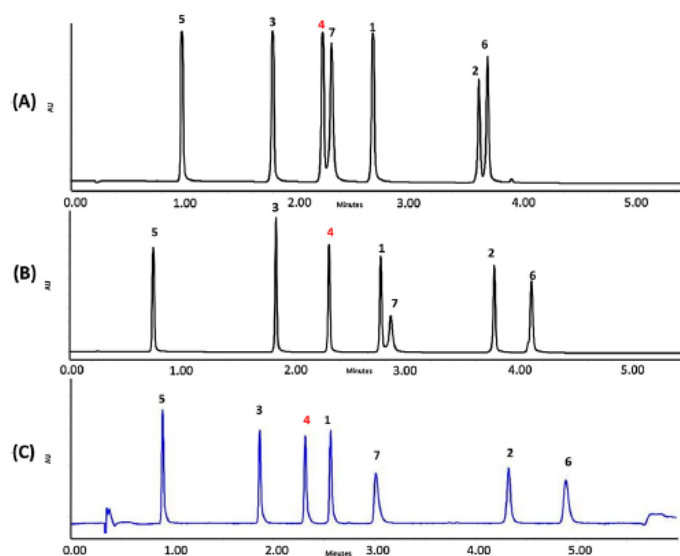


Fig. 5. The optimization of the UHPLC chromatographic conditions on Acquity UPC² BEH Shield RP18, 50 mm. (A) The generic gradient at flow-rate 0.6 ml/min using ACN as modifier and buffer pH 9.0, time of analysis 5 min. (B) The generic gradient with ACN and buffer pH 9.5, flow rate 0.6 ml/min, analysis time 5 min (C) Mixture of ACN and methanol in the ratio 1:1 as organic modifier, buffer pH 9.5, 5–70% in 5 min, gradient curve 4, flow-rate 0.4 ml/min. The temperature was 30 °C and peak numbers correspond to Fig. 2.

as follows: gradient started at 5% and increased up-to 70% within 5 min under gradient curve number 4 (other parameters were set up as described in Section 2). These guaranteed baseline separation as well as narrow and symmetric peaks for all compounds.

3.3. Quantitative analysis and validation of methods

Quantitative analysis of agomelatine and its six potential impurities was accomplished at optimized conditions described in Section 3.1 and 3.2. The applicability of these chromatographic conditions was confirmed by System suitability test. Table 1 shows the results for the repeatability of retention times and peak areas, resolution, peak symmetry and peak capacity. RSD < 1.0% for both retention times and peak areas confirmed very good repeatability of both developed methods. The values of peak symmetry close to 1.0 as well as the resolution > 1.5 demonstrated good peak shapes and resolution. Both methods provided approximately the same results of peak capacity.

The developed methods demonstrated very good linearity with correlation coefficient values > 0.9992 in the range of 0.25–70 µg/ml for UHPSFC method and with correlation coefficient values > 0.9990 in the range of 0.1–10 µg/ml for UHPLC method (for impurities dimer, amine and AgoSalt the linear range was larger corresponding to 0.1–25 µg/ml) (Table 2). Higher concentration levels were tested also on UHPLC, but the measured absorbance for these concentrations was beyond the linear range.

The lowest point of calibration curves was determined as the limit of quantification providing the signal/noise ratio corresponding to 10 and appropriate results for accuracy and precision. Accuracy and precision (intra- and inter-day) were evaluated at three concentrations levels for agomelatine as API and for impurities. The concentrations of UHPSFC samples were 40, 50 and 60 µg/ml for agomelatine and 2, 2.5 and 3 µg/ml for its impurities. The samples analyzed by UHPLC system were diluted ten times more.

Table 4

The results of the measurement of tablet samples, which proved the uniformity of content of single-dose preparations.

	UHPSFC		UHPLC	
	Tablet's powder	Tablet	Tablet's powder	Tablet
1	101.0	98.9	98.1	98.4
2	100.8	97.5	97.9	96.5
3	100.3	100.3	97.3	99.3
4	99.8	98.4	96.3	98.0
5	98.9	97.6	96.2	97.4
6	100.1	97.5	96.3	97.6
7	99.3	98.8	96.0	97.0
8	100.2	100.2	95.5	97.9
9	98.5	100.1	95.5	97.6
10	100.1	98.6	95.4	97.1
% Recovery	99.9	98.8	96.4	97.7
RSD [%]	0.8	1.1	1.0	0.8

In UHPSFC system the results of accuracy were between 100.2% and 101.7% for agomelatine and 97.4%–102.7% for impurities, respectively. Method intra-day precision expressed as RSD was < 0.8 for agomelatine and < 2.4 for impurities. In UHPLC, results of method accuracy were between 95.2% and 98.0% for agomelatine and 95.7%–104.0% for impurities, respectively. RSD values for intra-day precision were < 1.5 for agomelatine and < 2.6 for impurities. The results for inter-day precision provided RSD better than 8.5% (Table 3).

3.4. Application of developed methods and evaluation of tablet samples

Subsequently the measurement of tablet samples was performed. Ten samples from both individual tablets and tablet's powder were prepared by dissolving in methanol using an ultrasonic bath. Subsequently, the samples for UHPSFC and UHPLC were diluted by tetrahydrofuran or methanol, respectively. As shown in

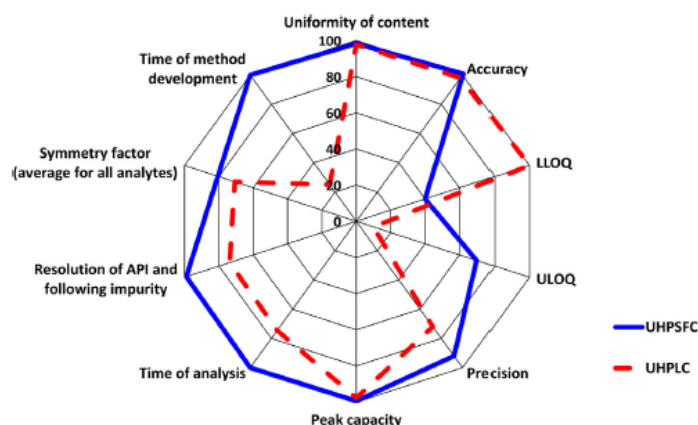


Fig. 6. The comparison of developed UHPSFC and UHPLC methods for the determination of agomelatine and its six impurities.

Table 4, the average recovery of tablet samples was 98.8% and for powder samples 99.9% in UHPSFC, while it was 97.7% and 96.5% in UHPLC, respectively, with RSD values <1.1 in all cases. This proved the uniformity of the content of the single-dose preparations as described in European Pharmacopoeia, which states that every unit of medicinal product must contain an API in the concentration range 85–115% of the average content [27].

3.5. Comparison of UHPSFC and UHPLC methods

Quantitative performance of both UHPLC and UHPSFC methods demonstrated very good results in terms of repeatability, linearity, accuracy and precision. A comparison of these two chromatographic techniques in the multiple selected parameters is shown in Fig. 6. Both methods fulfill the requirement of method validation, even though UHPSFC provided slightly better results for method precision (RSD 0.2 contrary to 1.4%) and resolution between peaks of API and following impurity (8.21–5.54). Also total analysis time was slightly shorter (4.1 min–5.5 min). Unlike in UHPLC, where the peaks of amide and Ago Salt were quite wide, all of UHPSFC peaks were symmetric and very narrow. However, the average peak capacity of both methods was practically the same. The advantage of UHPLC method was higher sensitivity (LLOQ 0.1 µg/ml compared to 0.25 µg/ml in UHPSFC). However, a great amount of experiments and long time needed for optimization of UHPLC method was needed for this particular QC method. Moreover, using of gradient curve 4 makes UHPLC method hard to transfer on another instrument.

4. Conclusion

Two chromatographic methods for determination of agomelatine and its impurities in tablets were developed using UHPLC and UHPSFC. The selectivity of different additives added to CO₂/methanol based mobile phases in UHPSFC was compared. In this particular method ammonium formate provided better results compared to ammonium acetate. Moreover, a positive effect of the addition of a small amount of water in the mobile phase on the peak shape, resolution and selectivity was observed.

The development of UHPLC method was much more challenging due to complicated fine tuning phase—either the separation of API and following impurity or the separation of two impurities was a persisting problem. An important factor for successful separation was a use of basic pH and combined acetonitrile/methanol (1:1)

modifier, which is less typical in LC method development and which further confirms the complexity of the problem.

Both methods were optimized to achieve the best possible selectivity and properly validated. UHPLC as well as UHPSFC method achieved good results in all requested parameters, which allows for their widespread use in QC in pharmacy. In conclusion, the UHPSFC method was designated as a slightly more appropriate one for the determination of agomelatine and its impurities in tablets due to the advantages of speed, ecological mobile phase and more straightforward method development.

Acknowledgement

The authors gratefully acknowledge the grant project SVV 260292/2016.

References

- [1] R.A. Sansone, L.A. Sansone, Agomelatine: a novel antidepressant, *Innov. Clin. Neurosci.* 8 (2011) 10–14.
- [2] S.H. Kennedy, B.S. Eisfeld, Agomelatine and its therapeutic potential in the depressed patient, *Neuropsychiatr. Dis. Treat.* 3 (2007) 423–428.
- [3] D. Eßer, T.C. Baghai, H.-J. Möller, Agomelatine: the evidence for its place in the treatment of depression, *Core Evid.* 4 (2009) 171–179.
- [4] D. de Berardis, S. Marini, M. Fornaro, V. Srinivasan, P. Iasevoli, C. Tomassetti, A. Valchera, C. Perma, M.-A. Quera-Salva, G. Martinotti, M. di Giannantonio, The melatonergic system in mood and anxiety disorders and the role of agomelatine: implications for clinical practice, *Int. J. Mol. Sci.* 4 (2013) 12458–12483.
- [5] D. Taylor, A. Sparshatt, S. Varma, O. Olofinjana, Antidepressant efficacy of agomelatine: meta-analysis of published and unpublished studies, *BMC* 348 (2014) g1888.
- [6] Y. Liu, L. Chen, Y. Ji, Quantification and structural elucidation of potential impurities in agomelatine active pharmaceutical ingredient, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 81–82 (2013) 193–201.
- [7] K.V.S. Indumathi, N.S. Rao, B.M. Rao, Forced degradation, identification and characterization of impurities of agomelatine using chromatographic and spectroscopic techniques, *Res. J. Pharm. Biol. Chem. Sci.* 6 (2015) 1112–1126.
- [8] R.N. El-Shaheny, Evaluation of agomelatine stability under different stress conditions using an HPLC method with fluorescence detection: application to the analysis of tablets and human plasma, *Luminescence* 29 (2014) 920–928.
- [9] B. Hanika, V. Srikalyani, B.N. Nalluri, M. Vijaya Lakshmi, Development and validation of RP-HPLC method for the estimation of agomelatine in bulk drug and pharmaceutical dosage forms, *J. Chem. Pharm. Res.* 5 (2013) 1162–1167.
- [10] M.A. Saracino, L. Mercolini, C. Carhini, V. Volterra, A.L. Quarta, M. Amore, M.A. Raggi, Multi-matrix assay of the first melatonergic antidepressant agomelatine by combined liquid chromatography–fluorimetric detection and microextraction by packed sorbent, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 95 (2014) 61–67.
- [11] C. Simonin, L. Bru, E. Lelièvre, J.-P. Jeannot, N. Borroet, B. Walther, C. Boursier-Neyret, Determination of melatonin in biological fluids in the presence of the melatonin agonist S 20098: comparison of immunological techniques and GC–MS methods, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 21 (1999) 591–601.

- [12] S.R. Pati, K.K. Nerurkar, A.M. Kalamkar, V. Pulkale, K.V. Mangaonkar, S.G. Pingale, Validated LC-MS/MS method for quantification of agomelatine in human plasma and its application in a pharmacokinetic study, *J. Mass Spectrom.* 47 (2012) 23–28.
- [13] X. Wang, D. Zhang, M. Liu, H. Zhao, A. Du, L. Meng, H. Liu, LC-MS/MS method for the determination of agomelatine in human plasma and its application to a pharmacokinetic study, *Biomed. Chromatogr.* 28 (2014) 218–222.
- [14] V. Desfontaine, D. Guillaume, E. Francoise, L. Novakova, Supercritical fluid chromatography in pharmaceutical analysis, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 113 (2015) 56–71.
- [15] E. Lermasson, S. Bertin, P. Hening, H. Boiteux, E. Lesellier, C. West, Development of an achiral supercritical fluid chromatography method with ultraviolet absorbance and mass spectrometric detection for impurity profiling of drug candidates. Part I: optimization of mobile phase composition, *J. Chromatogr. A* 1408 (2015) 217–226.
- [16] E. Lermasson, S. Bertin, P. Hening, H. Boiteux, E. Lesellier, C. West, Development of an achiral supercritical fluid chromatography method with ultraviolet absorbance and mass spectrometric detection for impurity profiling of drug candidates. Part II: selection of an orthogonal set of stationary phases, *J. Chromatogr. A* 1408 (2015) 227–235.
- [17] E. Lesellier, Retention mechanisms in super/subcritical fluid chromatography on packed columns, *J. Chromatogr. A* 1216 (2009) 1881–1890.
- [18] E. Lesellier, Overview of the retention in subcritical fluid chromatography with varied polarity stationary phases, *J. Sep. Sci.* 31 (2008) 1238–1251.
- [19] E. Lesellier, C. West, The many faces of packed column supercritical fluid chromatography—a critical review, *J. Chromatogr. A* 1382 (2015) 2–46.
- [20] L. Novakova, A. Grand-Guillaume Perrenoud, I. Francois, C. West, E. Lesellier, D. Guillaume, Modern analytical supercritical fluid chromatography using columns packed with sub-2- μm particles: a tutorial, *Anal. Chim. Acta* 824 (2014) 18–35.
- [21] S. Khater, C. West, E. Lesellier, Characterization of five chemistries and three particle sizes of stationary phases used in supercritical fluid chromatography, *J. Chromatogr. A* 1319 (2013) 148–159.
- [22] A. Grand-Guillaume Perrenoud, J.-L. Veuthey, D. Guillaume, Comparison of ultra-high performance supercritical fluid chromatography and ultra-high performance liquid chromatography for the analysis of pharmaceutical compounds, *J. Chromatogr. A* 1266 (2012) 158–167.
- [23] C. Gourmel, A. Grand-Guillaume Perrenoud, L. Waller, E. Reginat, J. Verne, B. Duley, J.-L. Veuthey, S. Rudaz, J. Schappler, D. Guillaume, Evaluation and comparison of various separation techniques for the analysis of closely-related compounds of pharmaceutical interest, *J. Chromatogr. A* 1282 (2013) 172–177.
- [24] ICH Expert Working Group, Validation of analytical procedures: Text and methodology, ICH Harmonised Tripartite Guideline, 2005.
- [25] HHS, FDA, CDER, CBER, Guidance for Industry Q3B(R2) Impurities in New Drug Products, ICH, 2016, pp. 1–7.
- [26] C. West, E. Lesellier, A unified classification of stationary phases for packed column supercritical fluid chromatography, *J. Chromatogr. A* 1191 (2008) 21–39.
- [27] Council of Europe, European Pharmacopoeia, Council of Europe, Strasbourg, 2001, 234.