

UNIVERZITA KARLOVA
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

Katedra analytickej chémie

**Testovanie separačného potenciálu stacionárnych
fáz na báze porézneho grafitového uhlíku**

Vedúci diplomovej práce: doc. PharmDr. Lucie Nováková, Ph.D.

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

ABSTRAKT

Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra Analytickej chémie

Kandidát: Ondrej Guláš

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

Názov diplomovej práce: Testovanie separačného potenciálu stacionárnych fáz na báze porézneho grafitového uhlíku.

Stacionárne fázy na báze porézneho grafitového uhlíku (PGC) sa vyznačujú mnohými zaujímavými vlastnosťami. Napríklad ide o vysokú mechanickú odolnosť, stabilitu v celom rozmedzí pH a výbornú odolnosť proti vysokým teplotám. Zároveň sa vyznačujú unikátnym mechanizmom retencie. Avšak napriek týmto pozitívam a dlhej existencii na trhu sa nedostali do širšieho používania vo farmaceutickej analýze.

V našej práci bolo analyzovaných 11 skupín liečiv zahŕňajúcich účinnú látku a jej potenciálne nečistoty. Celkovo bolo teda analýze podrobených 67 látok. Jednotlivé separácie na PGC boli optimalizované s cieľom dosiahnuť čo najlepšie výsledky. Zmeny podmienok separácii zahrňovali otestovanie niekoľkých mobilných fáz, gradientovú aj isokratickú elúciu a otestovanie vplyvu vyššej teploty. Ako najuniverzálnejšie podmienky sa uplatnilo využitie gradientovej elúcie s mobilnou fázou, ktorej organickú časť tvoril acetonitril a isopropanol v pomere 1:1 a vodnú časť 0,1% kyseliny trifluóroctová. Zároveň boli dané látky analyzované na referenčnej kolóne BEH C18 a výsledky boli porovnané s výsledkami získanými z analýz na PGC. Referenčná kolóna dosahovala dobré výsledky aj bez potreby zložitejších optimalizácií. Väčšinou boli eluované všetky látky a vykazovala dobrú selektivitu a rozlíšenie. Naproti tomu analýza na PGC si vyžadovala komplexnejší prístup a zložitejší proces optimalizácie. Napriek tomu jej využiteľnosť vo farmácii je možná a môže byť riešením pre zložité separácie vysoko polárnych látok.

Kľúčové slová: porézny grafitový uhlík; nečistoty; optimalizácia; porovnanie

ABSTRACT

Charles University, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Analytical Chemistry

Candidate: Ondrej Guláš

Supervisor: Assoc. Prof. PharmDr. Lucie Nováková, Ph.D.

Title of Diploma Thesis: Evaluation of separation potential of stationary phases based on porous graphitic carbon.

Stationary phases based on porous graphitic carbon (PGC) exhibit many interesting features. For example high mechanical resistance, stability across the entire pH range and excellent high temperature resistance. Moreover, they are significant due to their unique mechanism of retention. Despite all of these positive features and long existence on the market, their broader use in pharmaceutical analysis is still lacking.

In our paper we have analyzed 11 groups of drugs, including active pharmaceutical ingredient and its potential impurities. Overall, 67 substances have been analyzed. Each separation on PGC has been optimized in order to achieve the best results. Changes in conditions of separation included testing of several mobile phases, gradient and isocratic elution and testing the effect of higher temperature. The use of gradient elution, with mobile phase consisting of acetonitrile and isopropanol in proportion 1:1 as organic modifier and 0,1% trifluoroacetic acid as aqueous part has appeared as the most versatile conditions. Furthermore, the same substances were analyzed on a reference column BEH C18 and results have been compared with results obtained by analysis on PGC. Reference column achieved good results without necessity of complicated optimizations. Most substances have been eluted and column has proven good selectivity and resolution. In contrast, more complex approach and complicated process of optimization were necessary for the PGC analysis. Nevertheless, its use in pharmacy is possible and can represent a solution for difficult separation of highly polar substances.

Keywords: porous graphitic carbon; impurities; optimization; comparison

„Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpal, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány. Práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.“

V Hradci Králové dňa 4.9. 2017

.....

Ondrej Guláš

V prvom rade ďakujem doc. PharmDr. Lucii Novákovej, Ph.D. za jej odborné a obetavé vedenie, venovaný čas, trpezlivosť a cenné rady poskytnuté pri spracovaní mojej diplomovej práce. Ďalej ďakujem pracovníkom Katedry analytickej chémie za pomoc a zhovievavosť, mojej rodine a všetkým ľuďom, ktorí mi boli počas štúdia a vypracovávania diplomovej práce oporou.

Obsah

Zoznam použitých skratiek	8
1. Úvod.....	9
2. Cieľ a zadanie práce.....	10
3. Teoretická časť.....	11
3.1. Chromatografia.....	11
3.1.1. Kvapalinová chromatografia	11
3.1.2. Vysokoučinná a ultra-vysokoučinná kvapalinová chromatografia	12
3.1.3. Stacionárne fázy pre UHPLC.....	13
3.1.3.1. Hybridné stacionárne fázy.....	14
3.1.3.2. Stacionárne fázy na báze porézneho grafitového uhlíku	15
3.2. Prehľad publikovaných aplikácií využívajúcich PGC	17
3.3. Skupiny testovaných látok a ich vlastnosti	20
3.3.1. Agomelatin a jeho nečistoty	20
3.3.2. Betablokátory.....	22
3.3.3. Enzalutamid a jeho nečistoty	24
3.3.4. Atomoxetín a jeho nečistoty	25
3.3.5. Atorvastatin a jeho nečistoty	27
3.3.6. Ezetimib a jeho nečistoty	28
3.3.7. Tikagrelor a jeho nečistoty	30
3.3.8. Vardenafil a jeho nečistoty	32
3.3.9. Dasatinib a jeho nečistoty.....	33
3.3.10. Estrogény.....	34
3.3.11. Abiraterón a jeho nečistoty.....	36
4. Experimentálna časť	38
4.1. Štandardné látky.....	38
4.2. Rozpúšťadlá.....	42
4.3. Ďalšie chemikálie	42
4.4. Prístrojové vybavenie	43
4.5. Pracovný postup	43
4.5.1. Príprava štandardov	43
4.5.2. Príprava zmesí štandardov analyzovaných látok	44

4.5.3.	Príprava mobilných fáz, aditív a pufrov	44
4.5.4.	Postup a podmienky separácii	45
5.	Výsledky a diskusia	47
5.1.	Analýza na referenčnej stacionárnej fáze BEH C18	47
5.2.	Analýza na kolóne so stacionárnou fázou na báze PGC	59
5.2.1.	Analýza agomelatinu a jeho nečistôt na PGC.....	59
5.2.2.	Analýza betablokátorov na PGC.....	61
5.2.3.	Analýza enzalutamidu a jeho nečistôt na PGC.....	65
5.2.4.	Analýza atomoxetínu a jeho nečistôt na PGC	68
5.2.5.	Analýza atorvastatínu a jeho nečistôt na PGC	71
5.2.6.	Analýza ezetimibu a jeho nečistôt na PGC.....	72
5.2.7.	Analýza tikagreloru a jeho nečistôt na PGC	73
5.2.8.	Analýza vardenafilu a jeho nečistôt na PGC.....	73
5.2.9.	Analýza dasatinibu a jeho nečistôt na PGC.....	74
5.2.10.	Analýza estrogénov a jeho nečistôt na PGC.....	74
5.2.11.	Analýza abiraterónu a jeho nečistôt na PGC.....	75
6.	Záver	76

Zoznam použitých skratiek

ACN	acetonitril
BEH	hybridná stacionárna fáza s ethylenovými mostíkmi
BEH C18	hybridná stacionárna fáza s ethylenovými mostíkmi modifikovaná osemnásťuhlíkovým reťazcom
FAC	kyselina mravčia
FD	fluorescenčný detektor
H	výškový ekvivalent teoretickej priehradky
HPLC	vysokoúčinná kvapalinová chromatografia
HYP	hypercarb – obchodná značka kolóny na báze porózneho grafitového uhlíka od firmy Thermo Scientific
IMP	nečistota
LC	kvapalinová chromatografia
MeOH	methanol
MS	hmotnostný spektrometer
PDA	detektor diódového poľa
PGC	porézny grafitový uhlík
PSA	sodná soľ kyseliny pentansulfonovej
PREG	polárna retencia na grafitu
RP	reverzná fáza
RP-HPLC	vysokoúčinná kvapalinová chromatografia na reverzných fázach
TCA	trichlóroctová kyselina
TFA	trifluoroctová kyselina
THF	tetrahydrofuran
UHPLC	ultra-vysokoúčinná kvapalinová chromatografia
UPLC	ultra-performance liquid chromatography (značka firmy Waters)
UV	ultrafialová oblasť svetla

1. Úvod

Už v sedemdesiatych rokoch minulého storočia si vedci uvedomovali nevýhody spojené so stacionárnymi fázami na báze silikagelu. Čiastočne išlo o obtiažnu elimináciu alebo zaštieňenie reziduálnych silanolových skupín ale taktiež o krehkosť a nestabilitu naviazaných ligandov. Kvôli spomínaným a ďalším nevýhodám sa pozornosť upriamila na uhlík. Po prekonaní prvotných problémov so syntetizovaním fázy na báze uhlíka a optimalizácii mechanickej stability a chromatografickej účinnosti boli na trh uvedené nové stacionárne fázy na báze porézneho grafitového uhlíka (PGC). Napriek tomu, že spomínané fázy boli vynájdené pred viac ako tridsiatimi rokmi a komerčne dostupné pred viac než dvadsiatimi rokmi, nedočkali sa širšieho využitia vo farmácii a zaoberá sa nimi iba pomerne malé množstvo prác.

Aplikácia vo farmaceutickej analýze vyžaduje dostatočnú retenciu cieľového analytu, kvôli limitácii potencionálnych interferencií s príbuznými látkami a nečistotami. V tomto prípade konvenčné RP-HPLC stacionárne fázy nezabezpečujú dostatočnú retenciu polárnych látok a teda PGC je zaujímavou alternatívou. Taktiež mnohé ďalšie vlastnosti ako napríklad stabilita v celom rozmedzí pH, stabilita pri vysokých teplotách, stereoselektivita povrchu a iné vlastnosti by mohli byť riešením na analýzy, pri ktorých silikagelové stacionárne fázy poskytujú nevyhovujúce výsledky alebo ich neumožňujú. Preto sme sa v tejto práci rozhodli vyskúšať potenciál využitia kolón na báze porézneho grafitového uhlíka vo farmácii.

2. Cieľ a zadanie práce

Hlavným cieľom tejto diplomovej práce bolo otestovanie separačného potenciálu stacionárnych fáz na báze porézneho grafitového uhlíka a ich eventuálne využitie vo farmácii. Taktiež optimalizácia podmienok analýzy pri používaní PGC s cieľom dosiahnuť vhodnejšie výsledky. Vzhľadom na možné odlišnosti bolo jedným z cieľov porovnanie so separáciou za použitia referenčnej kolóny na báze silikagelu s reverznou fázou C18, ktorá bola zvolená z dôvodu, že sa jedná o univerzálnu fázu prvej voľby v RP-HPLC.

V rámci porovnania a overenia využitia PGC v analýze liečiv, bolo podrobených analýze jedenásť skupín liečiv a ich potencionálnych nečistôt s chemickou štruktúrou odvodenou od daného liečiva. Výber analytov zahrňoval látky s veľmi rozdielnymi fyzikálne-chemickými vlastnosťami a taktiež látky s veľmi blízkou štruktúrou a podobnými vlastnosťami. Testovanie potenciálu a optimalizácia jednotlivých analýz spočívala v rozličných obmenách separačných podmienok. V rámci toho bolo vyskúšaných viacero mobilných fáz, gradientová aj isokratická elúcia a taktiež zmeny teploty.

3. Teoretická časť

3.1. Chromatografia

3.1.1. Kvapalinová chromatografia

Kvapalinová chromatografia patrí do skupiny separačných metód a je založená na rozdeľovaní látok v zmesi medzi dve rôzne nemiešateľné fázy, teda medzi mobilnú a stacionárnu fázu. Ako už vyplýva z názvu, mobilnou fázou je pri tejto metóde kvapalina, stacionárnou fázou potom môže byť pevná látka alebo kvapalina upevnená na pevnom nosiči. V kvapalinovej chromatografii je však vždy stacionárna fáza umiestnená v chromatografickej kolóne vo forme sorbentu [1].

Látky zmesi sú následne separované na základe svojich rozdielnych distribučných koeficientov, pretože medzi oboma zmienenými fázami existuje fázové rozhranie. Po nástreku je vzorka unášaná prúdom mobilnej fázy na kolónu, kde dochádza k opakovanému ustáľovaniu rovnováhy medzi stacionárnou a mobilnou fázou [1].

Separácia jednotlivých zložiek je tým pádom ovplyvnená vlastnosťami oboch zmienených fáz. Podľa vzájomnej polarít jednotlivých fáz sa rozlišuje chromatografia na normálnych a reverzných fázach. O normálnu fázu sa jedná, keď sa v sorbente chromatografickej kolóny nachádzajú polárnejšie skupiny (napr. silikagel, CN, NH₂) a mobilná fáza má nepolárny charakter (napr. alifatické a aromatické uhľovodíky). Naopak v systéme reverzných fáz sú používané polárne roztoky zložené z organického modifikátoru (napr. metanol, acetonitril, tetrahydrofuran) a vodnej zložky. Charakter rozpúšťadla ovplyvňuje mieru retencie a selektivitu separácie, kedy látky s vyššou polaritou sú eluované skôr, pretože vykazujú vyššiu afinitu k tejto polárnej mobilnej fáze než k stacionárnej fáze s nepolárnymi skupinami (napr. C8, C18, fenyl) [1].

Elúcia môže prebehnúť za konštantného zloženia mobilnej fázy, tzv. izokratická elúcia, alebo s využitím mobilnej fázy, ktorej elučná sila je podľa zvoleného programu postupne zvyšovaná, čiže tzv. gradientovej elúcie. Prvá zmienená sa uplatňuje v prípade, že zložky zmesi majú podobné fyzikálne-chemické vlastnosti. Naopak, gradientová elúcia sa uplatňuje keď látky majú výrazne odlišné fyzikálne-chemické vlastnosti a isokratická elúcia by pri nich bola veľmi náročná na čas [1].

Chromatografický záznam je charakterizovaný prostredníctvom elučných kriviek gaussovského tvaru, ktoré sú nazývané píky. Retenčný čas je označovaný ako doba od nástreku vzorku do dosiahnutia maxima elučnej krivky (vrcholu píku) a kvalitatívne charakterizuje danú látku. Pre kvantitatívne hodnotenie je potom využívaná plocha pod píkom zvolenej látky. Ideálna chromatografická separácia sa vyznačuje dokonale oddelenými píkmami s ostro ohraničenými zónami [1].

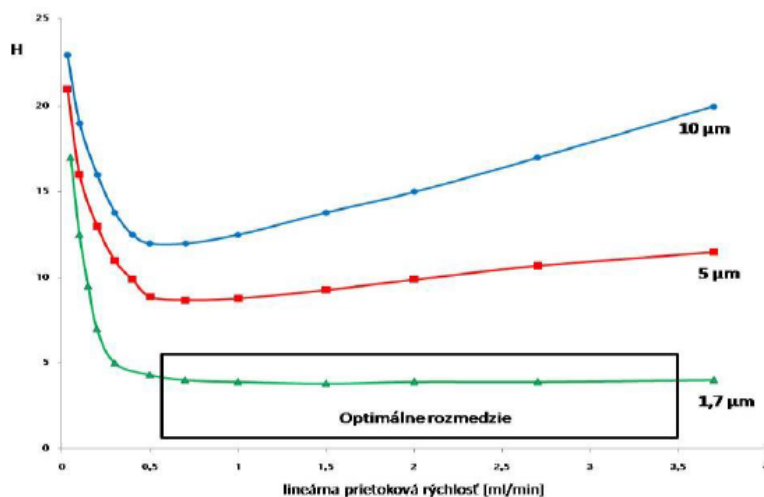
3.1.2. Vysokoúčinná a ultra-vysokoúčinná kvapalinová chromatografia

Vysokoúčinná kvapalinová chromatografia (HPLC) sa v priebehu svojho vývoja rýchlo stala efektívnou separačnou metódou. Tento inovatívny, rýchly a vysoko selektívny analytický nástroj má široké uplatnenie v biologických, chemických, farmaceutických, potravinárskych, environmentálnych a ďalších oblastiach analýzy [2].

Hlavným cieľom HPLC metódy je dosiahnutie čo najlepšieho rozdelenia látok v čo najkratšom čase. Z tohto hľadiska je veľkým pokrokom zavádzanie ultra-vysokoúčinnnej kvapalinovej chromatografie (UHPLC), ktorá je relatívne dobre zavedenou technológiou poskytujúcou nové možnosti v kvapalinovej chromatografii [1] [3]. Termín UHPLC (vtedy ultra-highpressure liquid chromatography) bol prvý krát spomenutý Jorgensonom v roku 1997, keď použil kolóny s časticami o veľkosti 1,0 - 1,5 μm kompatibilné s tlakom až 4100 bar (60 000 psi) [4] a neskôr v roku 2003, 7200 bar. Na základe dôkazov tohto konceptu bol v roku 2004 komerčne zavedený firmou Waters prvý chromatografický systém kompatibilný s tlakom 1000 bar pod značkou UPLC (ultra performance liquid chromatography) [5].

K dosiahnutiu účinných a rýchlych separácií sa teda pri UHPLC využíva chromatografický sorbent, ktorého častice sú menšie ako 2 μm . Z van Deemterovej dynamickej teórie vyplýva, že pri zmenšení častíc v stacionárnych fázach je možné dosiahnuť zvýšenie separačnej účinnosti (viz obr. 1). Optimálna separačná účinnosť (najnižšie hodnoty výškového ekvivalentu teoretickej priehradky – H) je teda dosiahnutá pri vyšších lineárnych prietokových rýchlostiach a je zachovaná v ich širšom rozsahu, v dôsledku nízkeho odporu proti prevodu hmoty. Preto je možné častice menšie než 2 μm využívať pre zlepšenie účinnosti, rozlíšenie píkov a pre skrátenie doby analýzy.

Nevýhodou zmenšenia častíc je zvýšenie spätného tlaku vyžadujúce uspôsobenie systému. Podľa Darcyho zákona je tento nárast tlaku nepriamo úmerný druhej až tretej mocnine veľkosti častíc. Čiže pri optimálnej lineárnej prietokovej rýchlosti bude častica s veľkosťou 1,7 μm vytvárať spätný tlak 27x vyšší ako častica s veľkosťou 5 μm . Zvýšenie prietokovej rýchlosti a používanie kolón s menším priemerom ako u HPLC má za následok skrátenie doby analýzy a redukcii množstva používaných rozpúšťadiel [1][3].



Obr.1 – Vplyv veľkosti častíc stacionárnej fázy na priebeh van Deemterovej krivky.

Obrázok prevzatý a upravený zo zdroja [1].

Inštrumentácia v UHPLC musí byť zostavená tak aby systém mohol pracovať za vysokých tlakov. Taktiež musí spĺňať požiadavky na robustné čerpadlo a dávkovací systém, vysokú frekvenciu zberu dát, minimálne mimokolónové objemy a vhodnú stacionárnu fázu [1].

3.1.3. Stacionárne fázy pre UHPLC

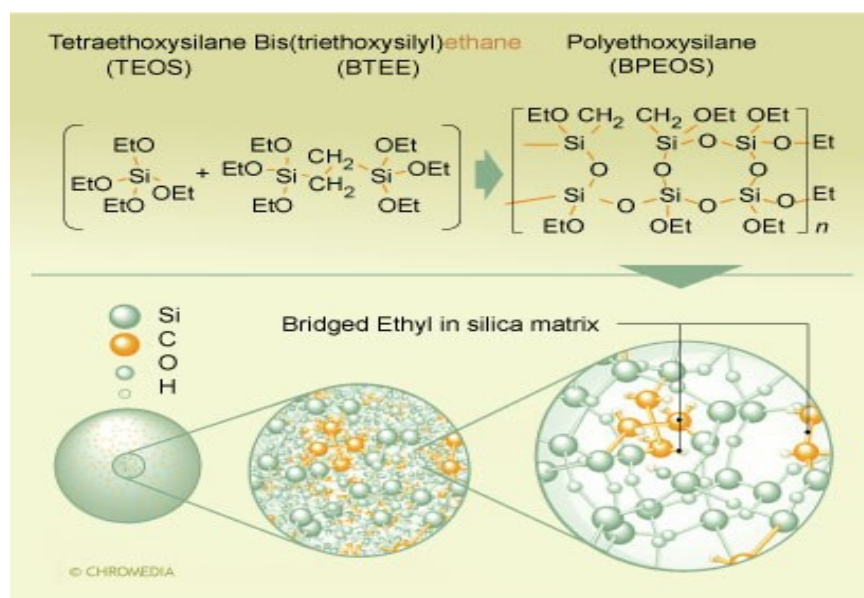
Stacionárna fáza je nepohyblivou zložkou chromatografického systému. Môže ňou byť tuhá látka alebo kvapalina zakotvená prípadne chemicky naviazaná na tuhý nosič. Ide teda o náplň kolóny, na ktorej dochádza k vlastnej separácii [1]. Náplne kolón je možné rozčleniť do troch kategórií: organické, anorganické a hybridné. Pričom uhlík a silikagel patria medzi anorganické. V súčasnosti je porézny sférický silikagel najpopulárnejším substrátom pre stacionárne fázy, a to vďaka svojej monodisperzite, modifikovateľnému povrchu, mechanickej pevnosti a celkovej chromatografickej

účinnosti. Má však zároveň určité limitácie, ako napríklad nestabilita pri extrémnom pH a pri vyšších teplotách. Naproti tomu organické materiály odolávajú pH, avšak majú často nižšiu mechanickú stabilitu a neuspokojivú chromatografickú účinnosť. Tretie spomínané – hybridné materiály sa do istej miery vyznačujú pozitívnymi vlastnosťami anorganicko – organickej kompozície, hlavne zlepšenou tepelnou a chemickou stabilitou [2].

3.1.3.1. Hybridné stacionárne fázy

Základom hybridného sorbentu je kombinácia anorganického silikagelu a polyméru organického organosilanu. Toto spojenie umožňuje získať výhody oboch zložiek. Vysokú účinnosť a mechanickú odolnosť silikagelu a taktiež teplotnú stabilitu polyméru, ktorý zároveň zabezpečuje elimináciu zvyškových silanolových skupín. Hybridné fázy sa zároveň vyznačujú vysokou stabilitou v širokom rozmedzí pH (1-12) [1].

V tejto diplomovej práci bol použitý hybridný sorbent od firmy Waters s komerčným názvom BEH (Bridged ethyl hybrid). Táto stacionárna fáza bola syntetizovaná spolukondenzáciou bis(triethoxysilyl)ethanu s tetraethoxysilanom v pomere 1:2 (obr.2). Hybridné častice s ethylenovými mostíkmi boli modifikované 18 uhlíkovým reťazcom [1][6].

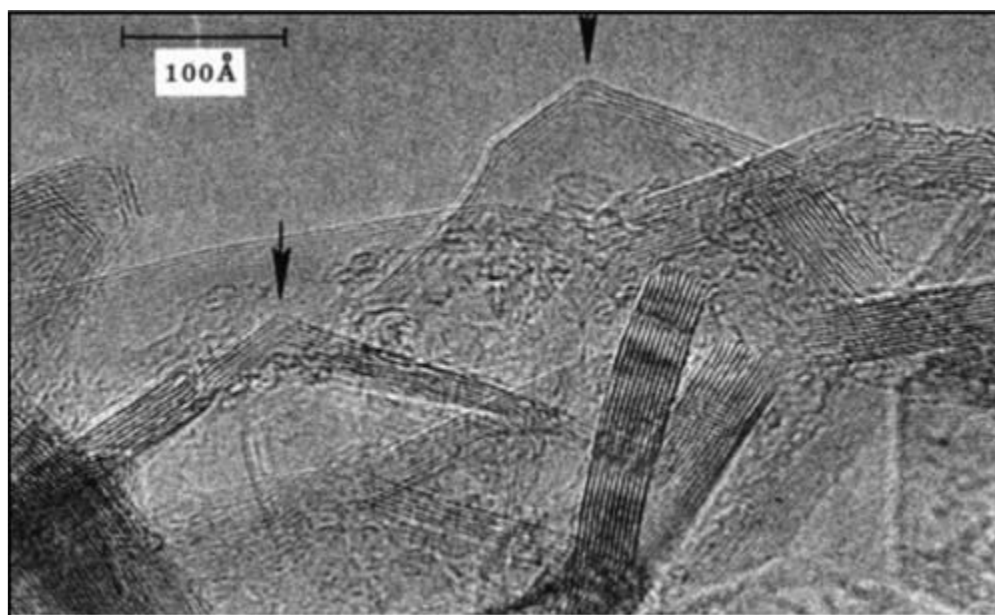


Obr.2 – Štruktúra hybridnej častice s využitím technológie BEH [7].

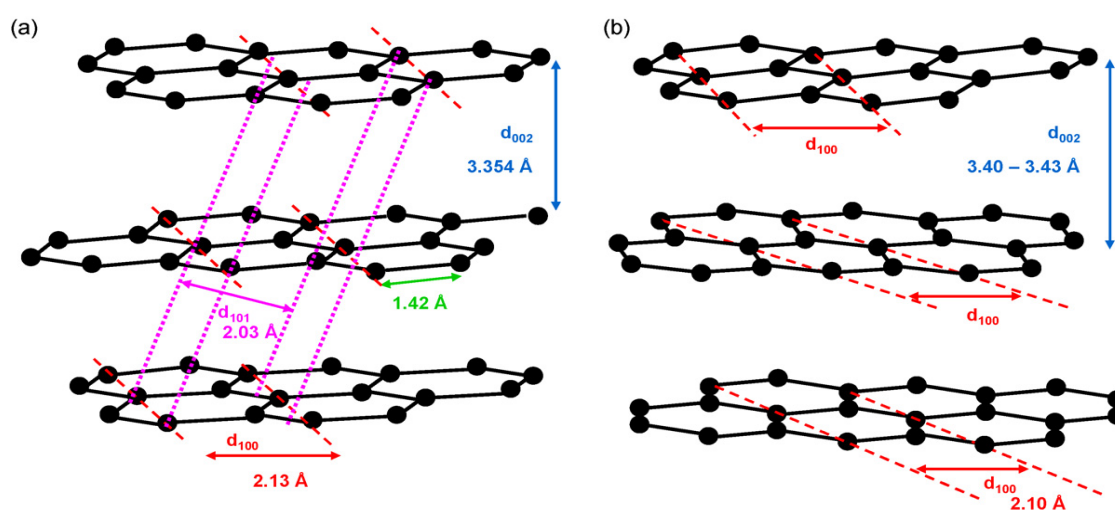
3.1.3.2. Stacionárne fázy na báze porézneho grafitového uhlíku

Porézny grafitový uhlík (PGC) sa v použití ako stacionárna fáza vyznačuje mnohými zaujímavými vlastnosťami. Chemické vlastnosti povrchu odlišujú PGC od konvenčných stacionárnych fáz na báze silikagelu a polymérov. Vzhľadom k nepolárnym látkam sa PGC správa podobne ako silne retenčný alkylom modifikovaný silikagel [8]. V prípade polárnych zlúčenín je retencia na PGC odlišná. Pri konvenčných alkylom modifikovaných silikageloch pridaním polárnej skupiny do molekuly zvyčajne dochádza v systéme reverzných fáz k redukcii retencie, avšak u PGC je táto redukcia výrazne nižšia a v niektorých prípadoch sa retencia dokonca zvyšuje. Preto by malo byť PGC vhodné pre separáciu veľmi polárnych a ionizovaných látok. PGC sa taktiež vyznačuje stereoselektivitou povrchu so schopnosťou oddeľovať od seba geometrické izoméry, diastereoizoméry a štruktúrne blízke zlúčeniny [9]. Ďalšími výhodami PGC je jeho odolnosť voči agresívnym mobilným fázam a separačným podmienkam. Vyznačuje sa stabilitou v celom rozmedzí pH 0 – 14 a je odolný voči vysokým teplotám (až do 200 °C) [10]. Naproti tomu, tradičné stacionárne fázy na báze silikagelu sú stabilné do teploty približne 60 °C pri použití aprotických rozpúšťadiel. Výhodou použitia vyššej teploty je zníženie spätného tlaku, taktiež umožňuje použitie stacionárnych fáz s menšími časticami, ktoré bohužiaľ pre PGC zatiaľ nie sú dostupné. Analýza teda môže prebiehať pri vyššej prietokovej rýchlosti a vo výsledku dochádza k rýchlejšim a efektívnejším separáciám [11].

PGC využíva porézne sférické častice s porozitou približne 75%. Povrch je kryštalický so špecifickým povrchom 120m²/g, skladajúci sa z plochých na seba priliehajúcich vrstiev (obr.3) hexagonálne usporiadaných atómov uhlíka. Jednotlivé atómy uhlíka majú plne obsadené valenčné orbitály. V princípe teda neobsahujú žiadne funkčné skupiny. Žiadna kryštalická štruktúra však nie je dokonalá a na hranách uhlíkových vrstiev sa môžu vyskytnúť rôzne funkčné skupiny. Efekt týchto skupín na chromatografickú separáciu je však minimálny, pretože zaberajú menej ako 1% povrchu [8]. PGC sa odlišuje od pravého troj-dimenzionálneho grafitu tým, že jeho po sebe nasledujúce vrstvy nie sú pravidelne orientované. Preto ho niektoré zdroje nazývajú dvoj-dimenzionálny grafit (obr.4) [10].



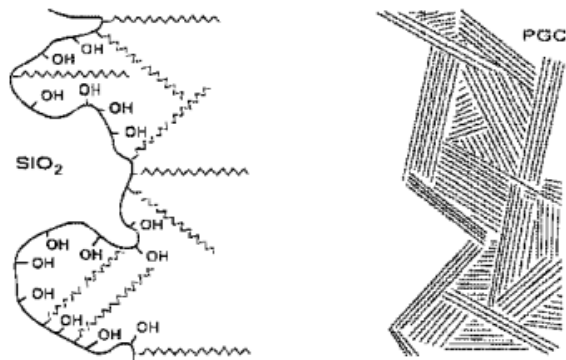
Obr.3 – PGC zobrazené prostredníctvom elektrónového mikroskopu [12].



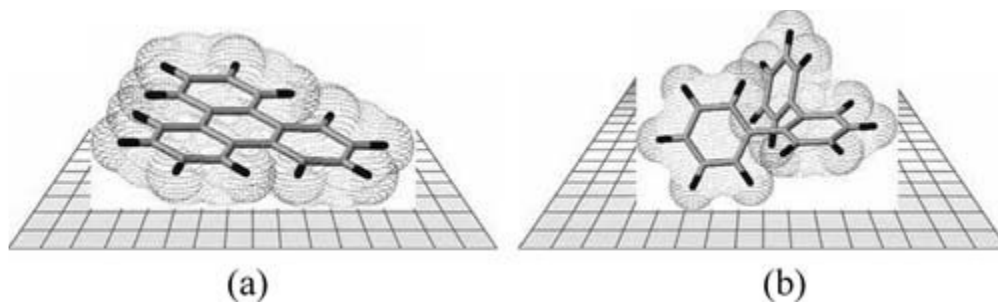
Obr.4 – Štruktúra grafitu: a.) troj-dimenzionálny grafit, b.) dvoj-dimenzionálny grafit (PGC) [12].

Ako bolo vyššie spomínané na molekulárnej úrovni je povrch PGC plochý a vysoko kryštalický. Na rozdiel od klasických silikagelových fáz, ktoré sú štetinovitého typu s naviazanou fázou a zvyškovými silanolovými skupinami (obr.5). V dôsledku toho je mechanizmus interakcii veľmi odlišný. Retencia grafitom z eluentu je determinovaná rovnováhou dvoch faktorov: (1) hydrofobicitou, ktorá spôsobuje vypudenie analytov z roztoku a (2) interakciou polarizovateľných a polarizovaných skupín v analyte

s grafitom. Sila interakcii závisí od plochy analytu, ktorá je v kontakte s povrchom grafitu a od povahy, typu funkčných skupín [8]. Vďaka plochej štruktúre PGC bude vo väčšej miere dochádzať k interakciám s planárnymi molekulami (obr.6A) než s priestorovo usporiadanými molekulami (obr.6B) [1].



Obr.5 – Porovnanie povrchu medzi silikagelom s viazaným C18 a PGC [13].



Obr.6 – Zobrazenie interakcie PGC [8].

3.2. Prehľad publikovaných aplikácií využívajúcich PGC

Podrobný prehľad aplikácií PGC podľa jednotlivých oblastí uvádza vo svojej práci L. Pereira [8]. V nasledujúcich riadkoch a tabuľke 1 uvádzame prehľad niektorých významnejších aplikácií PGC vo farmácii a súvisiacich s našou prácou.

Tabuľka 1 – prehľad publikovaných aplikácií

autor	Skupina analytov	metoda	detekcia	Kolóna	prietok
A. Mitakos [14]	Klopidogrel	MS	MS	50x3mm, 5µm	0,25 ml.min ⁻¹
Y. Daali [15]	Akarboza a metabolit	FD	FD	100x4,6m, 5µm	1 ml.min ⁻¹
M. Gouy [16]	Arabinosid -CMP,	MS	MS	50x2,1mm, 5µm	0,4 ml.min ⁻¹
N. Helali [17]	Cimetidin a nečistoty	PDA	PDA	100x4,6m, 7µm	1 ml.min ⁻¹
J. Martens-Lobenhoffer [18]	Levetiracetam	UV	UV	150x4,6m, 5µm	1 ml.min ⁻¹
H. Ehrsson [19]	Oxaliplatin	UV	UV	250x4,6m, 5µm	0,5ml.min ⁻¹
J. Reepmeyer [20]	Estrogény	MS	MS	250x4,6m, 5µm	0,3 ml.min ⁻¹
J. Barret [21]	Morfín a metabolity	UV	UV	100x4,6m, 7µm	1 ml.min ⁻¹
A. Karlsson [22]	Betablokátor	UV	UV	100x4,6m, 5µm	1 ml.min ⁻¹
L. Monser [23]	Paracetamol	UV	UV	100x4,6m, 7µm	1 ml.min ⁻¹
MF					
		MeOH /voda (70/30)	ACN/voda (8/92)	A: voda s 0,1% FAC B: fosfátový pufr s PSA pH 2,5	s 0,1% TFA
LC					
detekcia					
MF					
		MeOH /voda (70/30)	ACN/voda (8/92)	A: 0,423% H ₃ PO ₄ B: ACN	s 0,1% TFA
LC					
detekcia					
MF					
		MeOH /voda (70/30)	ACN/voda (8/92)	A: 10mM TEA/voda B: 10mM TEA/acetón/ACN	s 0,1% TFA
LC					
detekcia					
MF					
		MeOH /voda (70/30)	ACN/voda (8/92)	A: 0,05M octanový alebo uhlíčitano-vý	s 0,1% TFA
LC					
detekcia					
MF					
		MeOH /voda (70/30)	ACN/voda (8/92)	A: 20mM NaOH / MeOH B: 20mM NaOH / MeOH	s 0,1% TFA
LC					
detekcia					

Naproxen a nečistoty	THF/ MeOH (80/20)	THF/voda s 0,5% TCA (55/45)	UV	UV	HPLC	HPLC	100x4,6m, 7 μm	100x4,6m, 7 μm	1 ml.min ⁻¹	1 ml.min ⁻¹	L. Monser [24]	L. Monser [25]
-------------------------	-------------------------	-----------------------------------	----	----	------	------	-------------------	-------------------	------------------------	------------------------	-------------------	-------------------

Význam skratiek: ACN – acetonitril, CMP – cytidínmonofosfát, FAC – kys. mravčia, FD – fluorescenčný detektor, HPLC – vysokoúčinná kvapalinová chromatografia, LC – kvapalinová chromatografia, MeOH – methanol, MS – hmotnostný spektrometer, PDA – detektor diódového poľa, PSA –pentansulfonová kyselina, TEA – triethylamín, TFA – trifluóroctová kyselina, THF – tetrahydrofuran, UV – spektrofotometrický detektor.

Prvých sedem aplikácií uvedených v tabuľke sa zaoberá separáciou polárnych látok. V týchto aplikáciách je zjavná výhoda využitia PGC vzhľadom na efekt, ktorý popísal vo svojej práci J. Knox [9] a nazval ho „Polárna retencia na grafitu“ (PREG). Tento efekt definuje schopnosť molekúl majúcich voľný elektrónový pár alebo aromatický kruh interagovať prostredníctvom mechanizmu transferu elektrónov do elektrónového oblaku grafitu. Ide o akési prekrytie orbitalov medzi elektrónmi uhlíku a voľným párom σ /alebo π elektrónmi analytu [9]. Zaujímavé výsledky boli dosiahnuté v práci J. Martens-Lobenhoffera [18], kde bola vytvorená metóda na určenie levetiracetamu. Ide o veľmi polárnu látku a preto všetky predchádzajúce metódy využívajúce reverzné fázy boli schopné dosiahnuť primeranú retenciu iba s použitím veľmi nízkej frakcie organického modifikátora v mobilnej fáze. Použitie PGC viedlo k lepšej retencii, veľmi ostrým a symetrickým píkum a vysokej selektivitě pre levetiracetam.

Ďalšou zaujímavou prácu publikoval J. Reepmeyer [20]. Venovala sa separácii izomérov dvoch konjugovaných estrogénov prostredníctvom PGC a potvrdzuje vhodnosť využitia danej stacionárnej fázy v separácii izomérov a štruktúrne príbuzných zlúčenín. Y. Daali [15] pri separácii akarbózy, jej metabolitov a anomérov upozorňuje a znázorňuje silný vplyv zloženia mobilnej fázy na retenciu pri použití PGC. Zároveň poukazuje na vplyv kyslého modifikátora (v tomto prípade sa jednalo hlavne o TFA ale boli vyskúšané aj iné) na selektivitu, tvar píku, retenčný čas a reprodukovateľnosť.

Ako bolo už vyššie spomínané jednou z výhod PGC je vysoká tepelná odolnosť [10]. Vplyvu zmeny teploty sa zaoberá viacero prác, napríklad A. Karlsson [22] pri separácii alprenololu a príbuzných látok zistil, že pri zvyšovaní teploty boli dané látky ovplyvnené rovnako a nedošlo k zmene poradia retencie. Taktiež J. Barret [21] spomína, že vyššia teplota zvyšuje solubilitu látok v mobilnej fáze a taktiež uľahčuje transport do porézneho materiálu. Zároveň zvýšenie teploty znižuje retenčný čas, čo má praktický dopad v celkovom zrýchlení doby analýzy.

3.3. Skupiny testovaných látok a ich vlastnosti

V našej práci bolo na testovanie separačného potenciálu stacionárnych fáz na báze porézneho grafitového uhlíka použitých jedenásť skupín látok, ktoré obsahovali liečivo a jeho potencionálne nečistoty, príbuzné látky alebo izoméry.

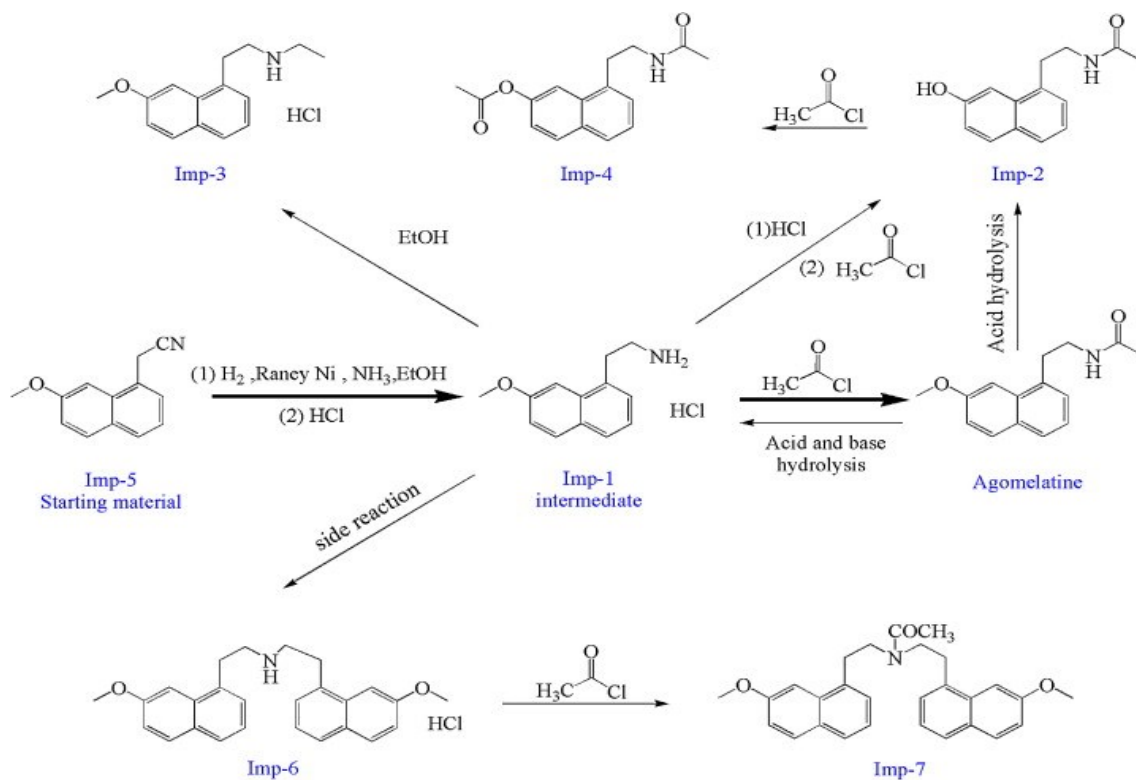
V nasledujúcich podkapitolách sú uvedené tabuľky, ktoré obsahujú označenia jednotlivých analytov a obrázky s ich štruktúrou. Ďalej sú pre porovnanie a popísanie ich fyzikálne-chemických vlastností uvedené hodnoty, kde M_w je molová hmotnosť. Hodnota pK_a je rovná zápornému dekadickému logaritmu disociačnej konštanty látky, ktorá popisuje silu danej kyseliny či zásady. Koeficient P popisuje pomer rovnovážnych koncentrácií látky v dvoch nemiešateľných kvapalinách, oktanolu a vode, z ktorého môžeme usudzovať hydrofilne-lipofilné vlastnosti danej látky.

3.3.1. Agomelatin a jeho nečistoty

Agomelatin je syntetický analóg spánkového hormónu melatoninu. Patrí do skupiny agonistov melatoninových receptorov a selektívnych antagonistov serotoninových receptorov. Terapeuticky je určený na liečbu depresívnych stavov, ale ovplyvňuje aj cirkadiánne rytmy [26].

Chemicky je agomelatin N -(2-(7-methoxynaft-1-yl)ethyl)acetamid, teda acetamidový naftalenový analóg melatoninu [27]. Bol vyvinutý európskou farmaceutickou firmou Sevier Laboratories Ltd a pre terapeutické využitie bol schválený v roku 2009 [28].

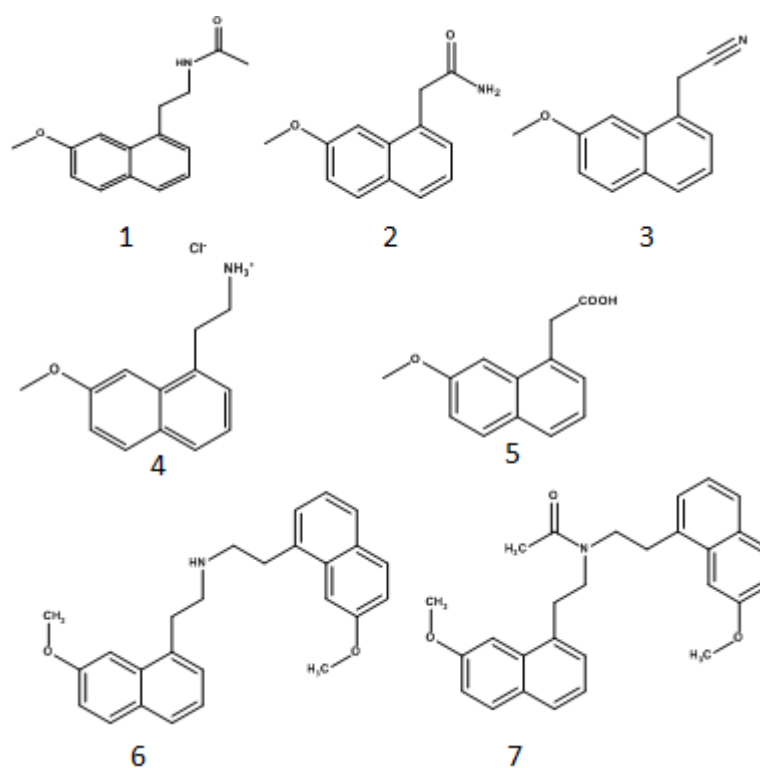
Všetky separované látky v tejto práci sa vyznačujú základným skeletom zhodným s tým, ktorý tvorí agomelatin. Odlíšujú sa väčšinou substituentom viazaným cez metylový mostík na naftalén. Tabuľka 2 uvádza prehľad vlastností agomelatinu a nečistôt a obrázok 8 štruktúry jednotlivých látok. Látka (látka 5 v obr. 8) , ktorá bola pre zjednodušenie označená ako kyselina na základe karboxylovej skupiny tvoriacej substituent je (7-methoxynaft-1-yl)octová kyselina. Podobne aj pre ďalšie látky boli odvodené skráteneiny: (7-methoxynaft-1-yl)acetamid - amid, (7-methoxynaft-1-yl)acetonitril – nitril, (7-methoxynaft-1-yl)ethylamin hydrochlorid – soľ. Štruktúrne sa líšia analyty bis[2-(7-methoxynaft-1-yl)-ethyl]amin, ktorý bol pre sprehľadnenie označený ako amin a N,N-bis(2-(7-methoxynaft-1-yl)ethyl)acetamid označený ako dimer. Ide vlastne o cez dusík spojené dve substituované naftalénové jadrá agomelatinu, odlišujúce sa substituentom na danom dusíku. V prípade dimeru ide o metylkarbonylovú skupinu, amin obsahuje iba vodík. Všetky tieto látky sú považované za potencionálne nečistoty agomelatinu, pretože ich tvorba behom syntézy agomelatinu je veľmi pravdepodobná a väčšina z nich vzniká niektorou z popísaných vedľajších reakcii (Obr.7) [29].



Obr. 7 – Vznik niektorých analyzovaných nečistôt agomelatinu [29]. Imp-1 – soľ, Imp-5 – nitril, Imp-6 – amin, Imp-7 – dimer.

Tabuľka 2 – Vlastnosti agomelatinu a nečistôt

Látka	Mw	logP	pKa (kyslé)	pKa (bazické)
Agomelatin	243,30	2,46	16,2	-0,5
Amid	215,25	16,11	16,1	-0,7
Nitril	197,23	2,69	NA	NA
Soľ	237,26	2,89	10,0	NA
Kyselina	216,23	2,79	4,3	-
Amin	385,50	6,96	-	9,7
Dimer	427,53	6,58	-	0,6



Obr. 8 – štruktúry agomelatinu (1) a jeho nečistôt - 2 – amid, 3 – nitril, 4 – soľ, 5 – kyselina, 6 – amin, 7 -dimer

3.3.2. Betablokátory

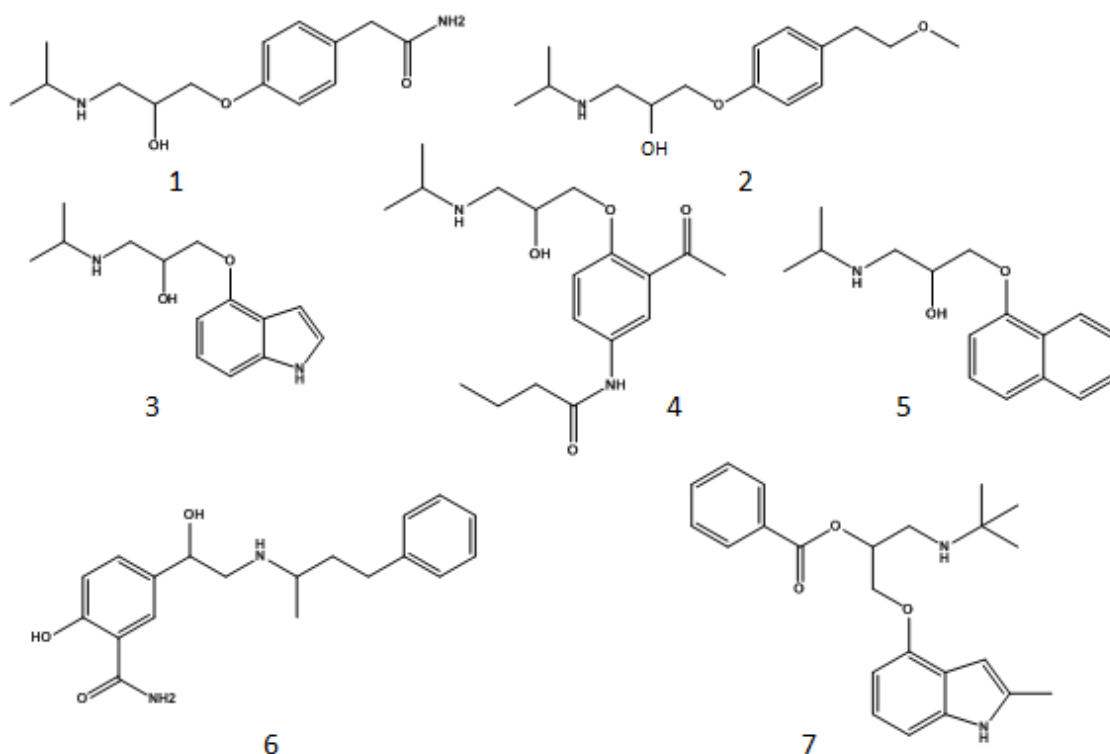
Látky z tejto skupiny sa využívajú hlavne v terapii hypertenzie, uplatnenie nachádzajú tiež ako antiarytmiká, antiglaukomatiká a podporné anxiolytiká. Z terapeutického hľadiska sa využíva ich pôsobenie na β_1 -receptory, ktoré sa nachádzajú v srdci [30].

Tvoria štruktúrne veľmi jednotnú skupinu látok. Prakticky z hľadiska štruktúry existujú dve skupiny – arylaminoethanolové (typ A) a aryloxyaminopropanolové deriváty (typ B). Medzi látky staršieho typu A patrí labetalol, ktorý tvorí štyri aktívne izoméry. V praxi sa najčastejšie využíva zmes oboch racemátov. Prevažná väčšina dnes používaných látok patrí do typu B, ktorý vznikol predĺžením spojovacieho reťazca vsunutím skupiny -OCH₂- medzi aromatickú časť a uhlík s alkoholickou skupinou. Sekundárna alkoholická skupina je nevyhnutná pre účinok, jej obmena je možná iba prostredníctvom prekursoru ako je to napríklad v prípade bopindololu, ktorý je benzylesterom pindololu. Ostatné látky sa od seba odlišujú iba substituentom v polohe 4 benzénového jadra a v prípade acebutololu zbytkom kyseliny octovej v polohe 2 [30].

Z hľadiska analýzy predstavuje táto skupina výzvu vzhľadom na vysokú štruktúrnu príbuznosť, bazicitu látok a zároveň veľmi blízke fyzikálne-chemické vlastnosti uvedené v tabuľke 3.

Tabuľka 3 – Vlastnosti betablokátorov

Látka	Mw	logP	pKa (kyslé)	pKa (bazické)
Atenolol	266,34	0,34	13,88	9,43
Metoprolol	267,36	1,63	13,89	9,43
Pindolol	248,32	1,68	13,94	9,54
Acebutolol	336,43	1,77	13,78	9,40
Labetalol	328,41	2,19	8,21	9,30
Propranolol	259,34	2,90	13,84	9,50
Bopindolol	380,48	4,90	17,59	9,40



Obr. 9 – štruktúry betablokátorov: 1 – atenolol, 2 – metoprolol, 3 – pindolol, 4 – acebutolol, 5 – propranolol, 6 – labetalol, 7 -bopindolol

3.3.3. Enzalutamid a jeho nečistoty

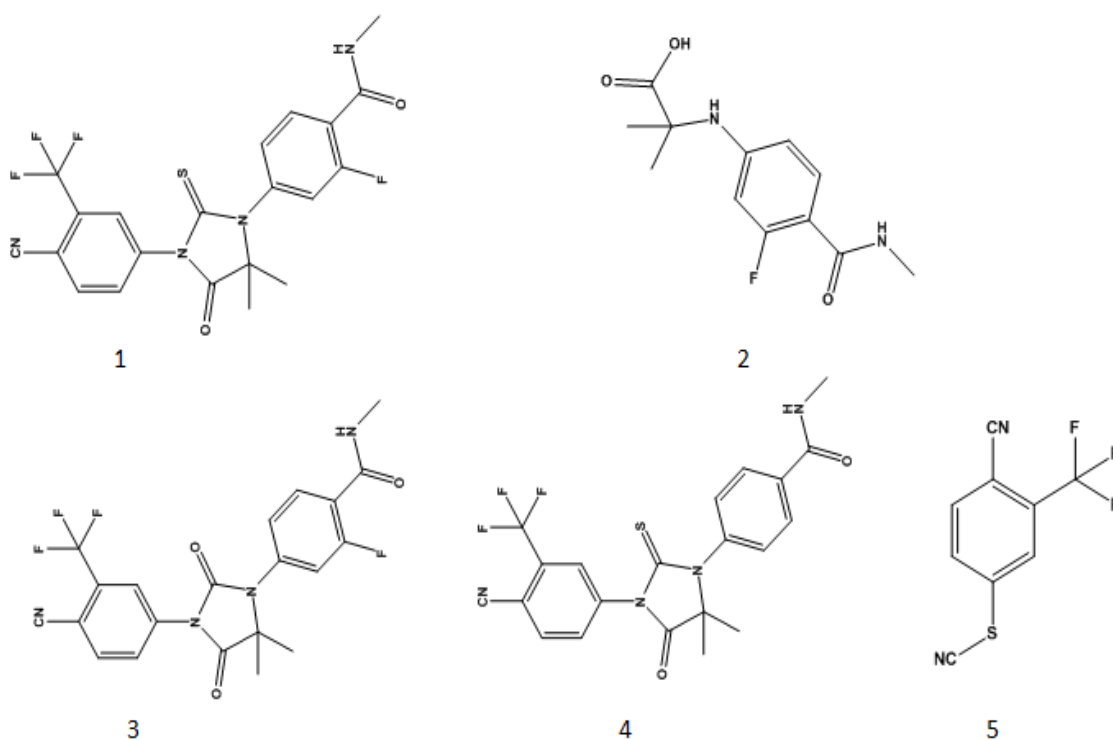
Enzalutamid predstavuje hormonálny prípravok novej generácie, ktorý blokuje androgénnu signálnu cestu a je teda antagonistou na androgénnych receptoroch. Využíva sa na terapiu kastračne rezistentného karcinómu prostaty [31]. Toto liečivo bolo navrhnuté spoločnosťou Medivation Inc. a pre používanie bolo schválené v auguste 2012 [31][32].

Bolo navrhnutých niekoľko spôsobov syntézy enzalutamidu, pri ktorých sa samozrejme vyskytlo aj množstvo nečistôt v podobe procesných nečistôt alebo degradačných produktov. Pri jednotlivých látkach je viditeľná štruktúrna podobnosť. Zlúčenina označená ako ENZ 1 je podľa výrobného procesu medziproduktom, procesnou nečistotou a môže sa nachádzať vo výslednom produkte. ENZ 2 vzniká pravdepodobne ako oxidačný produkt a je hlavným produktom degradácie pri vyššej teplote [33]. Líši sa od enzalutamidu izosternou zámennou síry naviazanej na imidazolidín za kyslík. Nečistota ENZ 3 sa odlišuje iba neprítomnosťou fluóru na benzéne. Pravdepodobne procesnou

nečistotou je aj nečistota označená ako ENZ 4, ktorá taktiež vykazuje štruktúrnu podobnosť s molekulou enzalutamidu.

Tabuľka 4 – Vlastnosti enzalutamidu a jeho nečistôt

Látka	Mw	logP	pKa (kyslé)	pKa (bazické)
Enzalutamid	464,44	2,98	13,88	-1,99
ENZ 1	254,26	0,12	3,59	0,53
ENZ 2	448,37	2,34	13,99	-1,47
ENZ 3	446,45	2,92	14,46	-1,91
ENZ 4	228,19	3,30	-	-



Obr. 10 – štruktúry enzalutamidu (1) a jeho nečistôt - 2 –ENZ 1, 3 – ENZ 2, 4 – ENZ 3, 5 – ENZ 4

3.3.4. Atomoxetín a jeho nečistoty

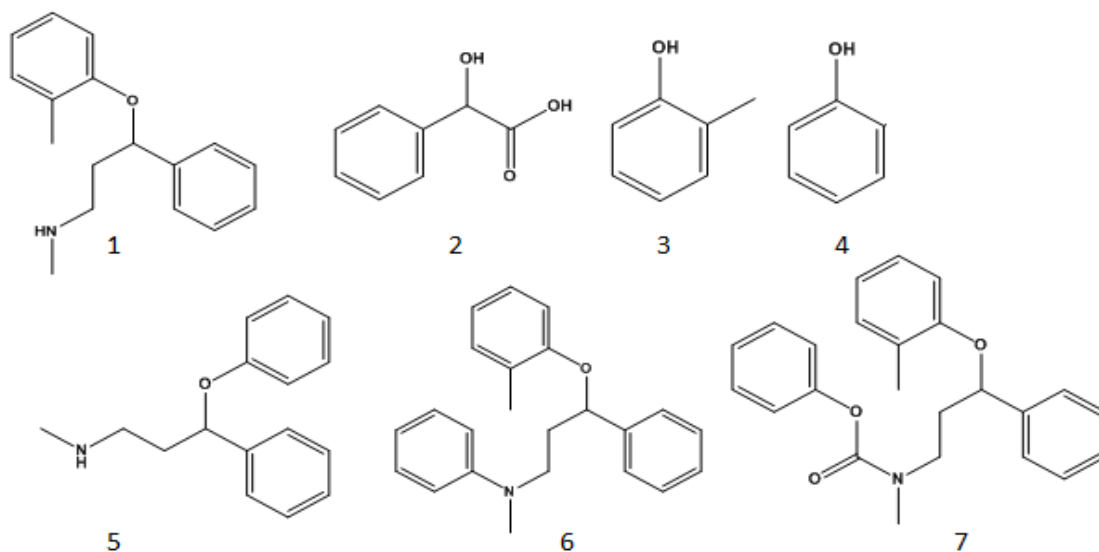
Atomoxetín je látka štruktúrne podobná antidepresívam zo skupiny selektívnych inhibítorov spätného vychytávania noradrenalínu, avšak používa sa ako psychostimulans v liečbe hyperkinetickej poruchy detí. Chemicky sa jedná o (3R)-N-methyl-3-(2-methylfenoxy)-3-fenylpropan-1-amin [26].

Obr. 11 zobrazuje atomoxetín a zvolené procesné, degradačné a iné možné nečistoty. Nečistoty ATO 1 až 3 sú pomerne jednoduché zlúčeniny. Jedná sa o kyselinu mandľovú (ATO 1), o- kresol (ATO 2) a fenol (ATO 3). Nečistota ATO 4 sa od atomoxetínu odlišuje neprítomnosťou metylu na fenoxi skupine, preto je označovaná aj ako fenoxi. ATO 5 má naviazaný fenyl na amíne základného skeletu atomoxetínu, preto je tiež označovaný ako fenyl. ATO 6 tvorí s aminoskupinou atomoxetínu fenylkarbamát, preto je označovaný ako karbamát.

Atomoxetín a jeho nečistoty tvoria pomerne rôznorodú skupinu látok vzhľadom na štruktúru, veľkosť zlúčenín a fyzikálne chemické vlastnosti (viz tabuľka 5). Sú preto zaujímavou skupinou pre farmaceutickú analýzu.

Tabuľka 5 – Vlastnosti atomoxetínu a jeho nečistôt

Látka	Mw	logP	pKa (kyslé)	pKa (bazické)
Atomoxetín	255,35	3,36	-	10,15
ATO 1 (mandľová kys.)	152,15	0,55	3,41	-
ATO 2 (o-kresol)	108,14	1,96	10,32	-
ATO 3 (fenol)	94,11	1,54	9,86	-
ATO 4 (ato-fenoxi)	241,33	2,84	-	10,14
ATO 5 (benzyl-ato)	345,48	5,24	-	8,32
ATO 6 (karbamát)	375,46	5,43	-	-1,73



Obr. 11 – štruktúry atomoxetínu (1) a jeho nečistôt - 2 - ATO 1 (mandľová kys.), 3 - ATO 2 (o-kresol), 4 - ATO 3 (fenol), 5 - ATO 4 (fenoxi), 6 - ATO 5 (benzyl), 7 - ATO 6 (karbamát)

3.3.5. Atorvastatin a jeho nečistoty

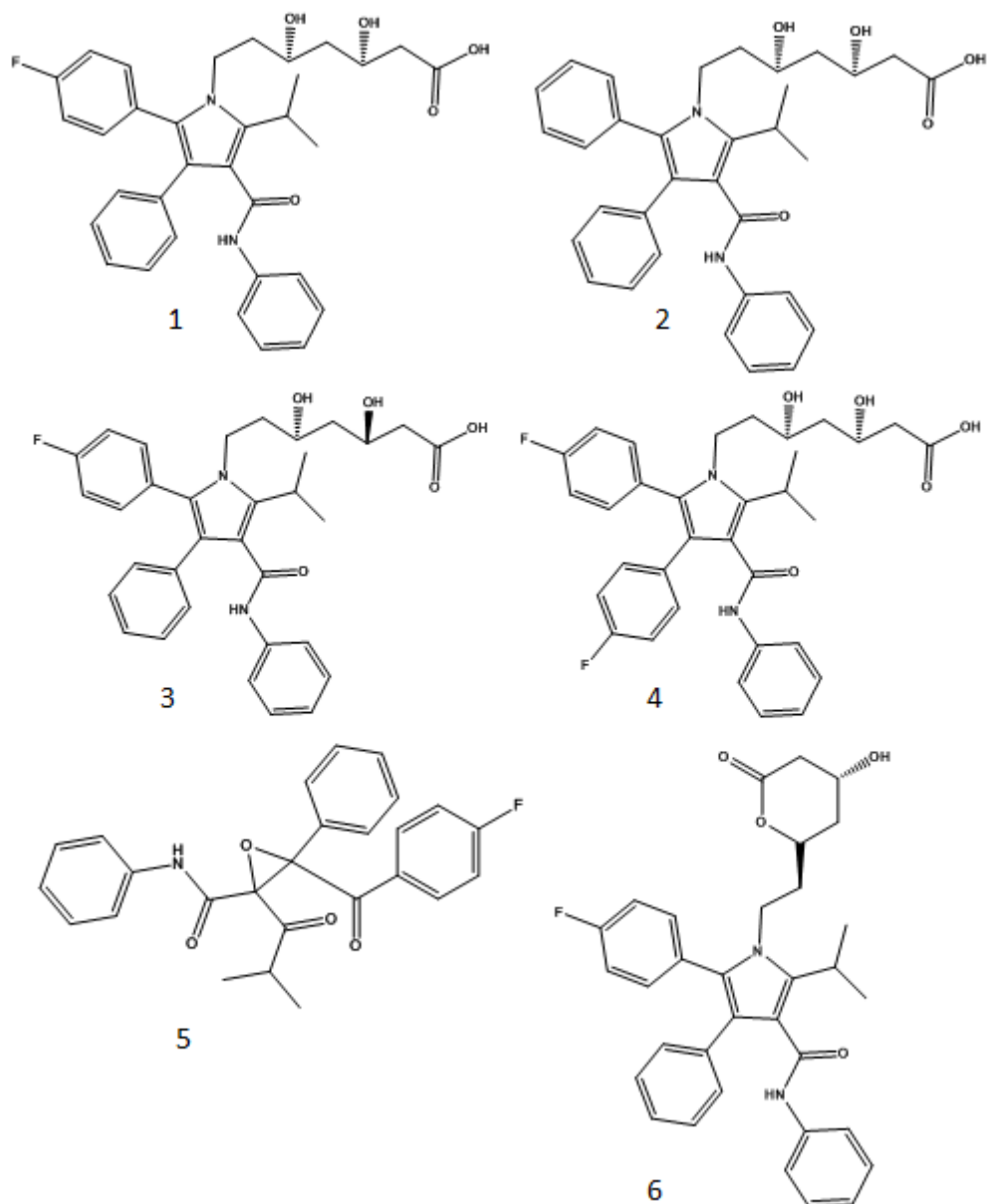
Atorvastatin patrí medzi antihyperlipidemiká. Mechanizmus účinku tohto liečiva spočíva v zastavení syntézy cholesterolu inhibíciou enzýmu HMG-CoA-reduktázy. Chemicky je to (3R,5R)-7-[3-fenyl-4-(fenylaminokarbonyl)-2-(4-fluorfenyl)-5-isopropyl-1-pyrrolyl]-3,5-dihydroxyheptanová kyselina a najčastejšie sa používa vo forme vápenatej soli [34].

Atorvastatin má dva stereogénne uhľíky a teda štyri potenciálne diastereoizoméry. Nečistota označená ako IMP B je toho príkladom, má konfiguráciu 3S,5R . Nečistoty IMP A a C sa líšia od atorvastatinu počtom fluórov. Zatiaľ čo IMP A je desfluoro derivát, IMP C má jeden fluór navyše v polohe 4 na fenyle naviazanom na pyrrolyl. IMP D je epoxidový derivát atorvastatinu a nečistota označená ako LAC je vlastne lakton, ktorý vznikol cyklizáciou karboxylovej skupiny atorvastatinu.

Vzhľadom na vysokú štruktúrnu podobnosť a prítomnosť diastereoizomérov predstavuje táto skupina analytickú výzvu. Zároveň fyzikálne-chemické vlastnosti sú veľmi podobné až na IMP D, ktorá má vyššie log P aj pKa.

Tabuľka 6 – Vlastnosti atorvastatinu a jeho nečistôt

Látka	Mw	logP	pKa (kyslé)	pKa (bazické)
Atorvastatín	558,64	3,85	4,29	0,38
Imp A	540,65	3,91	4,29	0,38
Imp B	558,64	3,85	4,29	0,38
Imp C	576,63	3,78	4,29	0,37
Imp D	431,46	4,93	13,66	-0,05
Lac	540,63	3,90	13,39	0,38



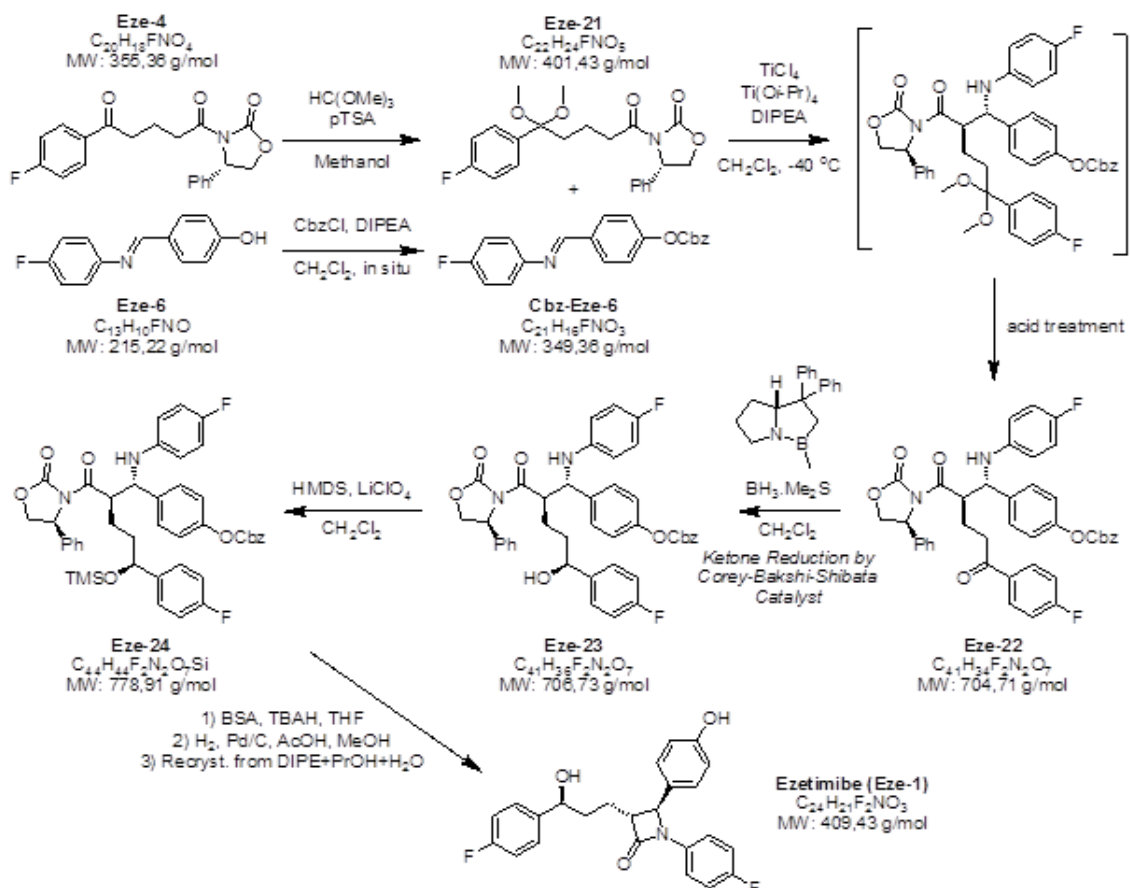
Obr. 12 – štruktúry atorvastatínu (1) a jeho nečistôt - 2 – IMP A, 3 – IMP B, 4 – IMP C, 5 – IMP D, 6 – Lac

3.3.6. Ezetimib a jeho nečistoty

Ezetimib znižuje hladinu cholesterolu mechanizmom inhibície absorpcie cholesterolu v tenkom čreve. Využíva sa v terapii primárnej hypercholesterolemii, homozygotnej sitosterolemii a zmiešanej hyperlipidemii [35].

Chemicky je ezetimib 1-(4-fluorofenyl)-3(R)-[3(S)-(4-fluorofenyl)-3-hydroxypropyl]-4(S)-(4-hydroxyfenyl)-2-azetidín. Nečistoty (viz obr. 14) vybrané do

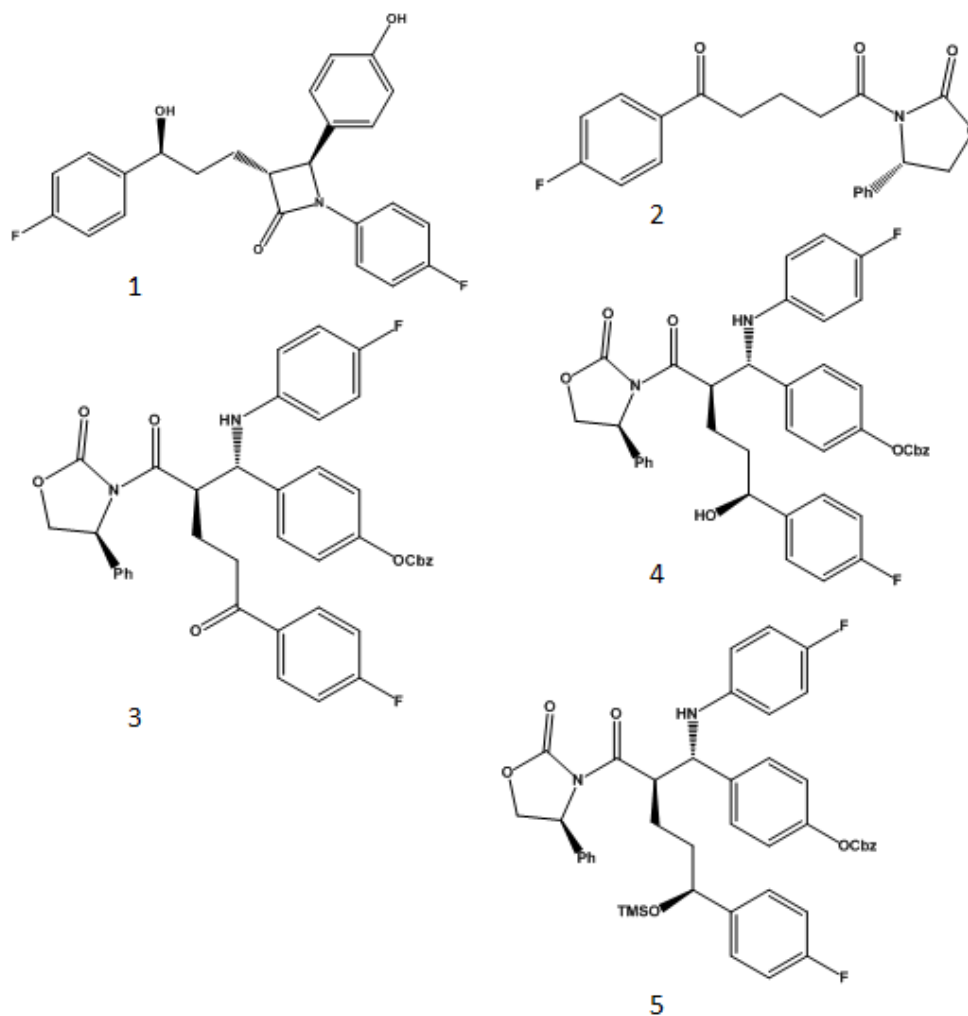
tejto práce sú procesné nečistoty, ktoré môžu vzniknúť ako medziprodukty syntézy (viz obr. 13) a eventuálne sa vyskytnúť v konečnom produkte.



Obr. 13 – syntéza ezetimibu [obrázok bol poskytnutý výrobcom daných štandardov, spoločnosťou Zentiva]

Tabuľka 7 – Vlastnosti ezetimibu a jeho nečistôt

Látka	Mw	logP	pKa (kyslé)	pKa (bazické)
Ezetimib	409,43	3,77	9,72	-0,20
EZE 21	401,43	3,42	-	-3,09
EZE 22	704,23	5,41	-	2,90
EZE 23	706,73	4,96	14,15	2,97
EZE 24	778,91	6,76	-	2,96



Obr. 14 – štruktúry ezetimibu a jeho nečistôt - 2 – EZE 21, 3 – EZE 22, 4 – EZE 23, 5 – EZE 24

3.3.7. Tikagrelor a jeho nečistoty

Tikagrelor je priamy reverzibilný inhibítor trombocytových receptorov pre adenosintrifosfát (ADP) typu P2Y₁₂. Indikuje sa v prevencii trombotických príhod u pacientov akútnymi koronárnymi príhodami typu angíny pectoris a infarktu myokardu [36].

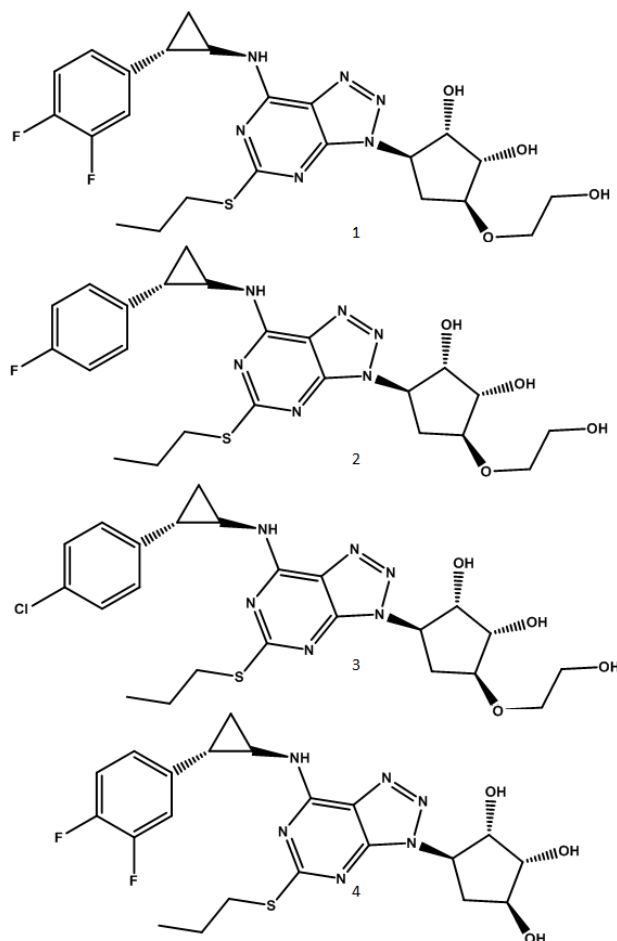
Tikagrelor možno chemicky popísať ako (1S,2S,3R,5S)-3-[7-[[[(1R,2S)-2-(3,4-difluorofenyl)cyklopropyl]amino]-5-propylsulfanyl]triazolo[4,5-d]pyrimidin-3-yl]-5-(2-hydroxyethoxy)cyklopentan-1,2-diol. Nečistota označená ako TICA 1 sa líši od API tým, že sa jedná desfluóro derivát v polohe 3 na fenyle. TICA 2 je podobná TICA 1 ale

zostávajúci fluór v polohe 4 na fenyle má nahradený chlóm. Nečistota TICA 3 je oproti API desethoxy derivát a je teda cyklopentantriol.

Tikagrelor a jeho nečistoty je vzhľadom na ich vysokú štruktúrnu podobnosť extrémne zložité vyseparovať. Preto predstavujú veľkú výzvu.

Tabuľka 8 – Vlastnosti tikagreloru a jeho nečistôt

Látka	Mw	logP	pKa (kyslé)	pKa (bazické)
Tikagrelor	522,57	2,02	13,26	3,05
TICA 1 (desfluoro)	504,58	2,20	13,26	3,05
TICA 2 (ChlorT)	540,03	2,93	12,81	-
TICA 3 (DesethoxyT)	478,52	2,02	13,38	3,05



Obr. 15 – štruktúry tikagreloru (1) a jeho nečistôt - 2 – TICA 1 (desfluóro), 3 – TICA 2 (ChlórT), 4 – TICA 3 (desethoxyT)

3.3.8. Vardenafil a jeho nečistoty

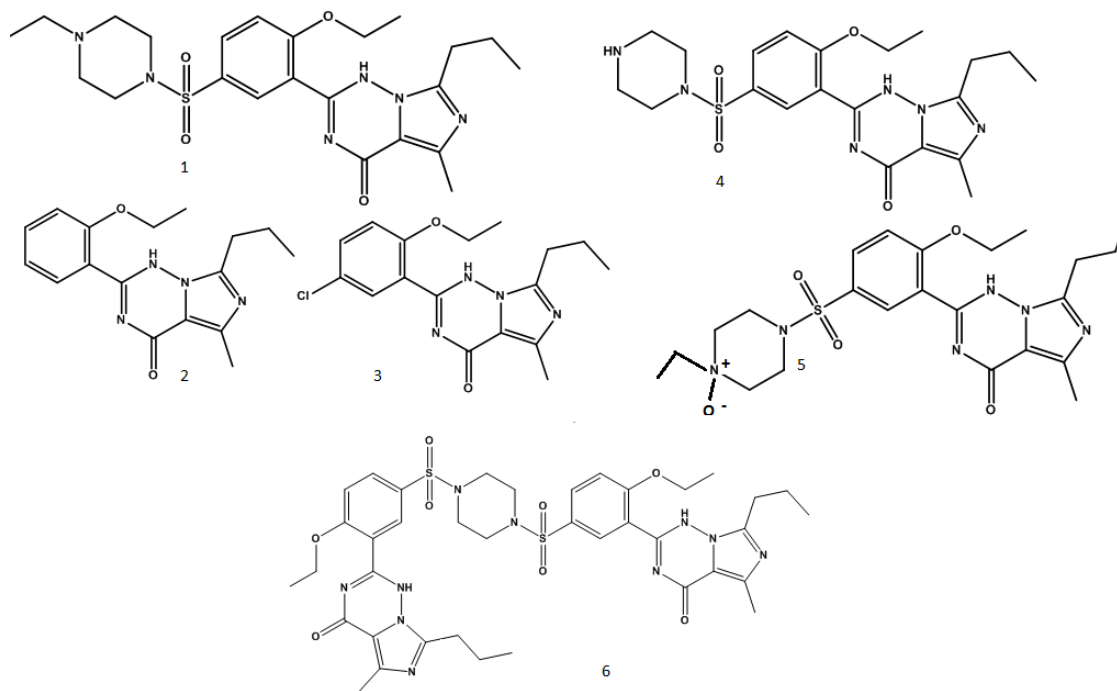
Vardenafil patrí medzi inhibitory fosfodiesterázy 5. Inhibíciou daného enzýmu sa zvyšuje hladina cGMP a vyvoláva relaxáciu hladkého svalstva ciev čo zlepšuje prúdenie krvi v penise. Liečivo sa teda využíva v terapii erektilnej disfunkcie [37].

Vardenafil možno chemicky popísať ako 2-[2-ethoxy-5-(4-ethylpiperazin-1-sulfonyl)-fenyl]-5-methyl-7-propyl-3H-imidazo[5,1-f]-[1,2,4]triazine-4-on. Nečistota označená ako VAR 1 je vlastne časťou molekuly vardenafilu. Vyznačuje sa neprítomnosťou ethylpiperazínsulfonylovej skupiny. VAR 2 je prakticky rovnaká ako VAR 1 ale v tomto prípade je ethylpiperazínsulfonylová skupina nahradená chlóróm. Nečistota VAR 3 je desethyl vardenafil, odlišuje sa neprítomnosťou ethyl v polohe 4 na piperazíne. VAR 4 obsahuje N-oxid v polohe 4 piperazínu. Nečistota VAR 5 je sulfonová kyselina. Oproti molekule vardenafilu teda neobsahuje ethylpiperazínový zbytok. V prípade nečistoty s označením VAR 6 sa jedná o dimér.

Skupina nečistôt vardenafilu je aj napriek spoločnému štruktúrnemu základu veľmi rozmanitá a vzhľadom na rôzne funkčné skupiny sa uplatňujú rozličné fyzikálne-chemické vlastnosti (viz tabuľka 9) a teda z hľadiska farmaceutickej analýzy predstavuje zložitú skupinu.

Tabuľka 9 – Vlastnosti vardenafilu a jeho nečistôt

Látka	Mw	logP	pKa (kyslé)	pKa (bazické)
Vardenafil	488,60	3,64	9,86	7,15
VAR 1	312,37	3,43	10,08	2,28
VAR 2	346,81	3,43	NA	-
VAR 3	460,54	2,32	7,73	-
VAR 4	504,21	2,16	4,58	-
VAR 5	836,98	6,09	1,04	-



Obr. 15 – štruktúry vardenafilu (1) a jeho nečistôt - 2 – VAR 1, 3 – VAR 2, 4 – VAR 3, 5 – VAR 4, 6 – VAR 5,

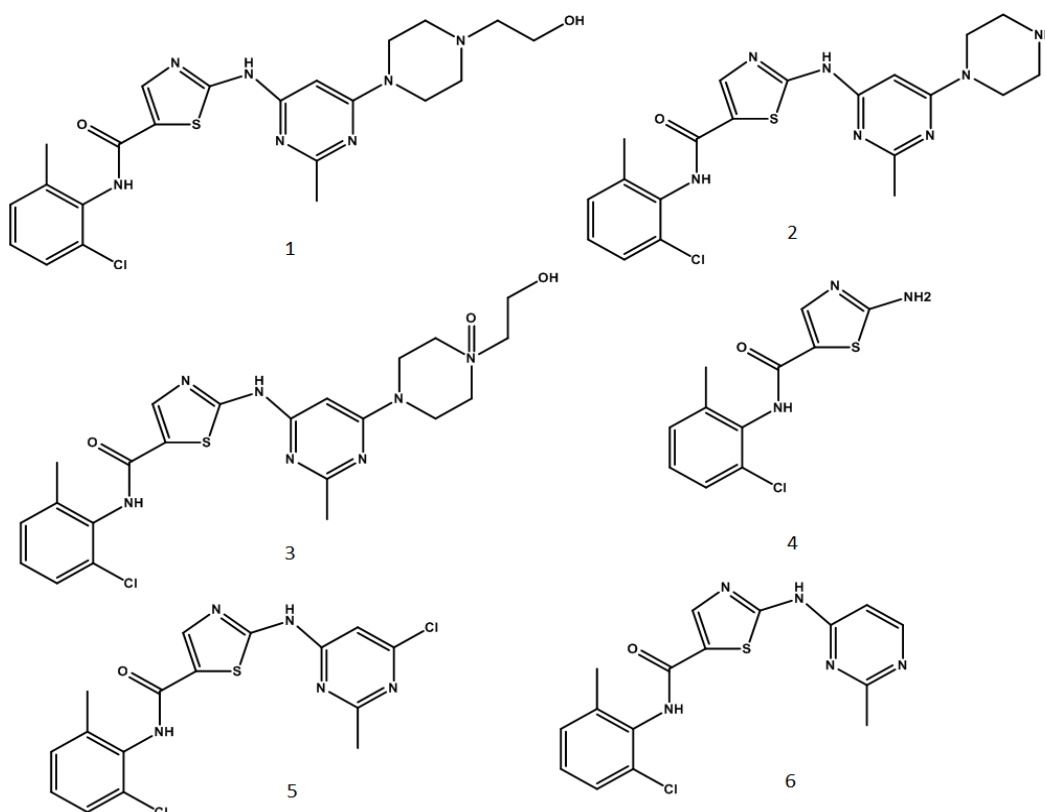
3.3.9. Dasatinib a jeho nečistoty

Dasatinib patrí do skupiny inhibitorov tyrozinkinázy. Využíva sa v terapii chronickej myeloidnej leukémie [38].

Chemicky ide o derivát aminopyrimidínu, presnejšie N-(2-chlor-6-methyl-fenyl)-2-(6-(4-(2-hydroxyethyl)-piperazin-1-yl)-2-methylpyrimidin-4-ylamino)thiazol-5-karboxamid. Nečistota označená ako DAS 1 je deshydroxyethyl derivát dasatinibu. DAS 2 je N-oxid. Nečistotu DAS 3 môžeme nájsť ako štruktúrnu časť api. Chemicky sa jedná o 2-Amino-N-(2-chloro-6-methylfenyl)-5-thiazolkarboxamid. DAS 4 má na pyrimidíne v polohe 4 miesto hydroxyethylpiperazínu naviazaný chlór a nečistota označená DAS 5 v danej polohe má iba vodík.

Tabuľka 10 – Vlastnosti dasatinibu a jeho nečistôt

Látka	Mw	logP	pKa (kyslé)	pKa (bazické)
Dasatinib	488,01	0,14	10,94	7,29
DAS 1	443,95	0,73	10,94	8,31
DAS 2	503,14	-0,82	6,78	6,78
DAS 3	267,73	0,53	11,09	3,06
DAS 4	394,28	2,00	10,92	2,93
DAS 5	359,83	1,15	10,94	3,97



Obr. 16 – štruktúry dasatinibu a jeho nečistôt - 2 – DAS 1, 3 – DAS 2, 4 – DAS 3, 5 – DAS 4, 6 – DAS 5

3.3.10. Estrogény

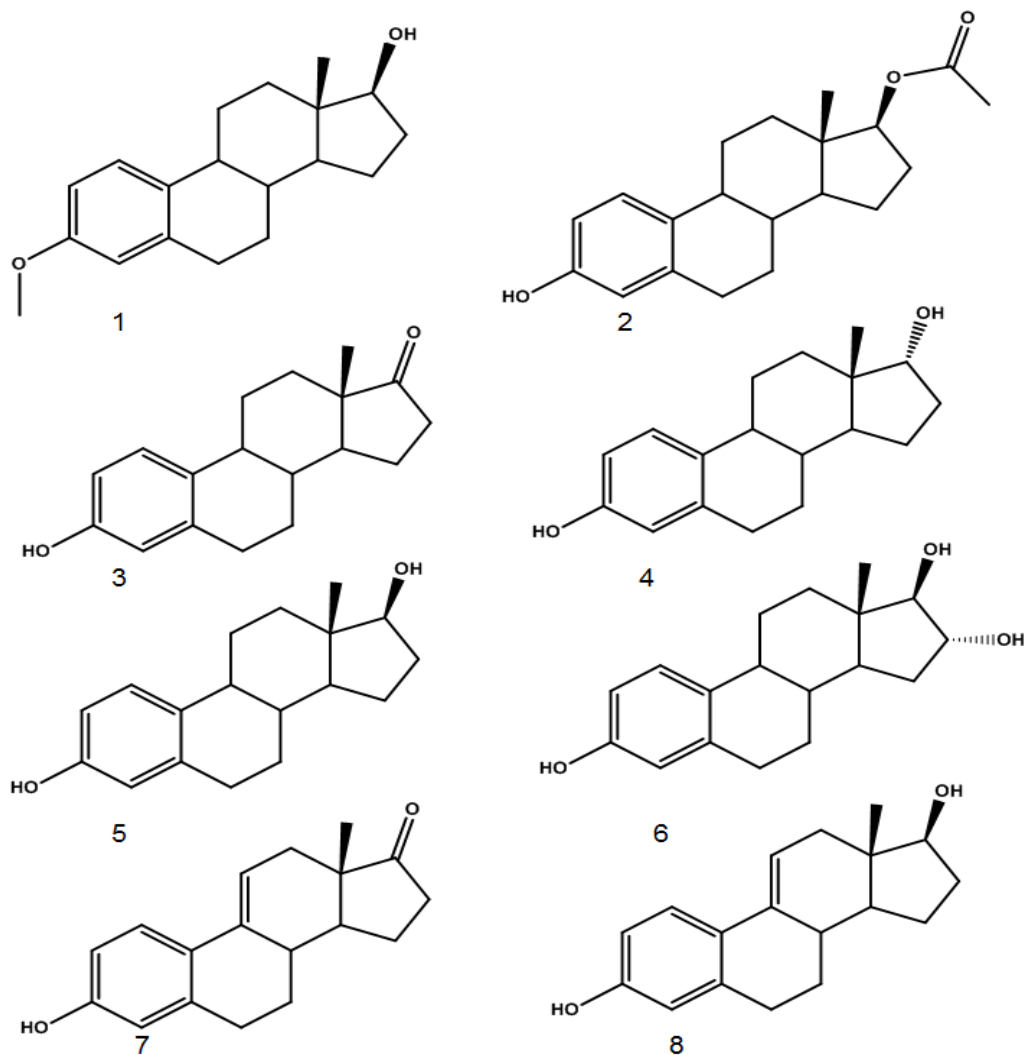
Estrogény sú skupina hormónov zohrávajúcich dôležitú úlohu vo vývine ženy, v reprodukcii, menštruačnom cykle a zároveň ovplyvňujú mnoho orgánov a ďalších pochodov v organizme [39].

Tabuľka 11 uvádza vlastnosti jednotlivých látok tejto skupiny a obrázok 17 ich štruktúry. Základný skelet všetkých látok tvorí estratrien. Prvá uvedená látka bola označená ako EST-ME pretože sa jedná o methoxyestradiol. Jedná sa o methoxyderivát estradiolu s methoxy skupinou v polohe 3. Látka označená ako EST-AC je ester estradiolu s kyselinou octovou v polohe 17. ESN je látka, ktorá má v polohe 17 keto skupinu a jedná sa teda o estron. α -EST a β -EST sú označenia pre α -estradiol a β -estradiol, ktoré majú hydroxy skupinu v polohe 17 orientovanú ako α resp. β . ESTR1 má navyše hydroxyskupinu v polohe 16 a jedná sa teda o estriol. Δ -ESN a Δ -EST sú na rozdiel od predchádzajúcich tetraeny, pričom prvý spomínaný má v polohe 17 keto skupinu a je to teda Δ -estron a druhý hydroxy skupinu Δ -estradiol.

Látky tejto skupiny sú veľmi jednotné a líšia väčšinou iba substituentom v polohe 17 a jeho orientáciou, preto ich separácia je výzvou.

Tabuľka 11 – Vlastnosti estrogénov

Látka	Mw	logP	pKa (kyslé)	pKa (bazické)
EST-ME (methoxyestradiol)	286,41	5,03	15,07	-
EST-AC (estradiol acetát)	312,40	4,98	10,26	-
ESN (estron)	270,37	4,40	10,25	-
α -EST (α -estradiol)	272,38	3,91	10,27	-
β -EST (β -estradiol)	272,38	3,91	10,27	-
ESTRI (estriol)	288,38	2,91	10,25	-
Δ -ESN (Δ -estron)	268,37	3,62	10,41	-
Δ -EST (Δ -estradiol)	270,38	3,59	11,39	-



Obr.17 - štruktúry estrogénov – 1 – EST-ME, 2 – EST-AC, 3 – ESN, 4 - α-EST, 5 - β-EST, 6 – ESTRI, 7 - Δ-ESN, 8 - Δ-EST

3.3.11. Abiraterón a jeho nečistoty

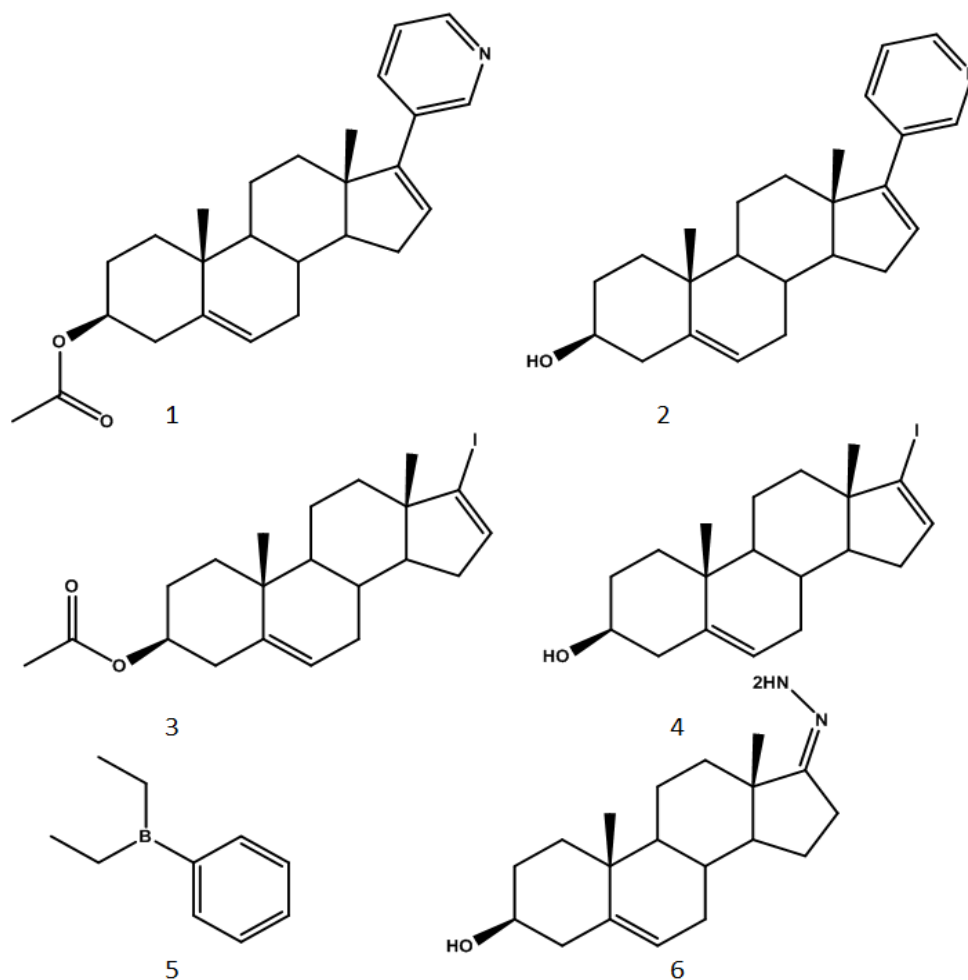
Abiraterón sa využíva na terapiu metastázujúceho kastrochne rezistentného karcinómu prostaty. Liečivo sa používa vo forme acetátu a v podmienkach in vivo sa konvertuje na abiraterón, ktorého mechanizmus účinku spočíva v inhibícii biosyntézy androgénov [40].

Chemicky je abiraterón derivátom androstanu presne 17-(3-pyridyl)androsta-5,16-dien-3β-ol. V našej práci bol označený ako ABI 1 pretože sa môže vyskytnúť ako nečistota vo výslednom prípravku, ktorý ako účinnú látku obsahuje abirateron acetát. ABI 2 je despyridyl derivát abirateron acetátu a ABI 3 je despyridil derivát abirateronu.

V oboch prípadoch pyridyl nahradil jodid. Nečistota ABI 4 je chemicky diethyl(fenyl)boran. ABI 5 má pyridyl v molekule abirateronu nahradený hydrazonom.

Tabuľka 12 – Vlastnosti abiraterón acetátu a nečistôt

Látka	Mw	logP	pKa (kyslé)	pKa (bazické)
Abiraterón acetát	391,55	6,58	-	5,31
ABI 1	349,24	5,66	14,71	5,31
ABI 2	440,39	6,14	NA	NA
ABI 3	398,32	5,22	14,69	-
ABI 4	147,03	1,71	-	4,40
ABI 5	302,15	3,58	15,01	4,56



Obr. 18 – štruktúry abirateron acetátu (1) a jeho nečistôt - 2 – ABI 1, 3 – ABI 2, 4 – ABI 3, 5 – ABI 4, 6 – ABI 5

4. Experimentálna časť

4.1. Štandardné látky

Všetky nižšie zmienené štandardy boli poskytnuté spoločnosťou Zentiva (Praha, ČR). Výnimkou boli látky zo skupiny atorvastatínu získané z EDQM (Štrasburg, FR), látky zo skupiny betablokátorov získané od Sigma Aldrich (Praha, ČR), taktiež štandardy zo skupiny estrogénov s výnimkou Δ -estronu a Δ -etsriolu, ktoré boli získané od Steraloids (Newport, USA).

- Agomelatin, primárny referenčný štandard, Agomelatin-kyselina citrónová co-crystal, $C_{15}H_{17}NO_2 + C_6H_8O_7$, N-(2-(7-methoxynaft-1-yl)ethyl)acetamid – kyselina citrónová co-crystal, Mr 435,44 (243,31 +192,13)
- Amid, nečistota, referenčný štandard, 2-(7-methoxynaft-1-yl)acetamid
- Nitril, nečistota, referenčný štandard, 2-(7-methoxynaft-1-yl)acetonitril
- Soľ, nečistota, referenčný štandard, 2-(7-methoxynaft-1-yl)ethylamín hydrochlorid,
- Kyselina, nečistota, referenčný štandard, 2-(7-methoxynaft-1-yl)octová kyselina
- Amin, nečistota, referenčný štandard, N,N-bis[2-(7-methoxynaft-1-yl)-ethyl]amin
- Dimer, nečistota, referenčný štandard, N,N-bis[2-(7-methoxynaft-1-yl)-ethyl]acetamid
- Atenolol, (RS)-[4-(2-hydroxy-3-isopropylaminopropoxy)fenyl]acetamid,
- Metoprolol,(RS)-3-isopropylamino-1-[4-(2-methoxyethyl)fenoxyl]-2-propanol
- Pindolol, (RS)-1-(4-indolyloxy)-3-isopropylamino-2-propanol
- Acebutolol, (RS)-3-acetyl-4-(2-hydroxy-3-isopropylaminopropoxy)butyranilid
- Labetalol, 5-[1-hydroxy-2[(1-methyl-3-fenylpropyl)amino]ethyl]salicylamid
- Propranolol, 2-hydroxy-5-(1-hydroxy-2-((4-fenylbutan-2-yl)amino)ethyl)benzamid
- Bopindolol, (RS)-1-(terc.butylamino)-3-(2-methyl-4-indolyloxy)-2-propylbenzoát
- Enzalutamid, 4-(3-(4-cyano-3-(trifluoromethyl)fenyl)-5,5-dimethyl-4-oxo-2-thioxoimidazolidin-1-yl)-2-fluoro-N-methylbenzamid
- ENZ 1, 2-((3-fluoro-4-(methylcarbamoyle)fenyl)amino)-2-methylpropionová kyselina
- ENZ 2, 4-(3-(4-cyano-3-(trifluoromethyl)fenyl)-5,5-dimethyl-2,4-dioxoimidazolidin-1-yl)-2-fluoro-N-methylbenzamid

- ENZ 3, 4-(3-(4-kyano-3-(trifluoromethyl)fenyl)-5,5-dimethyl-2,4-dioxoimidazolidin-1-yl)-2-fluoro-N-methylbenzamid
- ENZ 4, 4-thiocyanato-2-(trifluoromethyl)benzonitril
- Atomoxetin, N-methyl-3-fenyl-3-(o-tolyloxy)propan-1-amín
- ATO 1, kyselina mandľová, 2-hydroxy-2-fenylctová kyselina
- ATO 2, o-kresol
- ATO 3, fenol
- ATO 4, N-methyl-3-fenoxy-3-fenylpropan-1-amín
- ATO 5, N-methyl-N-(3-fenyl-3-(o-tolyloxy)propyl)anilín
- ATO 6, fenylmethyl(3-fenyl-3-(o-tolyloxy)propyl)karbamát
- Atorvastatin, (3R,5R)-7-(2,3-bis(4-fluorofenyl)-5-isopropyl-4-(fenylkarbamoyl)-1H-pyrrol-1-yl)-3,5-dihydroxyheptanová kyselina
- Imp A, (3R,5R)-3,5-dihydroxy-7-(2-isopropyl-4,5-difenyl-3-(fenylkarbamoyl)-1H-pyrrol-1-yl)heptanová kyselina
- Imp B, (3S,5R)-7-(2-(4-fluorofenyl)-5-isopropyl-3-fenyl-4-(fenylkarbamoyl)-1H-pyrrol-1-yl)-3,5-dihydroxyheptanová kyselina
- Imp C, (3R,5R)-7-(2,3-bis(4-fluorofenyl)-5-isopropyl-4-(fenylkarbamoyl)-1H-pyrrol-1-yl)-3,5-dihydroxyheptanová kyselina
- Imp D, 3-(4-fluorobenzoyl)-2-isobutyryl-N,3-difenyloxiran-2-karboxamid
- Lac, 5-(4-fluorofenyl)-1-(2-((2S,4R)-4-hydroxy-6-oxotetrahydro-2H-pyran-2-yl)ethyl)-2-isopropyl-N,4-difenyl-1H-pyrrole-3-karboxamid
- Ezetimib, (3R,4S)-1-(4-fluorofenyl)-3-((S)-3-(4-fluorofenyl)-3-hydroxypropyl)-4-(4-hydroxyfenyl)azetidín-2-on
- EZE 21, 3-[5-(4-fluorofenyl)-5,5-dimethoxy-1-oxopentyl]-4-fenyl-2-oxazolidinon
- EZE 22, benzyl 4-((1S,2R)-5-(4-fluorofenyl)-1-((4-fluorofenyl)amino)-5-oxo-2-((S)-2-oxo-4-fenyloxazolidín-3-karbonyl)pentyl)fenyl) karbonát
- EZE 23, benzyl 4-((1S,2R,5S)-5-(4-fluorofenyl)-1-((4-fluorofenyl)amino)-5-hydroxy-2-((S)-2-oxo-4-fenyloxazolidín-3-karbonyl)pentyl)fenyl) karbonát
- EZE 24, benzyl 4-((1S,2R,5S)-5-(4-fluorofenyl)-1-((4-fluorofenyl)amino)-2-((S)-2-oxo-4-fenyloxazolidín-3-karbonyl)-5-((trimethylsilyl)oxy)pentyl)fenyl) karbonát

- Tikagrelor, (1S,2S,3R,5S)-3-(7-(((1S,2S)-2-(3,4-difluorofenyl)cyklopropyl)amino)-5-(propylthio)-3H-[1,2,3]triazolo[4,5-d]pyrimidin-3-yl)-5-(2-hydroxyethoxy)cyklopentan-1,2-diol
- TICA 1, (1S,2S,3R,5S)-3-(7-(((1S,2S)-2-(4-fluorofenyl)cyklopropyl)amino)-5-(propylthio)-3H-[1,2,3]triazolo[4,5-d]pyrimidin-3-yl)-5-(2-hydroxyethoxy)cyklopentan-1,2-diol
- TICA 2, (1S,2S,3R,5S)-3-(7-(((1S,2S)-2-(4-chlorofenyl)cyklopropyl)amino)-5-(propylthio)-3H-[1,2,3]triazolo[4,5-d]pyrimidin-3-yl)-5-(2-hydroxyethoxy)cyklopentan-1,2-diol
- TICA 3, (1S,2R,3S,4R)-4-(7-(((1S,2S)-2-(3,4-difluorofenyl)cyklopropyl)amino)-5-(propylthio)-3H-[1,2,3]triazolo[4,5-d]pyrimidin-3-yl)cyklopentan-1,2,3-triol
- Vardenafil, 2-(2-ethoxy-5-((4-ethylpiperazin-1-yl)sulfonyl)fenyl)-5-methyl-7-propylimidazo[5,1-f][1,2,4]triazin-4(1H)-on
- VAR 1, 2-(2-ethoxyfenyl)-5-methyl-7-propylimidazo[5,1-f][1,2,4]triazin-4(1H)-on
- VAR 2, 2-(5-chloro-2-ethoxyfenyl)-5-methyl-7-propylimidazo[5,1-f][1,2,4]triazin-4(1H)-on
- VAR 3, 2-(2-ethoxy-5-(piperazin-1-ylsulfonyl)fenyl)-5-methyl-7-propylimidazo[5,1-f][1,2,4]triazin-4(1H)-on
- VAR 4, 2-(2-ethoxy-5-(piperazin-1-ylsulfonyl)fenyl)-5-methyl-7-propylimidazo[5,1-f][1,2,4]triazin-4(1H)-on
- VAR 5, 2,2'-((piperazine-1,4-disulfonyl)bis(6-ethoxy-3,1-fenylene))bis(5-methyl-7-propylimidazo[5,1-f][1,2,4]triazin-4(1H)-on)
- Dasatinib, N-(2-chloro-6-methylfenyl)-2-((6-(4-(2-hydroxyethyl)piperazin-1-yl)-2-methylpyrimidin-4-yl)amino)thiazol-5-karboxamid
- DAS 1, N-(2-chloro-6-methylfenyl)-2-((2-methyl-6-(piperazin-1-yl)pyrimidin-4-yl)amino)thiazol-5-karboxamid
- DAS 2, 4-(6-((5-((2-chloro-6-methylfenyl)karbamoyl)thiazol-2-yl)amino)-2-methylpyrimidin-4-yl)-1-(2-hydroxyethyl)piperazin 1-oxid
- DAS 3, 2-amino-N-(2-chloro-6-methylfenyl)thiazol-5-karboxamid
- DAS 4, 2-((6-chloro-2-methylpyrimidin-4-yl)amino)-N-(2-chloro-6-methylfenyl)thiazol-5-karboxamid

- DAS 5, N-(2-chloro-6-methylfenyl)-2-((2-methylpyrimidin-4-yl)amino)thiazol-5-karboxamid
- EST-ME, 3-methoxy-13,17-dimethyl-7,8,9,11,12,13,14,15,16,17-dekahydro-6H-cyklopenta[a]fenantren
- EST-AC, 3-hydroxy-13-methyl-7,8,9,11,12,13,14,15,16,17-dekahydro-6H-cyklopenta[a]fenantren-17-yl acetát
- ESN, (13S)-3-hydroxy-13-methyl-6,7,8,9,11,12,13,14,15,16-dekahydro-17H-cyklopenta[a]fenantren-17-on
- α -EST, (13S,17R)-13-methyl-7,8,9,11,12,13,14,15,16,17-dekahydro-6H-cyklopenta[a]fenantren-3,17-diol
- β -EST, (13S,17S)-13-methyl-7,8,9,11,12,13,14,15,16,17-dekahydro-6H-cyklopenta[a]fenantrene-3,17-diol
- ESTRI, (13S,16R,17R)-13-methyl-7,8,9,11,12,13,14,15,16,17-dekahydro-6H-cyklopenta[a]fenantrene-3,16,17-triol
- Δ -ESN, (13S)-3-hydroxy-13-methyl-6,7,8,12,13,14,15,16-oktahydro-17H-cyklopenta[a]fenantren-17-on
- Δ -EST, (13S,17S)-13-methyl-7,8,12,13,14,15,16,17-oktahydro-6H-cyklopenta[a]fenantren-3,17-diol
- Abiraterón acetát, 10,13-dimethyl-17-(pyridin-3-yl)-2,3,4,7,8,9,10,11,12,13,14,15-dodekahydro-1H-cyklopenta[a]fenantren-3-yl acetát
- ABI 1, 10,13-dimethyl-17-(pyridin-3-yl)-2,3,4,7,8,9,10,11,12,13,14,15-dodekahydro-1H-cyklopenta[a]fenantren-3-ol
- ABI 2, 17-iodo-10,13-dimethyl-2,3,4,7,8,9,10,11,12,13,14,15-dodekahydro-1H-cyklopenta[a]fenantren-3-yl acetát
- ABI 3, 17-iodo-10,13-dimethyl-2,3,4,7,8,9,10,11,12,13,14,15-dodekahydro-1H-cyklopenta[a]fenantren-3-ol
- ABI 4, diethyl(fenyl)boran
- ABI 5, 17-hydrazono-10,13-dimethyl-2,3,4,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17-tetradekahydro-1H-cyklopenta[a]fenantren-3-ol

4.2. Rozpúšťadlá

- Acetonitril, Acetonitrile LC-MS Chromasolv[®], Sigma-Aldrich (Praha, ČR), 2,5l, C₂H₃N, Mr 41,05, čistota ≥ 99%
- Ultračistá voda
Destilácia vody pomocou prístroja Milli-Q RG prebehla na Katedre analytickej chémie. K filtrácii pred každým pripravením mobilnej fáze či pufru určených pre UHPLC bolo využité vákuové čerpadlo a filter 0,20µm.

4.3. Ďalšie chemikálie

- Hydroxid amónny ≥ 25%, Sigma-Aldrich (Praha, ČR), 100 ml, NH₃, Mr 35,05
- Metanol, LC-MS Chromasolv[®], Sigma-Aldrich (Praha, ČR), 2,5 l, CH₄O, Mr 32,04, čistota ≥ 99%
- 2-propanol, LC-MS Chromasolv[®], Sigma-Aldrich (Praha, ČR) 2,5 l, C₃H₆O, Mr 60,10, čistota ≥ 99,9%
- Kyselina mravčia, Sigma-Aldrich (Praha, ČR), 100ml, HCOOH, Mr 46,03, čistota ≥ 95%
- Kyselina octová, Acetic acid, Sigma-Aldrich (Praha, ČR), 500 ml, C₂H₄O₂, Mr 60,05, čistota ≥ 99,7
- Mravčan amónny, Sigma-Aldrich (Praha, ČR), 1 kg, CH₅NO₂, 63,06, čistota ≥ 98%
- Octan amónny, Sigma-Aldrich (Praha, ČR), 1 kg, C₂H₇NO₂, Mr 77,08, čistota ≥ 98%
- Kyselina trifluorooctová, Sigma-Aldrich (Praha, ČR), 500 ml, C₂HF₃O₂, Mr 114,02, čistota 99%
- Dietylamin, Sigma-Aldrich (Praha, ČR), 100 ml, C₄H₁₁N, Mr 73,14, čistota 99,5%
- Pufir pH 4,01 pre kalibráciu pH metra, Technical Buffer pH 4,01, WTW (Londýn, UK)
- Pufir pH 7,00 pre kalibráciu pH metra, Technical Buffer pH 7,00, WTW (Londýn, UK)
- Pufir pH 10,00 pre kalibráciu pH metra, Technical Buffer pH 10,00, WTW (Londýn, UK)

4.4. Prístrojové vybavenie

- UHPLC chromatografický system Acquity UPLC (Waters, Milford, USA)
 - automatický dávkovač, čerpadlo, kolónový termostat, PDA detektor
- Analytická kolóna (Waters, Milford, USA)
 - Acquity UPLC BEH C18, 100 x 2,1 mm, 1,7 µm
- Analytická kolóna (Thermo Scientific, Waltham, USA)
 - Thermo Scientific Hypercarb®, 50 x 3 mm, 3µm
- Automatické mikropipety so špičkami, Biohit (Helsinki, FI)
- Analytické váhy, Sartorius (Goettingen, DE)
- Magnetická miešačka, RCT basic IKAMAG, IKA®Werke GmbH & Co. KG, (Staufen im Breisgau, DE)
- Membránové filtre, Albet, Chromservis (Praha, ČR)
- pH meter HANNA HI3512, HANNA instruments (Praha, ČR)
- Skrutkovacie vialky s uzávermi, Vitrum (Stříbrná Skalice, ČR)
- Vákuová pumpa, Vacc-space, Chromservis (Praha, ČR)

4.5. Pracovný postup

4.5.1. Príprava štandardov

Zásobné roztoky štandardov boli pripravené navážením približne 1 mg daného práškového štandardu vo vialke. Následne boli navážené štandardy priamo vo vialke rozpustené v 50% acetonitrile (ACN), tak aby výsledná koncentrácia roztoku bola 1mg/ml.

Potrebných nižších koncentrácií bolo dosiahnutých riedením zásobných roztokov 50% acetonitrilom. Do vialky bolo mikropipetou prenesených 100 µl zásobného roztoku a tá bola doplnená 50% acetonitrilom na 1 ml. Tým bola dosiahnutá koncentrácia 0,1mg/ml.

4.5.2. Príprava zmesí štandardov analyzovaných látok

Pri testovaní separačného potenciálu boli použité roztoky zmesí štandardov a ich nečistôt v rámci jednotlivých skupín. Z každého zásobného roztoku štandardov danej skupiny s koncentráciou 1 mg/ml bolo odobraných mikropipetou 100 µl do spoločnej vialky a doplnených na objem 1 ml 50% acetonitrilom. Tým bola dosiahnutá koncentrácia jednotlivých látok v zmesi 0,1 mg/ml.

4.5.3. Príprava mobilných fáz, aditív a pufrov

CHARAKTER	MF	PRÍPRAVA
ORGANICKÁ ZLOŽKA	ACN	
	ACN:IPA 1:1	Do 500 ml odmernej banky bolo prostredníctvom odmerného valca naplnených 250 ml acetonitrilu a banka bola následne isopropanolom doplnená po rysku.
	ACN:IPA 1:3	Do 500 ml odmernej banky bolo prostredníctvom odmerného valca naplnených 125 ml acetonitrilu a banka bola následne isopropanolom doplnená po rysku.
VODNÁ ZLOŽKA	voda	Ultračistá voda, ktorá bola pred použitím prefiltrovaná.
	Pufr pH 3 10 mM	Zásobný roztok (200 mM): 3,15g mravčanu amónneho bolo rozpustených v 225 ml ultračistej vody. K roztoku bolo pridaných 6,25 ml kyseliny mravčej. Skontrolovalo sa pH a doplnilo do 250 ml ultračistou vodou. Riedenie (10 mM): 12,5 ml zásobného roztoku bolo v čase potreby napipetované do 250 ml odmernej banky a doplnené po rysku ultračistou vodou. Pred použitím bol daný roztok prefiltrovaný.
	Pufr pH 9 10 mM	Zásobný roztok (200 mM): 3,85 octanu amónneho bolo rozpustených v 225 ml ultračistej vody. K roztoku bolo pridaných 20 ml hydroxidu amónneho. Skontrolovalo sa pH a doplnilo ultračistou vodou do 250 ml. Riedenie (10 mM): 12,5 ml zásobného roztoku bolo v čase potreby napipetované do 250 ml odmernej banky a doplnené po rysku ultračistou vodou. Pred použitím bol daný roztok prefiltrovaný.
	TFA 0,1%	0,25 ml kyseliny trifluoroctovej bolo napipetovaných do 250 ml odmernej banky a doplnené ultračistou a prefiltrovanou vodou po rysku.

VODNÁ ZLOŽKA (POKRAČOVANIE)	TFA 0,5%	1,25 ml kyseliny trifluoroctovej bolo napipetovaných do 250 ml odmernej banky a doplnené ultračistou a prefiltrovanou vodou po rysku.
	Kyselina mravčia 0,1%	0,25 ml kyseliny mravčej bolo napipetovaných do 250 ml odmernej banky a doplnené ultračistou a prefiltrovanou vodou po rysku.
	Kyselina mravčia 0,5%	1,25 ml kyseliny mravčej bolo napipetovaných do 250 ml odmernej banky a doplnené ultračistou a prefiltrovanou vodou po rysku.
	Hydroxid amónny 0,1%	1 ml 25% roztoku hydroxidu amónneho bol napipetovaný do do 250 ml odmernej banky a doplnený ultračistou a prefiltrovanou vodou po rysku.
	DEA 0,1%	0,25 ml diethylamínu bolo napipetovaných do 250 ml odmernej banky a doplnené ultračistou a prefiltrovanou vodou po rysku.
	MeOH + Mrav. 0,1%	0,25 ml kyseliny mravčej bolo napipetovaných 250 ml odmernej banky a doplnené methanolom po rysku.

4.5.4. Postup a podmienky separácii

Analýzy boli realizované na ultra-vysokoučinnom kvapalinovom chromatografickom systéme Acquity UPLC (Waters, USA) s UV detekciou pri 225 nm. Ako referenčná stacionárna fáza bola zvolená kolóna Acquity UPLC BEH C18, 100 x 2,1 mm, 1,7 µm (Waters, USA). Organickou časťou mobilnej fázy bol acetonitril a ako vodná zložka bola použitá voda, následne tlmivý roztok mravčanu amónneho s pH 3,0 a tlmivý roztok octanu amónneho s pH 9,0. Prietok bol nastavený na 0,5 ml/min s teplotou kolóny na 40°C a dĺžka analýzy bola 5 minút. Gradient začínal v pomere 95/5 vodnej a organickej zložky mobilnej fázy a končiaci v piatej minúte v pomere 5/95 pri využití gradientovej krivky 6.

Ako stacionárna fáza na otestovanie separačného potenciálu porézneho grafitového uhlíka bola použitá kolóna Thermo Scientific Hypercarb®, 50 x 3 mm, 3µm (Thermo Scientific, USA). Podmienky separácie a mobilné fázy boli zvolené na základe odporúčaní výrobcu [41]. Gradient začínal na pomere 70/30 vodnej a organickej zložky do piatej minúty, s použitím gradientovej krivky 6. Následne pokračoval v pomere 0/100

do ôsmej minúty, kedy sa znova vracal na počiatočný pomer 70/30, pri gradientovej krivke 11. Prietok bol nastavený na 1 ml/min pri teplote 40 °C a dĺžka analýzy bola 8 minút. Bolo vyskúšaných viacero mobilných fáz. Ako organická časť mobilnej fáze bol využitý acetonitril, ďalej acetonitril s isopropanolom v pomere 1:1 a ako vodná zložka boli vyskúšané vodné roztoky 0,1% TFA, 0,5% TFA, 0,1% kys. mravčia, 0,5% kys. mravčia, 0,1% hydroxid amónny, 0,1% diethylamín, tlmivé roztoky s pH 3 a 9. Ďalšie obmenou bolo vyskúšanie acetonitrilu a isopranoalom v pomere 1:3 ako organickej zložky a 0,1% TFA ako vodnej zložky. Taktiež bola vyskúšaná zámena vody za methanol vo vodnej zložke a mobilná fáza mala teda podobu ACN:IPA v pomere 1:1 a 0,1% kyselina mravčia v methanole.

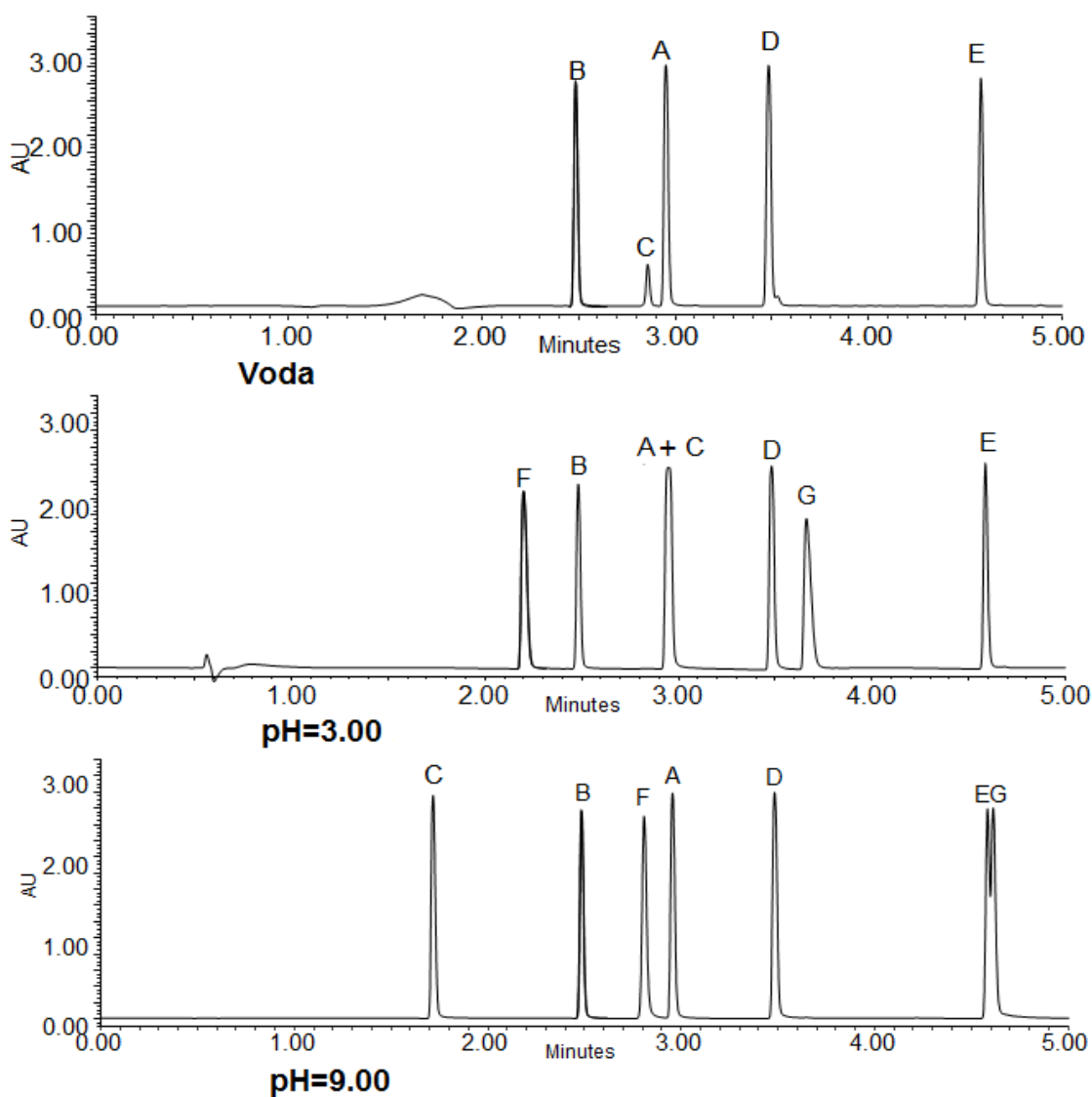
Následné zmeny sa týkali teploty. Za využitia mobilnej fázy ACN:IPA 1:1 a 0,1% TFA boli realizované separácie pri teplotách 50, 60, 70, 80 a 90 °C. Posledné analýzy sa týkali využitia isokratickej elúcie. Mobilná fáza bola zložená opäť z ACN:IPA 1:1 a 0,1% TFA. Iniciálny pomer bol 70/30 do piatej minúty, ďalej bol pomer 0/100 do ôsmej minúty a na koniec sa vrátil na 70/30. Prietok bol 1 ml/min. Miesto 70/30 bol vyskúšaný aj pomer 80/20 a 90/10 ale prietok bol znížený na 0,8 ml/min z dôvodu zvýšeného tlaku v systéme zapríčineného pravdepodobne opotrebovaním kolóny.

5. Výsledky a diskusia

5.1. Analýza na referenčnej stacionárnej fáze BEH C18

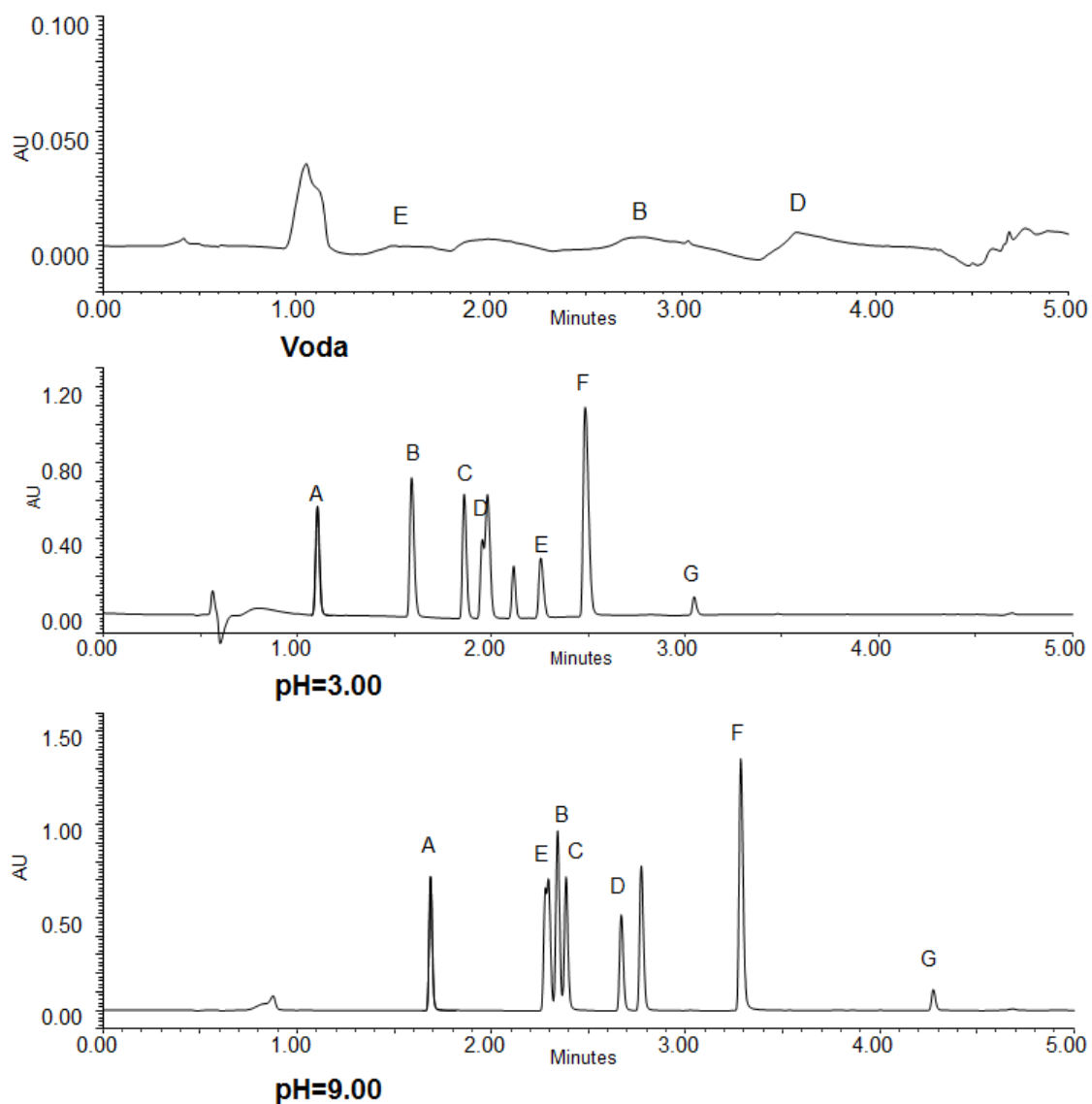
Pre porovnanie so stacionárnou fázou na báze grafitového uhlíka bola ako referenčná stacionárna fáza použitá kolóna BEH C18. Jednotlivé skupiny analytov boli separované za podmienok uvedených v kapitole 4.5.4. Organickú časť mobilnej fázy tvoril acetonitril a ako vodná časť boli využité voda a tlmivé roztoky s pH 3 a 9. Tieto podmienky boli zvolené pre porovnanie elúcie jednotlivých analytov v kyslom a bazickom prostredí.

Obr. 19 znázorňuje chromatografickú separáciu zmesi agomelatínu a jeho nečistôt. Ako problematické sa pri tejto sepárácii javilo, že nečistoty soľ (F) a amín (G) neboli eluované pri použití vody a teda sa nezobrazili vo výslednom chromatograme pravdepodobne v dôsledku príliš vysokej retencie. Taktiež blízka elúcia agomelatínu (A) a kyseliny (C), ktoré pri pH 3,0 až koeluovali. Najlepšia selektivita bola dosiahnutá pri bazickom pH. Nečistota C bola menej zadržovaná v bazickom prostredí v dôsledku jej nízkej hodnoty pKa a došlo k jej oddeleniu od agomelatínu, ktorý sa správal ako neutrálna látka. Problémom však bola elúcia diméru (E) a amínu (G) v blízkom retenčnom čase s malým rozlíšením.



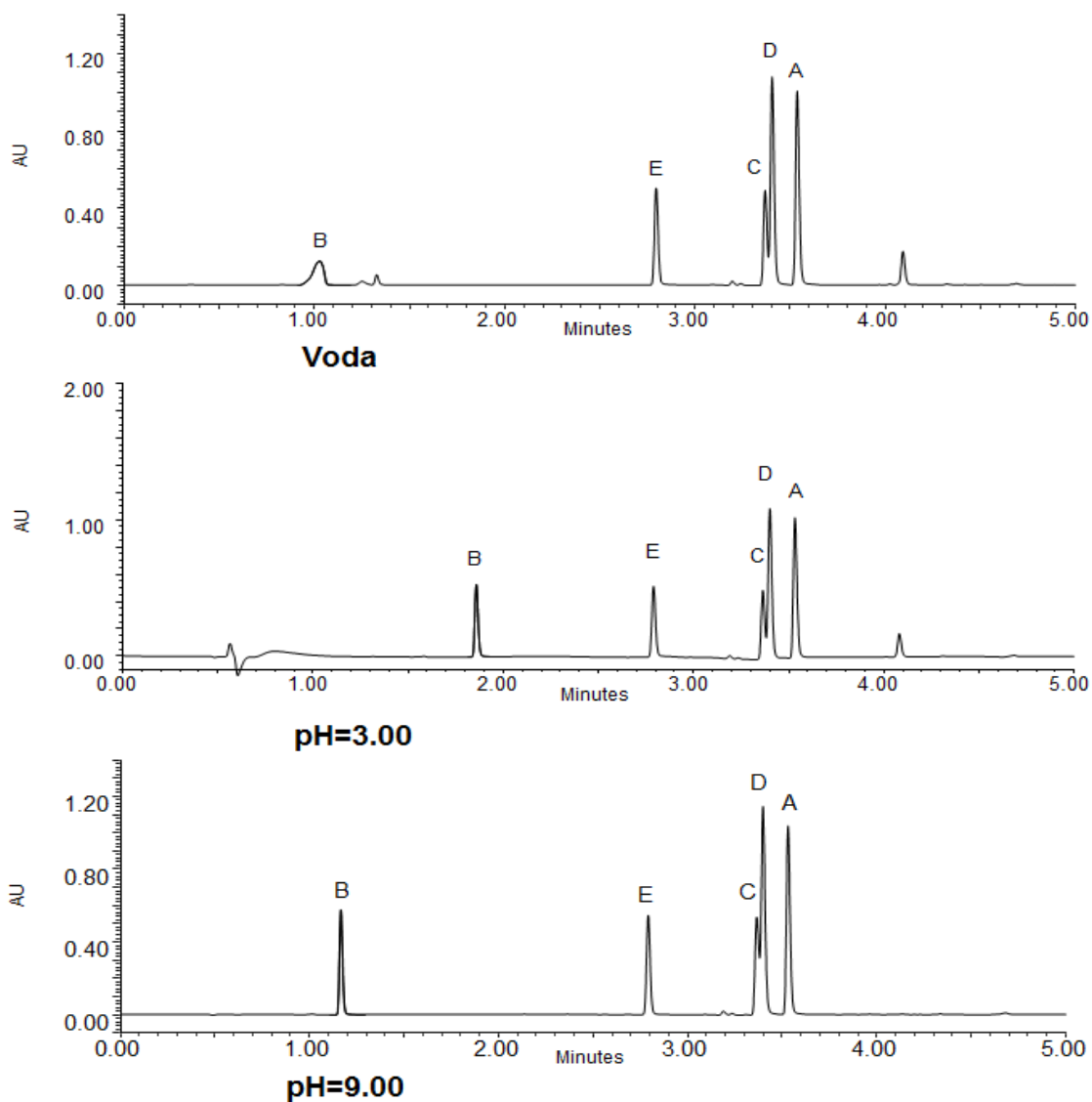
Obr. 19 - Separácia zmesí agomelatínu a jeho nečistôt na kolóne BEH C18. A – agomelatín, B – amid, C – kyselina, D – nitril, E – dimer, F – soľ, G – amín.

Obr. 20 znázorňuje separáciu zmesi betablokátorov za rovnakých separačných podmienok. Vo vodnom prostredí je viditeľné veľké rozmytie elučných zón a nedostatočné rozlíšenie, pretože sa jedná o bázičné látky a pre optimalizáciu je nutné použitie pufru. Pri použití tlmivých roztokov sú výsledky podstatne lepšie, bola dosiahnutá lepšia selektivita avšak mnohé látky sa eluujú vo veľmi blízkych retenčných časoch. Najoptimálnejšia sa javila separácia pri pH 3. Pri pH 9 došlo k celkovému posunu retenčných časov, pretože vzhľadom na bazicitu daných látok boli v prostredí s vyšším pH viac zadržané na kolóne. Problémom bola veľmi blízka elúcia pindololu (B), acebutololu (C) a labetalolu (E) s nízkym rozlíšením.



Obr.20 – Separácia zmesí betablokátorov na kolóne BEH C18. A – atenolol, B – pindolol, C – acebutolol, D – metoprolol, E – labetalol, F – propranolol, G – bopindolol

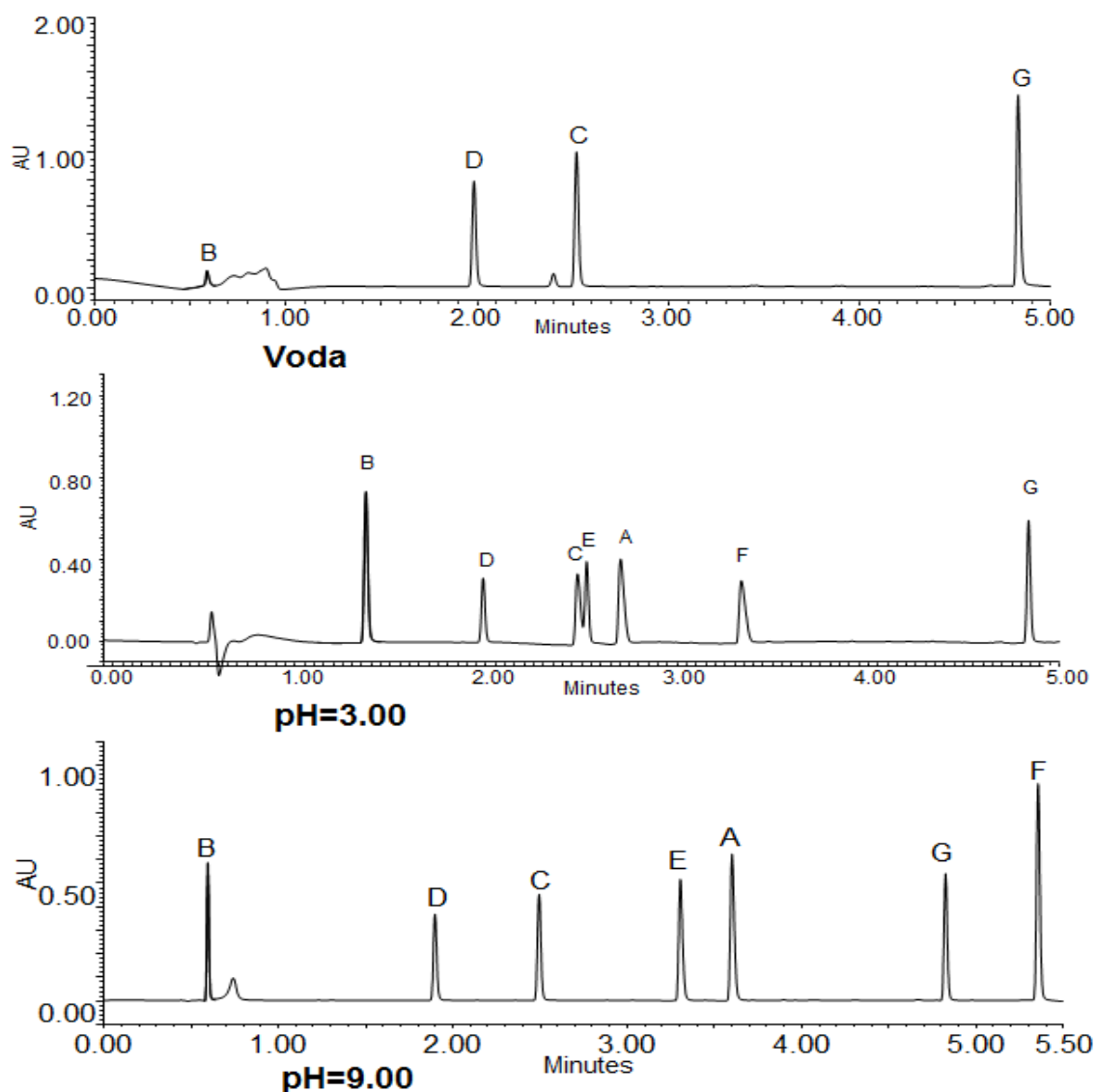
Obr. 21 zobrazuje separáciu zmesi enzalutamidu a jeho potencionalných nečistôt. Pri zmene pH nedošlo k výraznejším zmenám, jedná sa teda o neutrálne látky. Výnimkou je nečistota ENZ-1 (B), u ktorej došlo k zvýšenej retencii pri kyslom pH, pretože sa jedná o kyselinu. Problémom je však vo všetkých troch prípadoch blízka elúcia nečistôt ENZ-2 (C) a ENZ-3 (D) s nízkym rozlíšením. Zmienené nečistoty taktiež eluujú blízko účinnej látky (A), čo je pochopiteľné vzhľadom na vysokú štruktúrnu podobnosť a fyzikálne-chemické vlastnosti týchto látok (viz kap. 3.3.3).



Obr.21 – Separácia zmesí enzalutamidu a jeho nečistôt na kolóne BEH C18. A – enzalutamid, B – ENZ-1, C – ENZ-2, D – ENZ-3, E – ENZ-4.

Obr.22 zhrňuje chromatogramy získané pri separácii zmesi atomoxetínu a jeho nečistôt. Pri použití vody došlo k rozmytiu kyseliny mandľovej (B). Taktiež účinná látka (A) a nečistoty fenoxý (E) a benzyl (F) neboli eluované v dôsledku vysokej retencie pretože sa jedná o silne bazické látky. Lepšie výsledky boli dosiahnuté za použitia tlmivých roztokov, pričom obzvlášť dobré výsledky vzhľadom na selektivitu a rozlíšenie boli pri pH 9. Látky A, E a F boli pri vyššom pH viacej zadržované, čo vyplýva z ich bazických vlastností. Pri pH 3 bola problémom blízka retencia a malé rozlíšenie nečistôt kresolu (C) a fenoxý (E). Kyselina mandľová (B) bola vzhľadom na svoje kyslé vlastnosti

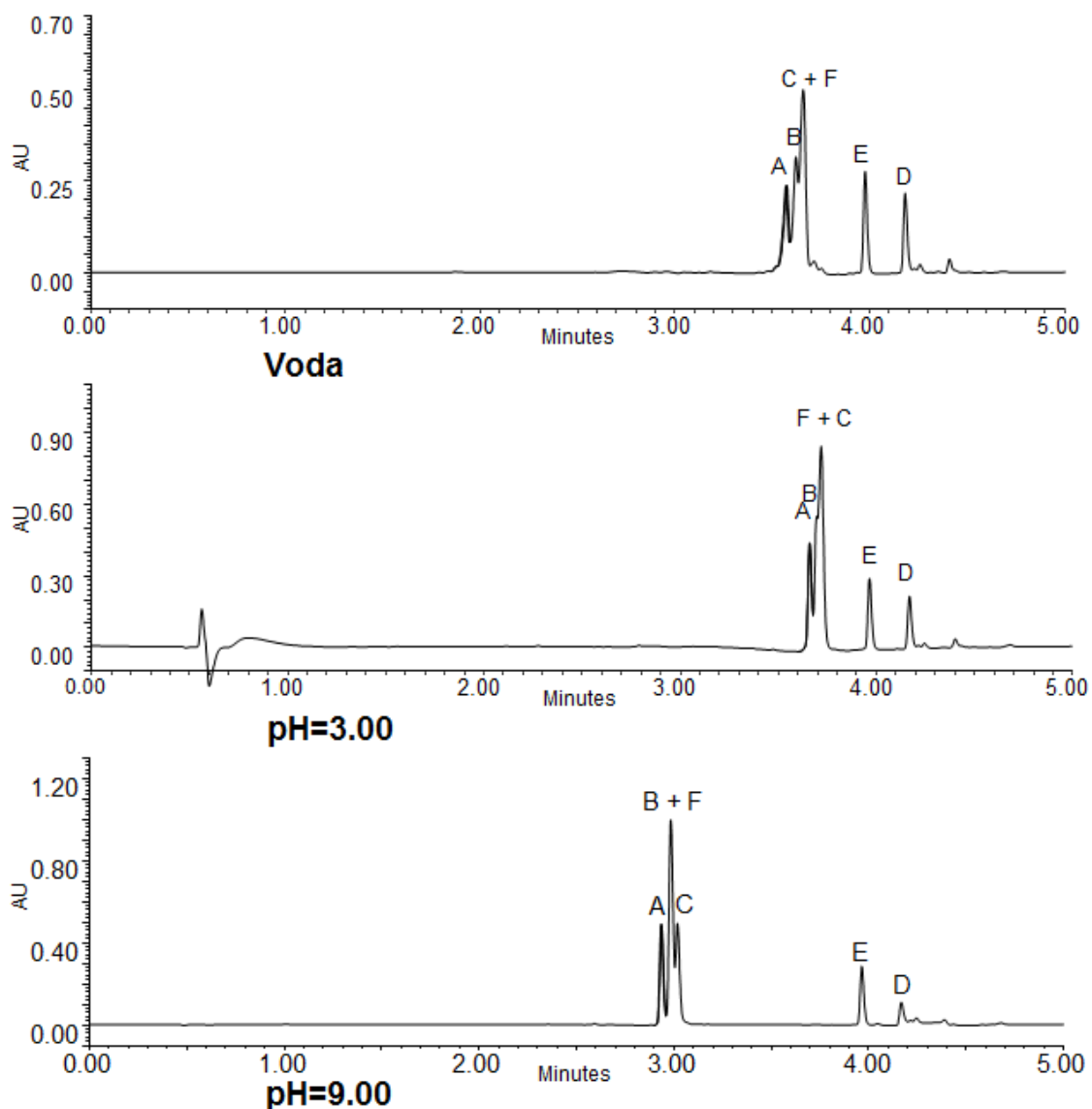
pri nižšom pH viac zadržovaná. Nečistoty C a D vystupovali ako neutrálne látky a ich retenčný čas sa pri zmene podmienok nemenil.



Obr.22 – Separácie zmesí atomoxetínu a jeho potencionálnych nečistôt na kolóne BEH C18. A – atomoxetín, B – mandľová kyselina, C – kresol, D – fenol, E – ato-fenoxy, F – benzyl-ato, G – karbamát.

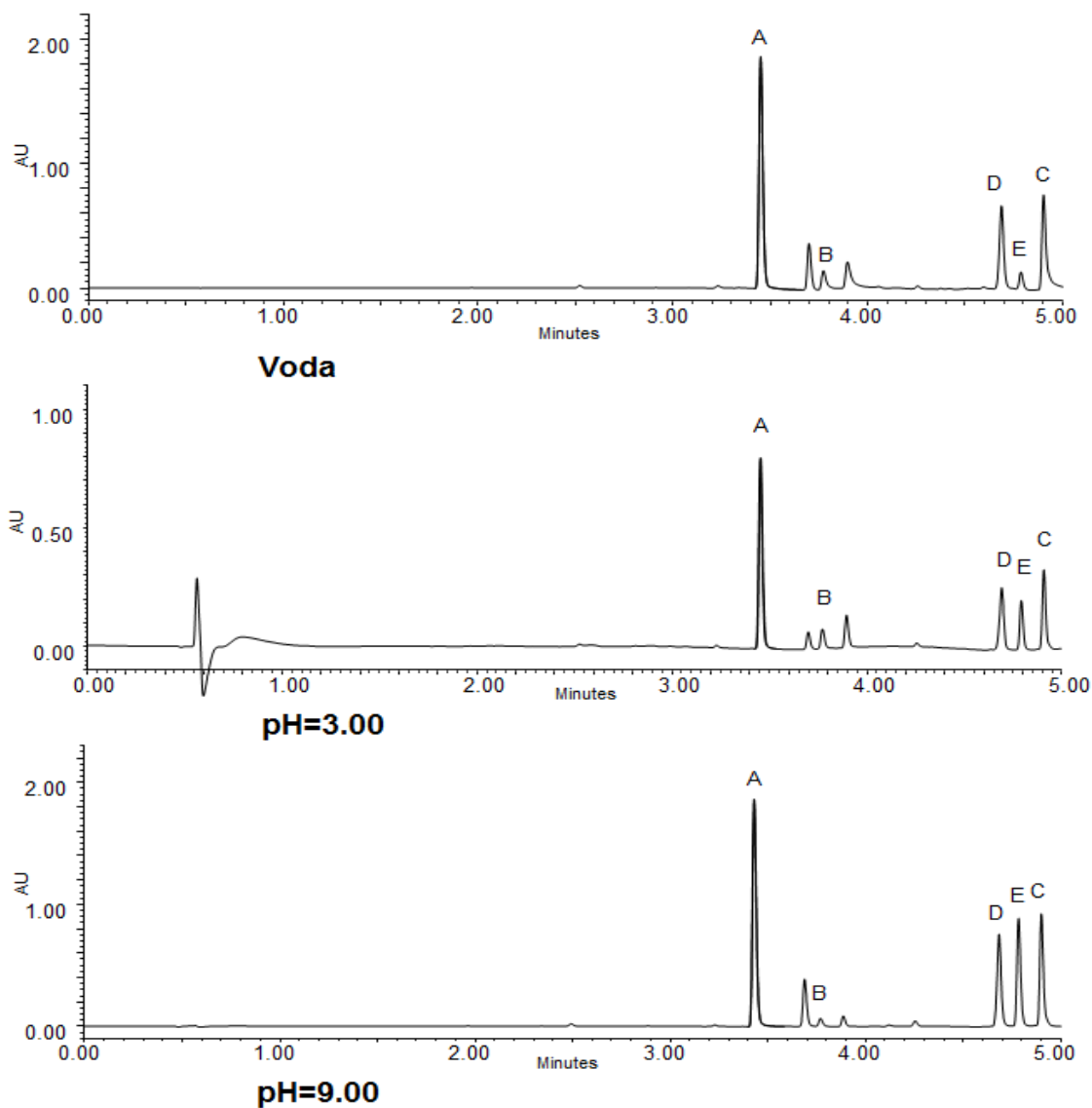
Z obr.23 je zjavné, že využitím daných podmienok nebola dosiahnutá optimálna selektivita a rozlíšenie. Hlavným problémom bolo, že nečistoty A, B, C a aj samotná účinná látka F mali veľmi blízke retenčné časy a dochádzalo ku koelúcii. Je to evidentné vzhľadom na veľmi blízku štruktúru a fyzikálne-chemické vlastnosti daných látok (viz kap. 3.3.5.). Zároveň v bázickom prostredí došlo k posunu retenčný časov spomínaných látok. Keďže sa jedná o slabé kyseliny v kyslom prostredí boli viac zadržované s vyšším

retenčným časom a v prostredí s vyšším pH boli zadržované menej a ich retenčný čas bol nižší.



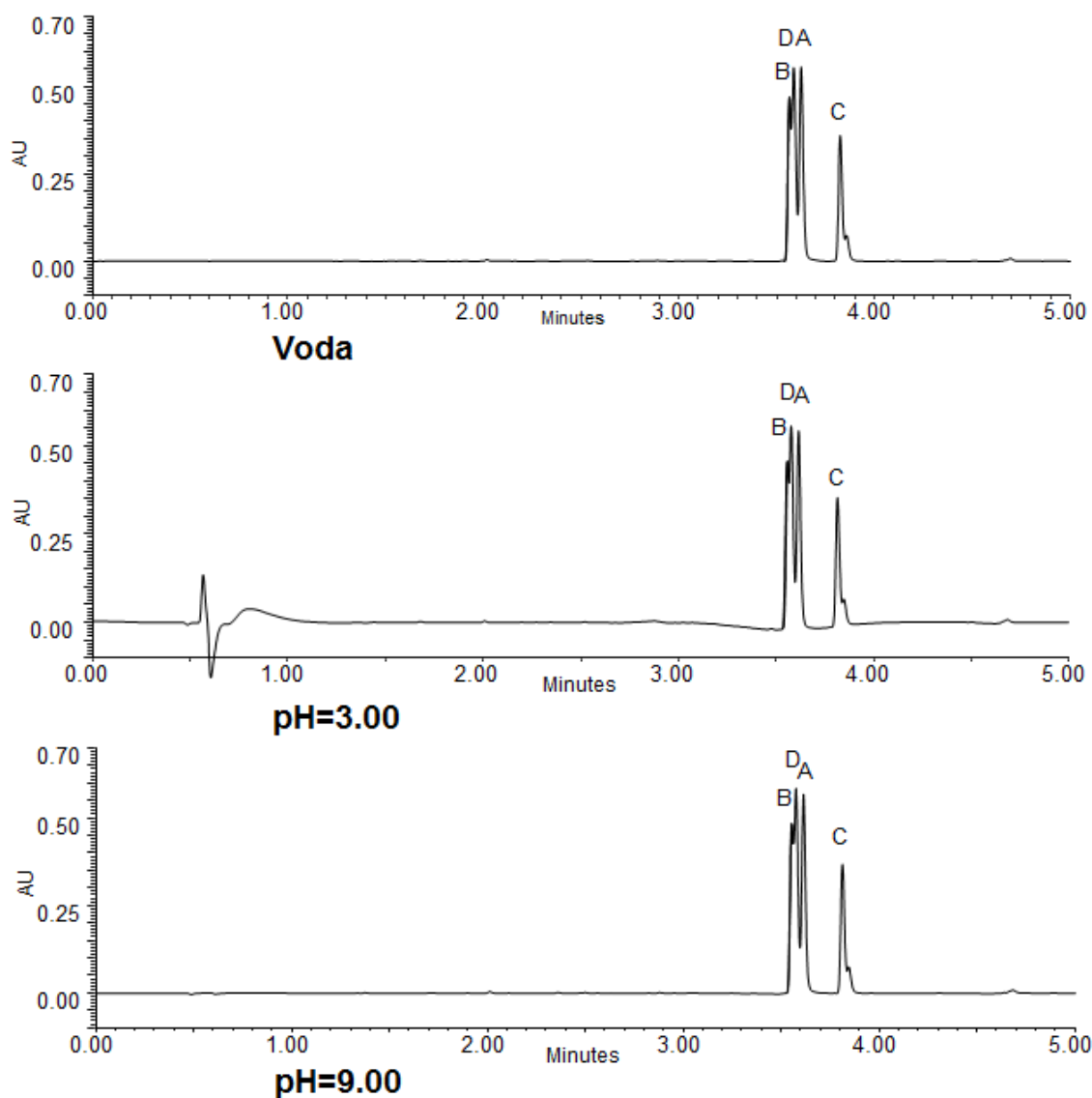
Obr.23 – Separácia zmesí atorvastatínu a jeho potencionálnych nečistôt na kolóne BEH C18. A – IMP A, B –IMP B, C – IMP C, D – IMP D, E – LAC, F – atorvastatín.

Obr.24 znázorňuje separáciu ezetimibu a jeho nečistôt. Boli dosiahnuté podobné výsledky pri všetkých použitých podmienkach. Jedná sa teda o neutrálne látky. Nečistoty C, E, D mali veľmi blízke retenčné časy, čo vyplýva z ich štruktúrnej príbuznosti a podobných vlastností (viz kap. 3.3.6). Pozitívom bola dobrá separácia účinnej látky (A) od nečistôt.



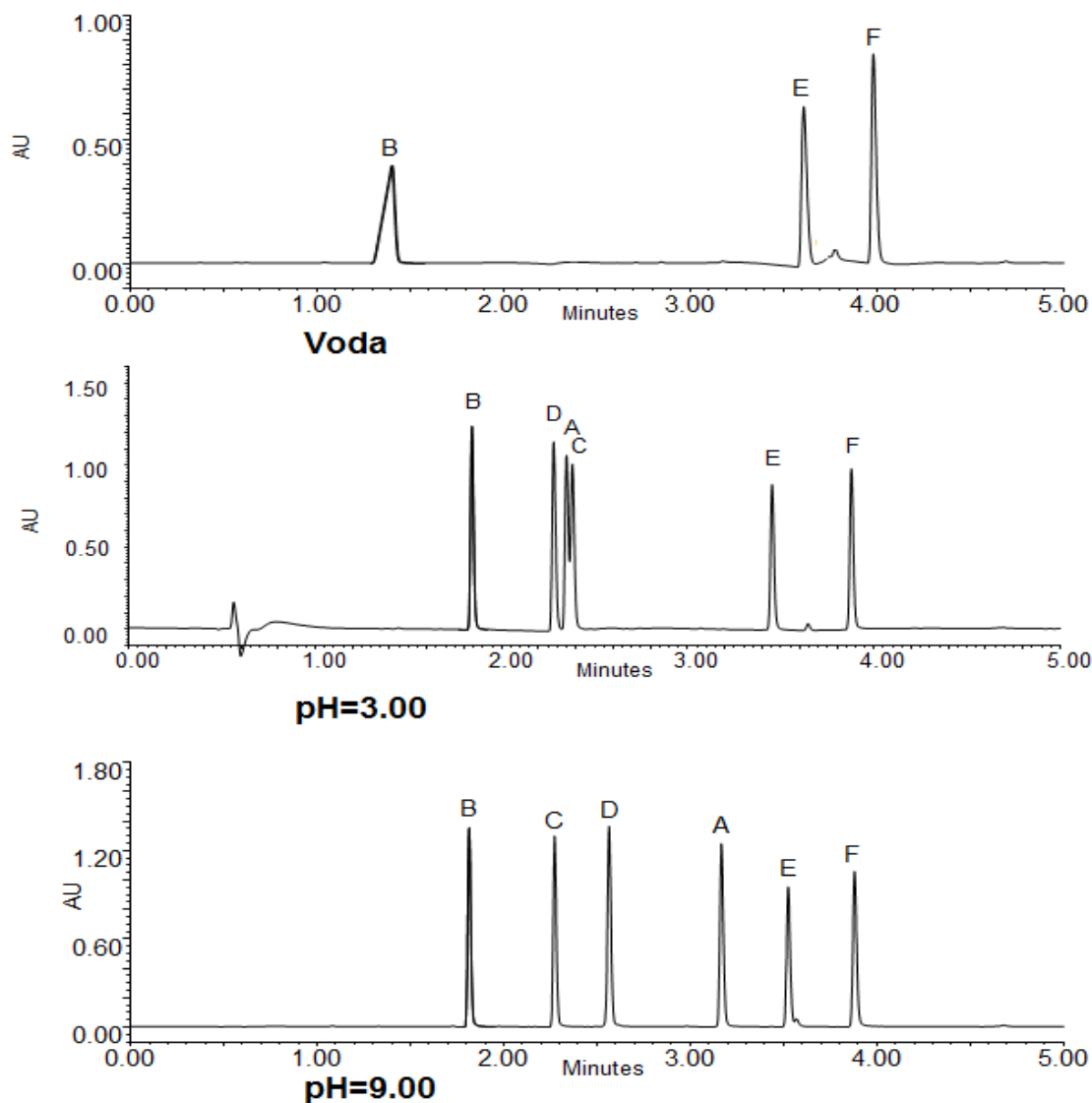
Obr.24 – Separácia zmesí ezetimibu a nečistôt na kolóne BEH C18. A – ezetimib, B – EZE 21, C – EZE 22, D – EZE 23, E – EZE 24

Obr. 25 zobrazuje separáciu tikagreloru a jeho nečistôt. Jednotlivé látky sú si štruktúrne veľmi podobné (viz kap. 3.3.7.) čo sa odrazilo aj v ich separácii. Zmenou podmienok nedošlo k zmenám pri separovaní daných látok. Opäť sa teda jedná o neutrálne látky Zároveň je zreteľné nedostatočné rozlíšenie a koelúcia tikagreloru (A) a nečistôt TICA 1 (B) a TICA 3 (D).



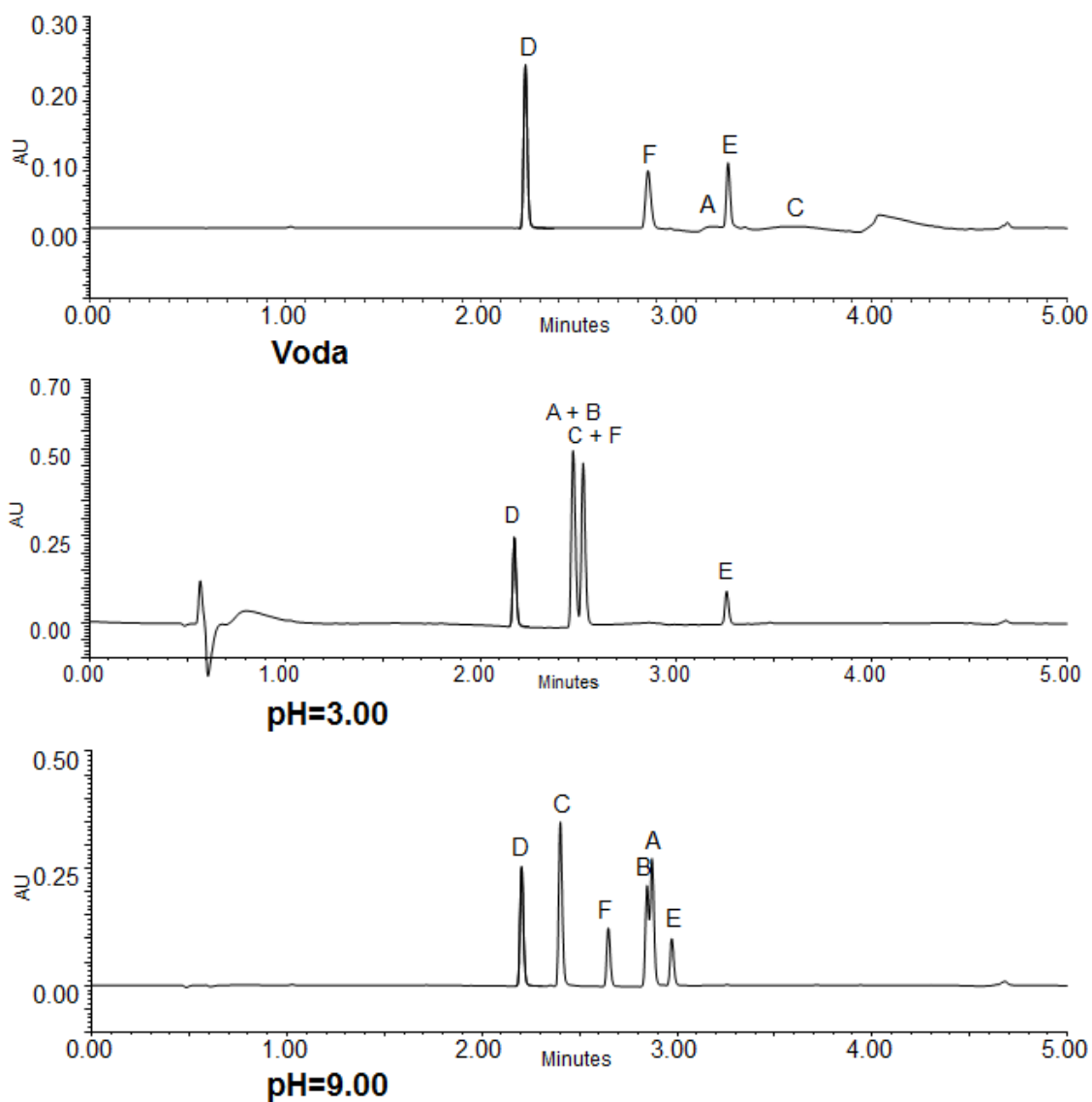
Obr. 25 - Separácia zmesí tikagreloru a nečistôt na kolóne BEH C18. A – tikagrelor, B – TICA 1, C – TICA 2, D – TICA 3

Obr. 26 zobrazuje separáciu vardenafilu a jeho potenciálnych nečistôt. Ako najvhodnejšie sa ukázalo využitie tlmivého roztoku s pH 9, kedy bola dosiahnutá najlepšia selektivita a rozlíšenie. Pri využití vody vardenafil (A) a nečistoty VAR 2 (C) a VAR 3 (D) neboli eluované. Pri použití tlmivého roztoku s pH 3 bolo problémom malé rozlíšenie a blízka elúcia účinnej látky (A) a nečistôt VAR 2 (C) a VAR 3 (D). Vardenafil sa správal ako zásada vzhľadom na jeho nižší retenčný čas pri kyslom pH a vyššiu retenciu pri pH 9.



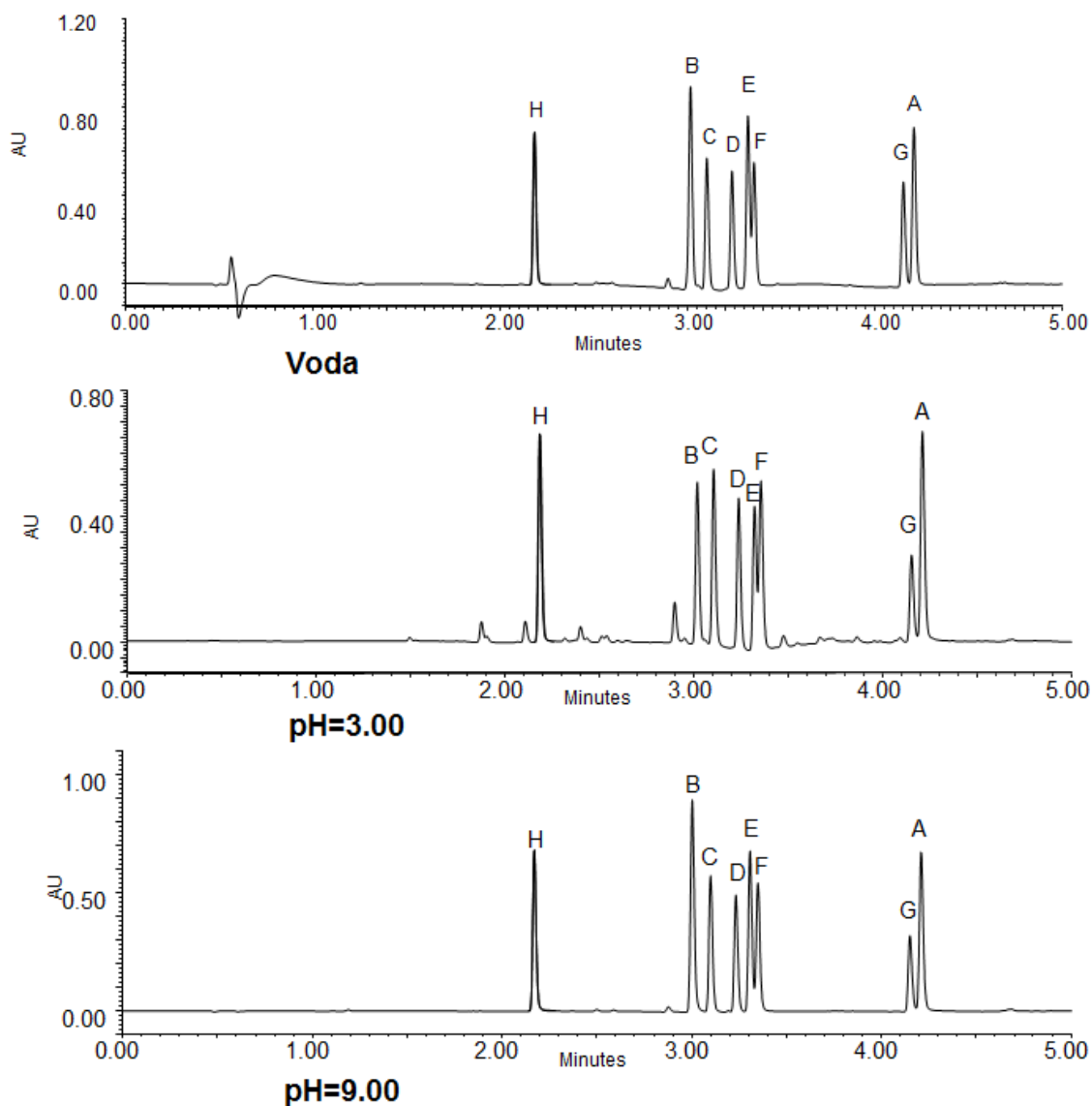
Obr. 26 - Separácia zmesí vardenafilu a nečistôt na kolóne BEH C18. A – vardenafil, B – VAR 1, C – VAR 2, D – VAR 3, E – VAR 4, F – VAR 5

Obr. 27 zobrazuje separáciu dasatinibu a jeho nečistôt. Pri použití vody bolo viditeľne rozmytie dasatinibu (A) a nečistôt DAS 1 (B) a DAS 2 (C). V kyslom prostredí tlmivého roztoku s pH 3 bolo problémom nízke rozlíšenie a koelúcia dasatinibu (A) a nečistôt DAS 1 (B), DAS 2 (C) a DAS 5 (F). Lepšie výsledky boli dosiahnuté použitím pufru s pH 9. Problémom však zostávala koelúcia dasatinibu (A) a nečistoty DAS 1 (B).



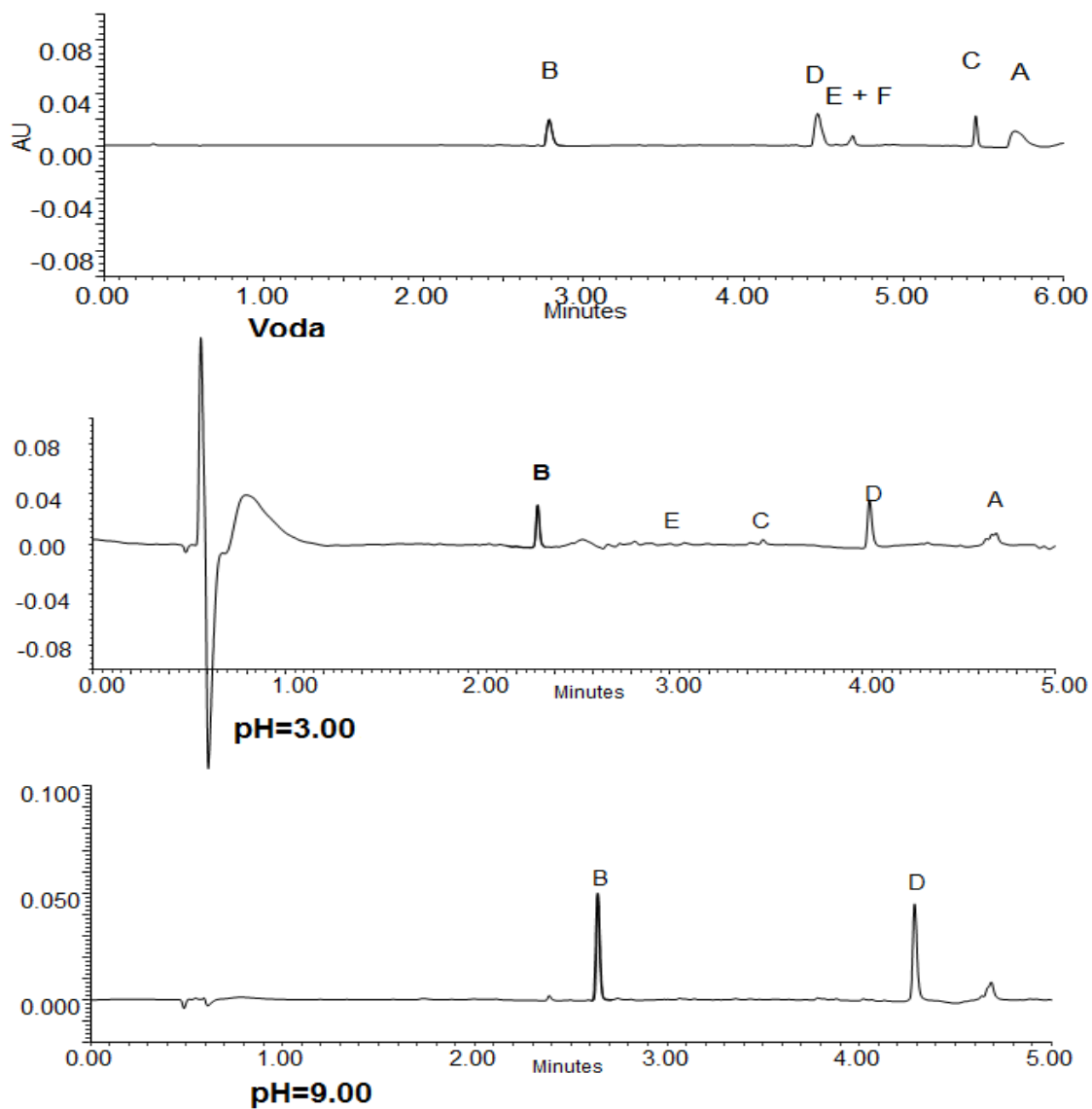
Obr. 27 - Separácia zmesí dasatinibu a nečistôt na kolóne BEH C18. A – dasatinib, B - DAS 1, C – DAS 2, D – DAS 3, E – DAS 4, F – DAS 5

Obr. 28 zobrazuje separáciu estrogénov. Vo všetkých troch metódach boli pozorované podobné výsledky aj pri zmene podmienok separácie. Jednalo sa teda o neutrálne látky. Problémom bola blízka elúcia látok E, F a A, G s nízkym rozlíšením.



Obr. 28 - Separácia zmesí estrogénov na kolóne BEH C18. A – EST-ME, B – Δ -EST, C – β -EST, D – α EST, E – Δ -ESN, F – ESN, G – EST-AC, H – ESTRI

Obr. 29 zobrazuje separáciu abiraterónu a jeho nečistôt. Vo vodnom prostredí bolo problémom malé rozlíšenie jednotlivých látok a koelúcia nečistôt E a F. Pri použití tlmivého roztoku s pH 3 došlo k rozmytiu jednotlivých elučných zón látok A, C, E a F. V prostredí tlmivého roztoku s pH 9 sa látky A, C, E a F nezobrazili na chromatograme pravdepodobne v dôsledku vysokej retencie. Žiadna z použitých metód nebola teda vyhovujúca.



Obr. 29 - Separácia zmesí abiraterónu a nečistôt na kolóne BEH C18. A – abirateron (acetát), B – ABI 5, C – ABI 3, D – ABI 1, E – ABI 2, F – ABI 4

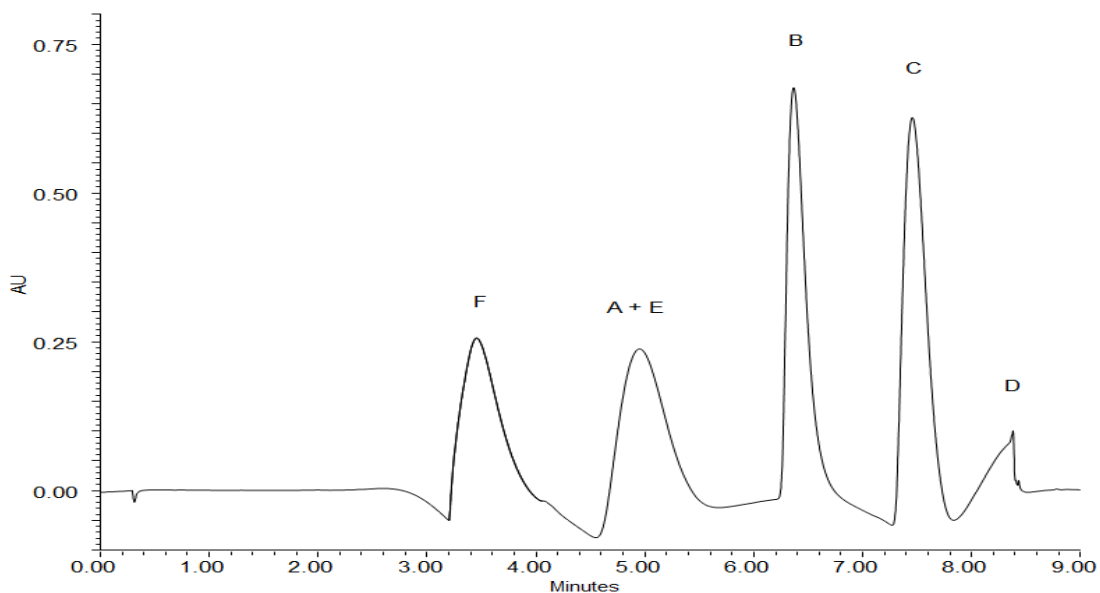
5.2. Analýza na kolóne so stacionárnou fázou na báze PGC

V nasledujúcich podkapitolách sú diskutované separácie na kolóne so stacionárnou fázou na báze porézneho grafitového uhlíka so sústredením sa na aplikácie pri daných skupinách látok. Podmienky analýz sú uvedené v kapitole 4.5.4.

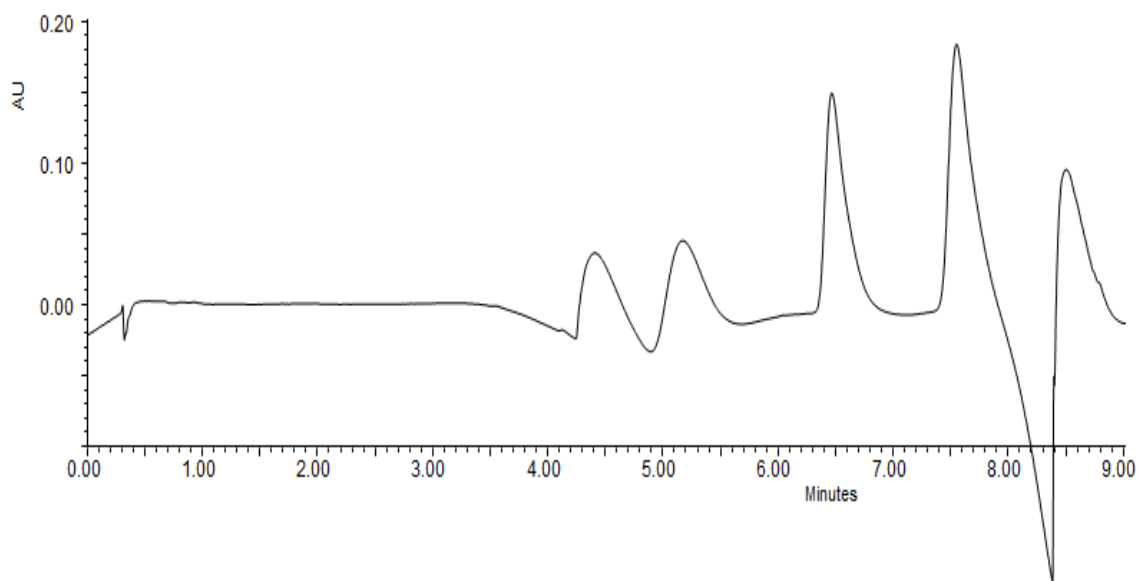
5.2.1. Analýza agomelatínu a jeho nečistôt na PGC

Ako prvé boli látky podrobené analýze za použitia mobilných fáz acetonitrilu a vody. Ďalej kombinácie acetonitrilu s isopropanolom v pomere 1:1 a vody. V oboch prípadoch došlo k silnému rozmývaniu jednotlivých elučných zón a nedostatočnému rozlíšeniu, zároveň väčšina látok ani nebolo eluovaných. Preto tu nie sú chromatogramy z daných analýz prezentované.

Najlepšie výsledky boli dosiahnuté pri použití kombinácie acetonitrilu s isopropanolom v pomere 1:1 ako organickej časti mobilnej fázy a 0,1% kyseliny trifluoroctovej ako vodnej zložky. Obr. 30 zobrazuje danú separáciu, ktorej problémom však bolo rozmývanie a nesymetrickosť jednotlivých pík, takisto koelúcia agomelatínu (A) a nečistoty E (dimer). Nečistota G (amín) sa nezobrazila vo výslednom chromatograme pravdepodobne v dôsledku vysokej retencie. Zvýšením koncentrácie kyseliny trifluoroctovej na 0,5% nedošlo k zmenám pri analýze ako je možné vidieť na obr. 31. Zmenou pomeru acetonitrilu a isopropanolu na 1:3 s použitím 0,1 %TFA ako vodnej zložky došlo k zníženiu retenčných časov a k výraznejšej koelúcii a nízkemu rozlíšeniu, preto chromatogram nie je prezentovaný.

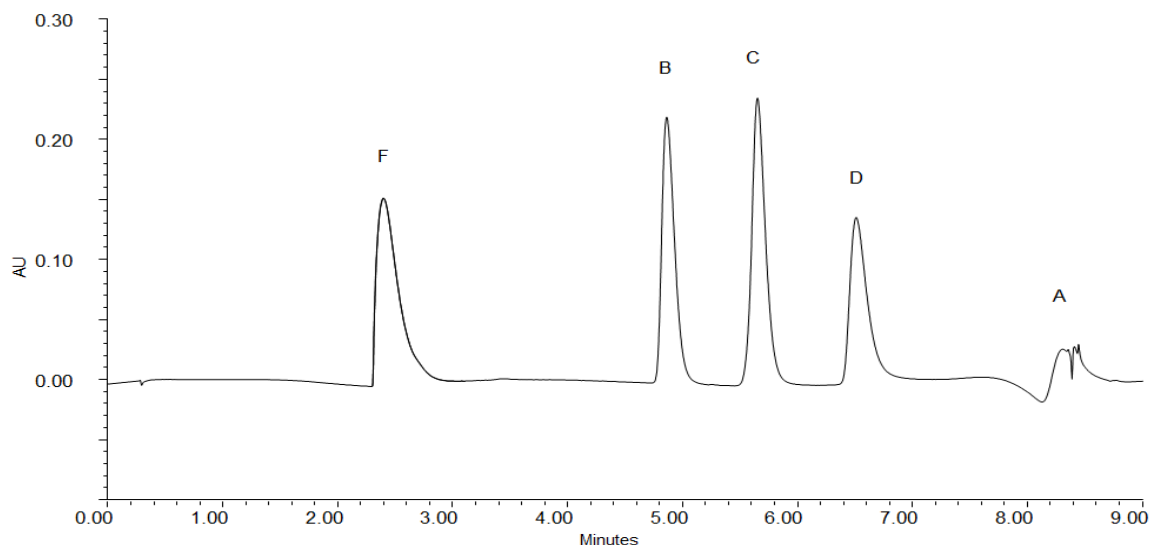


Obr. 30 - Separácia zmesí agomelatínu a jeho nečistôt na kolóne HYPERCARB. A – agomelatín, B – amid, C – kyselina, D – nitril, E – dimer, F – soľ, G – amín. Podmienky: ACN:IPA 1:1, TFA 0,1%



Obr. 31 - Separácia zmesí agomelatínu a jeho nečistôt na kolóne HYPERCARB. Podmienky: ACN:IPA 1:1, TFA 0,5%

Zvýšením teploty došlo k posunu retenčných časov a zrýchleniu analýzy. Zároveň je z obr. 32 očividná lepšia symetria píkov. Stratu píkov látok A a E si nevieme vysvetliť. Daná analýza bola zopakovaná s opätovnou prípravou vzoriek a výsledky boli identické.



Obr. 32 - Separácia zmesí agomelatínu a jeho nečistôt na kolóne HYPERCARB. A – agomelatín, B – amid, C – kyselina, D – nitril, E – dimer, F – soľ, G – amín. Podmienky: ACN:IPA 1:1, TFA 0,1%, 80 °C

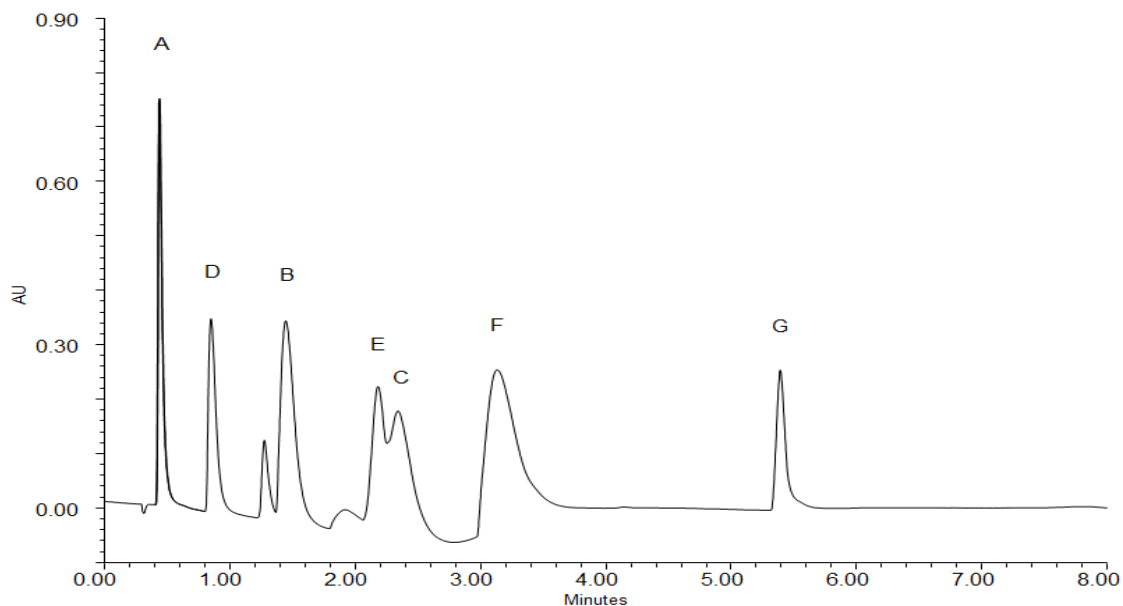
Pri použití 0,1% hydroxidu amónneho nedošlo k elúcii väčšiny látok pravdepodobne v dôsledku vysokej retencie. Rovnako tomu bolo tak aj pri použití 0,1% diethylamínu. Pri použití kyseliny mravčej 0,1% a 0,5% došlo k silnému rozmývaniu jednotlivých elučných zón a nedostatočnému rozlíšeniu. Zámenou vody za methanol s prídavkom 0,1% kyseliny mravčej došlo k posunu retenčných časov ale bolo zároveň viditeľné rozmytie a koelúcia jednotlivých pík. Ani isokratická elúcia neprinesla pozitívnu zmenu došlo iba k posunu retenčných časov, výraznejšej koelúcii a zlému rozlíšeniu. Preto tu nie sú spomínané chromatogramy prezentované.

V porovnaní so separáciou na referenčnej kolóne BEH C18 (viz kap. 5.1.), kde boli dosiahnuté dobré výsledky, má PGC výrazne horšiu selektivitu a rozlíšenie.

5.2.2. Analýza betablokátorov na PGC

Ako prvé boli látky podrobené analýze za použitia mobilných fáz acetonitrilu a vody. Ďalej kombinácie acetonitrilu s isopropanolom v pomere 1:1 a vody. V oboch prípadoch boli látky eluované vo veľmi blízkych retenčných časoch až došlo k celkovej koelúcii a tým pádom k nemožnému rozlíšeniu a zlej selektivitě. Preto tu nie sú chromatogramy z daných analýz prezentované.

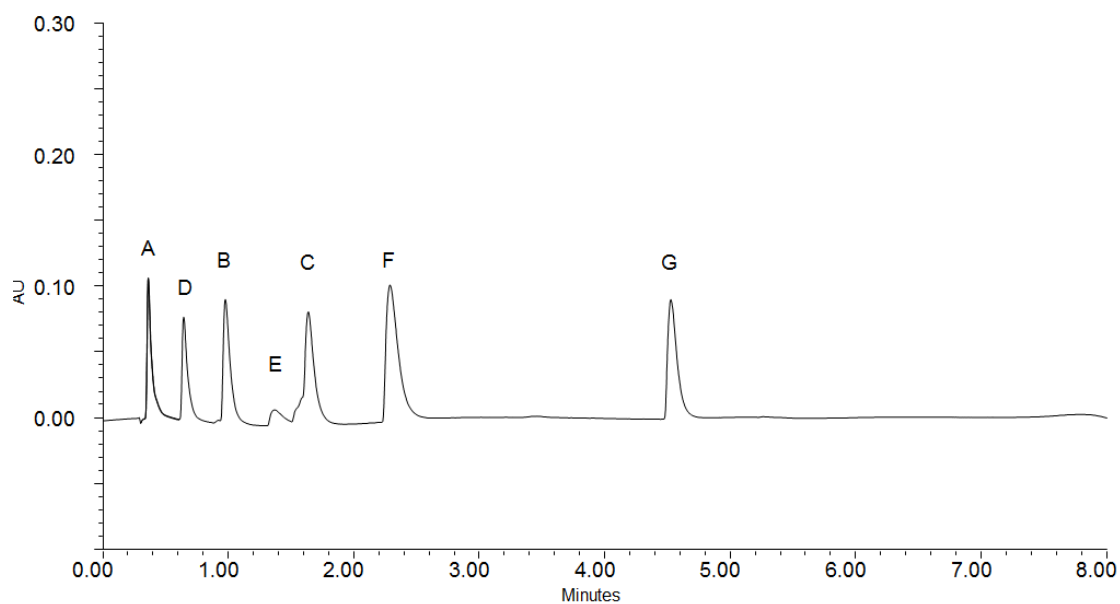
Pri použití kombinácie acetonitrilu s isopropanolom v pomere 1:1 ako organickej časti mobilnej fázy a 0,1% kyseliny trifluoroctovej ako vodnej zložky bola dosiahnutá relatívne dobrá selektivita a rozlíšenie (obr. 33). Problémom bola čiastočná koelúcia labetalolu (E) a acebutololu (C).



Obr.33– Separácia zmesí betablokátorov na kolóne HYPERCARB A – atenalol, B – pindolol, C – acebutolol, D – metoprolol, E – labetalol, F – propranolol, G – bopindolol. Podmienky: ACN:IPA 1:1, TFA 0,1%

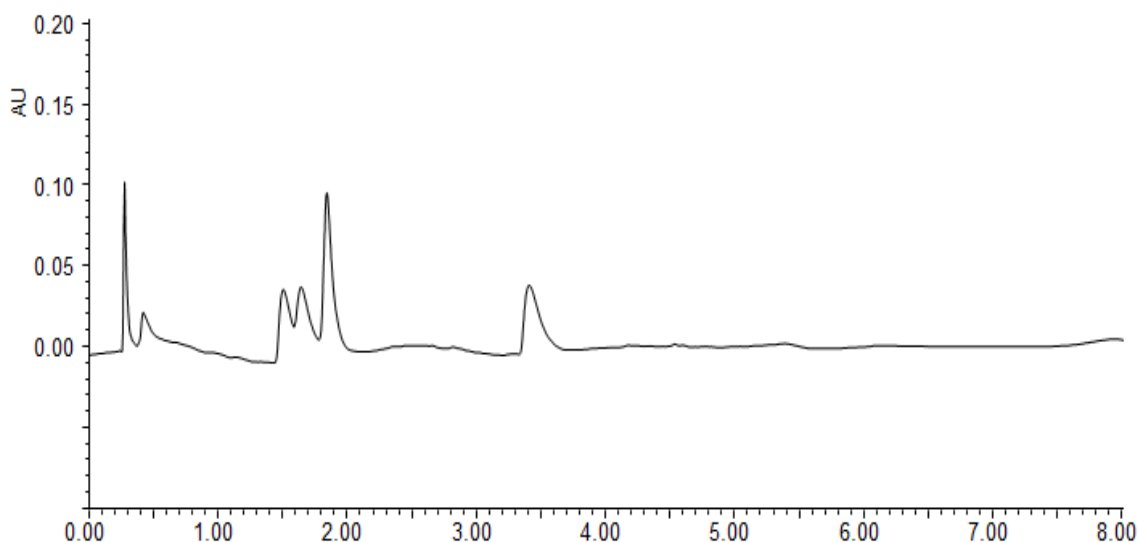
Zvýšením koncentrácie TFA na 0,5% nedošlo k výraznej zmene a výsledok bol takmer identický. Zmenou pomeru ACN:IPA na 1:3 došlo k posunu retenčných časov v prospech skrátenia analýzy avšak zároveň k vyššej koelúcii. Preto tu dané chromatogramy nie sú prezentované.

Zvýšením teploty sa pri 80°C podarilo oddeliť labetalol (E) a acebutolol (C) (viz obr.34), ktoré boli pri pôvodnej metóde využívajúcej teplotu 40°C koeluované. Zároveň došlo k zlepšeniu tvaru pík.



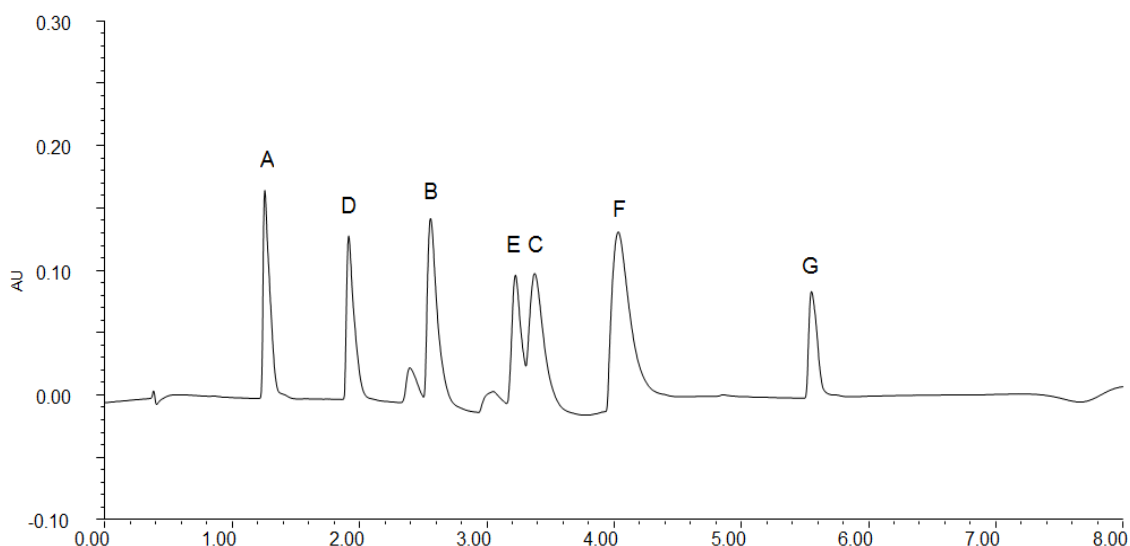
Obr.34– Separácia zmesí betablokátorov na kolóne HYPERCARB A – atenolol, B – pindolol, C – acebutolol, D – metoprolol, E – labetalol, F – propranolol, G – bopindolol. Podmienky: ACN:IPA 1:1, TFA 0,1%, 80 °C

Pri využití 0,1% hydroxidu amónneho ako vodnej zložky mobilnej fázy pravdepodobne v dôsledku vysokej retencie nebola eluovaná väčšina látok a teda sa nezobrazili vo výslednom chromatograme. V prípade využitia kyseliny mravčej tak v oboch koncentráciách došlo k rozmývaniu elučných zón a nedostatočnému rozlíšeniu. Zároveň jej použitie v methanole viedlo k úplnému rozmytiu a koelúcii. Preto dané chromatogramy nie sú prezentované. Ďalšia zmena vodnej zložky za 0,1% diethylamín by sa dala považovať za regresívny krok. Ako je vidieť na chromatograme (obr.35) daná metóda je nedostatočne selektívna.



Obr.35 – Separácia zmesí betablokátorov na kolóne HYPERCARB. Podmienky: ACN:IPA 1:1, DEA 0,1%

Pri využití isokratickej elúcie v pomere 90/10 sa čiastočne podarilo lepšie separovať labetalol (E) a acebutolol (C) (viz obr. 36). Zároveň došlo k posunu retenčných časov pravdepodobne v dôsledku menšieho prietoku, ktorý bol 0,8 ml/min. Isokratická elúcia bola uskutočnená v poslednej sérii experimentov a preto bol prietok znížený v dôsledku zvýšeného tlaku vyvolaného opotrebovaním chromatografickej kolóny.

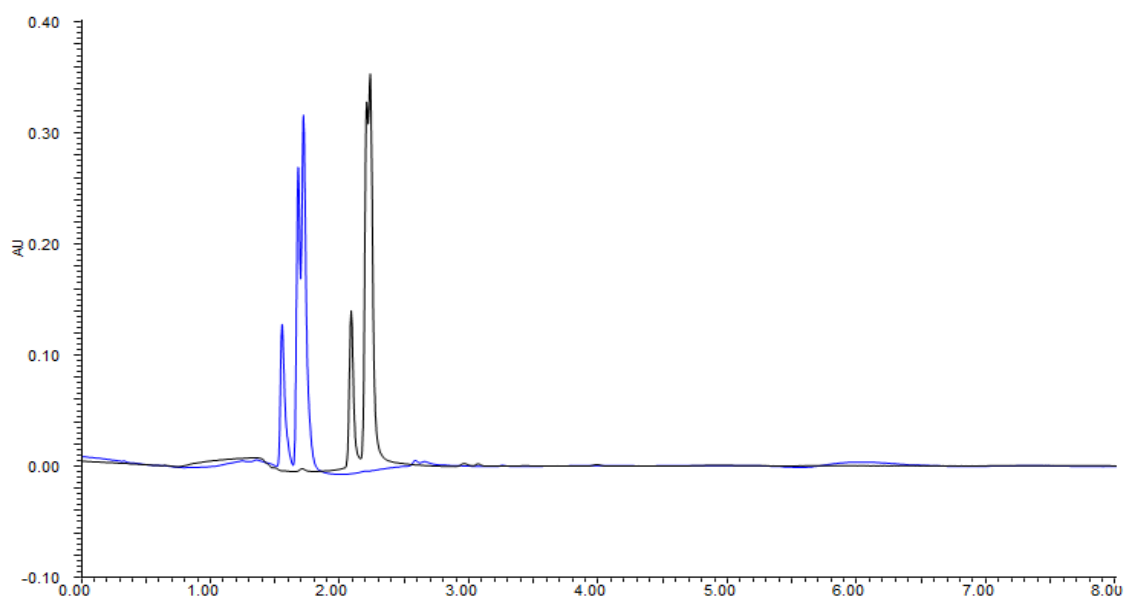


Obr.36 – Separácia zmesí betablokátorov na kolóne HYPERCARB A – atenolol, B – pindolol, C – acebutolol, D – metoprolol, E – labetalol, F – propranolol, G – bopindolol. Podmienky: ACN:IPA 1:1, TFA 0,1%

Za využitia stacionárnej fáze na báze PGC bolo dosiahnuté lepšie rozlíšenie jednotlivých látok v porovnaní s referenčnou kolónou.

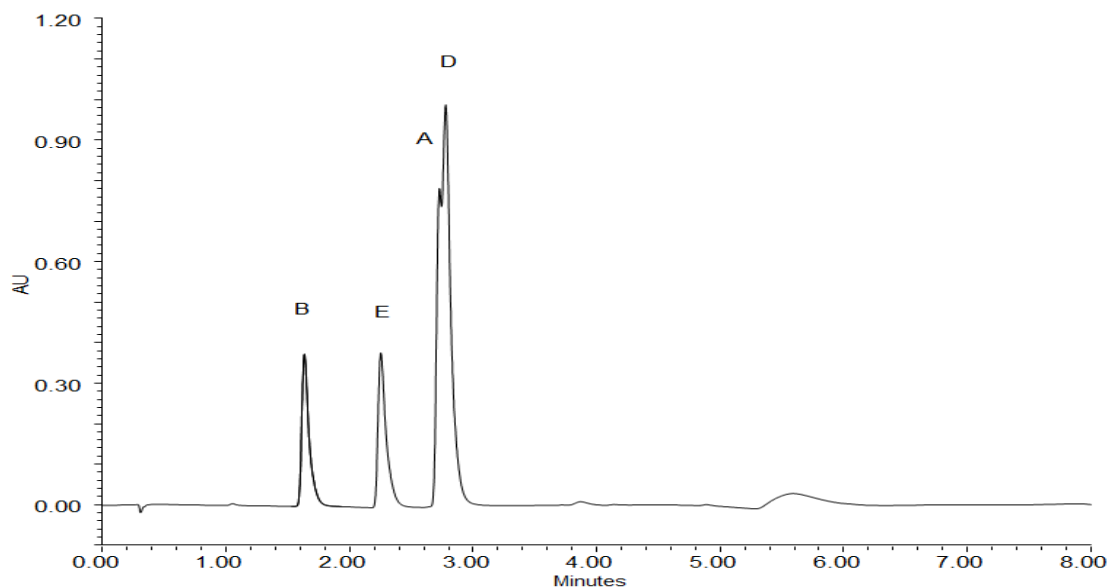
5.2.3. Analýza enzalutamidu a jeho nečistôt na PGC

Obr. 37 zobrazuje separáciu enzalutamidu a jeho nečistôt za použitia acetonitrilu a vody (čierna farba) a ACN:IPA v pomere 1:1 a vody (modrá farba). Výsledný chromatogram je veľmi podobný avšak s prídavkom isopropanolu dochádza k skráteniu retenčného času vzhľadom na jeho vyššiu elučnú silu. Každopádne obe metódy sa vyznačujú koelúciou väčšiny analytov a teda nedostatočným rozlíšením a selektivitou.



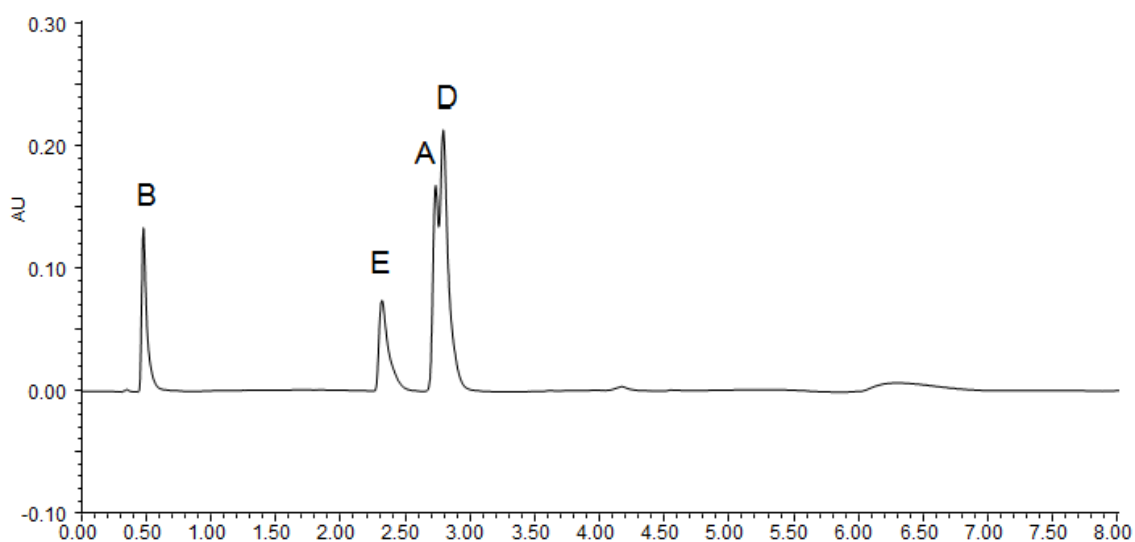
Obr.37 – Separácia enzalutamidu a jeho nečistôt na kolóne HYPERCARB. Podmienky: ACN, voda (čierne); ACN:IPA 1:1, voda (modré)

Ďalšou obmenou bolo použitie 0,1% TFA. Podľa chromatogramu (obr. 38) je zjavné, že problémom zostáva koelúcia enzalutamidu (A) a nečistoty ENZ 3 (D). Taktiež nečistota ENZ 2 (C) nebola za daných chromatografických podmienok eluovaná v dôsledku silnej retencie.



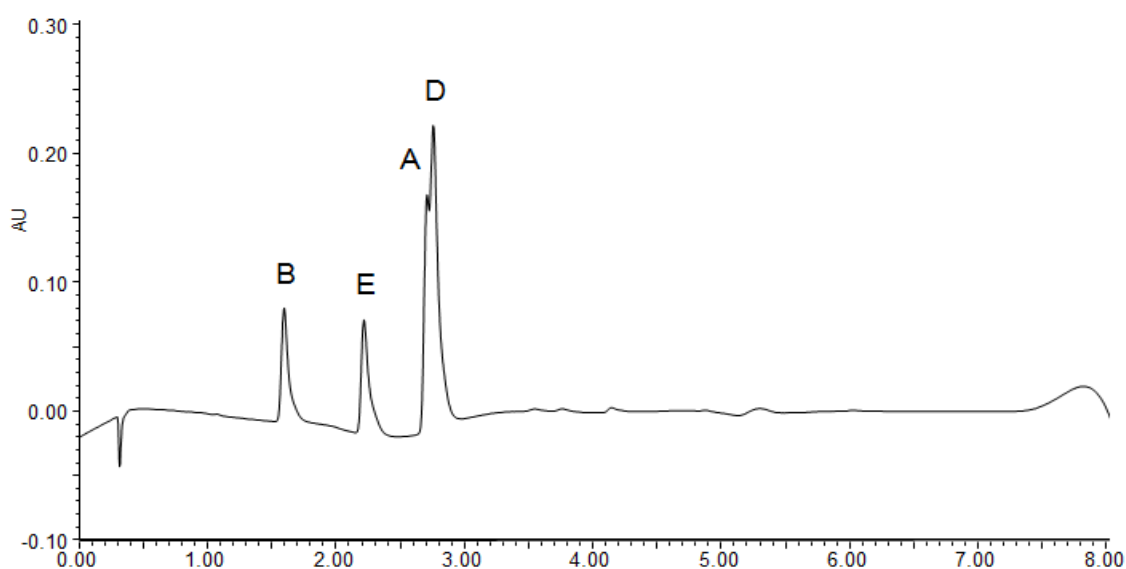
Obr.38 – Separácia enzalutamidu a jeho nečistôt na kolóne HYPERCARB. A – enzalutamid, B – ENZ 1, C – ENZ 2, D – ENZ 3, E – ENZ 4. Podmienky: ACN:IPA 1:1, TFA 0,1%

Zámenou vodnej zložky za 0,1% diethylamín alebo 0,1% hydroxid amónny došlo v oboch prípadoch k skráteniu retenčného času nečistoty ENZ 1 (B) (viz obr. 39) čo vychádza vlastne z jej fyzikálne chemických vlastností. Oproti ostatným látkam má výrazne nižšie pKa a v bázičkom prostredí bola teda menej zadržovaná.



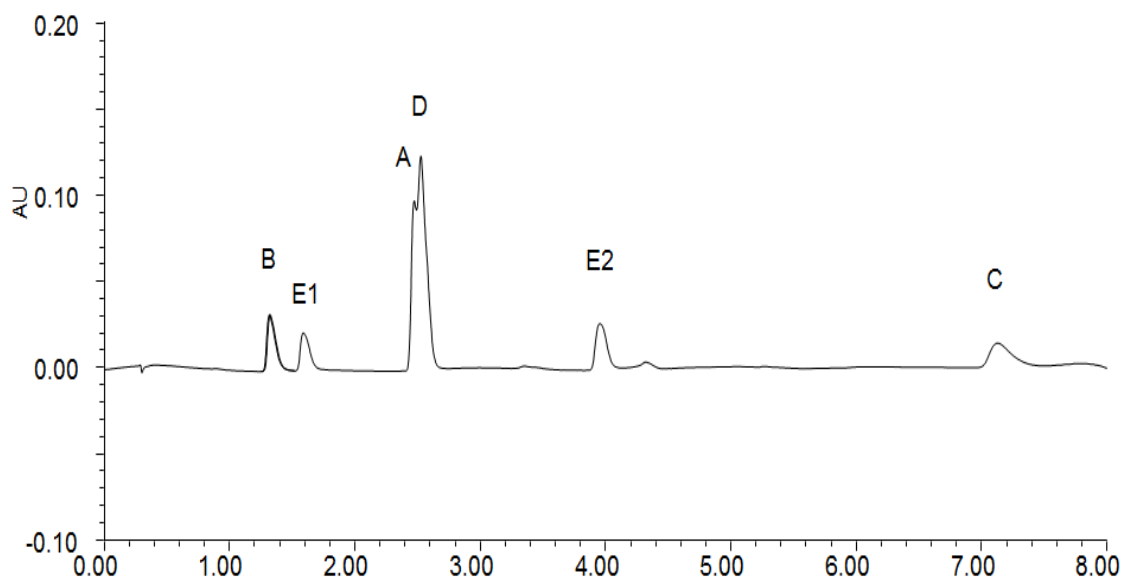
Obr. 39 – Separácia enzalutamidu a jeho nečistôt na kolóne HYPERCARB. A – enzalutamid, B – ENZ 1, C – ENZ 2, D – ENZ 3, E – ENZ 4. Podmienky: ACN:IPA 1:1, NH₄OH 0,1%

Pri použití kyseliny mravčej v oboch koncentráciách boli výsledky podobné ako v prípade použitia 0,1% TFA (viz obr. 38). Obr. 40 zobrazuje separáciu pri použití 0,1% kys. mravčej. Separáciu s využitím vyššej – 0,5% koncentrácie neuvádzame pretože výsledok bol takmer identický. Zároveň nie je uvedená metóda so zámenou vody za methanol pretože došlo k rozmytiu a nemožnosti rozlíšenia jednotlivých elučných zón. Isokratickou elúciou sa látky taktiež nepodarilo rozdeliť inak ako to už bolo zobrazené v predchádzajúcich metódach a preto ju neuvádzame.



Obr. 40 – Separácia enzalutamidu a jeho nečistôt na kolóne HYPERCARB. A – enzalutamid, B – ENZ 1, C – ENZ 2, D – ENZ 3, E – ENZ 4. Podmienky: ACN:IPA 1:1, kyselina mravčia 0,1%

Zvýšením teploty sa podarilo zobrazit' vo výslednom chromatograme (obr. 41) aj nečistotu ENZ 2 (C), kedy vplyvom vyššej teploty sa znížila jej retencia. Zároveň sa objavil aj pík označený ako E2, ktorý je pravdepodobne rozkladným produktom nečistoty ENZ 4 vplyvom zvýšenej teploty.

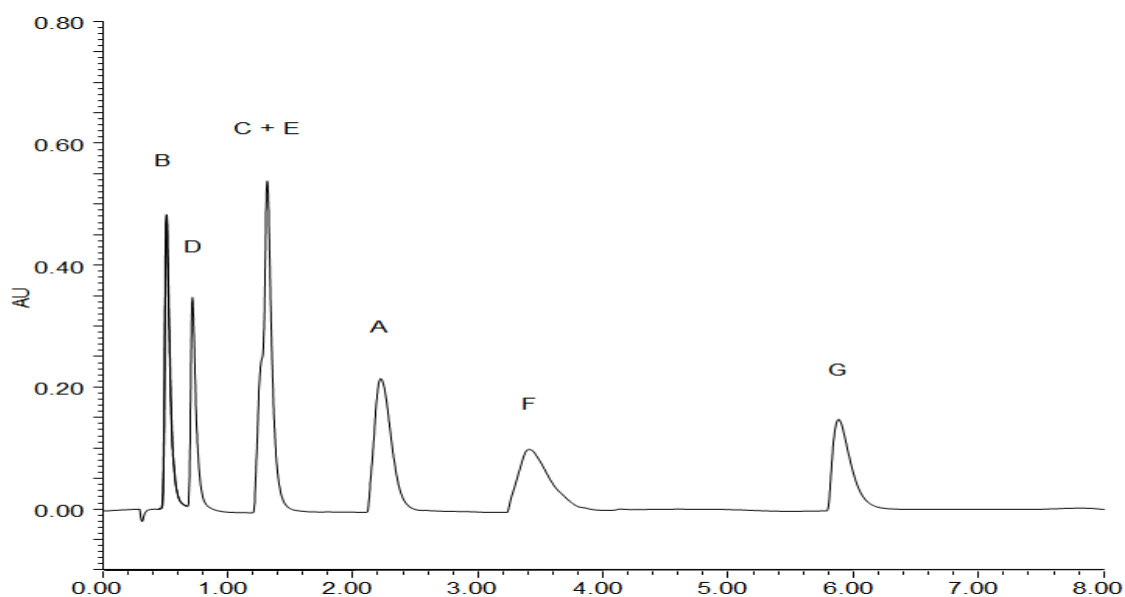


Obr. 41 – Separácia enzalutamidu a jeho nečistôt na kolóne HYPERCARB. A – enzalutamid, B – ENZ 1, C – ENZ 2, D – ENZ 3, E – ENZ 4. Podmienky: ACN:IPA 1:1, TFA 0,1%, 80 °C

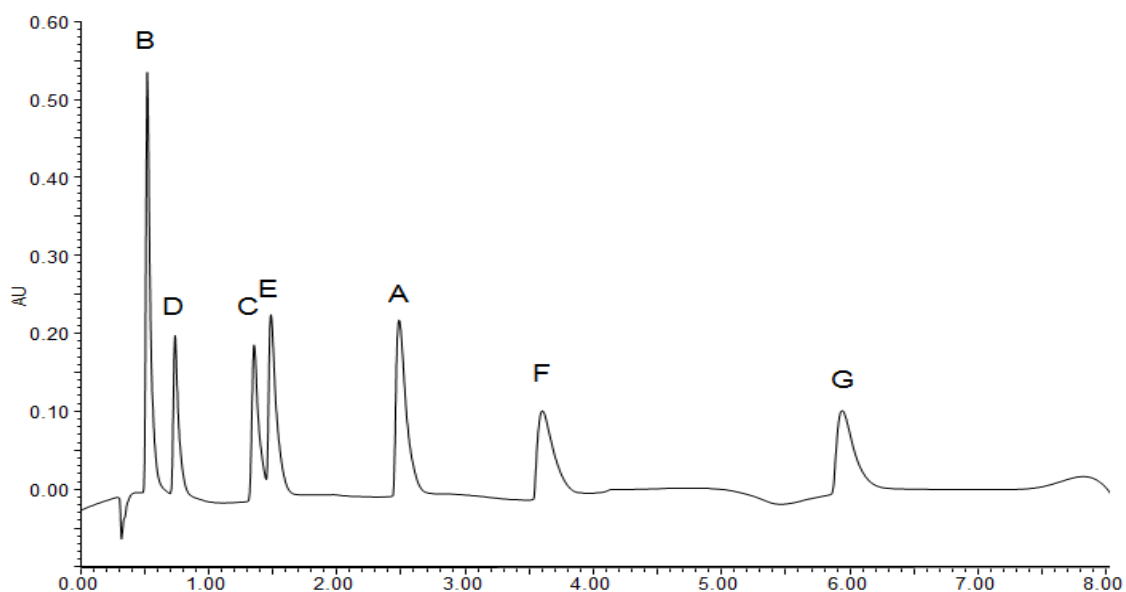
Pri analýze na referenčnej kolóne došlo k lepším výsledkom. Zaujímavým rozdielom bolo, že nečistota ENZ 2 mala pri použití PGC oveľa vyššiu retenciu.

5.2.4. Analýza atomoxetínu a jeho nečistôt na PGC

Ako prvé boli látky podrobené analýze za použitia mobilných fáz acetonitrilu a vody. Ďalej kombinácie acetonitrilu s isopropanolom v pomere 1:1 a vody. V oboch prípadoch prevládala koelúcia a značné rozmytie. Látky sa podarilo separovať až náhradou vody za 0,1% TFA (Obr. 42). Týmto podmienkami sa dosiahlo relatívne dobrej separácie látok za dobrého rozlíšenia. Problémom však bola koelúcia nečistoty C a E. Tieto dve nečistoty sa ale podarilo lepšie odseparovať zvýšením koncentrácie TFA na 0,5% (viz obr. 43), avšak stále mali veľmi blízke retenčné časy. Podobne sa ich podarilo čiastočne oddeliť zvýšením teploty analýzy pri 80 °C a 90 °C. Isokratickou elúciou sa nepodarilo dané nečistoty oddeliť a výsledky boli podobné ako na obr. 42 iba s posunom retenčných časov a to z dôvodu zníženia prietokovej rýchlosti na 0,8 ml/min, kvôli zvýšenému tlaku spôsobenému opotrebovaním kolóny. Zmena pomeru acetonitrilu a isopropanolu 1:3 viedla zase iba ku skráteniu retenčných časov jednotlivých látok, čo v danej separácii nie je žiadúce. Preto spomínaná separácia nebola uvedená.



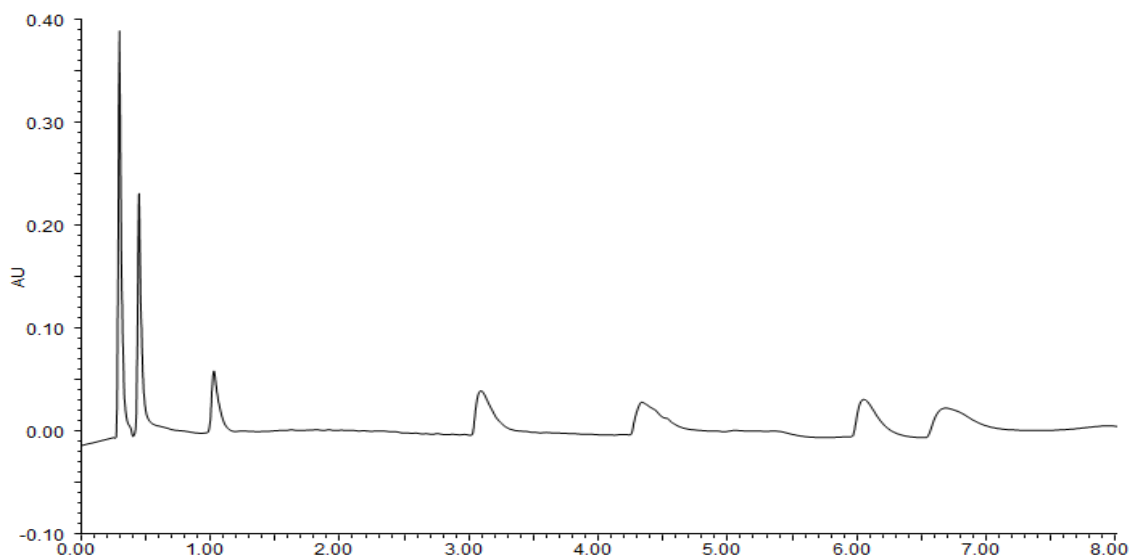
Obr.42 – Separácie zmesí atomoxetínu a jeho potencionálnych nečistôt na kolóne HYPERCARB. A – atomoxetín, B – mandľová kyselina, C – kresol, D – fenol, E – fenoxy, F – benzyl, G – karbamát. Podmienky: ACN:IPA 1:1, TFA 0,1%



Obr.43 – Separácie zmesí atomoxetínu a jeho potencionálnych nečistôt na kolóne HYPERCARB. A – atomoxetín, B – mandľová kyselina, C – kresol, D – fenol, E – fenoxy, F – benzyl, G – karbamát. Podmienky: ACN:IPA 1:1, TFA 0,5%

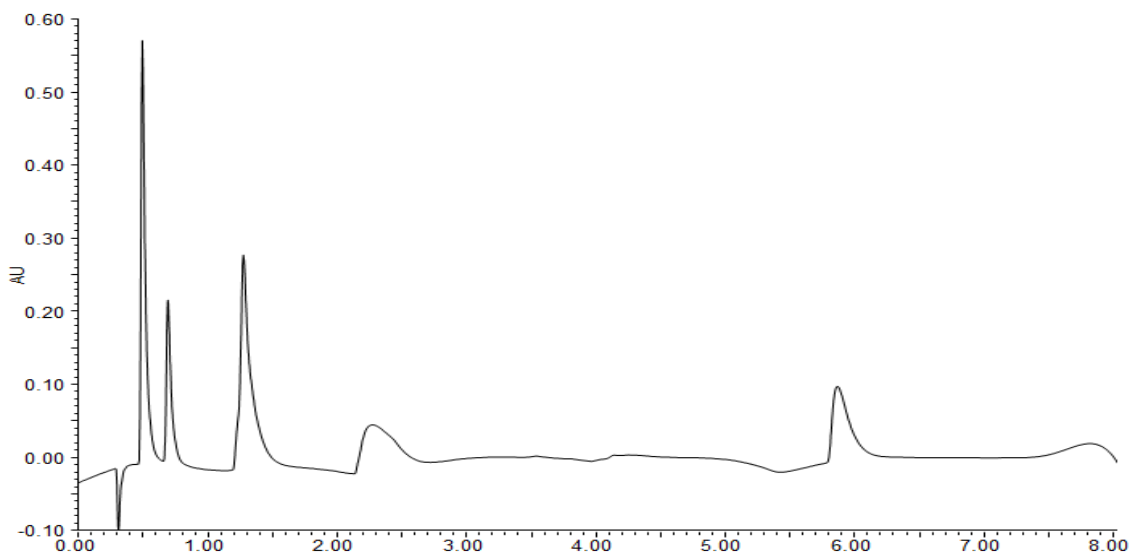
Pri použití hydroxidu amónneho alebo diethylamínu došlo k podobným výsledkom preto uvádzame separáciu iba za použitia diethylamínu (obr. 44). Pri týchto

podmienkach došlo k posunom retenčných časov jednotlivých látok a lepšiemu odseparovaniu ale zároveň sa píky vyznačujú výrazným rozmytím a asymetriou.



Obr. 44 – Separácie zmesí atomoxetínu a jeho potenciónálnych nečistôt na kolóne HYPERCARB. Podmienky: ACN:IPA 1:1, NH₄OH 0,1%

Pri použití 0,1% kyseliny mravčej došlo k čiastočnému rozmytiu niektorých píkov (viz obr. 45). Zvýšením jej koncentrácie na 0,5% boli dosiahnuté podobné výsledky a použitím 0,1% kys. mravčej v methanole došlo k úplnému rozmytiu a koelúcii bez možnosti rozlíšenia jednotlivých látok. Preto tieto chromatogramy neboli uvedené.

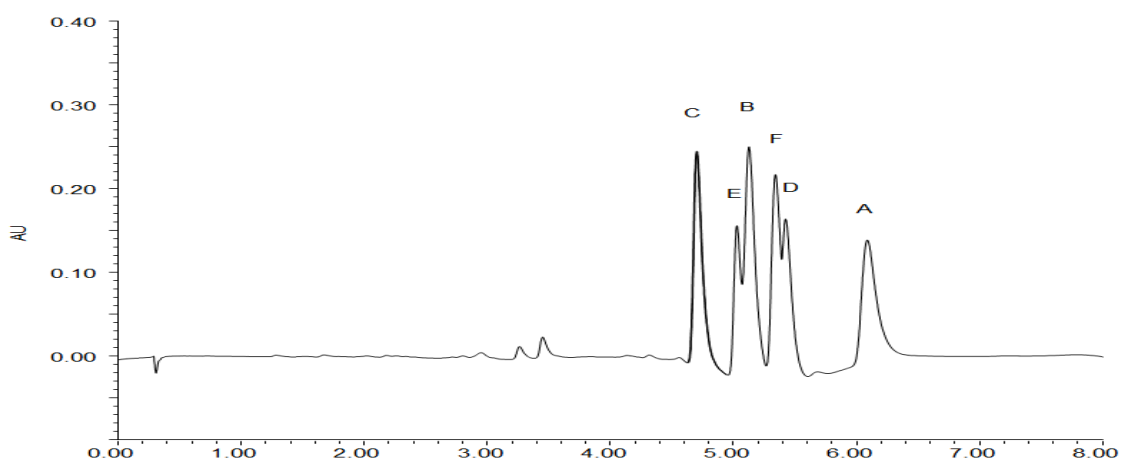


Obr. 45 – Separácie zmesí atomoxetínu a jeho potenciónálnych nečistôt na kolóne HYPERCARB. Podmienky: ACN:IPA 1:1, kyselina mravčia 0,1%

Separáciou na PGC boli dosiahnuté dobré výsledky ale aj napriek tomu pri separácii na referenčnej kolóne bola dosiahnutá o veľa lepšia selektivita, rozlíšenie a symetria jednotlivých píkov.

5.2.5. Analýza atorvastatínu a jeho nečistôt na PGC

Podobne ako v predchádzajúcej kapitole boli lepšie výsledky dosiahnuté až použitím ACN:IPA v pomere 1:1 a 0,1% TFA (viz obr.46). Problémom tejto separácie bol ale blízky retenčný čas jednotlivých analytov, kedy dochádzalo až ku koelúcii nečistôt B,D,E a samotného atorvastatínu (F). Jednalo sa o štruktúrne veľmi blízke látky a podobný problém sa vyskytol aj pri použití referenčnej kolóny BEH C18. Zvýšením koncentrácie TFA alebo zmenou pomeru ACN:IPA sa tento problém iba prehĺbil. Taktiež ani zvýšenie teploty ani isokratická elúcia nepomohli lepšie odseparovať dané látky.



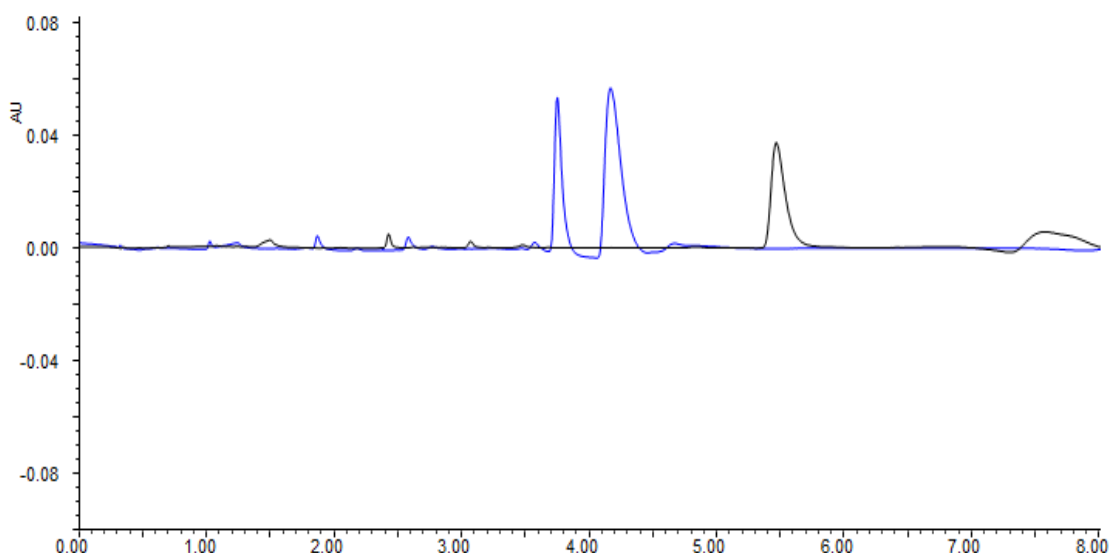
Obr.46 – Separácia zmesí atorvastatínu a jeho potencionálnych nečistôt na kolóne HYPERCARB. A – IMP A, B –IMP B, C – IMP C, D – IMP D, E – LAC, F – atorvastatín. Podmienky: ACN:IPA 1:1, TFA 0,1%

V prípade zámény vody za 0,1% diethylamín alebo 0,1% hydroxid amónny došlo k zníženiu retenčného času ale látky sa nepodarilo lepšie oddeliť. Pri použití kys. mravčej v oboch koncentráciách sa retenčný čas nemenil ani nedošlo k lepšej separácii iba sa viac prejavilo rozmytie elučných zón a znížilo sa rozlíšenie. Ani ďalšími obmenami nedošlo k pozitívnym zmenám vo výsledkoch, preto dané chromatogramy nie sú uvedené.

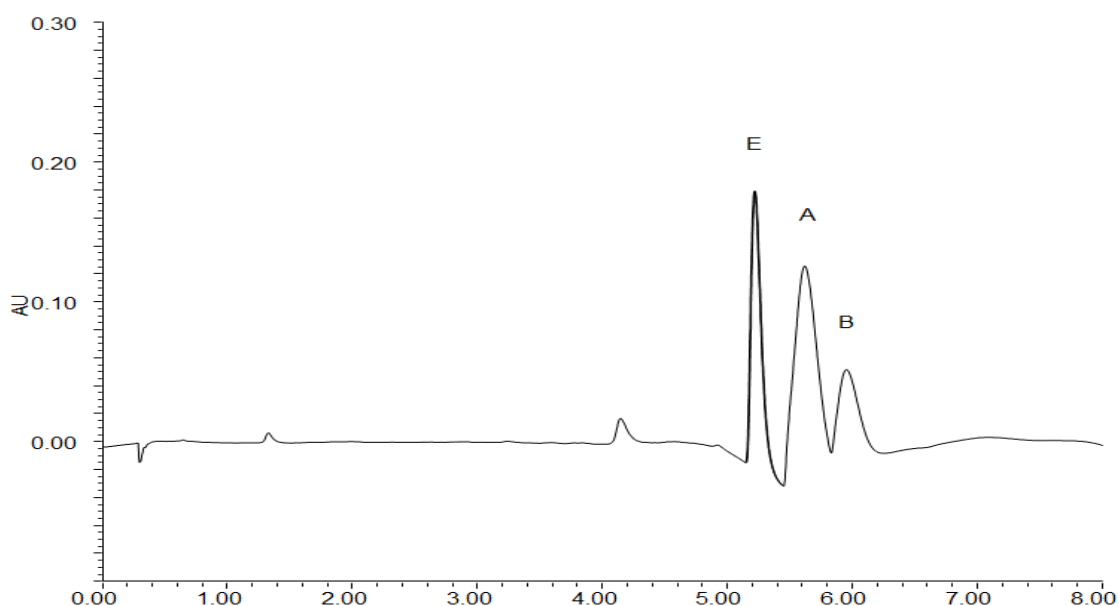
Pri tejto skupine látok bola účinnosť referenčnej aj testovanej kolóny podobná. V oboch prípadoch sa nepodarilo lepšie odseparovať jednotlivé látky aj keď problematické boli v oboch metódach iné analyty.

5.2.6. Analýza ezetimibu a jeho nečistôt na PGC

Obr. 47 zobrazuje ako pri použití kombinácie vody a acetonitrilu (čierna farba) nebola väčšina látok eluovaná v dôsledku vysokej retencie. Zámenou acetonitrilu za kombináciu ACN:IPA v pomere 1:1 (modrá farba) dochádza k zvýšeniu elučnej sily mobilnej fázy a na chromatograme sa skrátil retenčný čas a zároveň sa objavil ďalší pík. Ďalšou zámenou ale už vo vodnej zložke za 0,1% TFA došlo k lepšej separácii ale stále nečistoty C a D neboli eluované (viz obr. 48). Ani ďalšími zmenami podmienok sa nepodarilo zlepšiť danú metódu.



Obr.47 – Separácia zmesí ezetimibu a nečistôt na kolóne HYPERCARB. Podmienky: ACN, voda (čierne); ACN:IPA 1:1, voda (modré)



Obr.48 – Separácia zmesí ezetimibu a nečistôt na kolóne HYPERCARB. A – ezetimib, B – EZE 21, C – EZE 22, D – EZE 23, E – EZE 24 Podmienky: ACN:IPA 1:1, TFA 0,1%

Pri tejto skupine látok bola vhodnejšia referenčná kolóna, na ktorej sa podarilo odseparovať všetky látky s oveľa lepšou selektivitou a účinnosťou.

5.2.7. Analýza tikagreloru a jeho nečistôt na PGC

Pri tejto skupine látok sa nepodarilo ani pri jednej z použitých metód vyeluovať dané látky tak aby sa zobrazili vo výslednom chromatograme. Jedná sa o veľké molekuly pravdepodobne planárneho charakteru a preto je možné, že ich retencia na PGC bola veľmi vysoká. V tomto prípade boli vhodnejšie výsledky dosiahnuté pri použití referenčnej kolóny BEH C18. Avšak ani tam nedošlo k dobrej separácii daných látok.

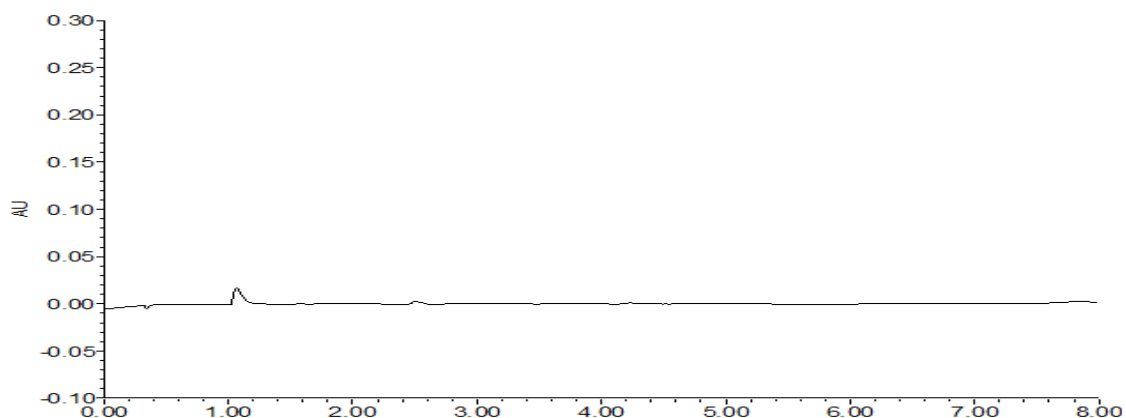
5.2.8. Analýza vardenafilu a jeho nečistôt na PGC

Podobne ako pri predchádzajúcej skupine ani pri tejto neboli pri použití hoci ktorej metódy dané látky eluované. Pravdepodobne išlo o veľmi silnú retenciu. Zároveň sa nedá vylúčiť možnosť silných špecifických interakcií.

Výrazne lepšie výsledky boli dosiahnuté s použitím referenčnej kolóny BEH C18, kde pri pH 9 bola veľmi dobrá selektivita a rozlíšenie (viz obr. 26).

5.2.9. Analýza dasatinibu a jeho nečistôt na PGC

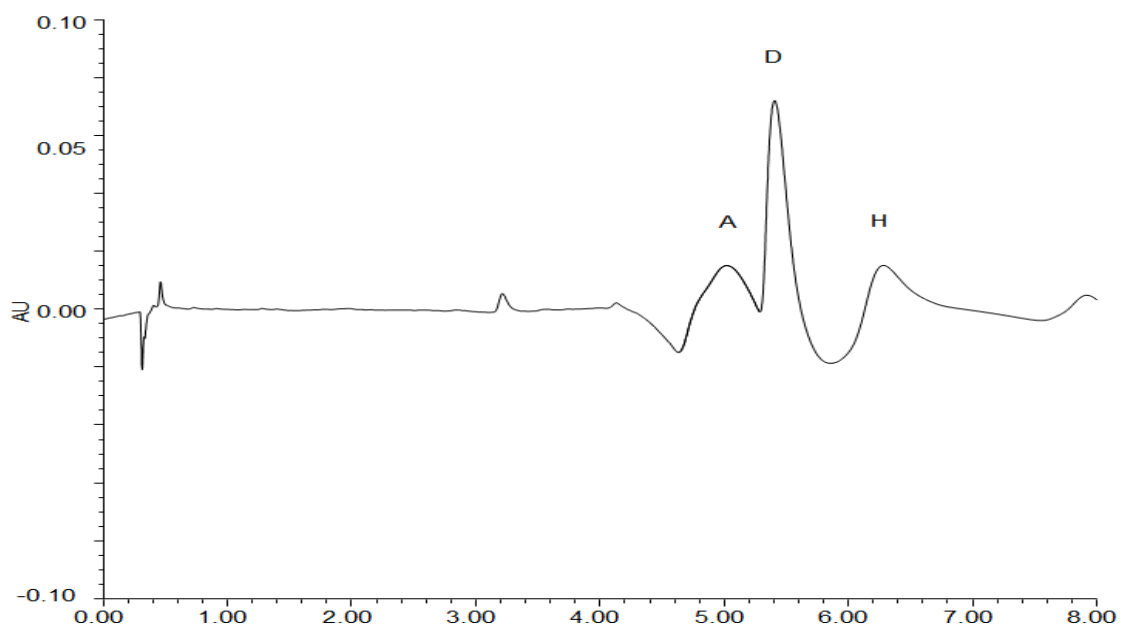
Skupina dasatinibu taktiež patrila medzi látky, ktoré sa nepodarilo dobre vyeluovať a odseparovať. Ako je to viditeľné na obr. 49 väčšinu látok sa nepodarilo eluovať. Rovnaké výsledky boli dosiahnuté aj pri vyskúšaní rôznych obmien mobilných fáz. Naproti tomu na referenčnej kolóne boli eluované všetky látky, preto je pri analýze tejto skupiny vhodnejšia.



Obr. 49 - Separácia zmesí dasatinibu a nečistôt na kolóne Hypercarb. A – dasatinib, B - DAS 1, C – DAS 2, D – DAS 3, E – DAS 4, F – DAS 5. Podmienky: ACN:IPA 1:1, TFA 0,1%

5.2.10. Analýza estrogénov a jeho nečistôt na PGC

Problematická bola aj analýza estrogénov. Najlepšie výsledky boli dosiahnuté pri použití ACN:IPA v pomere 1:1 ako organickej zložky a 0,1% TFA ako vodnej zložky mobilnej fáze. Avšak aj napriek tomu môžeme na obr. 50 vidieť, že táto metóda vôbec nie je vhodná, jednak pre blízky retenčný čas jednotlivých látok a rozmytie ostatných látok, ktoré ani nebolo možné presne identifikovať. Analýza na referenčnej kolóne má oproti použitiu PGC omnoho lepšiu selektivitu a rozlíšenie.



Obr. 50- Separácia zmesí estrogénov na kolóne HYPERCARB. A – EST-ME, B – Δ -EST, C – β -EST, D – α EST, E – Δ -ESN, F – ESN, G – EST-AC, H – ESTRI. Podmienky: ACN:IPA 1:1, TFA 0,1%

5.2.11. Analýza abiraterónu a jeho nečistôt na PGC

Pri tejto skupine látok sa nepodarilo ani pri jednej z použitých metód vyeluovať dané látky tak aby sa zobrazili vo výslednom chromatograme. Jednalo sa o nepolárne látky planárneho charakteru a preto je možné, že ich retencia na PGC bola veľmi vysoká. V tomto prípade boli teda vhodnejšie výsledky dosiahnuté pri použití referenčnej kolóny BEH C18 aj keď tam taktiež neboli úplne ideálne.

6. Záver

Separáčny potenciál stacionárnych fáz na báze porézneho grafitového uhlíku bol otestovaný na jedenástich skupinách látok zahrňujúcich liečivo a jeho potencionálne nečistoty. Zároveň bol porovnaný so separáciou na dobre známej a široko používanej referenčnej kolóne BEH C18. Vývoj a optimalizácia metód boli náročnejšie pri PGC a vyžadovali komplexnú úpravu podmienok separácie, naproti tomu pri použití kolóny BEH C18 boli v mnohých prípadoch dosiahnuté lepšie výsledky jednoduchšou cestou. Vo väčšine prípadov boli výsledky analýz z BEH C18 lepšie ako pri testovanej kolóne. Mnoho krát bola príčinou neeluovania jednotlivých látok vysoká retencia na PGC a nedostatočná elučná sila mobilných fáz. Výrobca v niektorých prípadoch odporúčal použitie tetrahydrofuranu, dichlormethanu a podobných mobilných fáz, ktoré sme sa rozhodli nevyužiť aby nedošlo k ohrozeniu funkčnosti chromatografického systému. Zároveň je dôležité zmieniť, že testovaná kolóna mala veľkosť častíc 3 μm , zatiaľ čo referenčná mala oveľa menšie častice s veľkosťou 1,7 μm . Táto skutočnosť mala jednoznačne vplyv na vyššiu účinnosť referenčnej kolóny BEH C18. Taktiež stojí za zmienku nízka kompatibilita šróbenia testovanej kolóny vzhľadom na odlišného výrobcu, čo tiež mohlo mať vplyv na nižšiu účinnosť separácie.

Ako najuniverzálnejšie podmienky pri separácii na PGC sa javilo použitie acetonitrilu a isopraponolu v pomere 1:1 ako organickej zložky a 0,1% roztoku kyseliny trifluorooctovej ako vodnej zložky mobilnej fázy.

PGC je potencionálne využiteľná vo farmácii. Medzi jej výhody, ktoré môžeme potvrdiť patrí vysoká mechanická odolnosť. Ďalej stabilita v celom rozmedzí pH a možnosť využitia vyšších teplôt. Jednotlivé metódy však vyžadujú osobitný prístup a komplexnejší vývoj.

Použitá literatura

- [1] L. Nováková et al., *Moderní HPLC separace v teorii a praxi I.* (2013) 11-267.
- [2] M. Zhang et al., *Trends in Analytical Chemistry*, 65 (2015) 107–121.
- [3] L. Nováková et al., *Talanta*. 68 (2006) 908-918.
- [4] J.E. MacNair et al., *Anal. Chem.* 69 (1997) 983–989.
- [5] S. Fekete et al., *Trends in Analytical Chemistry* 63 (2014) 2–13.
- [6] K.D. Wyndham et al., *Anal.Chem.* 75 (2003) 6781-6783.
- [7]<http://www.chromedia.org/chromedia?waxtrapp=nvlhIDsHonOvmOllEcCdB&subNav=htxjqDsHonOvmOllEcCdBL>, 18.2.2017.
- [8] L. Pereira, *J. Liq. Chrom. & Rel. Technol.*, 31 (2008) 1687-1731.
- [9] J. Knox, P. Ross, *Advances in Chromatography*, 37 (1997) 73-119.
- [10] C.West et al., *J. Chromatogr. A*, 1217 (2010) 3201-3216.
- [11] S. J. Marin et al., *J. Chromatogr. A*, 1030 (2004) 255-262.
- [12] J. Knox et al., *J. Chromatogr. A*, 352 (1986) 3–25.
- [13] Thermo Hypersil-Keystone, Hypercarb Columns, Technical Guide TG 01-06.
- [14] Mitakos et al., *Anal. Chim. Acta*, 505 (2004), 107–114.
- [15] Y. Daali et al., *J. Sep. Science*, 25 (2002), 280–284.
- [16] M. Gouy et al., *Anal. Chim. Acta*, 566 (2006), 178–184.
- [17] N. Helali et al., *Chromatographia* 63 (2006), 425–430.
- [18] J. Martens-Lobenhoffer et al., *J. Chromatogr. B*, 819, (2005), 197–200.
- [19] H. Ehrsson et al., *J. Chromatogr B*, 795, (2003), 291–294.
- [20] J. Reepmeyer et al., *J. Chromatogr. A*, 1083, (2005), 42–51.
- [21] D. Barrett et al., *Chromatographia*, 47, (1998), 667–672.
- [22] A. Karlsson et al., *J. Chromatogr. A*, 797, (1998), 75–82.

- [23] L. Monser, et al., J. Pharmaceut. Biomed. Anal., 27, (2002), 851–860.
- [24] L. Monser et al., J. Pharmaceut. Biomed. Anal., 32, (2003), 1087–1092.
- [25] L. Monser et al., J. Liq. Chromatogr. Rel. Techn., 26, (2003), 261–271.
- [26] M. Doležal et al., Farm. chemie léčiv působících na CNS, (2013) 33-80.
- [27] S.H. Kennedy et al., Neuropsychiatric Disease and Treatment 3, (2007), 423-428.
- [28] D. Taylor et al., BMJ, 348, (2014) g1888.
- [29] Y. Liu et al., J. of Pharm. and Biom. A., 81-82, (2013), 193-201.
- [30] M. Doležal et al., Farm. Chemie léčiv působících na ANS, (2011) 42-51.
- [31] M. Matoušková, Remedia 25 (2015), 46–48.
- [32] Nan Zhou et al., Chinese Chemical Letters, vol. 28. is.2, (2017) 426–430.
- [33] X. Ma et al., J. Pharmaceut. Biomed. Anal., 131 (2016) 436–443.
- [34] J. Hartl et al., Farmaceutická chemie III., (2008), 42-50.
- [35] K. Filip et al., J. of Molecular Structure, 991 (2011), 162-170.
- [36] J. Bultas, Remedia, 2 (2011), 116-125.
- [37] V. Reddy et al., An International J. for Rapid Communication of Synthetic Organic Chemistry, 42 (2012), 3513-3523.
- [38] M. Doubek, Remedia, 2 (2007), 201-206.
- [39] <https://www.urmc.rochester.edu/encyclopedia/content.aspx?ContentTypeID=85&ContentID=P00559>, 20.8.2017.
- [40] https://www.adc.sk/databazy/produkty/spc/zytiga-250-mg-tablety-169973.html#5_0, 20.8.2017.
- [41] Method Development Guide for Hypercarb Columns, 2007, Thermo Scientific.