

**Univerzita Karlova v Praze**  
**Farmaceutická fakulta v Hradci Králové**  
Katedra analytické chemie

ANALÝZA FARMACEUTICKY VÝZNAMNÝCH  
LÁTEK METODOU KAPALINOVÉ  
CHROMATOGRAFIE

Diplomová práce

Hradec Králové 2007

Marie Švástová

Ráda bych poděkovala PharmDr. Radkovi Sladkovskému, Ph.D. a PharmDr. Lucii Novákové, Ph.D. za odborné vedení mé diplomové práce, za jejich cenné rady a trpělivost. Poděkování také patří všem pracovníkům katedry analytické chemie za jejich vstřícný přístup.

# **1.Obsah**

1.	Obsah .....	3
2.	Úvod.....	5
3.	Cíl práce .....	7
4.	Teoretická část .....	9
4.1.	Vysokoučinná kapalinová chromatografie - HPLC .....	10
4.1.1.	Schéma kapalinového chromatografu.....	11
4.1.2.	Detektory v HPLC .....	11
4.1.3.	Chromatografické kolony .....	12
4.2.	Stacionární fáze na bázi silikagelu.....	14
4.2.1.	Výhody silikagelu: .....	14
4.2.2.	Nevýhody silikagelu: .....	15
4.2.3.	Typy silikagelů: .....	16
4.2.4.	Příprava reverzních fází .....	17
	Chemicky vázané stacionární fáze.....	17
4.3.	Stacionární fáze na bázi ZrO <sub>2</sub> .....	21
4.3.1.	Mechanismy separace vzorku na zirkoniové koloně .....	21
	Iontová výměna.....	21
	Výměna ligand .....	22
4.3.2.	Modifikace ZrO <sub>2</sub> .....	24
	ZrO <sub>2</sub> modifikovaný polybutadienem – PBP-ZrO <sub>2</sub> .....	24
	ZrO <sub>2</sub> modifikovaný uhlíkem – C-ZrO <sub>2</sub> .....	24
4.4.	Základní chromatografické vztahy .....	25
4.4.1.	Retenční čas a retenční objem.....	25
4.4.2.	Retenční faktor k (kapacitní faktor k') .....	25
4.4.3.	Faktor symetrie píku .....	26
4.4.4.	Rozlišení .....	26
4.5.	Tricyklická antidepressiva.....	27
5.	Praktická část .....	32
5.1.	Materiál a pomůcky .....	33
5.1.1.	Chemikálie .....	33
5.1.2.	Použité přístroje .....	33
5.1.3.	Příprava vzorků.....	34
5.1.4.	Příprava tlumivých roztoků.....	34
5.1.5.	Chromatografické podmínky použité při analýzách .....	35
6.	Výsledky a diskuse .....	36
6.1.	Chromatografické chování vybraných sorbentů v různých oblastech pH .....	37
7.	Seznam příloh .....	63
8.	Závěr .....	68
9.	Literatura.....	70

## **2.Úvod**

První zmínku o kapalinové chromatografii můžeme najít v roce 1903, kdy botanik M.S. Tswett poprvé použil k dělení listových barviv sorbent.

Avšak až na začátku čtyřicátých let minulého století objevem rozdělovací chromatografie dochází k rozvoji kapalinové chromatografie. V padesátých letech byly vyvinuté první automatické analyzátory na základě Moorových a Steinových prací. Tehdy používané kolony byly plněné částicemi o průměru 100 až 200  $\mu\text{m}$  a mobilní fáze protékala pouze působením gravitační síly. Koncem šedesátých let došlo k rozvoji gelové chromatografie, ale až v sedmdesátých letech došlo ke skutečnému posunu ve vývoji, s prudkým rozvojem teorie a instrumentace kapalinové chromatografie.

Význam kapalinové chromatografie neustále roste, má nezastupitelné místo v analýze řady oborů a tedy i ve farmacii při analýze léčiv.

Předností vysokoúčinné kapalinové chromatografie je rychlost analýzy, vysoká separační účinnost, dostupné instrumentační vybavení umožňující plně automatizovaný provoz, výborné kvantitativní i kvalitativní výsledky analýz.

Dnešní rozvoj se uskutečňuje především v používání nových detektorů a stacionárních fází.

Jednak je snaha modifikovat klasické silikagelové stacionární fáze a odstranit tak některé jejich nevýhodné vlastnosti, dále probíhá intenzivní výzkum stacionárních fází založených i na oxidech jiných kovů –  $\text{Al}_2\text{O}_3$ ,  $\text{TiO}_2$  a  $\text{ZrO}_2$ . Zatím nejperspektivněji se jeví kolony zirkoniové.

## **3.Cíl práce**

Cílem této práce bylo srovnání chromatografických sorbentů lišících se svojí syntézou i základem (silikagel a oxid zirkoničitý) v analýze vybraných léčiv ze skupiny tricyklických antidepresiv (amitriptylin, nortriptylin, imipramin a desipramin) metodou vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC). Předmětem bylo srovnání chromatografického chování daných léčiv v širokém rozmezí pH pracovních možností vybraných kolon při vhodných chromatografických podmínkách (složení mobilní fáze, teplota, průtok mobilní fáze).



## **4. Teoretická část**

## 4.1. Vysokoúčinná kapalinová chromatografie - HPLC

V současné době je vysokoúčinná kapalinová chromatografie – High performance Liquid Chromatography (HPLC) jednou z nejprogresivnějších metod, která se uplatňuje ve všech oblastech analýzy léčiv, ale i velmi výrazně v jiných oborech. Dělení látek probíhá mezi stacionární fází naplněnou v koloně a fází mobilní procházející kolonou za zvýšeného pracovního tlaku.

Separace složek vzorku je založena na opakovaném velmi rychlém ustavování rovnovážné distribuce jednotlivých látek mezi stacionární fází a okolním kapalným médiem (mobilní fází), která protéká kolonou a unáší s sebou složky vzorku. Rozdíly v distribuci jednotlivých složek vedou k tomu, že složky migrují kolonou s různou rychlostí a vystupují z kolony v různém čase, což se na časové závislosti odezvy detektoru (chromatogramu) projeví vzájemně oddělenými elučními vlnami (píky), které mají v ideálním případě gaussovský profil.

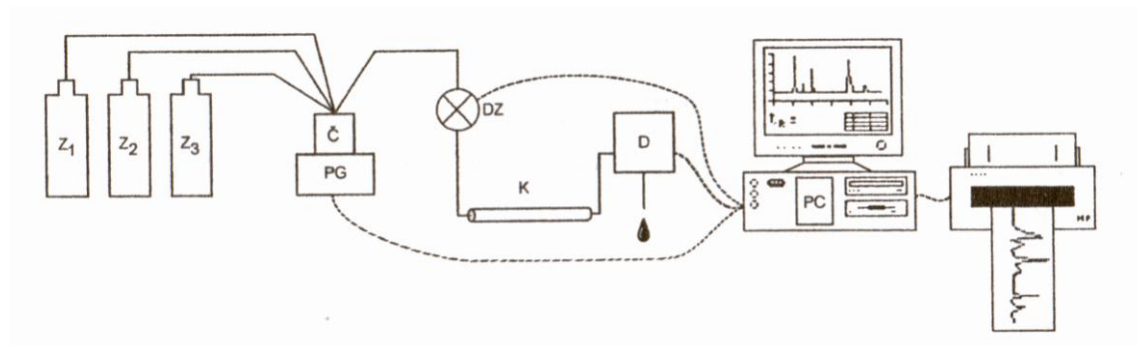
Zmenšením částic stacionární fáze je dosaženo větší účinné plochy a tudíž vyšší separační účinnosti. Pro dostatečně rychlý průtok mobilní fáze je ovšem zapotřebí ji protlačit kolonou působením čerpadla pod vysokým tlakem (s optimálním pracovním tlakem v rozmezí 10-20 MPa). V průběhu separace látek se uplatňují nejčastěji následující mechanismy: rozdělovací, adsorpční, iontově-výměnný a gelový.

Jako mobilní fáze se volí běžná rozpouštědla nebo jejich směsi. Měření probíhá buď za konstantního složení mobilní fáze v průběhu celé analýzy (isokratická eluce) nebo se mění složení mobilní fáze v průběhu celé analýzy (gradientová eluce).

Předpokladem úspěšné HPLC analýzy je optimalizace podmínek chromatografie tak, aby separované látky poskytovaly ostré a symetrické chromatografické píky. Kvalitativní charakteristikou analýzy je retenční čas nebo retenční objem, kvantifikace se provádí stanovením plochy nebo výšky chromatografického píku s použitím standardů. Metodou vnějšího standardu se porovnává plocha píku stanovované látky s plochou píku standardu, který je analyzován za stejných podmínek. Přesnější je metoda standardu vnitřního, kdy se analyzuje standard i sledovaná látka v jednom vzorku za zcela stejných podmínek[1-4].

### 4.1.1. Schéma kapalinového chromatografu

Kapalinový chromatograf se skládá ze zásobníků mobilní fáze, pumpy, injektoru, chromatografické kolony, detektoru a systému pro sběr, vyhodnocování a uchovávání dat plus některá přídatná zařízení (termostat, degasser, přídatné filtry, sběrač frakcí atd.). viz obr.1



**Obr.1** Schéma kapalinového chromatografu [3]

Z<sub>1</sub>, Z<sub>2</sub>, Z<sub>3</sub> – zásobníky mobilní fáze; Č – vysokotlaké čerpadlo; PG – programovací jednotka; DZ – dávkovací zařízení; K – chromatografická kolona; D – detektor; PC – počítač

### 4.1.2. Detektory v HPLC

Základní funkcí detektoru je převádění výsledků separace v koloně na registrovatelnou formu. Přítomnost analyzované složky je zaznamenána jako závislost intenzity signálu na čase.

Ideální kapalinový detektor by měl splňovat následující vlastnosti [5]:

- nízký drift a hladinu šumu
- vysokou citlivost
- rychlou odezvu
- široký lineární rozsah
- malý mrtvý objem (minimální rozšiřování zón)
- tvar cely, který eliminuje promísení separovaných pásů
- nízkou citlivost ke změnám typu rozpouštědla, průtokové rychlosti a teplotě
- jednoduchou a spolehlivou obsluhu
- nedestruktivní
- univerzální
- vysoce selektivní

Přehled nejběžnějších detektorů [3]:

- spektrofotometrické (zejména v UV/VIS oblasti)
- refraktometrické
- fluorimetrické
- elektrochemické
- hmotnostní spektrometr [3]

### **4.1.3. Chromatografické kolony**

Kolona má rozhodující význam pro kvalitu chromatografie a její volba významně ovlivňuje i dobu analýzy. Mnoho rozličných aplikací HPLC podmiňuje existenci velkého množství kolon různé délky, vnitřního průměru a náplně.

Materiálem používaným na výrobu chromatografických kolon je nejčastěji nerezová ocel z důvodu kompromisu mezi cenou, zpracovatelností a rezistencí vůči korozi. Vnitřní průměr komerčně dostupných kolon je 2,1 - 4,6 mm.

Komerčně dostupné kolony se stejnou stacionární fází se mohou navzájem výrazně lišit ve svých vlastnostech v závislosti na způsobu výroby. V některých případech mohou být zaznamenány rozdíly v chromatografických vlastnostech i mezi jednotlivými šaržemi od jednoho výrobce. Tento jev je z hlediska vývoje a použitelnosti HPLC metodik nežádoucí, protože vyžaduje dodatečné zásahy do již vyvinuté metodiky. Renomovaní výrobci chromatografických kolon garantují shodu mezi jednotlivými šaržemi pomocí vybraných parametrů, mezi které patří počet teoretických pater ( $N$ ), selektivita ( $\alpha$ ), retenční (kapacitní) faktor ( $k$ ) pro testovací analyty a často je uveden i údaj o hodnotě zpětného tlaku na koloně za definovaných podmínek [6].

Ideální stacionární fáze by měla splňovat následující parametry:

- dlouhodobá chemická stabilita vůči agresivním mobilním fázím v nízké i vysoké oblasti pH
- mechanická stabilita – odolnost vůči vysokým pracovním tlakům
- jednotlivé částice by měli mít velký povrch a měli by být co nejvíce uniformní – distribuční funkce rozložení jejich velikosti by měla být co nejužší, moderní částice by měli být sférické, aby byl minimalizován zpětný tlak
- velikost pórů by měla odpovídat velikosti analytu

- materiál by měl být termálně odolný
- materiál by měl mít povrch, který je energeticky homogenní a měl by být chemicky modifikovatelný
- minimální bobtnavost v případě polymerních fází nebo při potažení nosiče polymerní vrstvou [6,7]

## 4.2. Stacionární fáze na bázi silikagelu

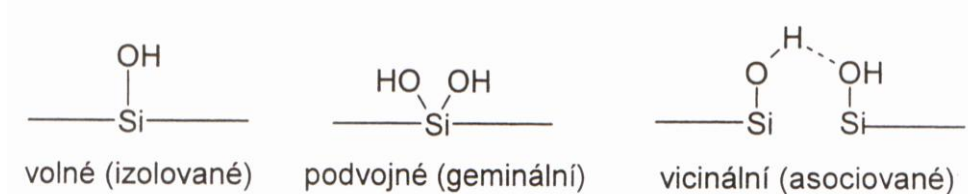
Chromatografické kolony, které se dnes nejvíce používají, jsou na bázi silikagelu. Je to dáno mnoha výhodnými vlastnostmi tohoto materiálu.

### 4.2.1. Výhody silikagelu:

- vysoká mechanická odolnost i při použití vysokých pracovních tlaků
- lze vyrobit různě velké částice s různou velikostí pórů
- povrch silikagelu je velmi snadno modifikovatelný, lze tedy připravit velké množství stacionárních fází o různých vlastnostech
- jako mobilní fázi lze použít vodu i organická rozpouštědla, aniž by docházelo k prostorovým změnám stacionární fáze, jak tomu může být v případě polymerních stacionárních fází.
- chemické složení silikagelu vyjádřeno jako  $\text{SiO}_2 \times \text{H}_2\text{O}$ , z toho vyplývá, že voda je vázána v nestechiometrickém množství [1,6]

V zásadě lze výrobou získat dva druhy částic silikagelu. Nepravidelné částice získáme hydrolyzou anorganických silikátů, zpravidla obsahují stopová množství jiných kovů- zejména Al a Fe. Kolony plněné nepravidelnými částicemi mohou mít nižší selektivitu a později i vyšší zpětný tlak na koloně, což je nevýhodné. Oproti tomu kolony plněné pravidelnými sférickými částicemi, které vznikají hydrolyzou alkoxy-silikátů, jsou daleko méně znečištěny kovy a mají vyšší selektivitu, čemuž ale odpovídá i vyšší cena.

Povrch silikagelu je tvořen silanoly a siloxany. Silanoly jsou hydrofilní a vyskytují se jako volné (izolované), podvojně (geminální) a asociované (vicinální), viz obr.2



**Obr.2** silanoly na povrchu silikagelu: volné (izolované), podvojně (geminální) a vicinální (asociované)[4]

Siloxany jsou hydrofobní a odpovídají za retenci hydrofobních látek v polární mobilní fázi.

Silikagely vhodné pro HPLC jsou plně hydratované, což znamená, že obsahují cca 8  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}$  silanolových skupin, které vytvářejí povrchovou vrstvu. Hydratovaný silikagel obsahuje všechny tři typy silanolových skupin. Volné silanoly se vyskytují v malých koncentracích, mají velmi kyselý charakter a jsou tedy zdrojem silných interakcí s bazickými látkami. Silikagel s větším počtem izolovaných silanolů významně zadržuje bazické látky, píky jsou širší a chvostují [6,8].

Podvojně silanoly se vyskytují v koncentraci 25-30%, jsou méně kyselé, nereagují tedy tolik s bazickými látkami.

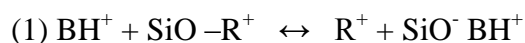
Asociované silanoly vykazují nejmenší kyselost a tvoří největší procento silanolů. Počet asociovaných silanolů lze ještě zvýšit tzv. rehydroxylací silikagelu. (Tato metoda zbavuje silikagel také stopových množství kovů).

Plně hydroxylovaný silikagel má řadu výhod:

- větší počet asociovaných silanolů
- menší tendence adsorbovat bazické látky
- lepší mechanická stabilita
- lepší hydrolytická stabilita vázaných ligand[6]

#### 4.2.2. Nevýhody silikagelu:

- Chemicky stabilní jen v oblasti pH 2-8, dlouhodobě stabilní jen v oblasti pH 3-7
- Kyselé katalyzovaná hydrolýza siloxanové vazby se projevuje pod pH 4, což vede ke ztrátě vázané fáze a tím ke snížení chromatografické účinnosti. Nad pH 9 se silikagel začíná rozpouštět, protože není kompletně chráněn mobilní fází a také dochází ke snížení účinnosti.
- Kyselý povrch, komplikuje separaci bazických látek  
Bazická látka interaguje s volnými silanoly, což může vést k neostrým píkům, chvostování nebo nárůstu retenčního času, všechny tyto faktory nakonec snižují reprodukovatelnost analýzy. Vhodnými podmínkami lze však tyto interakce minimalizovat. Interakce mezi volným silanolem a bazí je iontově-výměnná, viz rovnice (1)



Přítomnost nečistot v silikagelu, zejména kovy (Al, Fe, Zn, Ni, atd.) způsobují interakce s chelatujícími látkami, což se může ve výsledku projevit opět chvostujícími píky, nebo jsou látky na koloně zadrženy úplně. Kovy také aktivují povrchové silanoly, a dochází k významnému zvýšení kyselosti daných silanolů. Na druhé straně bylo prokázáno, že méně čisté silikagely v oblasti pH 8 a vyšší jsou více stabilní než vysoce čisté silikagely [9].

Silikagel má nízkou hodnotu pH, takže silanoly disociují za neutrálního pH a povrch má negativní náboj, dochází k interakci mezi silanoly a bazickými látkami. K zamezení těchto interakcí lze [10]:

- snížit pH, aby se potlačila disociace silanolů (pod pH 2 je většina stacionárních fází nestabilních)
- zvýšit pH, aby se analyt nacházel v deprotonovaném stavu (při pH nad 8 dochází k rozpouštění silikagelu)
- přidat do mobilní fáze látku, která bude blokovat silanoly nebo přidat iontově párové činidlo, které vytvoří iontový pár a zamezí se tak interakcím s povrchem

#### 4.2.3. Typy silikagelů:

**Silikagel typ A** (původně vyráběný typ) – silikagel typu sil-gel, obsahuje více volných silanolů, je též více znečištěn kovy, připravuje se gelací roztoků křemičitanů, vyznačuje se vyšší pórovitostí a nepravidelným tvarem pórů [1].

**Silikagel typ B** (novější typ) – silikagel typu sil-sol-gel, vysoce čištěný, obsahuje méně volných silanolů, připravuje se shlukováním částic solů oxidu křemičitého při pyrolyze organokřemičitých látek, má menší pórovitost a pravidelnější uspořádání pórů než typ A, vykazuje i lepší chemickou stabilitu a separaci i látek iontových a ionizovatelných.

**Silikagel typ C** (nejnovější typ) – vychází z typu B, ale díky patentovanému způsobu výroby (firma MicroSolv, USA) není povrch zakončen silanolovými skupinami, ale vazbou Si-H, která je značně stabilní a velmi polární [6].



#### 4.2.4. Příprava reverzních fází

##### Chemicky vázané stacionární fáze

Náplně s chemicky vázanými stacionárními fázemi na nosič mají od původně používaných stacionárních fází (silikagel, oxid hlinitý) značné praktické výhody. Především je to možnost programově volené změny teploty nebo složení mobilní fáze a daleko rychlejší vytváření rovnováhy mezi sorbentem a mobilní fází. Nejčastěji používaným nosičem je silikagel [11]. Chemická modifikace silikagelu se týká všech procesů vedoucích ke změně chemického složení povrchu. Dva základní typy modifikace jsou:

- fyzikální úprava (termální nebo hydrotermální) vedoucí ke změně v koncentraci a poměru silanolových a siloxanových skupin na povrchu.
- chemická úprava; chemicky vázanými organickými ligandy, které významně mění adsorpční vlastnosti silikagelového povrchu [1].

##### Typy vazeb

Velmi rozšířenou variantou je atakování silikagelového povrchu organicko funkčními skupinami, R. Tyto skupiny přinášejí substituenty s různou funkční závislostí (alkoholové, fenolicko-hydroxylové, fenylové, aminové, karbonylové, nitrilové atd.). Funkční skupina R je spojena s povrchem křemíkového atomu následnými způsoby[5]:

##### Si-R

Funkční skupina je přímo navázána k povrchu křemíkového atomu. Eliminace původní hydroxylové skupiny je dosaženo chlorací povrchu s následnou úpravou chlorovaného povrchu organokovovou sloučeninou. Tento typ povrchové modifikace je obvykle pracný a nedává stabilně reprodukovatelné povrchové modifikace.

##### Si-O-R

Tato vazba je známa jako esterová vazba a je snadno tvořena reakcí alkoholovými a povrchovými hydroxylovými skupinami.

## Si-O-Si-R

Tato struktura je získána úpravou hydroxylovaného povrchu silikagelu s organosilanami  $R_nSiX_{4-n}$ ; X je reaktivní skupina (halogen, ethoxy nebo methoxy skupina). Tento typ vázaného ligandu je nejčastěji používán v HPLC.



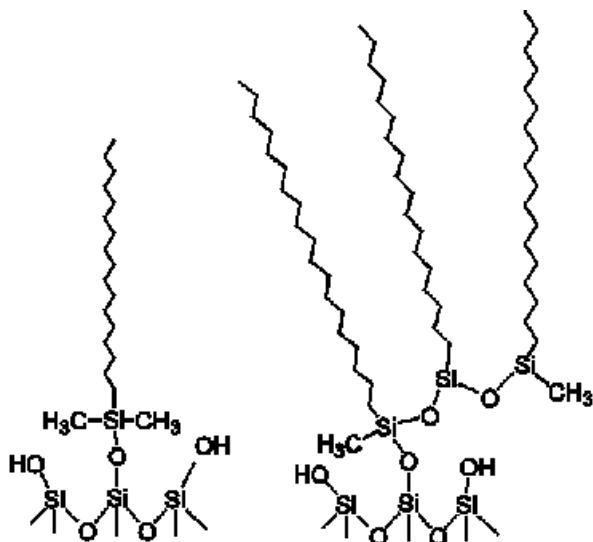
**Obr.3** Příprava chemicky vázaných stacionárních fází

Reakce povrchových silanolových skupin s chlordinmethylsilanem (A), trichlorsilanem (B), triethoxysilanem (C) [9]

## Monomerní a polymerní vazba

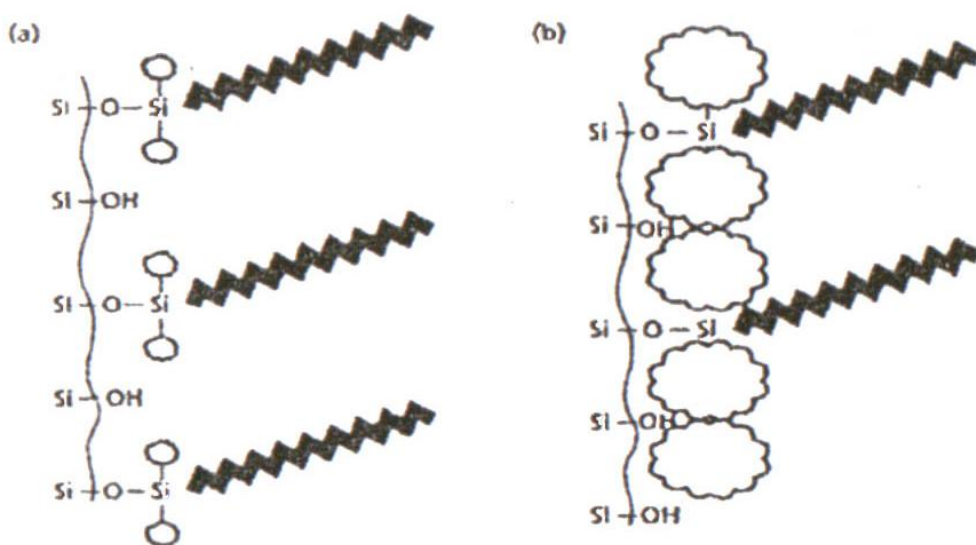
Reakcí monochlorsilanu s hydroxylovaným silikagelovým povrchem se tvoří vazba pouze jednoho alkylsilanového ligandu s jednou silanolovou skupinou. Tento typ vazebné vrstvy, který znamená vznik monomolekulární vrstvy na silikagelovém povrchu se nazývá "monomerní vazba".

Polymerní fáze se připraví reakcí silikagelu s di- nebo trichlorsilany v přítomnosti stopového množství vody a dochází ke vzniku stromovité struktury na jedné reakční silanolové skupině silikagelového povrchu [5,6].



**Obr.4.** Schéma monomerně a polymerně vázaných skupin .[5]

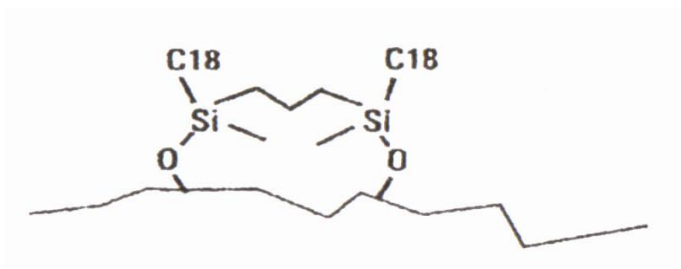
Pro přípravu fází se sníženou silanolovou aktivitou lze využít silizace s objemnějšími substituenty - rozvětvenými postranními alkyly, např. diisopropylými či terc-butylovými, které stericky brání přístupu k nezreagovaným silanolovým skupinám (obr.5)



**Obr.5** Stínění povrchu silikagelu pomocí velkých postranních řetězců pro chemicky vázané fáze připravené a) z chlordinmethyl-oktadecylsilanu a b) z chlordiisopropyl-oktadecylsilanu [1]

Zlepšení symetrie píků bazických látek a zvýšené stability v širším rozmezí pH lze dosáhnout i u „bidentátových“ stacionárních fází, připravených reakcí silikagelů se silanizačními činidly se skupinami C18 nebo C8 na dvou atomech křemíku vzájemně

spojených propylenovou skupinou, která „přemostí“ silanolové skupiny na povrchu silikagelu (obr.6)



**Obr.6** Horizontálně polymerované stacionární fáze s bidentátovou chemicky vázanou fází [1]

### „Endcapping“

Některé silikagelové stacionární fáze jsou upravované procesem zvaným „endcapping“. Po navázání stacionární fáze je ve druhém kroku tato fáze podrobena reakci s malými silany jako např. trimethylchlorsilanem či dimethyldichlorsilanem. Tyto malé „endcapping“ molekuly vážou volné silanolové skupiny a snižují tak jejich počet, čímž se minimalizují nežádoucí interakce s analytem. Výhodou endkapujících molekul je, že tvoří hydrofóbní bariéru na povrchu a brání tak rozpouštění silikagelu ve vyšším pH. Jejich nevýhoda spočívá v jejich hydrolyze v mobilní fázi s nízkým pH [1,6].

### 4.3. Stacionární fáze na bázi ZrO<sub>2</sub>

Vedle silikagelových stacionárních fází je řadu let věnován výzkum i stacionárním fázím na bázi jiných oxidů kovů – ZrO<sub>2</sub>, TiO<sub>2</sub>, Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> aj. Nejperspektivněji se v současnosti jeví stacionární fáze s obsahem oxidů zirkonia [1].

Chromatografické kolony na bázi ZrO<sub>2</sub> mají srovnatelnou efektivitu jako silikagelové kolony (>100 000pater/m), ale jejich chemická a tepelná stabilita je daleko vyšší. Od silikagelových kolon se také odlišují v retenci a selektivitě.

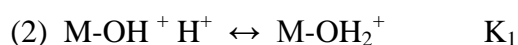
Vysoká chemická stabilita zirkoniových kolon vychází ze struktury ZrO<sub>2</sub>. Síla vazby mezi atomem zirkonia a kyslíkem je srovnatelná jako síla vazby mezi atomem křemíku a kyslíkem, ale v krystalové mřížce ZrO<sub>2</sub> je každý atom zirkonia vázán současně sedmi atomy kyslíku, kdežto u SiO<sub>2</sub> je každý atom křemíku vázán pouze čtyřmi atomy kyslíku [6].

Podstata separačního procesu je u zirkoniových kolon odlišná než u silikagelových. Díky nízké hodnotě p<sub>H</sub>pc (pH, při kterém má povrch celkový nulový náboj) připadá na silikagelu do úvahy pouze výměna kationtů, kdežto ZrO<sub>2</sub> se chová jako amfoterní iontoměnič. O tom, zda se bude chovat jako anex nebo katex rozhodne pH prostředí. Další odlišností je skutečnost, že na povrchu ZrO<sub>2</sub> se vyskytují skupiny typu Lewisových kyselin, které zodpovídají za schopnost ZrO<sub>2</sub> působit jako měniče ligandů. I když se v HPLC používá modifikovaný ZrO<sub>2</sub>, nelze touto modifikací zablockovat úplně všechny skupiny typu Lewisových kyselin, na retenci látek na koloně se tedy podílí i tento efekt. Jaký mechanismus separace se při analýze projeví jako dominantní závisí na více faktorech – typu analytu, pH mobilní fáze, typu pufru a jeho iontové síle, na použité organické složce mobilní fáze [6].

#### 4.3.1. Mechanismy separace vzorku na zirkoniové koloně

##### Iontová výměna

Povrchové hydroxyly ZrO<sub>2</sub> se chovají v závislosti na prostředí jako baze – přijímají proton (2), nebo jako kyseliny – odevzdávají proton (3)[12].

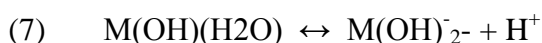
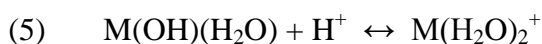


K<sub>1</sub> a K<sub>2</sub> jsou ionizační konstanty. H<sup>+</sup> a OH<sup>-</sup> jsou potenciální určující ionty.

Jestliže počet iontů kladně nabitých skupin ( $M-OH_2^+$ ) se rovná počtu iontů záporně nabitých skupin ( $M-O^-$ ), pak celkový povrchový náboj se rovná nule. Hodnota pH, kdy je celkový náboj nulový se označuje jako  $pH_{pzc}$  a závisí na ionizačních konstantách viz rovnice (4)

$$(4) \quad pH_{pzc} = 0,5(pK_1 + pK_2)$$

Oxid kovu se bude chovat jako anex při pH menším než  $pK_1$  a naopak se chovat jako katex, jestliže pH prostředí bude větší než  $pK_2$ .



M v těchto rovnicích znamená  $Zr^{IV}$

Rovnice (5), (6) vysvětlují, jak lze zadržovat anionty. S rostoucím pH se posunuje rovnováha v rovnici (5) směrem vlevo a klesá i kapacita pro retenci aniontů. Následující rovnice (7) a (8) nám zase ozřejmuje, jak stacionární fáze na bázi  $ZrO_2$  zadržuje kationty. Čím má prostředí vyšší pH, tím je schopnost zadržovat kationty vyšší. Z výše uvedených rovnic vyplývá, že stacionární fáze  $ZrO_2$  zadržují kationty i anionty v závislosti na pH prostředí.  $ZrO_2$  se mění z katexu na anex v intervalu pH 6-7, (což odpovídá hodnotě izoelektrického bodu  $ZrO_2$ ).

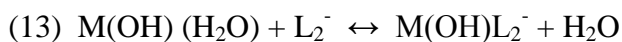
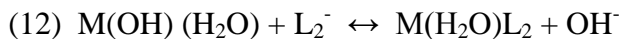
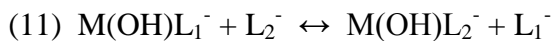
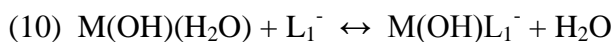
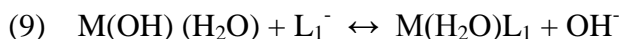
U silikagelu je tomu jinak. Silikagel má nízkou hodnotu  $pH_{pzc}$ , takže silanoly disociují za neutrálního pH a povrch má negativní náboj, dochází k interakci mezi silanoly a bazickými látkami.

Oxidy kovů mají vyšší hodnoty pH než  $SiO_2$ , takže v neutrálním prostředí není povrch neutrálně nabitý a k interakcím s bázemi nedochází. Díky stabilitě ve vysokém pH lze bazické látky analyzovat jako nedisociované molekuly.

## Výměna ligand

Na povrchu  $ZrO_2$  existují skupiny typu Lewisových kyselin, díky jejich přítomnosti je možná výměna ligand s analytem typu Lewisových bází. Výměna ligand může probíhat i na modifikovaných oxidech, protože při potažení povrchu oxidu uhlíkem či polymerem se nevytváří nepropustná souvislá vrstva, část povrchu oxidu může reagovat. Hlavní úlohu hrají koordinačně vázané molekuly vody, které mohou být vyměněny za jinou Lewisovu bazi [10,12]. Čím je tato Lewisova baze silnější, tím

snazší je výměna ligand. Následující rovnice popisují různé možnosti interakcí mezi oxidem kovu a bazemi



V rovnicích značí M kov,  $\text{L}_1$  Lewisovu bazi mobilní fáze a  $\text{L}_2$  analyt typu Lewisovu baze. Rovnice (9) a (10) popisují interakci modifikovaného povrchu oxidu kovu, pokud je součástí mobilní fáze látka typu Lewisovy baze. Výměnu ligandu mobilní fáze  $\text{L}_1$  za ligand analytu  $\text{L}_2$  popisují rovnice (11) až (13). Příspěvky  $\text{H}_2\text{O}$  a  $\text{OH}^-$  k výměně ligandů jsou silně závislé na pH mobilní fáze. Při vysokém pH je příspěvek rovnic (9) a (13) k celkové výměně ligand zřejmě minimální, protože ion  $\text{OH}^-$  je velmi silná Lewisova zásada.  $\text{OH}^-$  je na  $\text{ZrO}_2$  nejsilnější Lewisova baze a je schopna vytěsnit z povrchu baze ostatní. Přítomnost koordinovaně vázané vody je pro výměnu ligand velmi důležitá. Silikagel takto vázanou vodu neobsahuje, proto na něm výměna ligand neprobíhá.

Síla interakce mezi Lewisovou kyselinou a Lewisovou bází je závislá na elektronové hustotě a na polarizovatelnosti baze. Malá polarizovatelnost a velká hustota má za následek silnější interakce. Síla interakce klesá v řadě:

Fosfát > fluorid > citrát > sulfát > acetát > formiát > nitrát > chlorid [12]

Eluotropní řada je vytvořena podle klesající schopnosti vytěsnit anion kyseliny benzoové.

$\text{ZrO}_2$  silně reaguje s Lewisovými bazemi - s hydroxidy, fluoridy a karboxyláty. Maximum adsorpce se vyskytuje pravděpodobně v bodě, když  $\text{pH} = \text{pK}_a$ . Z toho vyplývá, že když je analyt velmi silná Lewisova baze, tak se dá očekávat hodně malá chromatografická účinnost, pokud není v mobilní fázi přítomná ještě silnější Lewisova baze (fosfát, acetát). Fluorid nelze použít v nízkém pH, jelikož se vytváří kyselina fluorovodíková, která  $\text{ZrO}_2$  rozpouští [12].

### 4.3.2. Modifikace ZrO<sub>2</sub>

K modifikaci stacionární fáze na bázi ZrO<sub>2</sub> lze použít tyto postupy [12]:

- Dynamická modifikace
- Kovalentní chemická modifikace
- Fyzikální modifikace – potažení vrstvou polymeru či uhlíku

#### **ZrO<sub>2</sub> modifikovaný polybutadienem – PBP-ZrO<sub>2</sub>**

ZrO<sub>2</sub> modifikovaný polybutadienem má výbornou tepelnou i chemickou stabilitu, je též velice stabilní za vysokého pH. Selektivita PBP- ZrO<sub>2</sub> je ve srovnání se silikagelovými fázemi odlišná, lze použít i vysokých teplot a tak také ovlivnit selektivitu. Na retenci bazických látek na PBP- ZrO<sub>2</sub> má výrazný vliv použitý pufr a také jeho koncentrace, tento vliv je mnohem výraznější než u silikagelových fází. Při retenci bazických látek se uplatňuje zejména kombinace iontově výměnných a hydrofobních interakcí. Analýza kyselých látek vykazuje nízkou efektivitu separace kvůli výměně ligandů, pokud v mobilní fázi není přítomna silná Lewisova báze[6].

#### **ZrO<sub>2</sub> modifikovaný uhlíkem – C-ZrO<sub>2</sub>**

Stacionární fáze na bázi ZrO<sub>2</sub> modifikovaného uhlíkem mají výbornou chemickou a mechanickou stabilitu a odlišnou selektivitu.

Modifikace povrchu ZrO<sub>2</sub> uhlíkem je poměrně jednoduchý a vysoce reprodukovatelný proces. Povrch ZrO<sub>2</sub> lze pokrýt uhlíkem až z 97%.

Takto modifikovaný povrch je více hydrofóbní. Adsorpce analytu na povrch stacionární fáze je závislá na tvaru molekuly, proto jsou tyto stacionární fáze selektivnější ke geometrickým izomerům více než fáze na bázi ZrO<sub>2</sub> modifikované polymerem nebo vázanými řetězci [6].



## 4.4. Základní chromatografické vztahy

### 4.4.1. Retenční čas a retenční objem

Charakteristickou veličinou pro každou analyzovanou látku je čas mezi bodem nástřiku a maximální odezvou detektoru. Tento parametr se nazývá „retenční čas“ ( $t_R$ ). Druhým důležitým parametrem je retenční objem ( $V_R$ ), který lze definovat jako objem elučního činidla proteklého kolonou zatímco se eluuje daný analyt. Retenční objem je dán součtem skutečného retenčního objemu a tzv. mrtvého objemu (viz rovnice 14). Pod pojmem mrtvý objem ( $V_M$ ) se chápe celkový objem mobilní fáze (nezadržovaná složka) od místa nástřiku přes kolonu až po detektor [13].

$$(14) \quad V_R = t_R \cdot \nu$$

### 4.4.2. Retenční faktor k (kapacitní faktor k')

Retenční faktor je univerzálnějším parametrem a lze jej vypočítat jako poměr skutečného elučního objemu (nebo času) a mrtvého objemu (nebo času) dle rovnic (15) a (16)[13]:

(15)

$$k = \frac{V_R - V_M}{V_M}$$

(16)

$$k = \frac{t_R - t_0}{t_0}$$

V nichž značí:

k – kapacitní faktor

$V_R$  – retenční objem

$V_M$  – mrtvý objem

$t_R$  – retenční čas

$t_0$  – mrtvý čas

Velikost k je ovlivněna vlastnostmi sorbetu, elučního činidla, chromatografovaných látek a poměrem stacionární a mobilní fáze.

### 4.4.3. Faktor symetrie píku

V chromatografii se většinou nesetkáme s ideálním Gaussovým tvarem píku, ale pík vykazuje určitou míru asymetrie (pík chvostuje). Faktor symetrie píku označovaný jako tzv. Tailing factor  $T_f$  lze vypočítat z rovnice (17):

$$(17) \quad T_f = \frac{W_{0,05}}{2 \cdot f}$$

$w_{0,05}$  – šířka píku ve vzdálenosti 5% výšky píku

$f$  – menší část úsečky  $w_{0,05}$ , která vznikne protnutím úsečky kolmicí spuštěnou z vrcholu píku

### 4.4.4. Rozlišení

Rozlišení  $R_s$  mezi píky dvou složek, které mají podobnou výšku, lze definovat rovnicí (18):

$$(18) \quad R_s = \frac{1,18(t_{R2} - t_{R1})}{w_{h1} + w_{h2}}$$

Kde  $t_{R2} > t_{R1}$

$t_{R2}$  a  $t_{R1}$  – retenční časy nebo vzdálenosti podél základní linie od bodu nástřiku ke kolmicím spuštěným z vrcholů dvou sousedních píků

$w_{h1}$  a  $w_{h2}$  – šířky píků v poloviční výšce

Rozlišení rovné hodnotě 1,5 odpovídá rozdělení píků na základní linii.

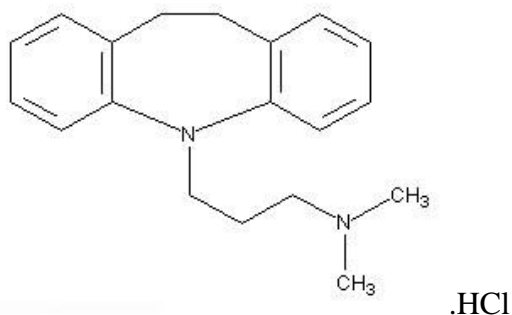
## 4.5. Tricyklická antidepresiva

Ve druhé polovině 50. let byl objeven imipramin, od něhož byla odvozena další tricyklická antidepresiva – norderivát desipramin, dále amitriptylin, nortriptylin aj.

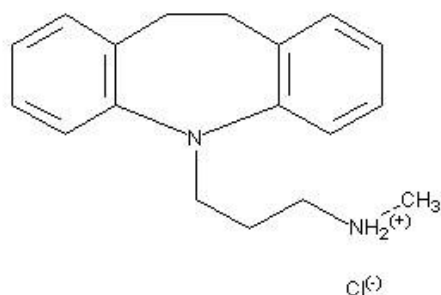
Tato léčiva jsou indikována v léčbě depresí různé etiologie jako přípravky AMYTRIPTYLIN-SLOVAKOFARMA® (amitriptylin), přípravek NORTRILEN® (nortriptylin), MELIPRAMIN® (imipramin). Desipramin je hlavním tělesným metabolitem imipraminu. Tricyklická antidepresiva se uplatňují také při léčbě dalších onemocnění, k nimž patří enuresis nocturna a některé chronické algické stavy .

Mechanismus účinku těchto léčiv spočívá v inhibici zpětného vychytávání noradrenalinu a serotoninu. Kvůli širšímu spektru nežádoucích účinků byla tricyklická antidepresiva nahrazena dalšími generacemi antidepresiv. Přesto je léčba tricyklickými antidepresivy u některých pacientů racionální a stále indikovaná [14]. Jde o látky lékopisné[13]:

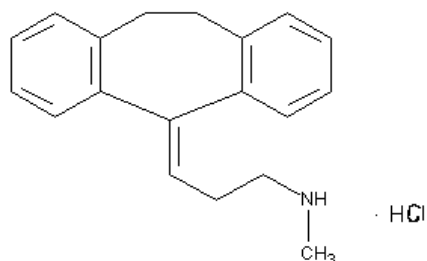
Imipramini hydrochloridum



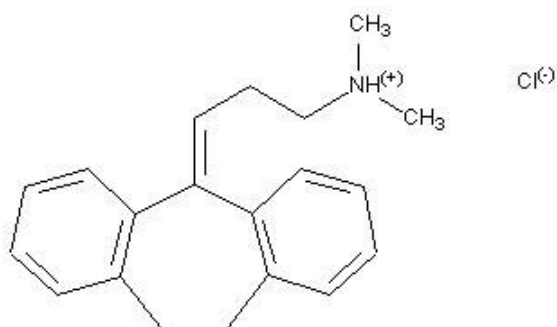
Desipramini hydrochloridum



### Nortriptylini hydrochloridum



### Amitriptylini hydrochloridum



### Metody stanovení tricyklických antidepresiv

Při stanovení tricyklických antidepresiv se často používá metoda HPLC, s použitím UV (příp. diode array), elektrochemického, nebo MS detektoru. Vlastní analýza látek z moči nebo plazmy se uskutečňuje po předešlé liquid-liquid či solid-phase extrakci. Jako stacionární fáze byly používány reverzní fáze C8, C18, CN na bázi silikagelu s různou syntetickou cestou. Jako mobilní fáze se uplatňovala směs organických rozpouštědel (acetonitril, methanol) a pufru (nejčastěji acetátového, fosfátového) v širokém rozmezí pH [15-33].

**Tabulka 1 - Metody stanovení tricyklických antidepresiv**

vzorek	analyzované látky	extrakce	kolona	mobilní fáze	detekce	zdroj
sérum	imipramin desipramin	liquid-liquid	C18	acetonitril:0,01M triethylamin v destilované vodě, upravený na pH 3 (60:40, v/v)	UV 260nm	[15]
sérum	amitriptylin, nortriptylin	solid-phase	kyano C	acetonitril (26%):0,05M fosfátový pufr s přísadkou ethylendiaminu	210nm	[16]
sérum/ plazma	amitriptylin, nortriptylin a jejich hydroxyderiváty		předkolona:RP C8 (20X4,6mm, 10µm) kolona:kyanopropyl (250X4,6mm, 5 µm)	acetonitril-methanol-0.01 M fosfátový pufr (pH 6.8) (578:188:235, v/v)	UV	[17]
sérum	amitriptylin, clomipramin, desipramin, imipramin, nortriptylin a další antipsychotika		RP C8 (100X4,6mm) 2 a 5 µm	methanol :20 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (pH 7) (60:40, v/v)	UV 254nm	[18]
sérum	amitriptylin, nortriptylin		C18	0.15 M SDS-6% (v/v) pentanol pufovaný na pH 7	elektrochemicky 650mV	[19]
plazma	amitriptyline, nortriptyline, doxepin, dosulepin, dibenzepin, opipramol		1.Oasis extraction column (1 x 50 mm, ID, 30 microm) 2.Symmetry C18 (Waters) analytical column (3.0 x 150 mm, ID)	1. 100%voda dest. 2.acetonitril-0.1% mravenčí kys.	atmospheric pressure chemical ionization tandem mass-spectrometry (HPLC-APCI-MS-MS)	[20]
sérum	amitriptylin, nortriptylin, imipramin, desipramin, clomipramin, norclomipramin	liquid/liquid extrakce (hexan a pH 11)	Nova-Pack C-18 HPLC cartridge column	fosfátový pufr s 50% (v/v) acetonitrilem and 0.2% (v/v) diethylaminem (konečné pH: 8)	UV 242nm	[21]

**Tabulka 2 - Metody stanovení tricyklických antidepresiv**

vzorek	analyzované látky	extrakce	kolona	mobilní fáze	detekce	zdroj
sérum	amitriptylin, imipramin, doxepin, trimipramin, desipramin, nortriptylin, desmethyldoxepin, protriptyline		Bond Elute C-18 columns. A 5- $\mu$ Supelcosil LC-PCN	10 mmol/L fosfát sodný (pH 7.0):acetonitril:methanol (28:58:14)	UV 254 a 280nm	[22]
plazma	trimipramin, doxepin, amitriptylin, imipramin, desmethyldoxepin, nortriptylin, desipramin, maprotilin, and protriptylin	liquid/liquid extrakce (hexan nebo DuPont's PREP I Automated Sample Processor)	Bondapak- CN column	acetonitrile/methanol/Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 5 mmol/L (60/15/25 by vol), pH 7.0	UV 254nm	[23]
	amitriptylin, imipramin chlorprothixen, thioridazin		RP C-18, 5 microm, 250 x 4.6 mm ID (Lichrospher 100RP-18)	acetonitrile and 0.01 M vodní roztok triethylaminu (1:1) pH upraveno na 2,7	UV 252nm	[24]
plazma	amitriptylin	1 M NaOH a 0.7 M ZnSO <sub>4</sub> . vodný roztok	analytical mbondapak C18 column (250 3.9 mm, i.d)	fosfátový pufr-acetonitril- triethylamin (65:35:0.1 v/v/v) upraveno na pH 5.1	UV 239nm	[25]
sérum	imipramin, klomipramin, amitriptylin, nortriptylin a jiná antipsychotika	proteinová precipitace	monolithic C 18 column (50 nun x 4.6 mm)	methanol gradient a 5 MM acetátový pufr o pH 3.9	API 4000 tandem mass spectrometer	[26]
sérum	imipramin, amitriptylin, desipramin, trimipramin, nortriptylin, clomipramina jiná antipsychotika	solid- phase Oasis (R) HLB cartridge column	Inertsil C-8 column	methanol: 10 mM acetát amonný (pH 5.0):acetonitril (70:20: 10)	LC/MS, sonic spray ionization (SSI)	[27]

**Tabulka 3 - Metody stanovení tricyklických antidepresiv**

vzorek	analyzované látky	extrakce	kolona	mobilní fáze	detekce	zdroj
sérum	imipramin, amitriptylin, nortriptylin a jiná antipsychotika	liquid-liquid	RP C18 column	acetonitril : acetát amonný pufr o pH 4	electrospray ionization mass spectrometry	[28]
sérum	imipramin, amitriptylin, nortriptylin a jiná antipsychotika	solid-phase	Nucleosil 100-Protect 1 column	acetonitrile : dihydrogenfosfátový pufr	UV	[29]
sérum/ plazma	imipramin, desipramin, amitriptylin a jiná tricyklická antidepresiva	liquid-liquid po alkalizaci hexan:ethyl acetát	Supelco Hypersil 5 $\mu$ m, 150 x 3.2 mm	acetonitril:methanol: fosfátový pufr (0.01 M, pH 7.4) 12:3:5 (v/v/v)	UV	[30]
sérum/ plazma	amitriptylin, nortriptylin, imipramin, desipramin, clomipramin, norclomipramin	liquid-liquid hexane pH 11	Nova-Pack C-18 HPLC cartridge column	fosfátový pufr s 50% (v/v) acetonitrilem a 0.2% (v/v) diethylamine (konečné pH 8)	UV 242 nm	[31]
plazma	amitriptylin, nortriptylin, doxepin, dosulepin, dibenzepin, opipramol a melitracen		5- $\mu$ m Symmetry C18 (Waters) analytical column (3.0 x 150 mm, ID)	1. 100% vodná mobilní fáze 2. gradientová eluce s acetonitrilem-0.1% kyselinou mravenčí	APCI-MS-MS (atmospheric pressure chemical ionization tandem mass-spectrometry)	[32]
plazma	imipramin, desipramin, amitriptylin, nortriptylin a clomipramin	liquid-liquid	trimethylsilyl (TMS) column	50 mM fosfátový pufr (pH 7.0) : acetonitril (55:45, v/v)	chemiluminescence detection kyselý tris(2,2'-bipyridyl)ruthenium(III) roztok	[33]

## **5.Praktická část**



## 5.1. Materiál a pomůcky

### 5.1.1. Chemikálie

Amitriptylini hydrochloridum 98% Sigma-Aldrich(Praha, Česká republika)  
Nortriptylini hydrochloridum 98% Sigma-Aldrich(Praha, Česká republika)  
Imipramini hydrochloridum 98% Sigma-Aldrich(Praha, Česká republika)  
Desipramini hydrochloridum 98% Sigma-Aldrich(Praha, Česká republika)  
Acetonitril HPLC gradient grade Sigma-Aldrich(Praha, Česká republika)  
Methanol HPLC gradient grade Sigma-Aldrich (Praha, Česká republika)  
Kyselina fosforečná 85 % p.a. Merck (Darmstadt, Německo)  
Kyselina mravčí 85 % p.a. Penta (Chrudim, Česká republika)  
Acidum boricum ČL 2002 Penta (Chrudim, Česká republika)  
Kalii chloratum ČL 2002 Penta (Chrudim, Česká republika)  
Hydroxid sodný p.a. Penta (Chrudim, Česká republika)  
Kyselina citrónová bezvodá p.a. Penta (Chrudim, Česká republika)  
Hydrogenfosforečnan disodný dihydrát p.a. Penta (Chrudim, Česká republika)

### 5.1.2. Použité přístroje

#### 1 HPLC systém:

**pumpa:** LCP 4100, ECOM s.r.o, (Praha, Česká Republika)

**dávkovací zařízení:** WATERS 717plus Autosampler (Milford, MA, USA)

**detektor :**WATERS 486 Tunable Absorbance detector (Milford, MA, USA)

**program:** DataApex CSW 1.7 (Praha, Česká Republika)

#### 2 HPLC systém:

**pumpa:** LC-10ADvp SCHIMADZU (Japonsko)

**dávkovací jednotka:** SIL-Hta autosampler SCHIMADZU (Japonsko)

**termostat:** CTO-10ACvp column oven, SCHIMADZU (Japonsko)

**Detektory:** SPD-M10Avp diode array detektor, SCHIMADZU (Japonsko)

**Program:** LC solution for Windows v.1.1

### Použité kolony:

Synergion-fusion-RP (75x3mm) 4 $\mu$ m, Phenomenex, (Torrance, CA, USA)

Zorbax Eclipse XDB (75 x 4,6 mm); 3,5  $\mu$ m, Agilent Technologies (Santa Clara, CA, USA)

XTerra RP 18 (100 x 3,0 mm) 5  $\mu$ m, Waters Corporation (Milford, MA, USA)

Zorbax Extend (75 x 4,6 mm) 3,5  $\mu$ m, Agilent Technologies (Santa Clara, CA, USA)

Discovery ZR-PBP 150 x 4,6; 5  $\mu$ m, Supelco(Bellefont, USA)

### 5.1.3. Příprava vzorků

**Tabulka 4** – Příprava vzorků

vzorek	látka	koncentrace (mg/ml)	navážka (mg)
imipramin	imipramin	0,100	1,00
desipramin	desipramin	0,100	1,00
<b>směs 1:</b>			
imipramin	imipramin	0,110	1,10
desipramin	desipramin	0,100	1,00
<b>směs 2:</b>			
amitriptylin	amitriptylin	0,102	1,02
nortriptylin	nortriptylin	0,126	1,26

Příslušná navážka (viz tabulka 1) byla vždy rozpuštěna v methanolu v odměrné baňce na 10ml a objem doplněn methanolem po rysku.

### 5.1.4. Příprava tlumivých roztoků

#### 1. 0,1M kyselina citrónová a 0,2M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>

*a* ml roztoku Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (35,62 dihydrátu na litr roztoku) se smísí s (20-*a*) ml roztoku C<sub>6</sub>H<sub>6</sub>O<sub>7</sub> (21,01 monohdrátu na litr roztoku) podle následující tabulky:

**Tabulka 5 – Příprava citrátového pufru**

pH	a (počet ml 0,2M Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	pH	a (počet ml 0,2M Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	pH	a (počet ml 0,2M Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )
2,2	0,40	4,2	8,28	6,2	13,22
2,4	1,24	4,4	8,82	6,4	13,85
2,6	2,18	4,6	9,35	6,6	14,55
2,8	3,17	4,8	9,86	6,8	15,45
3,0	4,11	5,0	10,30	7	16,47
3,2	4,94	5,2	10,72	7,2	17,39
3,4	5,70	5,4	11,15	7,4	18,17
3,6	6,44	5,6	11,60	7,6	18,73
3,8	7,10	5,8	12,09	7,8	19,15
4,0	7,71	6,0	12,63	8	19,45

**2. 0,1N NaOH a 0,1M H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> v 0,1M KCl**

50,0 ml roztoku H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> v 0,1M KCl (6,202g H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> a 7,456g KCl na litr roztoku) se smísí s *a* ml roztoku NaOH a doplní na objem 100ml.

**Tabulka 6 – Příprava boritanového pufru**

pH	a (počet ml 0,1N NaOH)	pH	a (počet ml 0,1N NaOH)	pH	a (počet ml 0,1N NaOH)
7,8	2,65	8,6	12,00	9,4	32,00
8,0	4,00	8,8	16,40	9,6	36,85
8,2	5,90	9,0	21,40	9,8	40,80
8,4	8,55	9,2	26,70	10,0	43,90

**5.1.5. Chromatografické podmínky použité při analýzách**

Mobilní fáze: acetonitril : voda nebo 0,085% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> nebo připravený pufr o daném pH

Průtoková rychlost: 1,0 ml/min

Teplota: 40°C

Nástřik na kolonu : 10 µl

Detekce: UV 254 nm

Isokratická eluce

## **6.Výsledky a diskuse**

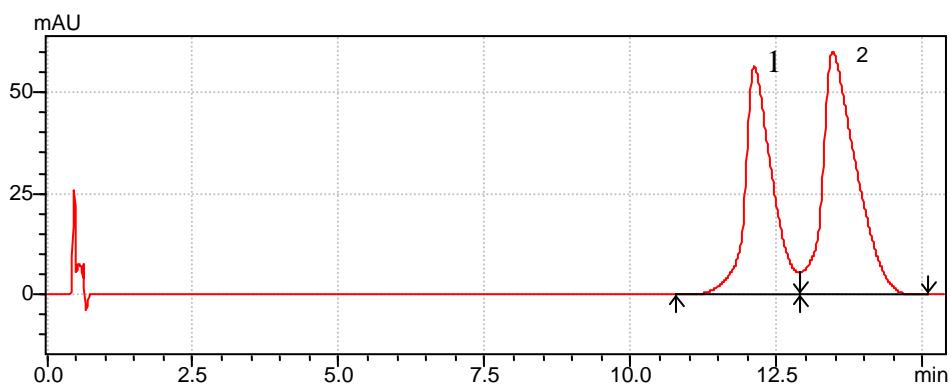
## 6.1. Chromatografické chování vybraných sorbentů v různých oblastech pH

Pro pilotní studii byl použit 1.HPLC systém, pro vlastní měření zde prezentovaných výsledků byl použit 2. HPLC systém uvedený výše.

### Synergi fusion-RP 75 x 3,0; 4 μm

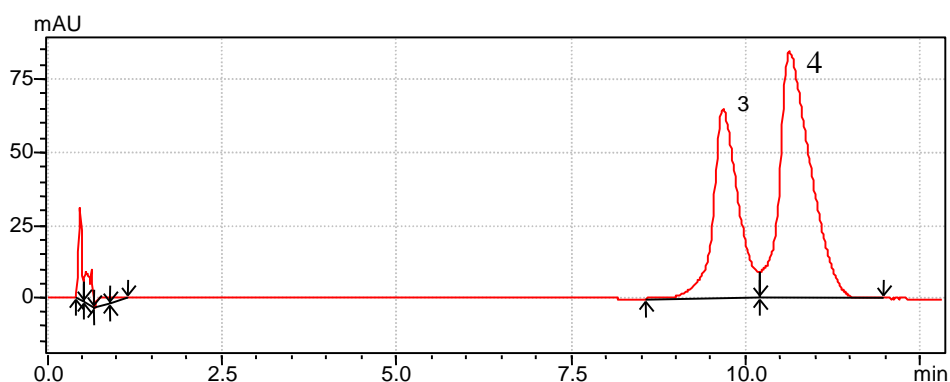
#### pH 2

#### Směs nortriptylinu (1) a amitriptylinu (2)



**Chromatogram 1** Synergi fusion-RP 75 x 3,0 mm; 4 μm, pH 2,  
MF: Acetonitril:0,085% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> - 20:80 (1 – nortriptylin, 2 – amitriptylin)

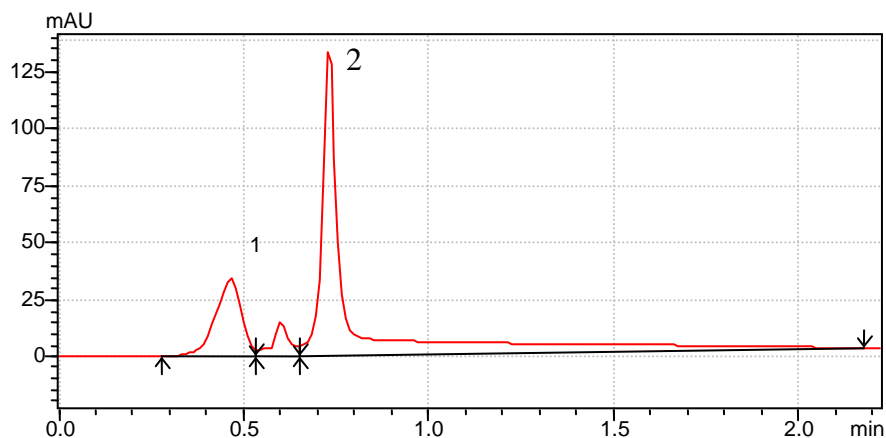
#### Směs desipraminu (3) a imipraminu (4)



**Chromatogram 2** Synergi fusion-RP 75 x 3,0 mm; 4 μm, pH 2,  
MF: Acetonitril:0,085% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> - 20:80 (3– desipramin, 4 - imipramin )

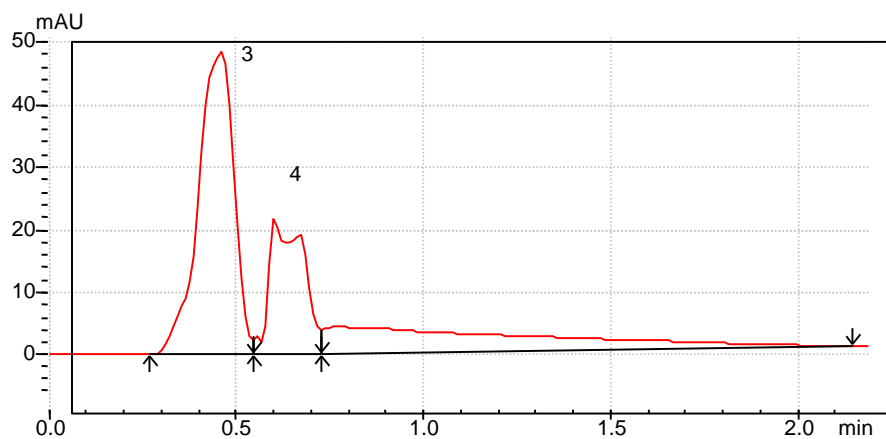
#### pH 7

#### Směs nortriptylinu (1) a amitriptylinu (2)



**Chromatogram 3** Synergi fusion-RP 75 x 3,0 mm; 4  $\mu$ m, pH 7,  
MF: Acetonitril:voda - 35:65 (1 – nortriptylin, 2 – amitriptylin)

**Směs desipraminu (3) a imipraminu (4)**

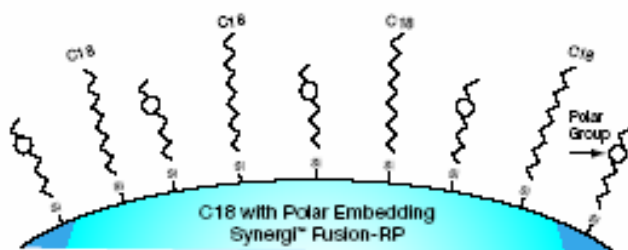


**Chromatogram 4** Synergi fusion-RP 75 x 3,0 mm; 4  $\mu$ m, pH 7,  
MF: Acetonitril:voda - 35:65 (3– desipramin 4 – imipramin)

Stacionární fázi kolony Synergi fusion je sorbent s vloženou polární skupinou (Obr.7). Polárně vloženými skupinami mohou být amidy, karbamáta, sulfonamidy, a ureáty. Tato kolona využívá polárně vložený a hydrofóbní ligand , aby dosáhla zlepšení selektivity. C18 ligand poskytuje dobrou hydrofóbní retenci a selektivitu, zatímco polárně vložená skupina umožňuje lepší retenci polární. Kolonu lze použít v rozmezí pH 1,5 – 10. Výhodou je možnost použít vysokého procenta vodné mobilní fáze, bez problému fázového kolapsu.

U analyzovaných látek přesto , že dochází k separaci a rozlišení je téměř 1,5, dochází také k tzv. frontingu a ve vyšším pH i k značnému chvostování plus velmi

nízká retence za daných podmínek se ve výsledku projevuje v eluci daných látek společně s mrtvým objemem systému a tudíž zcela nevhodné pro analýzu biologického materiálu bez excelentního odstranění balastních látek matrice.

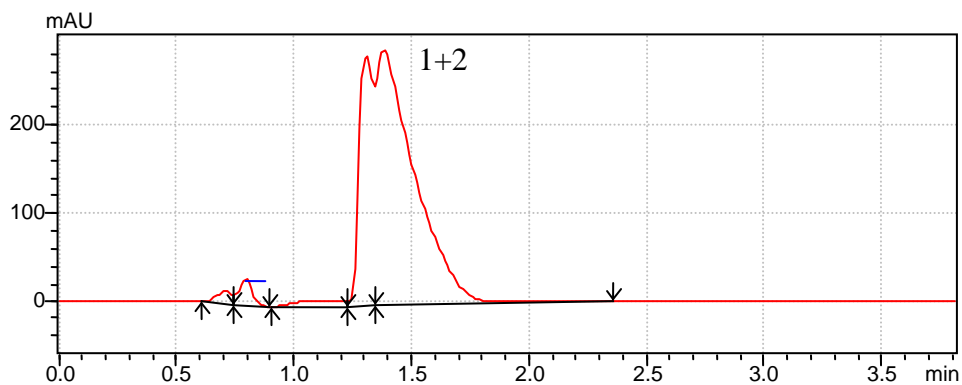


**Obr.7** Sorbent s vloženou polárnou skupinou

**Zorbax Eclipse XDB – C18 75 x 4,6; 3,5 µm**

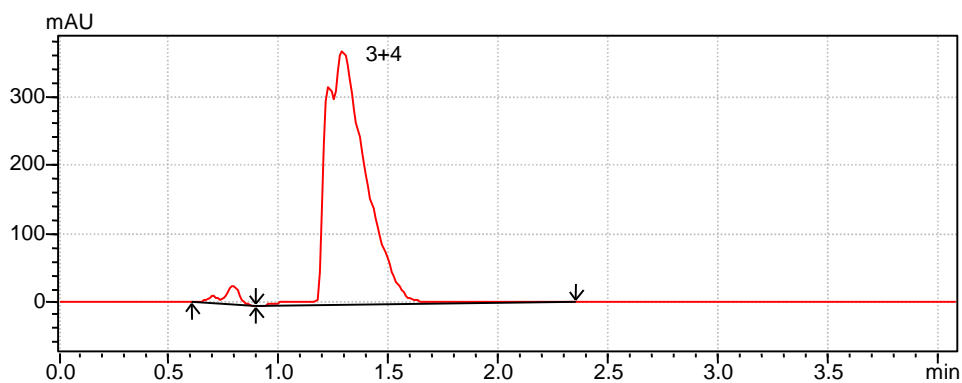
**pH 2**

**Směs nortriptylinu (1) a amitriptylinu (2)**



**Chromatogram 5** Zorbax Eclipse XDB – C18 75 x 4,6 mm; 3,5 µm, pH 2  
MF: Acetonitril:0,085% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> - 30:70 (1 – nortriptylin, 2 – amitriptylin)

**Směs desipraminu (3) a imipraminu (4)**

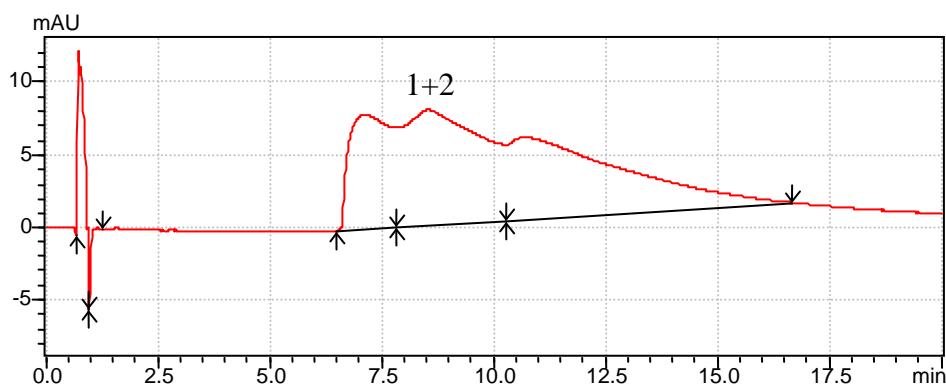


**Chromatogram 6** Zorbax Eclipse XDB – C18 75 x 4,6 mm; 3,5 µm, pH 2  
MF: Acetonitril:0,085% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> - 30:70 (3– desipramin, 4 - imipramin )



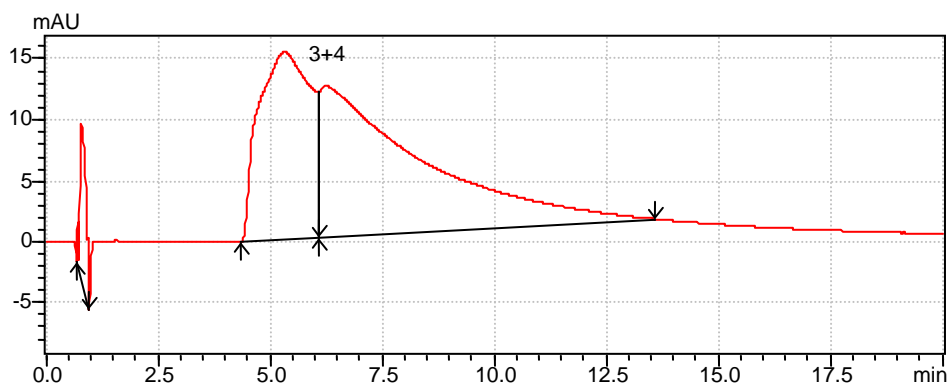
## pH 7

### Směs nortriptylinu (1) a amitriptylinu (2)



**Chromatogram 7** Zorbax Eclipse XDB – C18 75 x 4,6 mm; 3,5  $\mu$ m, pH 7  
MF: acetonitril:voda - 20:80 (1 – nortriptylin, 2 – amitriptylin)

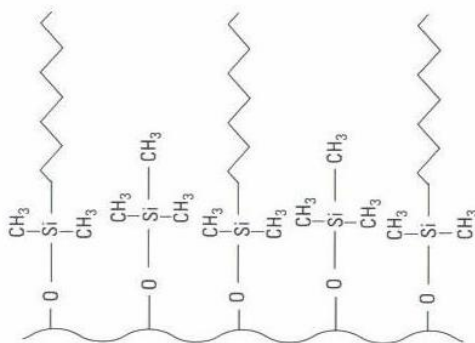
### Směs desipraminu (3) a imipraminu (4)



**Chromatogram 8** Zorbax Eclipse XDB – C18 75 x 4,6 mm; 3,5  $\mu$ m, pH 7  
(MF: Acetonitril:voda : 20:80) (3 – desipramin, 4 – imipramin)

Stacionární fázi kolony Zorbax Eclipse je sorbent s extrémně alkylovaným vázáním plus dvojitý „endcapping“. (Obr. 8). Jde o porózně silikagelové mikrosféry. Kolona Zorbax Eclipse je první volbou při vývinu metod, poskytuje výborný tvar píků bazických, kyselých i neutrálních látek, je možné ji použít v širokém rozsahu pH (2-9) a má dlouhou životnost. Objemné substituenty sa vkládají do struktury kvůli stabilitě kolony v daném rozsahu pH.

V kyselém ani neutrálním prostředí nedošlo k separaci látek, píky výrazně chvostují. Kolona zřejmě není vhodná pro analýzu tricyklických antidepresiv. Možností, jak zlepšit separaci těchto látek by mohlo být přidání nějakého nízkomolekulárního aminu do mobilní fáze např. triethylaminu.

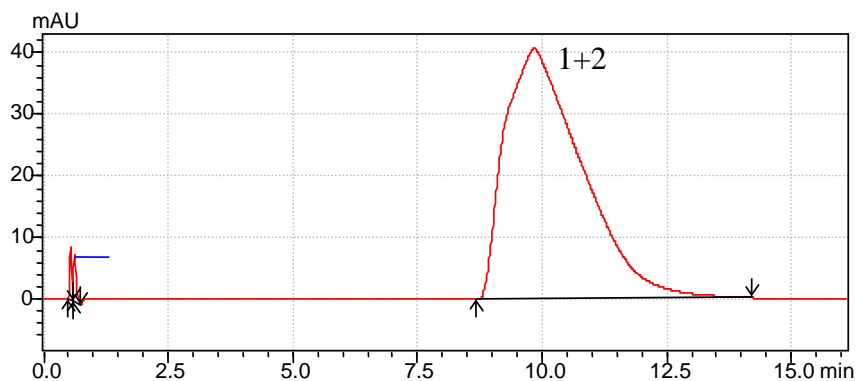


**Obr.8** Sorbent s extrémně alkylovaným vázáním plus dvojitý „endcapping“

**XTerra RP 18 100 x 3,0; 5 µm**

**pH 2**

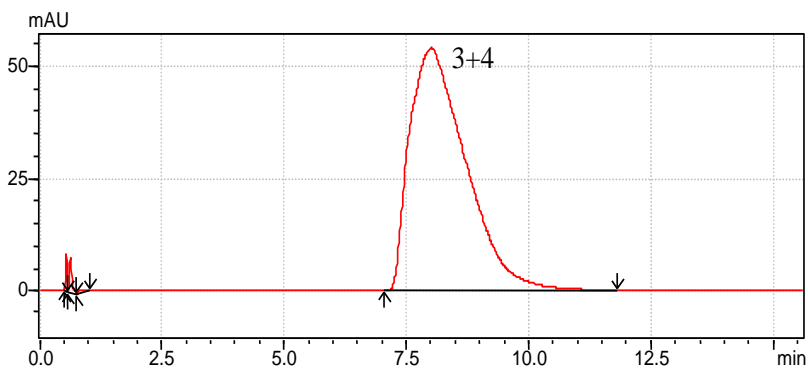
**Směs nortriptylinu (1) a amitriptylinu (2)**



**Chromatogram 9** XTerra RP 18 100 x 3,0 mm; 5 µm, pH 2

MF: Acetonitril:0,085% $H_3PO_4$  - 20:80 (1 – nortriptylin, 2 – amitriptylin)

**Směs desipraminu (3) a imipraminu (4)**

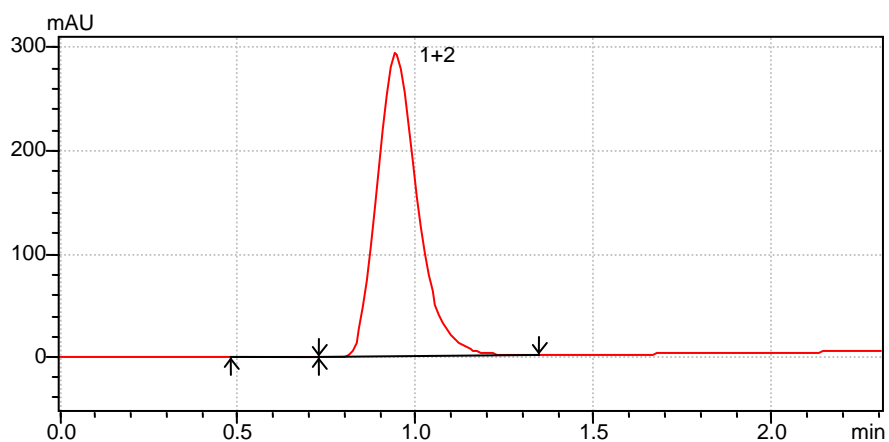


**Chromatogram 10** XTerra RP 18 100 x 3,0 mm; 5 µm, pH 2

MF: Acetonitril:0,085% $H_3PO_4$  - 20:80 (3– desipramin, 4 - imipramin )

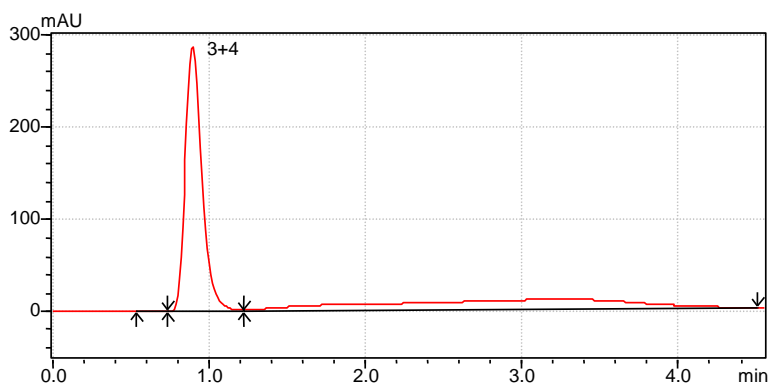
## pH 7

### Směs nortriptylinu (1) a amitriptylinu (2)



**Chromatogram 11** XTerra RP 18 100 x 3,0 mm; 5  $\mu$ m, pH 7  
MF: Acetonitril:voda - 30:70 (1 – nortriptylin, 2 – amitriptylin)

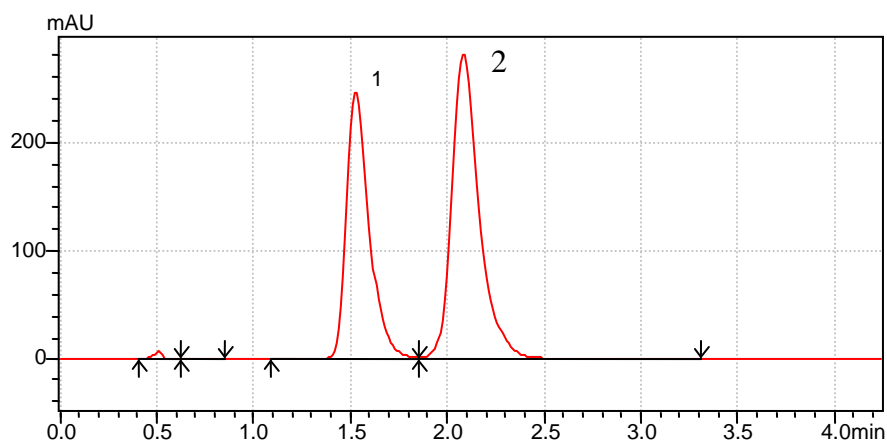
### Směs desipraminu (3) a imipraminu (4)



**Chromatogram 12** XTerra RP 18 100 x 3,0 mm; 5  $\mu$ m, pH 7  
MF: Acetonitril:voda - 30:70 (3– desipramin, 4 - imipramin )

## pH 9

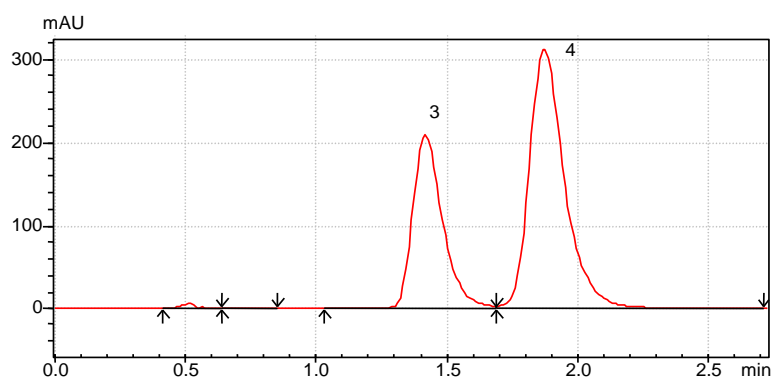
### Směs nortriptylinu (1) a amitriptylinu (2)



**Chromatogram 13** XTerra RP 18 100 x 3,0 mm; 5  $\mu$ m, pH 9

MF: Acetonitril:puf(r(pH 9) - 60:40 (1 – nortriptylin, 2 – amitriptylin)

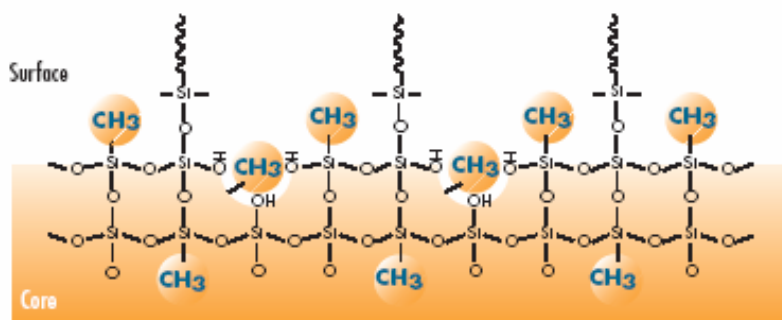
### Směs desipraminu (3) a imipraminu (4)



**Chromatogram 14** XTerra RP 18 100 x 3,0 mm; 5  $\mu$ m, pH 9

MF: Acetonitril:puf(r(pH 9) - 60:40 (3– desipramin, 4 - imipramin )

Stacionární fázi kolony XTerra tvoří sorbent s hybridními organicko-anorganickými částicami.(Obr.9) Tímto typem stacionární fáze sa eliminují některé nevýhody kolon založených na silikagelových částicích (interakce s aktivními silanolovými skupinami, disoluce při vysokém pH a jiné).



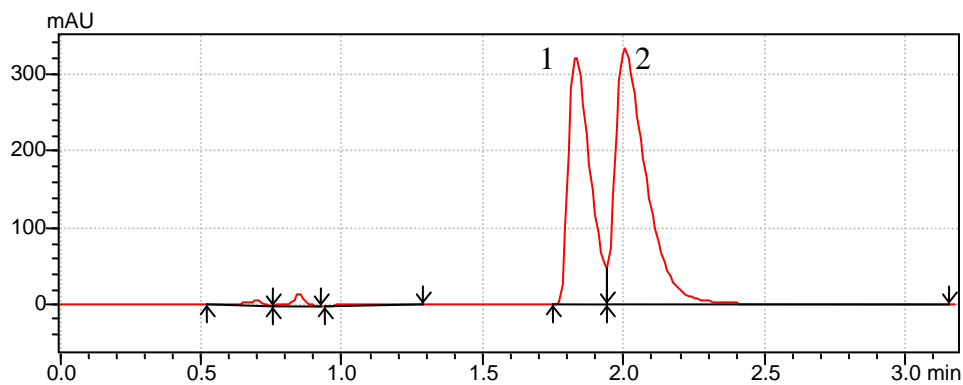
**Obr.9** Sorbent – technologie hybridných častíc

V kyselém ani neutrálním pH nedošlo vůbec k separaci analyzovaných látek, přestože jak bylo uvedeno výše jsou negativní reakce zčásti potlačeny. V zásaditém prostředí je naopak separace velmi dobrá, rozlišení se u obou směsí pohybuje okolo hodnoty 2, přesto píky i v tomto prostředí mírně chvostují ( tailing faktor okolo hodnoty 1,3).

**Zorbax Extend –75 x 4,6 mm; 3,5 µm**

**pH 2**

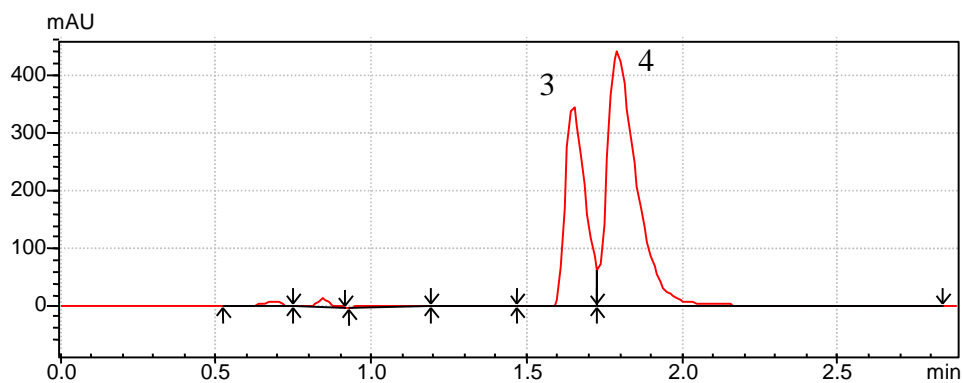
**Směs nortriptylinu (1) a amitriptylinu (2)**



**Chromatogram 15** Zorbax Extend 75 x 4,6 mm; 3,5 µm, pH 2

MF: Acetonitril:0,085% $H_3PO_4$  - 40:60 (1 – nortriptylin, 2 – amitriptylin)

**Směs desipraminu (3) a imipraminu (4)**

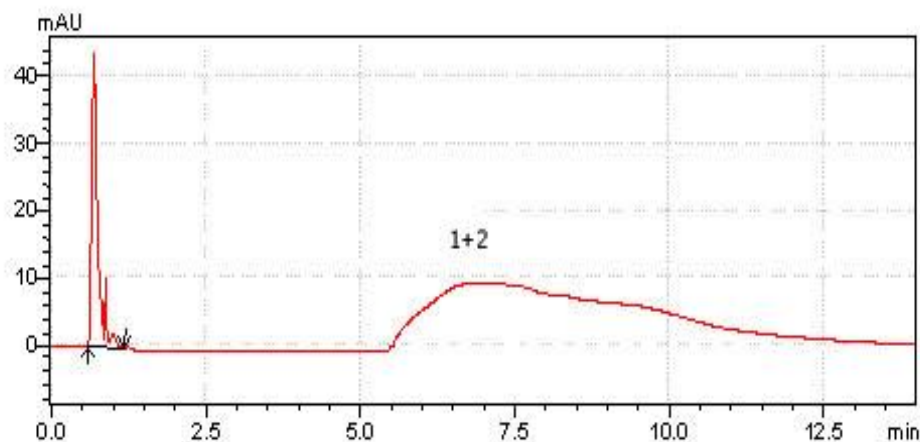


**Chromatogram 16** Zorbax Extend 75 x 4,6 mm; 3,5 µm, pH 2

MF: Acetonitril:0,085% $H_3PO_4$  - 40:60 (3– desipramin, 4 - imipramin )

## pH 7

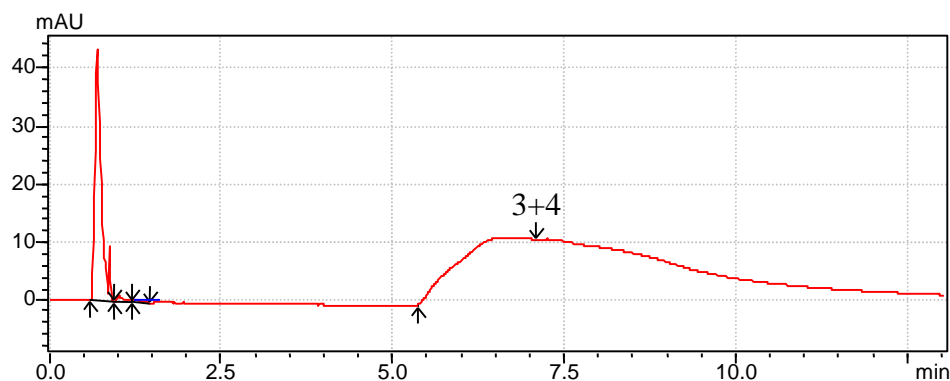
### Směs nortriptylinu (1) a amitriptylinu (2)



**Chromatogram 17** Zorbax Extend 75 x 4,6 mm; 3,5  $\mu$ m, pH 7

MF: Acetonitril:voda - 30:70 (1 – nortriptylin, 2 – amitriptylin)

### Směs desipraminu (3) a imipraminu (4)



**Chromatogram 18** Zorbax Extend 75 x 4,6 mm; 3,5  $\mu$ m, pH 7

MF: Acetonitril:voda - 30:70 (3+4 – desipramin+imipramin)

Tato kolona je tvořená bidentátovou C18 stacionární fází s dvojitým „endcappingem“, což poskytuje vysokou pH stabilitu. Bidentátové C18 stacionární fáze poskytují nejen stabilitu při vysokém pH (až do pH 11,5), ale i vyhovující účinnost kolony a retenčních charakteristik při vysokém i nízkém pH. Zorbax Extend dává zlepšené rozlišení, retenci a tvar píků bazických sloučenin a vysokou citlivost pro LC/MS separace peptidů a proteinů. Přes výše zmíněnou charakteristiku na tomto druhu



sorbentu se zvyšujícím se pH docházelo k velmi významnému chvostování.viz chromat. pH 7, proto analýza ve vyšším pH ani nebyla uskutečněna.

Na základě experimentálních výsledků s kolonami na bázi silikagelu, které se při stanovení amitriptylinu, nortriptylinu, desipraminu a imipraminu neukázaly jako ideální, bylo přistoupeno ke kolonám na bázi ZrO<sub>2</sub>, které by mohli být pro tyto látky vhodnějším sorbentem. Konkrétně byla vyzkoušena kolona zirkoniová modifikovaná polybutadienem.

Jedná se o kolonu s nosičem ZrO<sub>2</sub>, polybutadien je chemicky vázaný na sférických, porézních částicích o velikosti 5 µm. Částice sorbentu jsou mechanicky velmi stabilní, nezávislé na iontové síle mobilní fáze, nebobtnají ani nedochází k jejich kompresi. Na rozdíl od silikagelových nosičů je stabilní v širokém rozsahu hodnot pH (1-13). Kolona je tepelně stabilní až do 100 °C. Fáze je svými separačními vlastnostmi nejvíce podobná oktadecylovým kolonám se silikagelovým nosičem. Na rozdíl od nich má ale výhodu v tepelné a pH stabilitě. Je určena pro separace bází, především aminů.

### **Retenční parametry Discovery ZR-PBP 150 x 4,6; 5 µm**

**Mobilní fáze:** acetonitril : pufr (70 : 30)

### **Analýza směsi nortriptylinu (1) a amitriptylinu (2)**

**Tabulka 7** – Parametry směsi nortriptylinu a amitriptylinu

pH	t <sub>R1</sub>	t <sub>R2</sub>	T <sub>f1</sub>	T <sub>f2</sub>	R <sub>s</sub>	k <sub>1</sub>	k <sub>2</sub>
2,8	10,386	11,562	0,644	0,675	2,745	5,199	5,901
3,3	7,717	9,455	0,890	0,980	5,183	4,137	5,295
3,9	5,348	6,811	0,919	1,046	5,846	2,413	3,346
4,6	4,661	6,171	0,978	1,161	6,295	1,869	2,798
5,2	4,444	5,786	1,081	1,256	5,426	1,804	2,651
6,5	3,933	5,801	0,949	1,118	8,302	1,446	2,607
7,4	2,639	4,351	1,135	1,343	8,757	0,706	1,813
7,8	2,310	3,625	0,667	1,374	6,804	0,590	1,495
8,2	2,239	2,525	1,773	1,667	1,503	0,360	0,534
8,8	2,029	2,139	*	*	*	0,217	0,281

pH – hodnota pH vodné složky mobilní fáze

t<sub>R1</sub> a t<sub>R2</sub> – retenční časy nortriptylinu a amitriptylinu

T<sub>f1</sub> a T<sub>f2</sub> – tailing factor (faktor symetrie píku) nortriptylinu a amitriptylinu

R<sub>s</sub> – rozlišení

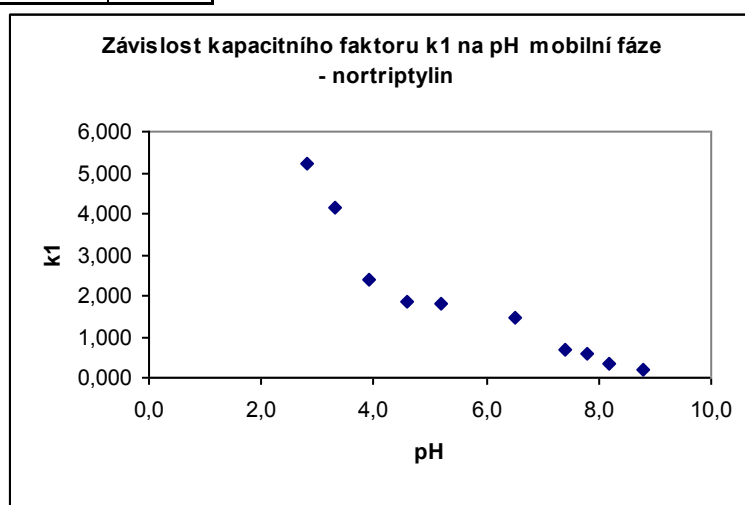
k<sub>1</sub> a k<sub>2</sub> – kapacitní faktory nortriptylinu a amitriptylinu

\* - nelze vyhodnotit

## NORTRIPTYLIN

**Tabulka 8** – hodnoty pH a  $k_1$  nortriptylinu

pH	$k_1$
2,8	5,199
3,3	4,137
3,9	2,413
4,6	1,869
5,2	1,804
6,5	1,446
7,4	0,706
7,8	0,590
8,2	0,360
8,8	0,217

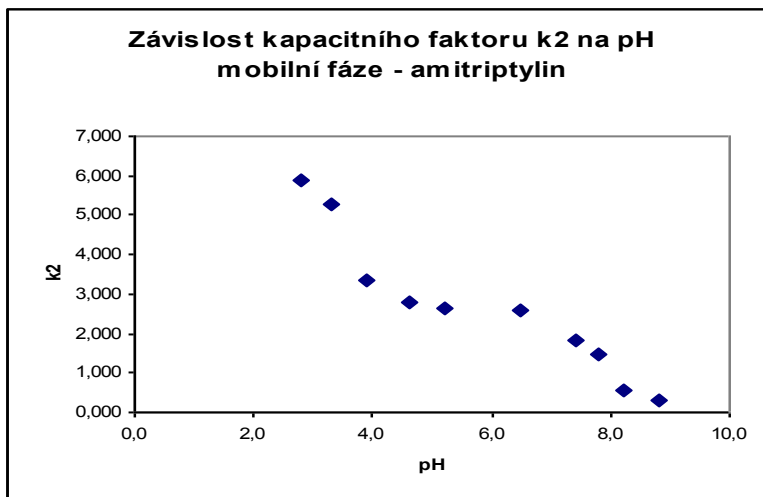


**Graf 1** graf závislosti kapacitního faktoru  $k_1$  na pH mobilní fáze u nortriptylinu

## AMITRIPTYLIN

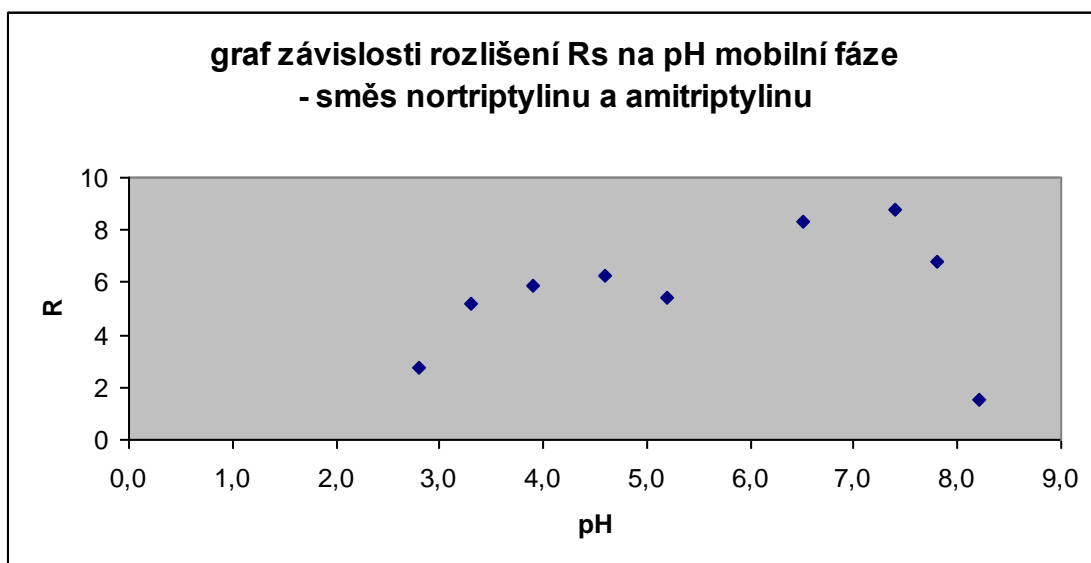
**Tabulka 9** – hodnoty pH a  $k_2$  amitriptylinu

pH	$k_2$
2,8	5,901
3,3	5,295
3,9	3,346
4,6	2,798
5,2	2,651
6,5	2,607
7,4	1,813
7,8	1,495
8,2	0,534
8,8	0,281



**Graf 2** graf závislosti kapacitního faktoru  $k_2$  na pH mobilní fáze u amitriptylinu

**Závislost rozlišení píků  $R_S$  na pH mobilní fáze - směs nortriptylinu a amitriptylinu**



**Graf 3** graf závislosti  $R_S$  na pH mobilní fáze u směsi nortriptylinu a amitriptylinu

### Analýza směsi desipraminu (3) a imipraminu (4)

**Tabulka 10** – Parametry směsi desipraminu a imipraminu

pH	t <sub>R3</sub>	t <sub>R4</sub>	T <sub>f</sub> 3	T <sub>f</sub> 4	R <sub>s</sub>	k <sub>3</sub>	k <sub>4</sub>
2,8	10,301	11,548	0,648	0,684	2,987	5,544	6,560
3,3	7,703	9,521	0,889	0,952	2,276	3,805	4,940
3,9	5,962	7,549	0,821	0,912	2,329	2,558	3,506
4,6	4,864	6,446	1,002	1,137	2,520	1,970	2,934
5,2	4,375	5,685	1,135	1,290	3,068	1,754	2,579
6,5	4,166	5,902	1,029	1,169	6,811	1,586	2,664
7,4	2,635	4,389	1,152	1,234	5,839	0,709	1,847
7,8	2,301	3,840	0,999	1,225	5,419	0,413	1,136
8,2	2,250	2,553	1,437	1,538	1,767	0,386	0,573
8,8	1,949	2,087	*	*	*	0,172	0,256

pH – hodnota pH vodné složky mobilní fáze

t<sub>R3</sub> a t<sub>R4</sub> – retenční časy desipraminu a imipraminu

T<sub>f3</sub> a T<sub>f4</sub> – tailing factor (faktor symetrie píku)

R<sub>s</sub> – rozlišení

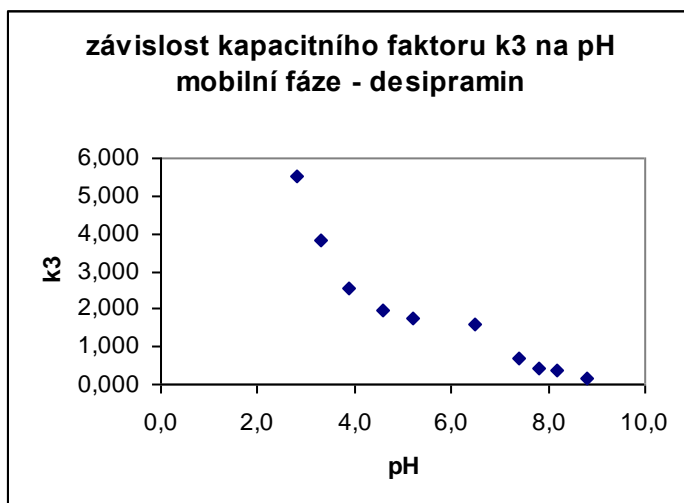
k<sub>3</sub> a k<sub>4</sub> – kapacitní faktory desipraminu a imipraminu

\* - nelze vyhodnotit

### DESIPRAMIN

**Tabulka 11** – hodnoty pH a k<sub>3</sub> desipraminu

pH	k <sub>3</sub>
2,8	5,544
3,3	3,805
3,9	2,558
4,6	1,970
5,2	1,754
6,5	1,586
7,4	0,709
7,8	0,413
8,2	0,386
8,8	0,172

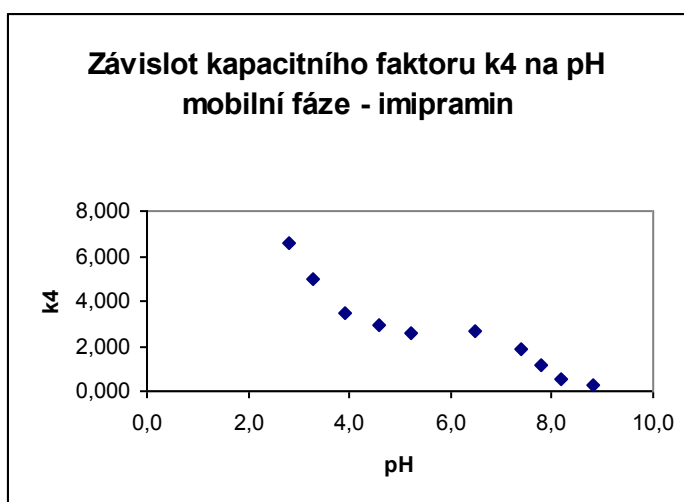


**Graf 4** graf závislosti kapacitního faktoru  $k_3$  na pH vodné složky mobilní fáze u desipraminu

### IMIPRAMIN

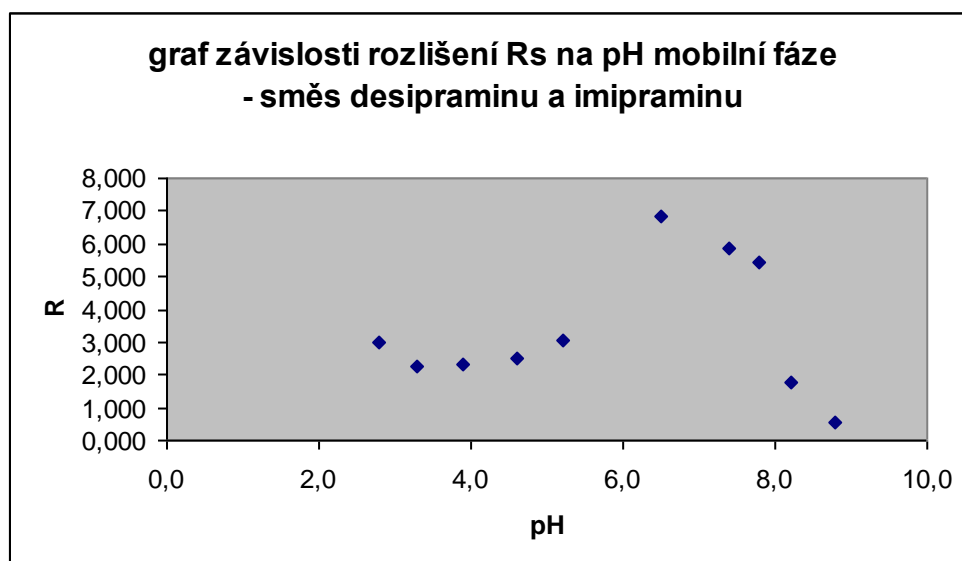
**Tabulka 129** – hodnoty pH a  $k_4$  imipraminu

pH	k <sub>4</sub>
2,8	6,560
3,3	4,940
3,9	3,506
4,6	2,934
5,2	2,579
6,5	2,664
7,4	1,847
7,8	1,136
8,2	0,573
8,8	0,256



**Graf 5** graf závislosti kapacitního faktoru  $k_4$  na pH vodné složky mobilní fáze u imipraminu

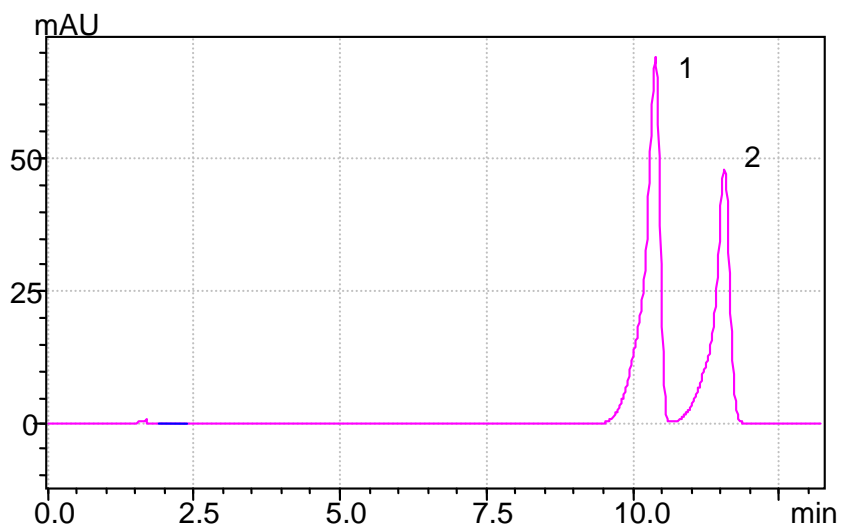
**Závislost rozlišení píků  $R_s$  na pH mobilní fáze - směs desipraminu a imipraminu**



**Graf 6** graf závislosti rozlišení  $R_s$  na pH mobilní fáze u směsi desipraminu a imipraminu

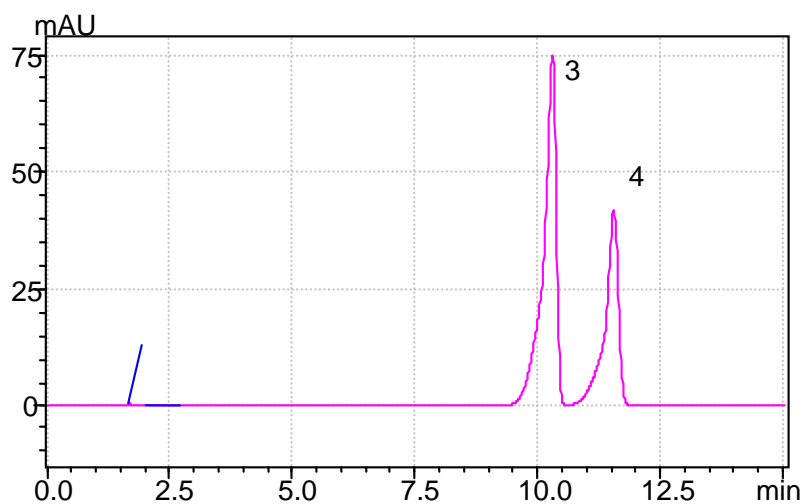
## pH 2,8

### Směs nortriptylinu (1) a amitriptylinu (2)



**Chromatogram 19** Discovery ZR-PBP 150 x 4,6; 5  $\mu$ m, pH 2,8  
MF: Acetonitril:puftr - 70:30 (1 – nortriptylin, 2 – amitriptylin)

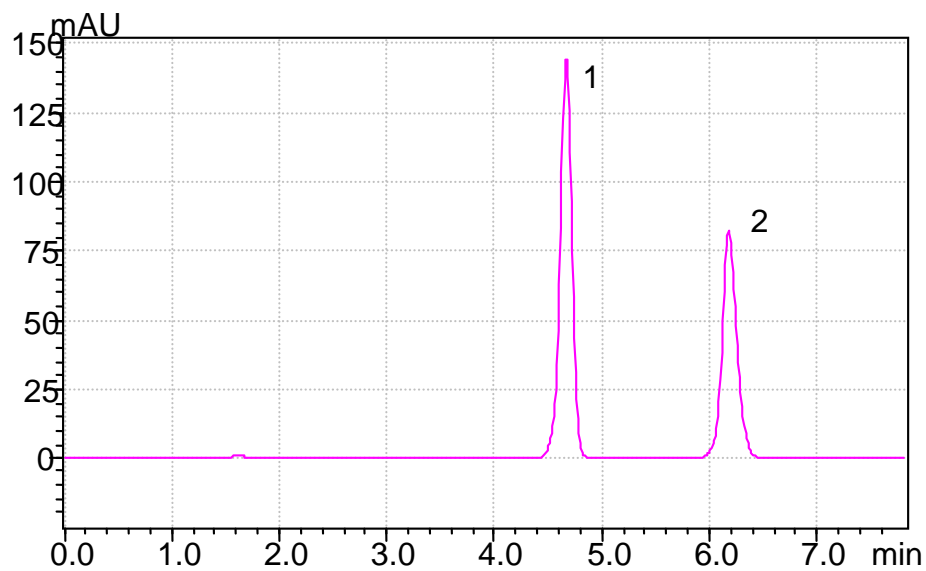
### Směs desipraminu (3) a imipraminu (4)



**Chromatogram 20** Discovery ZR-PBP 150 x 4,6; 5  $\mu$ m, pH 2,8  
MF: Acetonitril:puftr - 70:30 (3– desipramin, 4 - imipramin )

**pH 4,6**

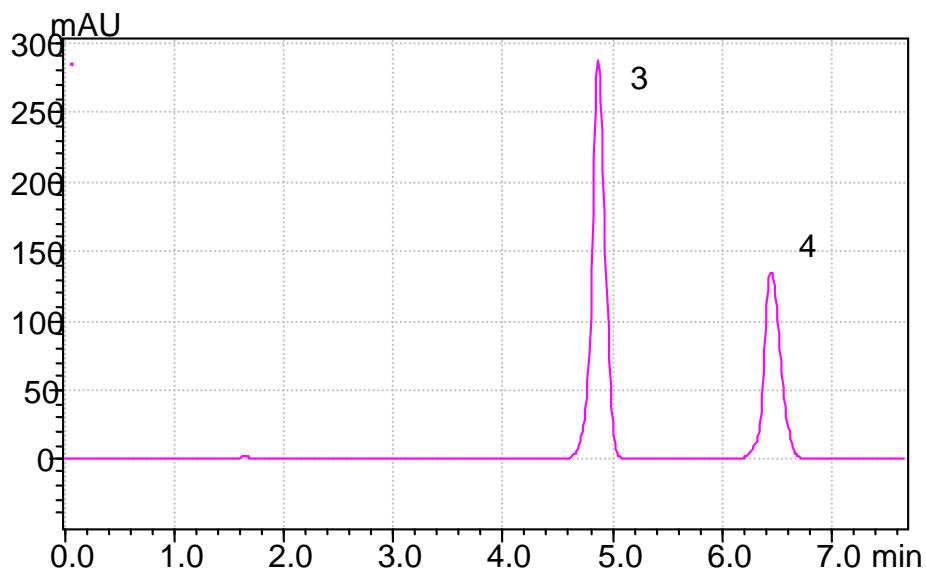
**Směs nortriptylinu (1) a amitriptylinu (2)**



**Chromatogram 21** Discovery ZR-PBP 150 x 4,6; 5  $\mu$ m, pH 4,6

MF: Acetonitril:puftr - 70:30 (1 – nortriptylin, 2 – amitriptylin)

**Směs desipraminu (3) a imipraminu (4)**



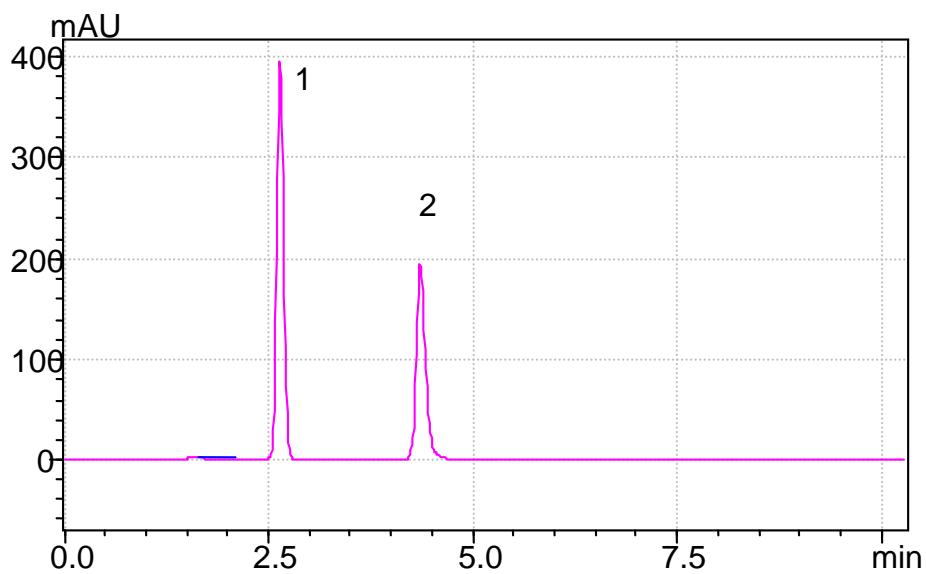
**Chromatogram 22** Discovery ZR-PBP 150 x 4,6; 5  $\mu$ m, pH 4,6

MF: Acetonitril:puftr - 70:30 (3– desipramin, 4 - imipramin )



**pH 7,4**

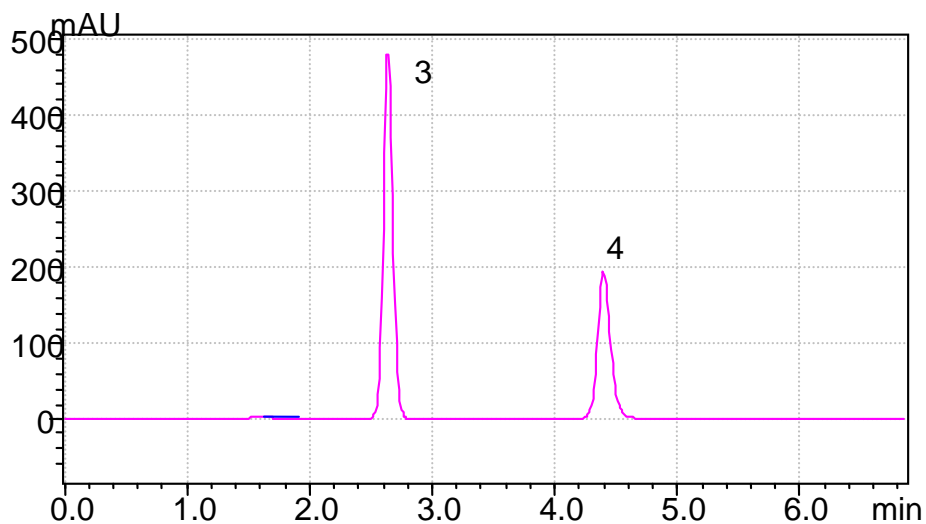
**Směs nortriptylinu (1) a amitriptylinu (2)**



**Chromatogram 23** Discovery ZR-PBP 150 x 4,6; 5  $\mu$ m, pH 7,4

MF: Acetonitril:puftr - 70:30 (1 – nortriptylin, 2 – amitriptylin)

**Směs desipraminu (3) a imipraminu (4)**

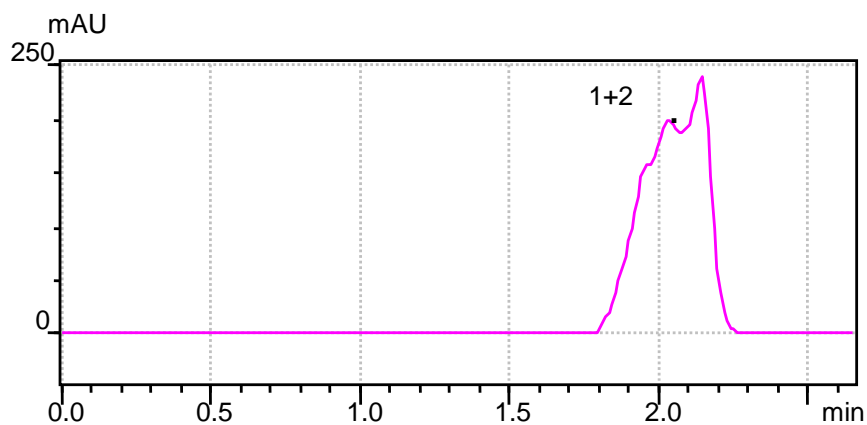


**Chromatogram 24** Discovery ZR-PBP 150 x 4,6; 5  $\mu$ m, pH 7,4

MF: Acetonitril:puftr - 70:30 (3– desipramin, 4 - imipramin )

**pH 8,8**

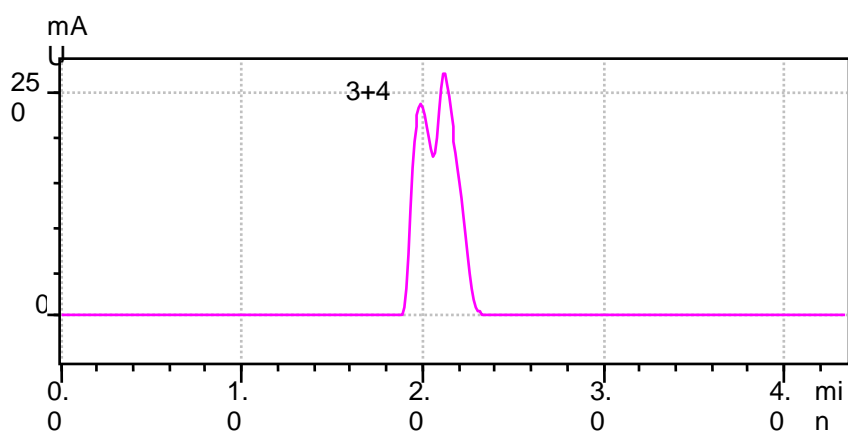
**Směs nortriptylinu (1) a amitriptylinu (2)**



**Chromatogram 25** Discovery ZR-PBP 150 x 4,6; 5  $\mu$ m, pH 8,8

MF: Acetonitril:puftr - 70:30 (1 – nortriptylin, 2 – amitriptylin)

**Směs desipraminu (3) a imipraminu (4)**

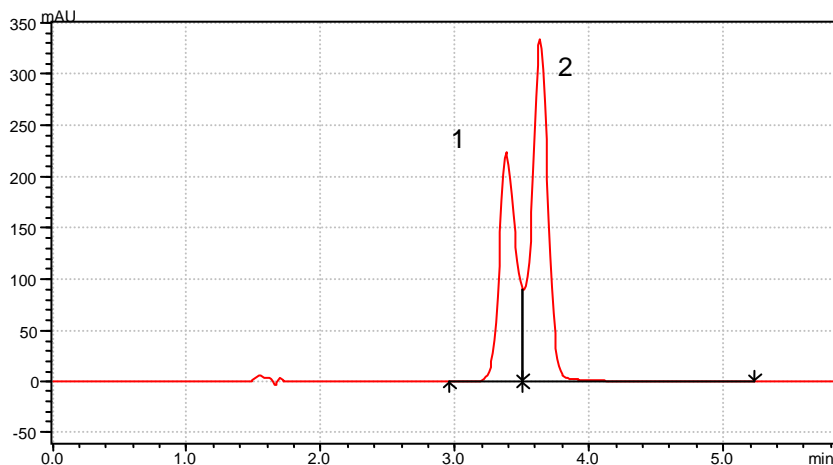


**Chromatogram 26** Discovery ZR-PBP 150 x 4,6; 5  $\mu$ m, pH 8,8

MF: Acetonitril:puftr - 70:30 (3– desipramin, 4 - imipramin )

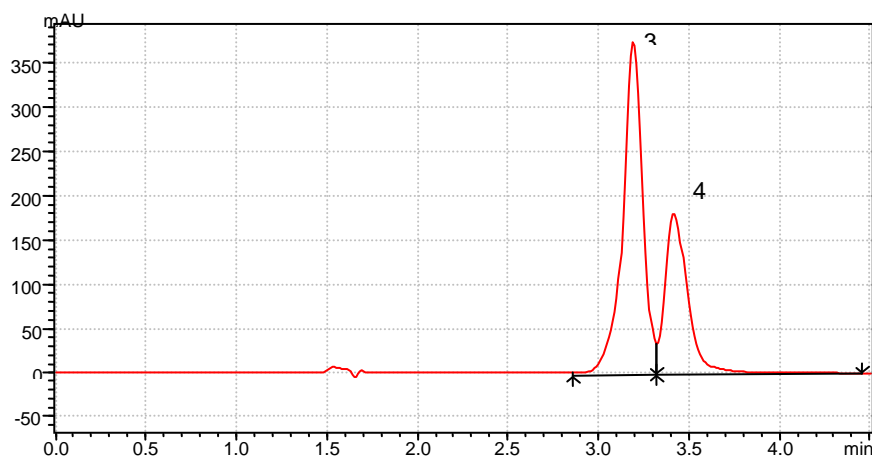
Při **pH 8,8** a poměru mobilní fáze : acetonitril:pufř - **70:30** nedošlo k separaci složek směsi, proto byl poměr mobilní fáze upraven na poměr acetonitril:pufř - **50:50**.

### Směs nortriptylinu (1) a amitriptylinu (2)



**Chromatogram 27** Discovery ZR-PBP 150 x 4,6; 5  $\mu$ m, pH 8,8  
MF: Acetonitril:pufř - 50:50 (1 – nortriptylin, 2 – amitriptylin)

### Směs desipraminu (3) a imipraminu (4)

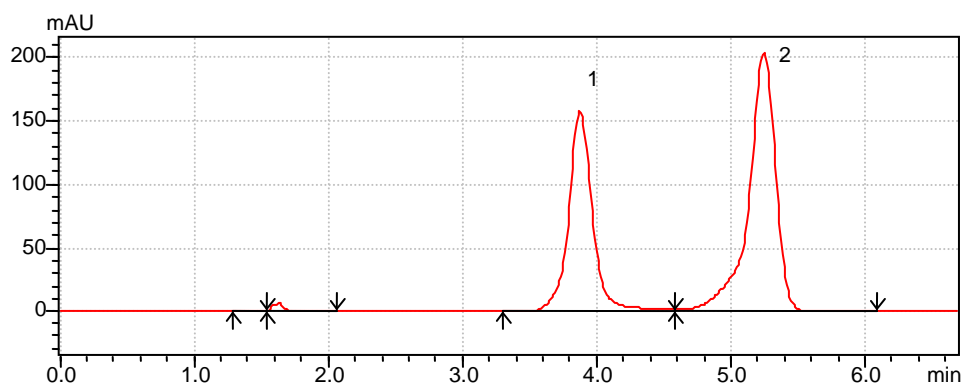


**Chromatogram 28** Discovery ZR-PBP 150 x 4,6; 5  $\mu$ m, pH 8,8  
MF: Acetonitril:pufř - 50:50 (3– desipramin, 4 - imipramin )

Separace se změnou poměru mobilní fáze mírně zlepšila ( $R_s$  0,98), nicméně stále nebyla dostatečná. Proto při analýze látek s ještě vyšším pH mobilní fáze byl zaměněn acetonitril za elučně slabší methanol. Separace se tím výrazně zlepšila při vyšším pH mobilní fáze.

**pH 11,2** (Methanol : pufr – 60:40)

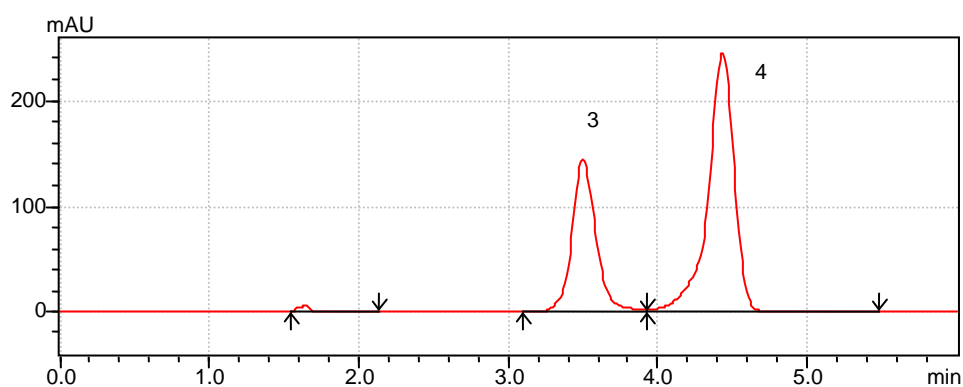
**Směs nortriptylinu (1) a amitriptylinu (2)**



**Chromatogram 29** Discovery ZR-PBP 150 x 4,6; 5 µm, pH 11,2

MF: Methanol:pufr - 60:40 (1 – nortriptylin, 2 – amitriptylin)

**Směs desipraminu (3) a imipraminu (4)**

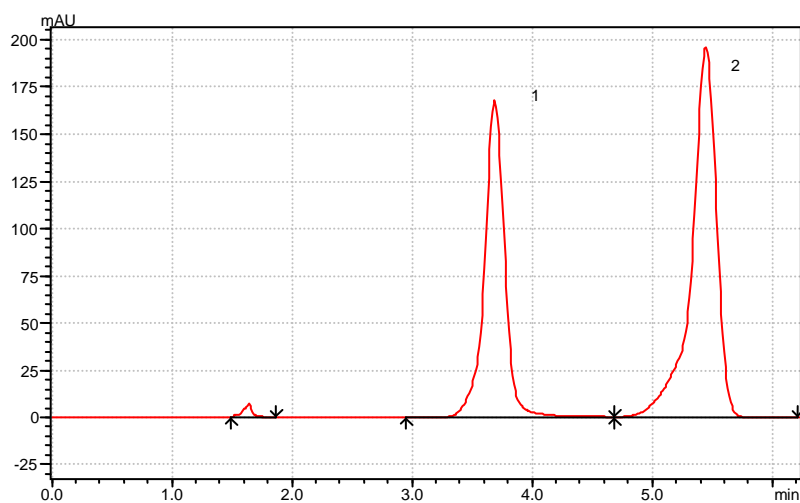


**Chromatogram 30** Discovery ZR-PBP 150 x 4,6; 5 µm, pH 11,2

MF: Methanol:pufr - 60:40 (3 – desipramin, 4 – imipramin)

**pH 12,0** (Methanol : pufr – 60:40)

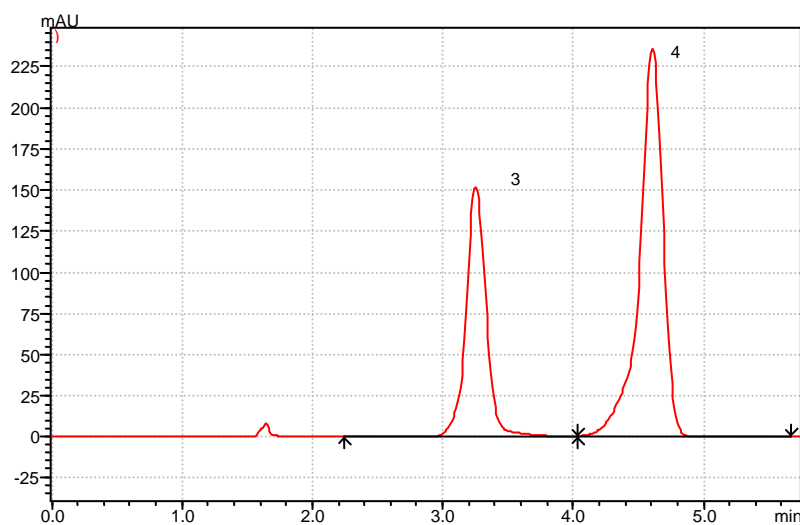
**Směs nortriptylinu (1) a amitriptylinu (2)**



**Chromatogram 31** Discovery ZR-PBP 150 x 4,6; 5 µm, pH 12,0

MF: Methanol:pufr - 60:40 (1 – nortriptylin, 2 – amitriptylin)

**Směs desipraminu (3) a imipraminu (4)**



**Chromatogram 32** Discovery ZR-PBP 150 x 4,6; 5 µm, pH 12,0

MF: Methanol:pufr - 60:40 (3 – desipramin, 4 – imipramin)

### **Analýza směsi nortriptylinu (1) a amitriptylinu (2) – pH 11,2 a 12,0**

**Tabulka 13** – Parametry směsi nortriptylinu a amitriptylinu (MF: Methanol:pufr - 60:40)

pH	tR1	tR2	Tf1	Tf2	Rs	k1	k2
11,2	3,870	5,241	1,055	0,811	4,184	1,764	2,744
12,0	3,682	5,442	0,960	0,795	5,429	1,249	2,324

### **Analýza směsi desipraminu (3) a imipraminu (4) – pH 11,2 a 12,0**

**Tabulka 14** – Parametry směsi desipraminu a imipraminu (MF: Methanol:pufr - 60:40)

pH	tR3	tR4	Tf 3	Tf 4	Rs	k3	k4
11,2	3,493	4,426	1,151	0,855	3,076	1,169	1,749
12,0	3,231	4,579	1,125	0,884	4,515	1,543	2,604

Změnou acetonitrulu za methanol se dosáhlo dobrého rozlišení.

Stacionární fáze na bázi  $ZrO_2$  se zdá být vhodnou alternativou k silikagelovým stacionárním fázím pro stanovení tricyklických antidepresiv nortriptylinu, amitriptylinu, desipraminu a imipraminu. Separace analyzovaných směsí byla velmi dobrá. Vliv pH mobilní fáze je u zirkoniových kolon daleko výraznější než u klasických silikagelových. Výhodou zirkoniové kolony modifikované polybutadienem je možnost použití širokého rozsahu pH (1-13), dále možnost použití vyšších teplot (až 100°C). Tvar píků byl ve srovnání s předešlými zkoušenými kolonami na bázi silikagelu lepší, píky téměř nechvostovaly.

## **7. Seznam příloh**

## Seznam obrázků

**Obr.1** Schéma kapalinového chromatografu

**Obr. 2** silanoly na povrchu silikagelu: volné (izolované), podvojně (geminální) a vicinální (asociované)

**Obr. 3** Příprava chemicky vázaných stacionárních fází

**Obr. 4** Schéma monomerně a polymerně vázaných skupin

**Obr.5** Stínění povrchu silikagelu pomocí velkých postranních řetězců pro chemicky vázané fáze připravené a) z chlordinemethyloktadecylsilanu a b) z chlordiisopropyloktadecylsilanu

**Obr.6** Horizontálně polymerované stacionární fáze s bidentátovou chemicky vázanou fází

**Obr.7** Sorbent s vloženou polárnou skupinou

**Obr.8** Sorbent s extrémně alkylovaným vázáním plus dvojitý „endcapping“

**Obr.9** Sorbent – technologie hybridních částic

## Seznam chromatogramů

**Chromatogram 1** Synergi fusion-RP 75 x 3,0 mm; 4 µm, pH 2,  
MF: Acetonitril:0,085% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> : 20:80 (1 – nortriptylin, 2 – amitriptylin)

**Chromatogram 2** Synergi fusion-RP 75 x 3,0 mm; 4 µm, pH 2,  
MF: Acetonitril:0,085% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> : 20:80 (3– desipramin, 4 - imipramin )

**Chromatogram 3** Synergi fusion-RP 75 x 3,0 mm; 4 µm, pH 7,  
MF: Acetonitril:voda : 35:65 (1 – nortriptylin, 2 – amitriptylin)

**Chromatogram 4** Synergi fusion-RP 75 x 3,0 mm; 4 µm, pH 7,  
MF: Acetonitril:voda : 35:65 (3– desipramin 4 – imipramin)

**Chromatogram 5** Zorbax Eclipse XDB 75 x 4,6 mm; 3,5 µm, pH 2  
MF: Acetonitril:0,085% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> : 40:60 (1 – nortriptylin, 2 – amitriptylin)

**Chromatogram 6** Zorbax Eclipse XDB 75 x 4,6 mm; 3,5 µm, pH 2  
MF: Acetonitril:0,085% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> : 40:60 (3– desipramin, 4 - imipramin )

**Chromatogram 7** Zorbax Eclipse XDB 75 x 4,6 mm; 3,5 µm, pH 7  
MF: acetonitril:voda 20:80) (1 – nortriptylin, 2 – amitriptylin)

**Chromatogram 8** Zorbax Eclipse XDB 75 x 4,6 mm; 3,5 µm, pH 7  
(MF: Acetonitril:voda : 20:80) (3 – desipramin, 4 – imipramin)

**Chromatogram 9** XTerra RP 18 100 x 3,0 mm; 5 µm, pH 2  
MF: Acetonitril:0,085% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> : 20:80 (1 – nortriptylin, 2 – amitriptylin)



**Chromatogram 10** XTerra RP 18 100 x 3,0 mm; 5 µm, pH 2  
MF: Acetonitril:0,085% $H_3PO_4$  - 20:80 (3– desipramin, 4 - imipramin )

**Chromatogram 11** XTerra RP 18 100 x 3,0 mm; 5 µm, pH 7  
MF: Acetonitril:voda - 30:70 (1 – nortriptylin, 2 – amitriptylin)

**Chromatogram 12** XTerra RP 18 100 x 3,0 mm; 5 µm, pH 7  
MF: Acetonitril:voda - 30:70 (3– desipramin, 4 - imipramin )

**Chromatogram 13** XTerra RP 18 100 x 3,0 mm; 5 µm, pH 9  
MF: Acetonitril:puf(r(pH 9) - 60:40 (1 – nortriptylin, 2 – amitriptylin)

**Chromatogram 14** XTerra RP 18 100 x 3,0 mm; 5 µm, pH 9  
MF: Acetonitril:puf(r(pH 9) - 60:40 (3– desipramin, 4 - imipramin )

**Chromatogram 15** Zorbax Extend 75 x 4,6 mm; 3,5 µm, pH 2  
MF: Acetonitril:0,085% $H_3PO_4$  - 40:60 (1 – nortriptylin, 2 – amitriptylin)

**Chromatogram 16** Zorbax Extend 75 x 4,6 mm; 3,5 µm, pH 2  
MF: Acetonitril:0,085% $H_3PO_4$  - 40:60 (3– desipramin, 4 - imipramin )

**Chromatogram 17** Zorbax Extend 75 x 4,6 mm; 3,5 µm, pH 7  
MF: Acetonitril:voda - 30:70 (1 – nortriptylin, 2 – amitriptylin)

**Chromatogram 18** Zorbax Extend 75 x 4,6 mm; 3,5 µm, pH 7  
MF: Acetonitril:voda - 30:70 (3+4 – desipramin+imipramin)

**Chromatogram 19** Discovery ZR-PBP 150 x 4,6; 5 µm, pH 2,8  
MF: Acetonitril:puf(r - 70:30 (1 – nortriptylin, 2 – amitriptylin)

**Chromatogram 20** Discovery ZR-PBP 150 x 4,6; 5 µm, pH 2,8  
MF: Acetonitril:puf(r - 70:30 (3– desipramin, 4 - imipramin )

**Chromatogram 21** Discovery ZR-PBP 150 x 4,6; 5 µm, pH 4,6  
MF: Acetonitril:puf(r - 70:30 (1 – nortriptylin, 2 – amitriptylin)

**Chromatogram 22** Discovery ZR-PBP 150 x 4,6; 5 µm, pH 4,6  
MF: Acetonitril:puf(r - 70:30 (3– desipramin, 4 - imipramin )

**Chromatogram 23** Discovery ZR-PBP 150 x 4,6; 5 µm, pH 7,4  
MF: Acetonitril:puf(r - 70:30 (1 – nortriptylin, 2 – amitriptylin)

**Chromatogram 24** Discovery ZR-PBP 150 x 4,6; 5 µm, pH 7,4  
MF: Acetonitril:puf(r - 70:30 (3– desipramin, 4 - imipramin )

**Chromatogram 25** Discovery ZR-PBP 150 x 4,6; 5 µm, pH 8,8  
MF: Acetonitril:puf(r - 70:30 (1 – nortriptylin, 2 – amitriptylin)

**Chromatogram 26** Discovery ZR-PBP 150 x 4,6; 5 µm, pH 8,8  
MF: Acetonitril:puf(r - 70:30 (3– desipramin, 4 - imipramin )

- Chromatogram 27** Discovery ZR-PBP 150 x 4,6; 5  $\mu$ m, pH 8,8  
MF: Acetonitril:puftr - 50:50 (1 – nortriptylin, 2 – amitriptylin)
- Chromatogram 28** Discovery ZR-PBP 150 x 4,6; 5  $\mu$ m, pH 8,8  
MF: Acetonitril:puftr - 50:50 (3– desipramin, 4 - imipramin )
- Chromatogram 29** Discovery ZR-PBP 150 x 4,6; 5  $\mu$ m, pH 11,2  
MF: Methanol:puftr - 60:40 (1 – nortriptylin, 2 – amitriptylin)
- Chromatogram 30** Discovery ZR-PBP 150 x 4,6; 5  $\mu$ m, pH 11,2  
MF: Methanol:puftr - 60:40 (3 – desipramin, 4 – imipramin)
- Chromatogram 31** Discovery ZR-PBP 150 x 4,6; 5  $\mu$ m, pH 12,0  
MF: Methanol:puftr - 60:40 (1 – nortriptylin, 2 – amitriptylin)
- Chromatogram 32** Discovery ZR-PBP 150 x 4,6; 5  $\mu$ m, pH 12,0  
MF: Methanol:puftr - 60:40 (3 – desipramin, 4 – imipramin)

#### Seznam tabulek

- Tabulka 1** - Metody stanovení tricyklických antidepresiv
- Tabulka 2** - Metody stanovení tricyklických antidepresiv
- Tabulka 3** - Metody stanovení tricyklických antidepresiv
- Tabulka 4** – Příprava vzorků
- Tabulka 5** – Příprava citrátového puftru
- Tabulka 6** – Příprava boritanového puftru
- Tabulka 7** – Parametry směsi nortriptylinu a amitriptylinu
- Tabulka 8** – hodnoty pH a  $k_1$  nortriptylinu
- Tabulka 9** – hodnoty pH a  $k_2$  amitriptylinu
- Tabulka 10** – Parametry směsi desipraminu a imipraminu
- Tabulka 11** – hodnoty pH a  $k_1$  desipraminu
- Tabulka 12** – hodnoty pH a  $k_1$  imipraminu
- Tabulka 13** – Parametry směsi nortriptylinu a amitriptylinu (MF: Methanol:puftr - 60:40)
- Tabulka 14** – Parametry směsi desipraminu a imipraminu (MF: Methanol:puftr - 60:40)

### Seznam grafů

**Graf 1** graf závislosti kapacitního faktoru  $k_1$  na pH vodné složky mobilní fáze u nortriptylinu

**Graf 2** graf závislosti kapacitního faktoru  $k_2$  na pH vodné složky mobilní fáze u amitriptylinu

**Graf 3** graf závislosti  $R_S$  na pH u směsi nortriptylinu a amitriptylinu

**Graf 4** graf závislosti kapacitního faktoru  $k_3$  na pH vodné složky mobilní fáze u desipraminu

**Graf 5** graf závislosti kapacitního faktoru  $k_4$  na pH vodné složky mobilní fáze u imipraminu

**Graf 6** graf závislosti  $R_S$  na pH u směsi desipraminu a imipraminu

## **8.Závěr**

Z této diplomové práce lze formulovat následující závěry:

- Bylo provedeno srovnání analýz tricyklických antidepresiv směsi nortriptylinu s amitriptylinem a desipraminu s imipraminem při třech vybraných hodnotách pH mobilní fáze (2,7,9) u čtyř kolon na bázi silikagelu:  
Synergi fusion-RP – sorbent s vloženou polární skupinou  
Zorbax Eclipse XDB – sorbent s extrémně alkylovaným vázáním plus dvojitý „endcapping“  
XTerra RP 18 – sorbent s hybridními organicko-anorganickými částicami  
Zorbax Extend – sorbent bidentátovou C18 stacionární fází s dvojitým „endcappingem“
- V rámci separace na těchto sorbentech chromatografické chování daných látek se projevovalo značným chvostováním a případně i tzv frontingem, s následným stížením separace těchto dvojic standardů.
- Jako velmi vhodná alternativa k silikagelovým kolonám bylo přistoupeno k sorbentu na bázi oxidu zirkoničitého (kolona Discovery ZR-PBP modifikovaná polybutadienem)
- Bylo vyzkoušeno široké rozmezí pH mobilní fáze (2-12)
- Mobilní fázi tvořil acetonitril a pufr o daném pH v poměru 70:30.
- Z důvodu nízké retenci látek při vysokém pH (11,2 a 12,0) byl zaměněn acetonitril za elučně slabší methanol (poměr methanol: pufr 60:40)
- Separace na daném sorbentu představuje obecně velmi dobrou možnost vedle již zmíněných silikagelových sorbentů s použitím širokého rozmezí pH mobilní fáze a teploty pro analýzu bazických látek.

## **9.Literatura**

- [1] Helán V. a kol.: Analýza organických látek (sborník přednášek), 2 THETA, Český Těšín, 2005, 209-236.
- [2] Karliček R. a kol.: Analytická chemie pro farmaceuty, Karolinum, Praha, 2001, 276-281.
- [3] Klimeš J. a kol.: Kontrola léčiv I., Karolinum, Praha, 2002, 22-33.
- [4] Klimeš J. a kol.: Kontrola léčiv II., Karolinum, Praha, 2004, 73,74.
- [5] Sladkovský R., Disertační práce, Analýza přírodních látek, Hradec Králové 2002, 4-30
- [6] Kučera R.: Zirkoniové a chirální stacionární fáze ve farmaceutické analýze, Hradec Králové, 2006, 26-62.
- [7] Klouda P.: Moderní analytické metody, Pavel Klouda, Ostrava, 2003, 25-31
- [8] Šulík K. a kol.: Analytické separační metody, Karolinum, Praha, 2004, 136-67
- [9] Snyder, L. R., Kirkland, J. J., Glajch, J. L., Practical HPLC Method Development, 2 ed., John Wiley and Sons, New York, 1997 (Chapter 5).
- [10] J. Nawrocki, C. Dumlal, A. McCormick, P.W. Carr, J. Chromatogr. A 1028 (2004), 1-30
- [11] Churáček J. a kol.: Nové trendy v teorii a instrumentaci vybraných analytických metod, Academia, Praha, 1993, 192-222
- [12] Nawrocki J., Rigney M. P., McCormick A., Carr P.W., J.Chromatogr. A 657 (1993) 229-282.
- [13] Kol. autorů, Český lékopis 2005, Grada, Praha, 2006
- [14] Databáze AISLP, mikroverze 2006.1
- [15] Yoo SD, Holladay JW, Fincher TK, Dewey MJ : J Chromatogr B 668 (1995), 338-42.
- [16] Dolezalova M : J Chromatogr. 579 ( 1992), 291-7.
- [17] Hartter S, Hiemke C : J Chromatogr. 578 (1992),273-82
- [18] Tanaka E, Terada M, Nakamura T, Misawa S, Wakasugi C.: J Chromatogr B.692 (1997), 405-12.
- [19] Bose D., Durgbanshi A., Martinavarro-Dominguez A., Capella-Peiro M.E., Carda-Broch S., Esteve-Romero J., Gil-Agusti M. J Pharmacol Toxicol Methods. 52 (2005) 323-9.
- [20] Kollroser M., Schober C. Ther Drug Monit. 24 (2002) 537-44.
- [21] Theurillat R., Thormann W. J Pharm Biomed Anal. 18 (1998) 751-60
- [22] Lin W.N., Frade P.D. Ther Drug Monit. 9 (1987) 448-55
- [23] Koteel P., Mullins R.E., Gadsden R.H. Clin Chem. 28 (1982) 462-6
- [24] Karpinska J., Starczewska B. J Pharm Biomed Anal. 29 (2002) 519-25

- [25] Zarghi A., Dadashzadeh S., Kiayi Z. *Boll Chim Farm.* 140 (2001) 458-61
- [26] Kirchherr, H Kuehn-Velten, W. N.: *J Chromatogr B.* 843 100-113
- [27] Shinozuka, T. Terada, M. Tanaka, E. *Forens. Scienc. Internat.* 162 (2006)108-112
- [28] Gutteck U., Rentsch K.M. *Clin. Chem. Labor.Med.* 41 (2003): 1571-1579
- [29] Frahnert C., Rao M.L., Grasmader K. *J Chromatogr B* 794 (2003) 35-47
- [30] Nyanda A.M., Nunes M.G., Ramesh A. J. *Toxikolog.* 38 (2000) 631-636
- [31] Theurillat R., Thormann W. J. *Pharm. Biomed. Anal.* 18 (1998) 751-760
- [32] Kollroser M., Schober C. *Ther Drug Monit.* 24 (2002) 537-544
- [33] Yoshida H., Hidaka K., Ishida J., Yoshikuni K., Nohta H., Yamaguchi M. *Anal. Chim. Acta* 413 (2000) 137-145