

**UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE**  
**FARMACEUTICKÁ FAKULTA**  
**V HRADCI KRÁLOVÉ**

**KATEDRA FARMACEUTICKÉ CHEMIE**  
**A KONTROLY LÉČIV**

**DIPLOMOVÁ PRÁCE**

Využití HPLC v analýze léčiv IV.

**Vedoucí diplomové práce: PharmDr. Radim Kučera, PhD.**

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

Datum:

Mé velké poděkování patří vedoucímu diplomové práce PharmDr. Radimu Kučerovi, PhD. za odborné rady při práci s chromatografem, pomoc a čas strávený se mnou nad výběrem vhodného dalšího postupu a trpělivost, a také Mgr. Peteru Kalafutovi, který mi radil a pomáhal v laboratoři a kontroloval mé postupy a výsledky. Také bych ráda poděkovala své rodině za veškerou podporu a svému příteli za trpělivost, ochotu a pomoc při kontrolování mé diplomové práce.

## Seznam zkratek

(-)MeERM	(-)methylergometrin
(-)MeERMin	(-)methylergometrinin
ACN	acetonitril
APCI	chemická ionizace (z angl. <i>Atmospheric pressure chemical ionization</i> )
APPI	fotoionizace (z angl. <i>Atmospheric pressure photoionization</i> )
C	barva píku (z angl. <i>Color</i> )
CARB	oxidy kovů používány jako stacionární fáze pokryté grafitizovaným uhlíkem
DAD	detektor fotodiodového pole (z angl. <i>Diod Array Detektor</i> )
EA	námelové alkaloidy (z angl. <i>Ergot alkaloids</i> )
ERM	ergometrin
ERMin	ergometrinin
ESI	elektrosprejová ionizace (z angl. <i>Electrospray ionization</i> )
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie (z angl. <i>High Performance Liquid Chromatography</i> )
HPLC-MS	HPLC-hmotnostní spektrometrie (z angl. <i>HPLC–Mass Spectrometry</i> )
isoLA	isolysergová kyselina
LA	lysergová kyselina
LC	kapalinová chromatografie
LC-MS-MS	kapalinová chromatografie s tandemovou hmotnostní spektrometrií
LSD	diethylamid kyseliny lysergové
MeERM	methylergometrin
MeERMin	methylergometrinin
MetOH	methanol
MSE	methylsergid
ODS	SiO <sub>2</sub> -C <sub>18</sub> (z angl. <i>Octadecyl Silane</i> )
PBD	polybutadien
PS	polystyren
Si-OH	silanolová skupina
THF	tetrahydrofuran
Zr-CARB	kolona Zirchrom <sup>®</sup> - CARB
Zr-MS	kolona Zirchrom <sup>®</sup> - MS (Zr-PBD s povrchem deaktivovaným EDTPA (z angl. <i>N,N,N',N'-Ethylenediaminetetra (methylenephosphonic acid)</i> ))
Zr-PBD	kolona Zirchrom <sup>®</sup> - PBD
Zr-PS	kolona Zirchrom <sup>®</sup> - PS

## Obsah

1. Úvod.....	7
2. Teoretická část.....	8
<b>2.1. Vysokoučinná kapalinová chromatografie (HPLC).....</b>	<b>8</b>
2.1.1. <i>Současné trendy v oblasti HPLC.....</i>	8
<b>2.2. Separace v HPLC.....</b>	<b>9</b>
2.2.1. <i>Konstrukce chromatografické kolony.....</i>	11
2.2.2. <i>Typy chromatografických kolon.....</i>	12
2.2.3. <i>Silikagelové kolony.....</i>	13
2.2.4. <i>Kolony na bázi oxidů kovů.....</i>	14
<b>2.3. Přístrojové vybavení pro HPLC.....</b>	<b>17</b>
2.3.1. <i>Schéma kapalinového chromatografu Shimadzu.....</i>	17
2.3.2. <i>Zásobníky mobilní fáze.....</i>	17
2.3.3. <i>Odplyňovač, typ DGU 20 A3.....</i>	17
2.3.4. <i>Pumpy, typ LC 20 AD.....</i>	17
2.3.5. <i>Autosampler, typ SIL-20AC.....</i>	18
2.3.6. <i>Řídící jednotka, typ CBM-20A.....</i>	18
2.3.7. <i>Detektor, typ SPD-M20A.....</i>	18
2.3.8. <i>Kolonový prostor, typ CTO-20AC.....</i>	20
2.3.9. <i>Výstupní zařízení s používaným softwarem.....</i>	20
<b>2.4. Kvalitativní chromatografie.....</b>	<b>21</b>
2.4.1. <i>Chromatografické parametry.....</i>	23
<b>2.5. Kvantitativní chromatografie.....</b>	<b>24</b>
<b>2.6. Farmakologické informace – Námelové alkaloidy.....</b>	<b>25</b>
2.6.1. <i>Ergotamin, dihydroergotamin.....</i>	25
2.6.2. <i>Bromocriptin, lisurid, tergurid, cabergolin.....</i>	25
2.6.3. <i>Ergometrin, methylergometrin.....</i>	26
<b>2.7. Analýza námelových alkaloidů v odborné literatuře.....</b>	<b>27</b>
<b>2.8. Analýza methylergometrinu v odborné literatuře.....</b>	<b>31</b>
2.8.1. <i>Článek: Methylergometrini maleas (Český lékopis 2009)1.....</i>	31
2.8.2. <i>Článek: Methylergonovine Maleate (USP 32, str. 2946 – 2947).....</i>	34
2.8.3. <i>Odborné články zaměřené na methylergometrin.....</i>	35
<b>2.9. Závěr po prostudování odborné literatury.....</b>	<b>37</b>

3. Cíl diplomové práce.....	38
4. Experimentální část.....	39
<b>4.1. Chromatografický systém a kolony, pomůcky, chemikálie.....</b>	<b>39</b>
<b>4.2. Příprava vzorků.....</b>	<b>41</b>
<b>4.3. Příprava mobilní fáze.....</b>	<b>42</b>
<b>4.4. Finální chromatografické podmínky.....</b>	<b>43</b>
5. Výsledky a diskuse.....	44
<b>5.1. Výběr vhodné stacionární fáze.....</b>	<b>44</b>
<b>5.2. HPLC analýzy na koloně Zr-PS.....</b>	<b>50</b>
<b>5.3. HPLC analýzy na koloně Zr-PBD.....</b>	<b>51</b>
<b>5.4. Vybrané výsledky a chromatogramy – kolona Zr-PBD.....</b>	<b>54</b>
<b>5.5. Finální výsledky a chromatogram – kolona Zr-PBD.....</b>	<b>62</b>
6. Závěr.....	63
7. Abstrakt.....	64
8. Abstract.....	65
9. Literatura.....	66

## 1. Úvod

Analýza léčiv se stále častěji přesouvá od chemických zkoušek do oblasti instrumentálních metod s využitím výpočetní techniky. Mezi jednu z nejrychleji se vyvíjejících patří vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC – z angl. *High Performance Liquid Chromatography*). Mezi její výhody patří možnost plné automatizace, vysoká citlivost, selektivita, rychlost analýz a možnost použití malých množství vzorků pro stanovení. Kapalinová chromatografie (LC) je separační metoda založená na rozdílu v distribuci látek mezi dvě nemísitelné fáze, z nichž mobilní fází je kapalina, která prostupuje stacionární fází naplněnou do kolony. LC je založena zejména na mechanismu adsorpce, rozdělování, výměny iontů, vylučování nebo stereochemických interakcích<sup>1</sup>.

Její využití ve farmaceutických odvětvích je velmi široké, zahrnující měření kvalitativní (identifikace a zkoušky totožnosti) i kvantitativní (obsah léčiva ve vzorku i biologickém materiálu), stabilitní testy a stanovení čistoty léčiv<sup>2</sup>.

V této diplomové práci se zabývám analýzou methylergometrinu (methylergonovinu), který se využívá v porodnictví pro zastavení děložního krvácení po porodu. Tato látka je nestabilní vůči působení vnějších vlivů (teplota, světlo), proto musí být uchovávána v tmavé nádobě a v chladu. Při nevhodných podmínkách skladování dochází k racemizaci za vzniku methylergometrininu, jehož množství se postupně ve vzorku zvyšuje. Metodou HPLC je možné stanovovat nejen tento epimer hlavní účinné látky, ale také strukturně podobné látky, které mohou být přítomny ve vzorku pouze v povolených množstvích jako registrované nečistoty.

Hledání nových podmínek HPLC pro přesnější kvalitativní i kvantitativní stanovení čistoty methylergometrinu je důležité z důvodu jeho nestability a možnosti negativního působení vznikajících nečistot na zdraví člověka.

## 2. Teoretická část

### 2.1. Vysokoučinná kapalinová chromatografie (HPLC)

Jedná se o kontinuální separační instrumentální metodu. Tento způsob analýzy léčiv zaujímá v dnešní době přední postavení. Z mnoha důvodů se stala nejpoužívanější metodou kvalitativních i kvantitativních stanovení:

- K separaci dochází na základě interakcí vzorku se stacionární i mobilní fází.
- Využívá široké spektrum stacionárních fází (silikagelových s modifikacemi, zirkoniových s modifikacemi a dalších).
- Umožňuje podle výběru kolony zvolit si vhodnou mobilní fází z širokého výběru (nepolární, polární látky – chromatografie na normálních či reverzních fázích).
- Oproti plošným chromatografickým metodám (tenkovrstvá, papírová) je přesnější, citlivější a rychlejší, díky využití vysokých tlaků vstupujících na kolonu, a oproti
- plynové chromatografii umožňuje separaci a analýzu látek málo těkavých a termicky labilních<sup>2</sup>.
- Díky vývoji nových stacionárních fází s vázanými skupinami na povrchu vznikly reverzní fáze, které napomáhají oddělování i složitých makromolekulárních látek.
- S tím souvisí i jejich využití při stanovování látek izolovaných ze vzorku biologického materiálu a monitorování léčiv a lékových hladin.
- Umožňuje hodnotit obsah přírodních léčivých látek v živočišných a rostlinných drogách<sup>2</sup>.
- Při separaci je možné přesně oddělit strukturně příbuzné látky (nečistoty, rozkladné produkty) od hlavní účinné látky a pomocných látek v léčivém přípravku.

#### 2.1.1. *Současné trendy v oblasti HPLC*

HPLC je díky svému širokému využití předmětem zkoumání laboratoří na celém světě, které se snaží o zvýšení používaných tlaků a rychlosti a o miniaturizaci celých separačních systémů. Hlavní vývoj je směřován k:

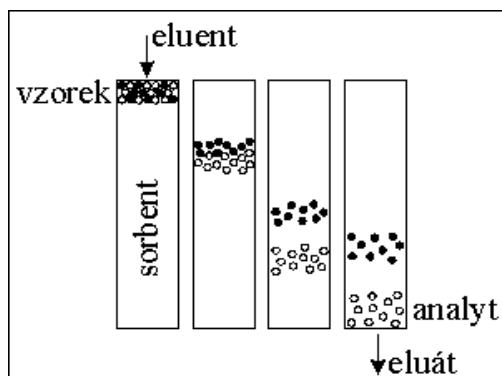
- zkracování kolon a zmenšování velikosti částic sorbentů (pelikulární náplně, povrchově porézní náplně a zejména mikropartikulární náplně);
- používání nových surovin pro náplně kolon (např. Al, Zr, Ti);
- vytváření nových reverzních fází, vazbou chemických skupin a řetězců na povrch stacionárních fází;
- používání kolon s menším vnitřním průměrem (mikrokapilární a kapilární);
- automatizaci analýz;
- využití ultra vysokých tlaků tzv. ultravysokoučinná kapalinová chromatografie (UPLC – z angl. *Ultra High Performance Liquid Chromatography*);
- spojování HPLC s hmotnostně spektrometrickými detektory (HPLC–MS – z angl. *HPLC–Mass Spectrometry*) a s tímto spojený vývoj nových kolon pro HPLC-MS systémy<sup>3</sup>.



## 2.2. Separace v HPLC

Kapalinová chromatografie není jen separační, ale i analytickou metodou, umožňující kvalitativní i kvantitativní stanovení látek. Separace látek probíhá v koloně, která je tvořena vhodnou stacionární fází (sorbentem) a protéká jí mobilní fáze (eluent) (Obr. 1).

**Obr. 1:** Modelové zobrazení rozdělování směsi látek na koloně<sup>4</sup>.



Podstata separace tkví v rozdílných vlastnostech jednotlivých dělených látek:

- Různá afinita dělených složek k sorbentu a mobilní fázi  $\Rightarrow$  rozdílné rozdělování mezi mobilní a stacionární fází  $\Rightarrow$  odlišná rychlost při průchodu kolonou  $\Rightarrow$  separace jednotlivých složek směsi.

Druhy vzájemných interakcí:

- Hydrofobní (van der Waalsovy) síly.
- Interakce dipól – dipól.
- Vodíkové můstky.
- Elektrostatické síly<sup>4</sup>.

Jednou z možností dělení HPLC metod je podle principu separace látek:

- **Gelová permeační chromatografie - GPC** (z angl. *Gel Permeable Chromatography*). Mechanické dělení molekul látek pronikajících do pórů gelu, na základě jejich rozdílné velikosti.
- **Rozdělovací chromatografie - LLC** (z angl. *Liquid – Liquid Chromatography*). Rozdílná rozpustnost molekul mezi dvěma zcela nemísitelnými kapalinami.
- **Adsorpční chromatografie - LSC** (z angl. *Liquid – Solid Chromatography*). Rozdílná adsorpce molekul na povrchu tuhé fáze s aktivními centry.
- **Iontově výměnná chromatografie - IEC** (z angl. *Ion – Exchange Chromatography*). Rozdílná výměnná adsorpce iontů na povrchu iontového měniče<sup>4</sup>.

Další možné dělení je podle způsobu eluce:

### **1. Izokratická eluce**

Během separace nedochází ke změně koncentrace jednotlivých složek mobilní fáze. Uplatňuje se konstantní eluční síla mobilní fáze. Látky se rozdělují jen na základě interakcí s mobilní a stacionární fází.

***Výhody izokratické eluce:***

- Nižší náročnost na přístrojové vybavení.
- Po jednotlivých krocích analýzy není třeba provádět ekvilibraci.
- Ze získaných údajů lze vycházet při vývoji gradientové eluce pro danou směs látek.

***Nevýhody izokratické eluce:***

- Separace jednotlivých látek ve vzorku je pomalejší, analýza je delší.
- Může docházet k rozmývání píků složek směsi vycházejících z kolony mezi posledními.

### **2. Gradientová eluce**

Eluční síla mobilní fáze se během analýzy zvyšuje. Složení mobilní fáze se mění s časem. Koncentrační gradient lze charakterizovat pomocí tří parametrů: počáteční koncentrace účinné eluční složky v mobilní fázi, strmosti gradientu a tvaru gradientu. Nejčastěji se používá gradient lineární, někdy též gradient exponenciální či logaritmický. Při analýze na chemicky vázaných nepolárních fázích se zpravidla používá gradient methanolu nebo acetonitrilu ve vodě nebo roztocích pufrů<sup>5</sup>.

***Výhody gradientové eluce:***

- Vhodnější metoda pro vzorky s velkým počtem analytů (obsahující ve směsi několik látek, které je potřeba oddělit).
- Lepší rozlišení pro píky na začátku a konci chromatogramu.
- Vyšší citlivost pro látky na konci chromatogramu.
- Větší kapacita píků (díky zvyšující se eluční síle mobilní fáze dochází ke změnám retenčních časů jednotlivých látek ve směsi, do chromatogramu se pak vejde více píků)<sup>6</sup>.

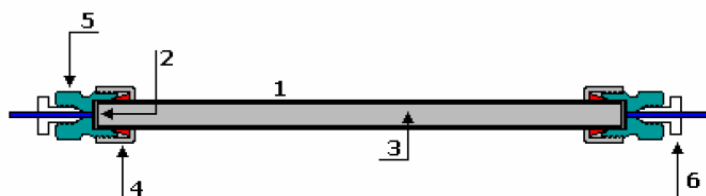
***Nevýhody gradientové eluce:***

- Náročnější instrumentace (důležitá jsou čerpadla, která pumpují mobilní fázi na kolonu na základě pokynů uvedených v LC časovém programu chromatografického softwaru). Pumpy musí být schopny dostatečně pohotově reagovat na změny koncentrace mobilní fáze (obvykle se zpožděním cca 1,5 – 2 min).
- Náročnější vývoj metody (jakákoli změna v gradientu může znamenat velké změny v separaci jednotlivých složek, které se ukáží v jednotlivých chromatogramech).
- Delší doba analýzy vyplývající z nutnosti ekvibrace kolon (je vhodné volit gradient tak, aby závěrečné koncentrační změny vedly k ustálení počátečních gradientových podmínek. Pokud tomu tak není, je nutné před dalším nástřikem vzorku provést ekvilibraci, což může vést k prodloužení času nejen jednoho kroku analýzy, ale i celého experimentu)<sup>6</sup>.

### 2.2.1. Konstrukce chromatografické kolony

HPLC chromatografické kolony jsou obvykle 5 – 25 cm dlouhé o vnitřním průměru 2,1 – 4,6 mm (kapilární model, Obr. 2). Ty s menším průměrem jsou označovány jako mikrokolony. Kolony jsou naplněny vhodnými sorbety, jejichž výběr závisí na podmínkách, které jsou nezbytné pro vybrané stanovení<sup>2</sup>.

Obr. 2: Model kapilární kolony<sup>7</sup>.



1. Plášť – obklopuje a udržuje soudržnost stacionární fáze, může být z nerezové oceli, skla, plastu (polyaryletherketonu).
  2. Porézní kovová frita – chrání před průnikem nerozpuštěných částic, popř. Jiných nečistot, do kolony a umožňuje plynulý tok mobilní fáze.
  3. Stacionární fáze – pokrývá plášť zevnitř nebo vyplňuje celý prostor kapiláry.
  4. Převlečný ochranný kroužek.
  5. Koncová hlavice.
  6. Vstup pro kapiláru se šroubem<sup>7</sup>.
- Normální stacionární fáze mají obvykle na povrchu vázány polární skupiny a při analýze se využívají nepolární mobilní fáze (bez přítomnosti vody).
  - Reverzní fáze naproti tomu využívají možnosti připojení nepolární skupiny na OH skupiny nosiče (např. silikagelu, hliníku, zirkonia). Těmito skupinami jsou nejčastěji nasycené alifatické řetězce (C<sub>8</sub>, C<sub>18</sub>) či modifikované a nemodifikované aromatické cykly (fenyl, alkylfenyl, aminofenyl), na jejichž charakteru závisí selektivita připravené fáze. Používají se polární mobilní fáze<sup>2</sup>.

## 2.2.2. Typy chromatografických kolon

Nejpoužívanějším způsobem dělení chromatografických kolon v kapalinové chromatografii je podle stacionární fáze (Tab. 1). Je možné je ale rozdělit i podle délky, průměru, velikosti částic, životnosti a na základě jejich dalších parametrů.

Tab. 1: Vybrané stacionární fáze<sup>8</sup>.

Druh, výplň	Vlastnosti	Poznámky
<b>Polární adsorbenty:</b>	<i>Normální fáze.</i>	Nepolární mobilní fáze.
1. Silikagel	Silanolové skupiny Si-OH. Povrch slabě kyselý (iontoměnič) – zadržuje více bazické látky.	Rozpouští se při pH = 8,0.
2. Chemicky vázané fáze	Aminopropyl, kyanopropyl a diol.	
3. Neutrální oxid hlinitý	Krystalická spinelová struktura, na povrchu s OH skupinami a centry s elektron-akceptorovými vlastnostmi (Lewisovy baze).	Vykazuje rozdílnou selektivitu než silikagel, používá se pro separaci nasycených a nenasycených alifatických uhlovodíků a polyaromatických uhlovodíků.
<b>Nepolární:</b>	<i>Obrácené (reverzní) fáze.</i>	Polární mobilní fáze.
Chemicky vázané fáze	Etherové: Si-O-C- Aminové: Si-N-C- Silanové: Si-O-Si-C-	Náchylné k hydrolyze. Stabilní při pH = 4,0 – 7,5. Odolné vůči hydrolyze (C <sub>18</sub> , C <sub>8</sub> , fenyl).
<b>Další:</b>		
Monolitické kolony	Jediný kus pórovitého materiálu, velké a středně velké póry.	Anorganické monolity. Makroporézní polymerní monolity. Stlačitelné monolity (komprimované gely).
Oxid zirkoničitý	Adsorpční centra charakteru Lewisových kyselin. Do mobilních fází se musí přidávat pufrы, které kompenzují silné interakce těchto center s hydroxylovými, fosfátovými či karboxylovými skupinami v molekulách látek.	Monodisperzní porézní kulové částičky, chemická a tepelná stabilita (použití za extrémních podmínek, např. čištění), tím prodloužení životnosti kolony.
Modifikovaný oxid zirkoničitý – vázané fáze.	Polystyren, polybutadien, grafitizovaný uhlík nebo grafitizovaný uhlík s vázanými C <sub>18</sub> řetězci.	Pro RP-HPLC (z angl. <i>Reverse phase-HPLC</i> ) je povrch ZrO <sub>2</sub> potažen vrstvou jedné z těchto vázaných fází.

### 2.2.3. *Silikagelové kolony*

Tyto kolony s mikropartikulárním silikagelem patří k nejpoužívanějším, převážně v reverzním módu. Silikagelové částice jsou monodisperzní, mechanicky odolné a vytvářejí velký povrch s Si-OH skupinami či chemicky vázanými ligandy. Mohou být používány v normální, reverzní, iontové výměnné a vylučovací chromatografii, což rozšiřuje spektrum možných stanovovaných látek.

Organosilanové chemicky vázané fáze jsou nejvýznamnější díky vysoce reprodukovatelné syntéze a dobře dosažitelným výsledným charakteristikám hmotnostního transportu. Fáze jsou stabilní v rozmezí pH = 3,0 – 9,0, pro dlouhodobé používání však již pouze při pH = 3,0 – 7,0. Při pH ≤ 4,0 dochází k urychlení hydrolyzy silanolové vazby a ke ztrátě chromatografické retence, při pH ≥ 9,0 k rozpouštění povrchu a odštěpování vázaných skupin. Dlouhodobé vystavení těmto podmínkám postupně snižuje účinnost kolony. Mobilní fáze používané při stanoveních na silikagelových kolonách se vyhýbají hodnotám pH, které by mohly zkrátit životnost kolon, což limituje využití těchto fází při stanovení řady látek. Při optimalizaci podmínek separace jsou přitom často využívány změny iontové síly mobilní fáze k dosažení co nejlepších výsledků.

Vyšší odolnosti vůči hydrolyze při nízkém pH bylo dosaženo navázáním alifatických uhlíkových řetězců na silikagelový povrch (C<sub>3</sub>, C<sub>8</sub>, C<sub>18</sub>, propylfenyl, isopropyl, isobutyl), které prostorově brání průniku agresivní mobilní fáze k silanolové vazbě. Komerčně dostupné stericky chráněné fáze jsou stabilní při pH = 1,0 i po delší dobu.

Dosažení protekce silikagelové stacionární fáze vůči vyšším hodnotám pH je složitější a zahrnuje kromě chemické úpravy povrchu (vazbou C<sub>18</sub> řetězců) také použití anorganických pufrů (fosfátových, uhličitanových) a práci při teplotě do 60°C. I přes tato opatření se ale životnost kolony za těchto podmínek pohybuje jen okolo 3 – 6 dní.

Předností silikagelových kolon je jejich cena a možnost využití systémů s chemicky modifikovaným povrchem nebo monolitickou úpravou (s průtočnými a difúzními póry)<sup>9</sup>.

#### Kolona Symmetry-C<sub>18</sub>

Jak již název napovídá, je používána v reverzním módu s polárními mobilními fázemi. Vzorky pro stanovení by měly být rozpustné v mobilní fázi pro dosažení optimálního tvaru píku a citlivosti. Pokud toho nelze dosáhnout, je nutné zkontrolovat vzájemnou mísitelnost vzorku, rozpouštědla a mobilní fáze k zabránění srážení některé ze složek s pufrům. Kolona je stabilní v rozmezí pH = 2,0 – 8,0. Její životnost při určité hodnotě pH závisí na použitém pufru, jeho koncentraci a teplotě. Důležitá je kvalita rozpouštědla pro přípravu vzorku a úpravu koncentrace pufru. Rozpouštědlo má být přefiltrováno (prevence nižší výkonnosti při vyšším tlaku) a deaerizováno (zábrana rušivých vlivů bublinek vzduchu v pumpě a detektoru). Doporučený pracovní tlak působící na kolonu je do 40MPa a teplota v rozmezí 20 – 45 °C<sup>10</sup>.

#### 2.2.4. Kolony na bázi oxidů kovů

Kovy používané ve formě svých oxidů jako stacionární fáze v HPLC jsou nejčastěji hliník a zirkonium, experimentálně také titan. Kolony s touto náplní jsou stabilnější vůči působení tlaku, pH i teploty než silikagelové. To rozšiřuje možnosti využití stacionárních fází na bázi oxidů kovů v HPLC analytických metodách.

Vlastnosti, pro které jsou tyto fáze ceněny:

- Stabilnější náplň kolony s nižším prosakováním a snadnějším rozvojem HPLC-MS metod a používáním detektorů světelného rozptylu.
- Možnost čištění kolony pomocí extrémních podmínek (pH, teploty) bez jejího poškození.
- Teplotní stabilita umožňuje zvýšení průtoku a urychlení stanovení, čímž roste robustnost analýzy. Stacionární fáze mohou být používány až při 200 °C.
- Kolony mají delší životnost, čímž se snižuje celková cena analýzy.

Oxid zirkoničitý se ukazuje jako velmi perspektivní materiál na výrobu stacionárních fází. Oxidy ostatních testovaných kovů mají rozdílné vlastnosti, které opravňují k tomu se domnívat, že jsou méně stabilní a mají problematičtější povrchovou chemii než ty na bázi oxidu zirkoničitého. Vlastnosti zirkoniových fází zůstávají nezměněny v rozmezí pH = 1,0 – 14,0 a do teploty 200 °C (v závislosti na úpravě povrchu náplně). Oxidy kovů mají bohatší povrchovou chemii oproti silikagelu, z čehož vyplývá jejich složitější používání a nutnost přizpůsobit se změnám chromatografických podmínek<sup>9</sup>.

Používají se krystalické formy:

##### **Al – $\alpha, \gamma$ , amorfní.**

Fáze se liší množstvím vody vázané na povrch sorbentu, 5 typů hydroxylových (OH) skupin ovlivňuje separaci a adsorpci.

##### **Zr – monoklinická forma.**

Na svém povrchu obsahuje vázané OH skupiny, vyšší teplota pak může ovlivnit separaci tím, že dochází ke zmenšení průměru, objemu pórů a zmenšení celého povrchu.

##### **Ti – anatas, rutil formy.**

Vliv teploty na vlastnosti fáze a pórů je stejný jako u Zr. Na povrchu Ti je pozorováno až 15 typů OH skupin<sup>9</sup>.

Částice jsou kulovité, monodisperzní s dobrou morfologií pórů a snadno vyrobitelné (hlavně Zr, Ti). Vyrábí se i keramické částice pokryté vrstvou oxidu kovu s nízkou polaritou, které se využívají při reverzní chromatografii. Pro vytvoření částic je možné používat i smíšené oxidy kovů, které modulují vlastnosti stacionární fáze. Stacionární fáze na bázi kovů fungují jako iontově výměnné i ligand výměnné (v závislosti na pH)<sup>9</sup>.

### Výroba částic:

1. Sprejové sušení vodné suspenze keramického koloidu – kapky rozprášené ve vzduchu – sušení kapek – slinování.
2. Olejová emulze – emulgované kapky – sušení – čištění a slinování.
3. Polymerizace vodné suspenze keramického koloidu s přísávkem ve vodě rozpustných monomerů – polymerní precipitace (hromadící se koloid) – čištění, polymerní žihání, konečné slinování.

Smíšené oxidy kovů modifikují vlastnosti částic, ze kterých jsou složeny výsledné stacionární fáze. Navzájem bylo vyzkoušeno množství kombinací a jako nejzajímavější se ukázaly Zr + Si na Al; oxidy kovů (Al, Zr, Fe, Sn, Cr) na Si; Zr, Ti, Al na Si. Takto vzniklé fáze vykazovaly specifické vlastnosti, využitelné pro separaci různých látek<sup>9</sup>.

Velká pozornost je věnována modifikovaným stacionárním fázím na bázi oxidů kovů. Cílem modifikace je získání fází hydrofobních a chemicky selektivních pro provedení reverzní separace (podobně jako u Si - reverzních fází). Ionizovatelné soluty pak mají smíšený režim zadržování: reverzní a na základě interakcí Lewisovy kyseliny či báze. Neionizovatelné soluty jsou zadržovány režimem reverzních fází<sup>11</sup>.

### Dělení modifikací:

1. **Dynamické** – vytvořeny přítomností silně interagujících sloučenin v mobilní fázi.
2. **Permanentní** – kovalentní vazba mezi povrchovými a chemicky vázanými skupinami.
3. **Fyzikální screening** – usazování polymeru na oxidu nebo plátování s uhlíkovými vrstvami.

**Ad 1.** Projevy Lewisovy kyseliny na povrchu se blokuje použitím fosfátů, fluoridů, nebo analogů silných komplexů EDTA (z angl. *ethylenediaminetetraacetic acid*) obsažených v mobilní fázi.

**Ad 2.** Silanizace povrchu oxidu kovů není vhodnou modifikací (nestabilita, hydrolyza, fáze se nedá použít při vyšším pH). Pokrytí polybutadienem je dobře známo u Zr a Al. Využívá se 2-oktadecyl-1,3-butadien. Modifikované oxidy jsou velmi stabilní v kyselém i zásaditém prostředí. Jiným druhem permanentního pokrytí je využití fosfátů, fluoridů, či fosfonových analogů EDTA (jako součásti mobilní fáze nebo modifikátory povrchu), které silně interagují s povrchem Zr a zlepšují chromatografické provedení<sup>11</sup>.

### Typy pokrývání polymerem:

- Tenký film neblokuje nebo nezmenšuje otvor pórů, neovlivní strukturu pórů a schopnost látek se v nich vázat, udržuje dobrý kvantitativní transfer do pórů a polymerního filmu.
- Jednotlivé pokrytí, které překryje nežádoucí nespecifické skupiny na povrchu.

### Typy reverzních stacionárních fází:

**PBD-ZrO<sub>2</sub>, Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>** (polybutadien) – reverzní fáze, použitelné za agresivních podmínek. Vysoká separační účinnost, vysoká teplotní a pH stabilita (srovnatelné s Si-C<sub>18</sub>, Si-C<sub>8</sub>).

**PS-ZrO<sub>2</sub>, Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>** (polystyren) – rozdíl oproti PBD je v ploše, kterou na povrchu částic zaujímají mikropóry a póry s malým průměrem. Fáze je stabilní v kyselém i alkalickém prostředí (pH = 1 – 13), při vysoké teplotě a vůči agresivním médiím. Tato fáze se zdá být vhodná pro použití především v případě složitých separací, kdy selhávají PBD-ZrO<sub>2</sub> i běžné fáze s vázaným Si.

**Polyethylenimin-ZrO<sub>2</sub>** – používané k separaci malých organických i anorganických nabitých molekul, jsou vysoce stabilními a účinnými měniči aniontů. Typ síťování polymeru na povrchu je významný pro hydrofobicitu a chemickou a teplotní stabilitu. Za použití různých typů síťování vznikají stacionární fáze, které jsou buď silnými nebo slabými měniči iontů.

**Chemicky vázaný řetězec C<sub>18</sub>-ZrO<sub>2</sub>** – povrch je méně hydrofobní než je tomu u běžných silikagelových fází. Pro jednoduché nenabité molekuly je doporučováno použití organické mobilní fáze nižší síly k dosažení srovnatelných retenčních parametrů jako u běžných C<sub>8</sub> a C<sub>18</sub> silikagelových stacionárních fází.

**Ad 3. (Fyzikální screening)** Oxidy kovů pokryté grafitizovaným uhlíkem (hlavně Zr), uhlíkové adsorbenty, jsou široce studovány pro využití v chromatografii. Vznikají pyrolýzou uhlíkatých prekurzorů při 700 – 1100 K<sup>11</sup>.

### Výhody propojení oxidů kovů a uhlíku:

- Chemická resistence k působení kyselin, zásad a organických solventů.
- Mechanická stabilita.
- Různá selektivita, použitelná při chromatografické separaci.

### Rozdíl mezi ZrO<sub>2</sub> pokrytým uhlíkem a alkylově vázanými modifikátory (Ad 2.):

- Má vyšší selektivitu pro separaci polárních i nepolárních geometrických izomerů.
- Je více hydrofobní.
- Polární roztoky jsou zadržovány elektrickými interakcemi  $\pi$  elektronů.

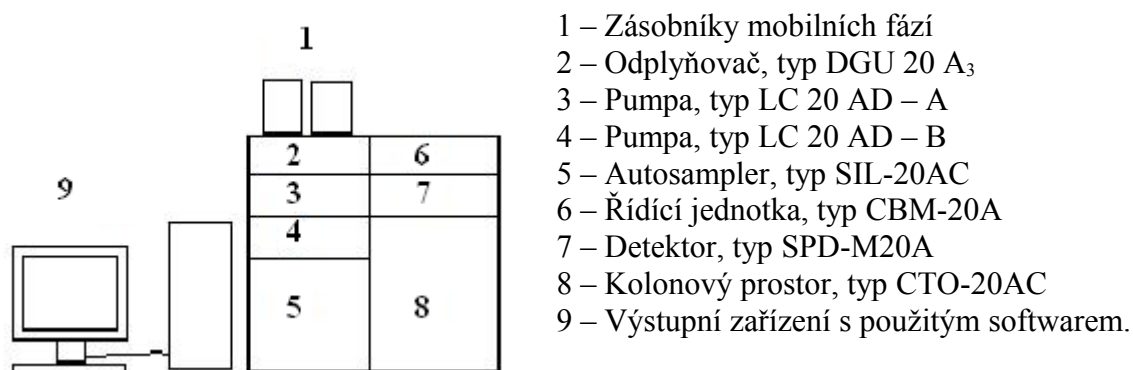
Zr fáze s vázaným uhlíkem byly chemicky modifikovány na reverzní fáze za použití diazoniových solí. Nově vzniklé fáze jsou stabilní při pH = 0,3 – 14 a odolávají teplotě 200 °C při neutrálním pH<sup>11</sup>.



## 2.3. Přístrojové vybavení pro HPLC

### 2.3.1. Schéma kapalinového chromatografu Shimadzu

Obr. 3: Schéma kapalinového chromatografu Shimadzu.



### 2.3.2. Zásobníky mobilní fáze

Jedná se o nádoby skleněné, plastové či z nerezové oceli naplněné jednotlivými složkami mobilní fáze, obvykle organickým rozpouštědlem a pufrem, které jsou pumpovány čerpadly pomocí plastových či ocelových kapilár. Tyto mají na konci ponořeném do kapaliny porézní přepážku, která slouží k ochraně před průnikem malých nerozpuštěných částic na kolonu.

### 2.3.3. Odplyňovač, typ DGU 20 A<sub>3</sub>

Odplyňovače slouží pro odplynění mobilní fáze přicházející na kolonu (ultrazvukem, vakuem či probubláváním přes helium). Odplynění je důležitou součástí stabilizace mobilní fáze před průchodem kolonou. Vysoké tlaky, potřebné pro pumpování vzorku, mění rozpustnost plynů. V mobilní fázi se tak mohou vytvořit bublinky, které při průchodu pumpami způsobí jejich nestejný chod a tlakové rázy. To se projeví hlavně v nereprodukovatelnosti retenčních časů a nestabilitě základní linie. Tento typ odplyňovače využívá fluorethylenovou membránu<sup>12</sup>.

### 2.3.4. Pumpy, typ LC 20 AD

Pumpy neboli čerpadla vedou mobilní fázi ze zásobníku přes odplyňovač a injektor na kolonu. Jsou jednou z nejdůležitějších a výrobně nejnáročnějších součástí chromatografu, protože jsou zodpovědné za udržení konstantního průtoku a tlaku mobilní fáze ve všech částech zařízení. Typ LC 20 AD je mikroobjemovým dvojitým pístovým čerpadlem, zajišťujícím konstantní průtok a tlak během celé analýzy při izokratické i gradientové eluci. Rozsah nastavení průtoku a tlaku je 0,0001 – 5 ml/min pro 1 – 40 MPa a 5,0001 – 10 ml/min pro 1 – 20 MPa. Podtlakový filtr má průměr pórů 10 μm, síťový filtr 5 μm a kapacitu 30 μl. Při operační teplotě 4 – 35 °C je možno najednou smísit až 4 rozpouštědla, a to v závislosti na tlaku při gradientové eluci a konstrukci chromatografického systému (přítomnosti či nepřítomnosti řídicí jednotky CBM-20A)<sup>13</sup>.

Námi používaný chromatograf má 2 čerpadla, označená podle části mobilní fáze jím procházející: anorganický pufr (A), organické rozpouštědlo (B).

### 2.3.5. Autosampler, typ SIL-20AC

Jedná se o automatický dávkovač vzorku do prostoru kolony, kde dochází k interakci injikovaných látek s mobilní i stacionární fází. Umožňuje vysokorychlostní dávkování a procesy s více vzorky umístěnými ve větší či menší zásuvce pro vialky. Každé místo má číselné označení, které odpovídá číslu vialky zapsanému před analýzou do počítačového programu. Autosampler je vybaven chladičem prostoru se vzorky. Tento je schopen udržovat stálou teplotu v rozmezí 4 – 40 °C. Standardně mohou být dávkovány vzorky po 1 – 100 µl při použitém tlaku 20 MPa. Při zadávání specifických injikovaných objemů je rozmezí 1 – 2000 µl při zvoleném tlaku 20 – 35 MPa. Standardní operační podmínky autosampleru odpovídají teplotě 4 – 35 °C, vlhkosti 20 – 85 % a pH = 1 – 14<sup>14</sup>.

### 2.3.6. Řídící jednotka, typ CBM-20A

Tato jednotka je vybavena funkcí ochrany dat a funguje jako mezičlánek pro připojení LC – pracovních stanic, síťových klientských počítačů a analytických přístrojů přes Ethernet. Patří mezi první řídicí jednotky HPLC na bázi internetu. Umožňuje uživateli snadný přístup pro nastavení, kontrolu a monitorování jeho HPLC přes webové rozhraní na dálku. K rozvodné síti CBM-20A může být připojeno více než osm zařízení.

Toto centrální zařízení zajišťuje výkonnost, zvyšuje ochranu pomocí víceúrovňových přístupových alternativ, poskytuje flexibilní analytické prostředí, a napomáhá udržovat cenný prostor na stole<sup>15</sup>.

### 2.3.7. Detektor, typ SPD-M20A

Nejdůležitějšími vlastnostmi detektorů používaných při HPLC jsou: univerzálnost (možnost stanovovat široké spektrum látek), citlivost (tzn. mez detekce, daná minimální koncentrací látky, kdy již dojde k zaznamenání signálu) a linearita odezvy (tzn. přímá úměrnost mezi hodnotou odezvy a koncentrací vzorku). Jednotlivé typy detektorů jsou shrnuty v Tab. 2. Detektor používaný při námi navrhované optimalizaci stanovení čistoty a příbuzných látek methylergometrinu využívá fotodiodového pole, vytvářeného deuteriovou či wolframovou lampou. Jedná se o nedestruktivní typ detektoru, který dokáže měřit absorpci látek v rozmezí vlnových délek 190 – 800 nm. Může být jedním z analytických zařízení, připojených k řídicí jednotce, využívající Ethernet. Ideální provozní podmínky jsou 4 – 35 °C, 45 – 85 % vlhkosti a tlak 12 MPa<sup>16</sup>.

#### **Výhody:**

- Schopnost rozlišit píky navzájem na základě absorpčních spekter.
- Robustnost a spolehlivost metody při použití detektoru fotodiodového pole – DAD (z angl. *Diod Array Detector*).
- Simultánní měření celé oblasti spektra.
- Okamžitý záznam a zobrazení dat.
- Možnost tvorby 3D chromatogramu.

#### **Nevýhoda:**

- Finanční náročnost.

Tab. 2: Nejčastěji používané typy detektorů v HPLC systémech<sup>2</sup>

Typ detektoru	Princip detekce, doplnění	Poznámka
<b>Spektrofotometrický:</b>	Měření absorbance elektromagnetického záření vzorkem, procházejícím celou detektorem.	Využívá se především UV oblast spektra. Je značně citlivý ( $10^{-9}$ – $10^{-10}$ g/ml). Gradientová eluce.
<i>UV</i>	S fixní $\lambda$ .	Nejčastěji 254, 280 nm.
<i>UV-VIS</i>	S měnitelnou $\lambda$ .	
<i>Scanning UV</i>	Snímá absorpční spektrum v maximu píku léčiva.	Trvání jen několik sekund.
<i>Diod Array (UV-VIS)</i>	Trojrozměrná projekce, několik $\lambda$ , absorpční spektra, porovnání poměrů absorbancí.	Řízen počítačem.
<b>Fluorimetrický:</b>	Záchyt fluoreskujících léčiv. Hg výbojka + filtry, deuteriová lampa nebo xenonová výbojka + monochromátor, na emisní straně filtr nebo monochromátor.	Méně univerzální, více citlivý ( $10^{-9}$ – $10^{-12}$ g/ml). Gradientová eluce.
<b>Elektrochemický:</b>	Využití elektrochemických dějů na rozhraní elektroda – eluent. Hodnota jedné z veličin je závislá na koncentraci (C) vzorku.	Oxidovatelnost a redukovatelnost léčiv.
<i>voltametrický</i>	Závislost napětí na C	
<i>ampérometrický</i>	Závislost proudu na C	Tuhé měrné elektrody – skelný uhlík, grafit, zlato, platina, měď či jiný kov. Povrch materiálů se zanáší produkty oxidace či redukce.
<i>polarografický</i>	Závislost proudu na C	Rtuťové dno a kapková Hg – elektroda.
<i>coulometrický</i>	Měření náboje potřebného k oxidaci či redukci celkového množství látky.	Porézní grafitová pracovní elektroda – fritový typ (vzorek protéká skrz ni).
<b>Refraktometrický:</b>	Měří rozdílný index lomu mezi mobilní fází bez a se vzorkem analyzované látky.	Univerzální, nižší citlivost ( $10^{-6}$ g/ml), termostatování. Nelze použít pro gradientovou eluci.
<b>Spojení s hmotnostním spektrometrem:</b>	Analyt je ionizován nejčastěji pomocí ionizačních technik pracujících za atmosférického tlaku (ESI, APCI, APPI). Nabité částice se rozdělí podle náboje a hmotnosti (záznam hmotnostního spektra).	Vysoce selektivní, citlivé, ale finančně nákladné spojení HPLC-MS.

### **2.3.8. Kolonový prostor, typ CTO-20AC**

Kolonový prostor slouží pro připevnění kolony v systému. Tento typ zařízení využívá ventilátorové větrací cirkulace s možností temperování prostoru v rozmezí 4 - 85 °C a kontroly teploty v řádu  $\pm 0,1$  °C, což bylo v našem případě výhodné z hlediska teplotní nestability methylergometrinu. Do temperovaného prostoru lze umístit 2 kolony. Proti přehřátí je vybaven termální pojistkou, proti úniku mobilní fáze senzorem průsaku<sup>17</sup>.

### **2.3.9. Výstupní zařízení s používaným softwarem**

Tato zařízení (počítače) slouží nejen pro shromažďování, vyhodnocení, zpracování a uložení dat získaných z detektoru, ale s pomocí nejmodernějšího programového vybavení odborně zaměřených firem i pro řízení a kontrolu celého separačního procesu.

Software LC Solution Version 1.22 SP1 umožňuje ovládat a kontrolovat podmínky analýzy:

- Smísení organické mobilní fáze s pufrem v požadovaném poměru (složení mobilní fáze).
- Nastavení celkového času jednoho kroku analýzy (izokratická eluce).
- Vytvoření gradientu mobilní fáze a pufru v určitých poměrech, měnících se s časem (gradientová eluce).
- Rychlost průtoku mobilní fáze kolonou.
- Sledování tlaku vstupujících mobilních fází.
- Při použití spektrofotometrického detektoru záznam odezvy při různých vlnových délkách zároveň.
- Teplotu v kolonovém prostoru a v autosampleru (zábrana rozkladu vzorku).
- Zastavení separace v kterémkoli okamžiku.
- Nastavení podmínek výplachu kolony před i po separaci vzorku.

## 2.4. Kvalitativní chromatografie

Chromatografické metody mají oproti některým jiným instrumentálním postupům výhodu v tom, že je možné stanovit nejen totožnost látky, ale také její množství (koncentraci) ve vzorku. Kvalitativní chromatografie využívá retenční parametry.

### Retenční parametry:

Retenční objem.....	$V_R$ [ml]
Retenční čas.....	$t_R$ [min]
Mrtvý objem kolony.....	$V_M$ [ml]
Mrtvý čas kolony.....	$t_M$ [min]
Redukovaný retenční objem.....	$V'_R$ [ml]
Redukovaný retenční čas.....	$t'_R$ [min]

**Retenční objem** – objem mobilní fáze, který musí projít kolonou, aby se analyt dostal ke konci separační kolony.

**Retenční čas** – celkový čas, který analyt stráví v separační koloně.

**Mrtvý objem** – objem eluentu, který musí projít kolonou, aby se nezadržovaný analyt dostal od počátku ke konci kolony.

**Mrtvý čas** – retenční čas analytu, který není v koloně zadržován, tj. pohybuje se kolonou stejnou rychlostí jako mobilní fáze. Všechny analyty stráví v mobilní fázi stejný čas – mrtvý čas kolony.

**Redukovaný retenční objem** – daný rozdílem retenčního a mrtvého objemu.

**Redukovaný retenční čas** – čas, který příslušný analyt stráví ve stacionární fázi.

Výpočetní vzorce veličin jsou uvedeny v Tab. 3.

Kvalitativní analýza je vyjádřena retenčním (elučním) časem ( $t_R$ ), tzn. časem od nástřiku vzorku na kolonu až po maximum chromatografického píku.  $t_R$  je relativní veličinou, protože jeho hodnota závisí na podmínkách stanovení: průtoku, složení mobilní fáze, vybrané stacionární fázi. Získaný retenční čas vzorku se pro přesnost porovnává s hodnotou naměřenou u standardu. Pokud se shodují retenční časy za různých chromatografických podmínek, lze s jistou pravděpodobností tvrdit, že neznámá látka je identická se standardem. Retenční čas sám o sobě nemůže sloužit k identifikaci daného analytu a bez předchozí částečné znalosti vzorku se nedá obecně použít pro identifikaci látek. Identifikace v chromatografii je však v některých případech možná, i při neznalosti vzorku, za použití vhodného detektoru (např. DAD, hmotnostního), ale znalost stanovovaného analytu ji značně usnadňuje. Existuje vždy předpoklad o identitě, který závisí na předběžné znalosti analytu, efektivnosti systému a použité identifikační metodě<sup>18</sup>. Další možností identifikace vzorku ve kvalitativní chromatografii je na základě relativních retenčních časů. Při této metodě se retenční čas analytu vztahuje na retenční čas určité vhodné látky (nejčastěji zkoušené látky).

Uvažujeme-li retenční čas komponent 1 a 2 –  $tr_1$ ,  $tr_2$ , potom pro relativní retenci – RR platí dle lékopisu vzorec<sup>1</sup>:

$$RR = \frac{tr_2}{tr_1}$$

S použitím relativních retence se eliminuje vliv délky kolony, fluktuace průtoku a teploty. Rovnice pro výpočty dalších vybraných chromatografických veličin jsou uvedeny v Tab. 3.

Tab. 3: Základní chromatografické veličiny s rovnicemi pro jejich výpočet<sup>4</sup>.

Veličina	Rovnice
Lineární rychlost mobilní fáze	$u = \frac{L}{t_M}$
Retenční objem i-tého analytu	$V_{R,i} = F_m \cdot t_{R,i}$
	$V_{R,i} = V_M + K_{D,i} \cdot V_s$
Retenční čas i-tého analytu	$t_{R,i} = \frac{V_{R,i}}{F_m} = \frac{V_M + K_{D,i} \cdot V_s}{F_m}$
Distribuční konstanta (rozdělovací konstanta)	$K_{D,i} = \frac{(c_i)_s}{(c_i)_m} = \frac{(n_i)_s}{(n_i)_m} \cdot \frac{V_m}{V_s}$
Retenční poměr	$k_i = \frac{(n_i)_s}{(n_i)_m} = K_{D,i} \cdot \frac{V_s}{V_m}$
Mrtvý objem	$V_M = F_m \cdot t_M$
Mrtvý čas	$t_M = L / u$
Redukovaný retenční objem	$V'_{R,i} = V_{R,i} - V_M$
	$V'_{R,i} = F_m \cdot t'_{R,i}$
	$V'_{R,i} = K_{D,i} \cdot V_s$
Redukovaný retenční čas	$t'_{R,i} = t_{R,i} - t_M$
	$t'_{R,i} = \frac{V'_{R,i}}{F_m} = \frac{K_{D,i} \cdot V_s}{F_m}$

Lineární rychlost mobilní fáze.....	u [cm/min]
Celková délka kolony.....	L [cm]
Objemový průtok mobilní fáze.....	F <sub>m</sub> [ml/min]
Distribuční konstanta.....	K <sub>D,i</sub>
Objem stacionární fáze.....	V <sub>s</sub> [ml]
Objem mobilní fáze.....	V <sub>m</sub> [ml]
Koncentrace i-tého analytu v mobilní fázi.....	(c <sub>i</sub> ) <sub>m</sub> [mol/l]
Koncentrace i-tého analytu ve stacionární fázi.....	(c <sub>i</sub> ) <sub>s</sub> [mol/l]
Látkové množství i-tého analytu v mobilní fázi.....	(n <sub>i</sub> ) <sub>m</sub> [g/mol]
Látkové množství i-tého analytu ve stacionární fázi.....	(n <sub>i</sub> ) <sub>s</sub> [g/mol]
Retenční poměr.....	k <sub>i</sub>

**Distribuční konstanta** K<sub>D,i</sub> – poměr rovnovážné koncentrace analytu ve stacionární a mobilní fázi. Nabývá obvykle hodnot 2 – 10.

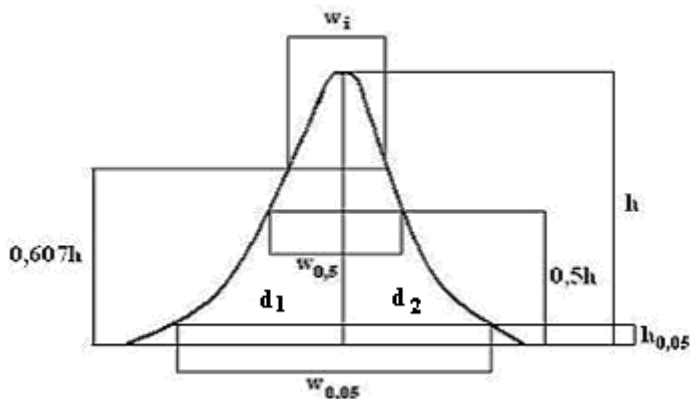
**Retenční poměr** k<sub>i</sub> – jedna z nejužívanějších retenčních veličin. Udává kolikrát více času stráví analyt ve stacionární fázi než ve fázi mobilní, tj. v kolikanásobku mrtvého času (objemu) analyt eluuje. Je to i poměr látkových množství analytu ve stacionární a mobilní fázi za rovnovážných podmínek.

K<sub>D,i</sub> a k<sub>i</sub> charakterizují selektivitu, tj. jak moc se analyty na koloně zdržují a zpožďují<sup>4</sup>.

### 2.4.1. Chromatografické parametry

Chromatografický záznam je tvořen chromatografickými píky (Obr. 4). Každý chromatografický pík je určen plochou ( $A$ ), výškou ( $h$ ) a šířkou mezi inflexními body ( $w_i$ ). Z teorie chromatografického patra vyplývá, že eluční křivka má tvar Poissonova rozdělení, které lze pro vysoký počet pater nahradit Gaussovou křivkou.

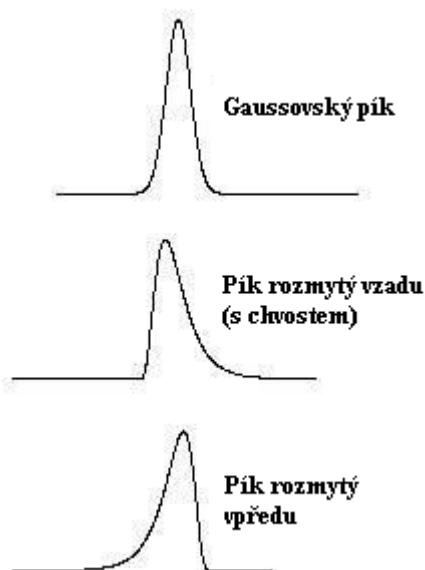
Obr. 4: Obrázek zobrazující některé použité veličiny.



Výška píku.....	h
Dvacetina výšky píku.....	0,05h
Polovina výšky píku.....	0,5h
Výška píku v inflexních bodech.....	0,607h
Šířka píku v 0,05h.....	$w_{0,05}$
Šířka píku v 0,5h.....	$w_{0,5}$
Šířka píku v inflexních bodech (v 0,607h).....	$w_i$
Vzdálenost mezi kolmicí spuštěnou z maxima píku a čelem píku v 0,05h.....	$d$
(u nesymetrických píků = 2 rozdílné hodnoty – $d_1$ a $d_2$ ).	

### Faktor symetrie $A_s$

Obr. 5: Možné tvary píků v chromatogramu<sup>4</sup>.



Z obrázku je patrné, že ne vždy jsou píky pravidelné. Veličinou, která vyjadřuje míru souměrnosti chromatografického píku, je faktor symetrie  $A_s$ . Tento můžeme vypočítat pomocí vzorce:

$$A_s = \frac{w_{0,05}}{2d}$$

Absolutně symetrický pík	$A_s = 1,0$
Pík rozmytý vzadu	$A_s > 1,0$
Pík rozmytý vpředu	$A_s < 1,0$
Akceptovatelné hodnoty	$A_s = 0,8 - 1,5^1$

## 2.5. Kvantitativní chromatografie

Kvantitativní analýza operuje s hodnotou plochy popř. výšky píku, které jsou přímo úměrné koncentraci stanovované látky. Využívají se nejčastěji dva postupy kvantitativního stanovení, tj. metodou vnějšího či vnitřního standardu.

**Metoda vnějšího standardu** porovnává odezvu píku zkoušeného látky s odpovídající odezvou píku standardu.

**Metoda vnitřního standardu** je složitější v tom, že je potřeba vybrat vhodnou látku pro vnitřní standard. Tato musí vycházet z kolony samostatně, musí být stálá za podmínek stanovení, nesmí reagovat se stanovovanou látkou a měla by být strukturně podobná stanovované látce. Vhodně zvolený vnitřní standard se pak přidá ve stejném množství ke vzorku i standardu zkoušené látky. Při použití této metody se porovnávají plochy píků: vnitřního standardu se standardem zkoušené látky a vnitřního standardu se zkoušenou látkou<sup>3</sup>.

Méně často se využívají pro kvantifikaci látek normalizační metoda a metoda standardního přídatku.



## 2.6. Farmakologické informace – Námelové alkaloidy

Námelové alkaloidy jsou skupinou strukturně blízkých látek odvozených od kyseliny lysergové, které je možné podle chemické struktury rozdělit do několika podskupin: ergotaminové, ergometrinové a ergotoxinové alkaloidy a jejich deriváty a další. Nachází se v námelu, což jsou černá zrna žita napadená cizopasnou houbou Paličkovicií nachovou (lat. *Claviceps purpurea*). Tato skupina látek má komplexní účinky na lidské tkáně:

- Stimulace  $\alpha_1$ -adrenergických receptorů – zvýšení kontrakce a tonu gravidní dělohy, kontrakce hladké svaloviny cév (zvýšení krevního tlaku, zmírnění migrény), střeva (zvýšení motility), bronchů a dalších vegetativně inervovaných tkání: *ergotamin*, *dihydroergotamin*, *ergometrin*, *methylergometrin*.
- Stimulace 5-HT<sub>1D</sub> serotoninergních receptorů – působení na myometrium: *ergotamin*, *ergometrin*, *methylergometrin*.
- Účinek na dopaminergní receptory v hypofýze – inhibice sekrece prolaktinu, spontánní i vyvolanou thyreotropin uvolňujícím hormonem hypotalamu: *bromocriptin*, *lisurid*, *tergurid*, *cabergolin*.
- Psychotropní účinky: *diethylamid kyseliny lysergové (LSD)*<sup>19</sup>.

### 2.6.1. Ergotamin, dihydroergotamin

Tyto dvě látky náleží mezi specifická antimigrenika, díky účinku na serotoninové a  $\alpha$ -adrenergní receptory, čímž způsobí konstrikcí dilatovaných kapacitních cév. Vliv právě na tyto receptory je však také zodpovědný za četné nežádoucí účinky (křeče hladkého svalstva, bolesti břicha, zvracení, vasokonstrikce periferních cév – nedokrvení končetin). Ergotamin se zavádí ve formě čípků. Pro svůj dlouhodobý efekt na hladkou svalovinu je kontraindikován v uterotonických indikacích. Spolu s ergotoxinovými alkaloidy vykazuje i  $\alpha$  sympatolytický účinek, který ale není natolik silný, aby překonal vasokonstrikční působení. Dihydroergotamin má nižší výskyt nežádoucích účinků a užívá se perorálně či subkutánně v mg dávkách<sup>20</sup>.

### 2.6.2. Bromocriptin, lisurid, tergurid, cabergolin

Jedná se o polysyntetické deriváty námelových alkaloidů s významnými inhibičními účinky na hypofýzu, zejména na vylučování prolaktinu. Každá z těchto látek se liší mechanismem účinku, ale ovlivnění hypofýzy je srovnatelné.

**Bromocriptin** se využívá k prevenci a potlačení laktace, léčbě galaktorey, terapii prolaktinomů (nádory hypofýzy se zvýšeným vylučováním prolaktinu), při parkinsonismu a akromegálií, v odvykacích kúrách u závislosti na kokainu (úprava hypersenzitivity inhibičních receptorů na dopaminergních neuronech). Mezi jeho nežádoucí účinky patří nausea, zvracení, zácpa a posturální hypotenze.

**Lisurid** je užíván perorálně při léčbě hyperprolaktinémie, prolaktinomu, akromegalie a poruch menstruačního cyklu. Na počátku terapie a při vyšších dávkách má kromě nežádoucích účinků zmíněných u bromocriptinu také další jako bolesti hlavy, ospalost, zmatenost a dyskinezi.

**Tergurid** má příznivější možnosti využití než výše zmíněné látky v oblasti léčby endokrinních a gynekologických indikací s nadměrnou produkcí prolaktinu a méně nežádoucích účinků. Příznivě působí na Parkinsonovu chorobu a extrapyramidové projevy po klasických neuroleptících.

**Cabergolin** se vyznačuje delším působením, méně vyjádřenými nežádoucími účinky a použitím ve stejných indikacích<sup>20</sup>.

### 2.6.3. *Ergometrin, methylegometrin*

Využívají se v uterotonických indikacích. V České republice je registrován pouze methylegometrin, v zahraničí se setkáváme i s ergometrinem. Tyto látky působí na gravidní dělohu zejména při její hypotonii tím, že zvyšují její kontrakce a tonus působením na  $\alpha_1$ -adrenergní a 5-HT<sub>1D</sub> serotoninergní receptory myometria. Z mechanismu účinku se dá usuzovat i na nežádoucí účinky, kterými jsou bolesti břicha, zvracení, tinitus, vzestup krevního tlaku, spasmus koronárních cév a další. Aplikace látek je pouze injekční a to intramuskulární či intravenózní (0,1 – 0,2 mg) k zesílení kontrakcí dělohy ve 3. porodní době, k prevenci anebo léčbě poporodního krvácení z atonie uteru, při nedostatečné involuci dělohy a v případě silných meno- a metroragií<sup>20</sup>.

## 2.7. Analýza námelových alkaloidů v odborné literatuře

Námelové alkaloidy – EA (z angl. *Ergot alkaloids*) jsou široce studovanou skupinou látek, nejen díky jejich farmakologickým a toxikologickým účinkům, ale také pro jejich komplexní strukturu a množství chemických modifikací základní molekuly. Hledají se stále dokonalejší metody separace jednotlivých látek ve směsi získané extrakcí z námele s použitím nejmodernějších chromatografických systémů.

Článků, které se zabývají optimalizací separačních metod pro dělení EA je celá řada. Některé z nich jsou shrnuty v Review M. Fliegera *et al.* z roku 1997: **Ergot alkaloids-sources, structures and analytical methods**<sup>21</sup>, které se zaměřuje právě na publikace o vysokoúčinné kapalinové chromatografii použité pro stanovení EA. V tabulce přehledně shrnuji ty vybrané práce (uvedené v Review 1997), na které jsme se zaměřili při výběru počátečních chromatografických podmínek (Tab. 4).

Tab. 4: HPLC – námelové alkaloidy<sup>21</sup>.

Stacionární fáze - kolona (délka × I. D. mm)	Mobilní fáze	Průtok [ml/min]	Detekce λ [nm]	Odkazy (cit. v Review 1997 <sup>21</sup> )
Sil X (500 × 2,5)	ACN – diisopropyl ether 40 : 60	1,0	UV 254	Wittwer a Kluckholm 1973
μBondapak C18 (300 × 4)	ACN – 10mmol/l (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> ve vodě 1 : 2, izokraticky	8,0	UV 280	Bethke <i>et al.</i> 1976 Ergotamin, LA, isomery
Nukleosil C18 (300 × 4,6) Nukleosil C18 (150 × 3)	ANC – 1 mmol/l (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> ve vodě. Grad.: 8 – 60% ACN(6kroků/4min)	8,0 1,5	UV 320 UV 254	Erni <i>et al.</i> 1976 Ergotamin, LA, isomery
Lichrosorb RP – 18 Lichrosorb RP – 8 Lichrosorb RP – 2 Spherisorb ODS; (125 × 4,2)	ACN - (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> ve vodě (32 – 42%), izokraticky	1,3 – 1,7	UV 254	Dolar 1977 Cyklické EA
MicroPak MCH 10 (250 × 2)	ACN – 0,1 mol/l (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> ve vodě 1 : 1, izokraticky	1,0	UV 254 Fluoresc. 330 ex. 420 em.	Abbott s Berg 1977 LSD
μBondapak C18 (300 × 4)	ACN – CH <sub>3</sub> COOH – H <sub>2</sub> O 20 : 1 : 79, izokraticky	1,0	UV	Sondack 1978 Ergonovin, LA, isomery
Lichrosorb RP – 8 (250 × 4,6)	ACN - (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> ve vodě (200 mg/l) 43 : 57, izokraticky	1,0 – 2,0	Fluoresc. 235 ex. 370 em. UV 254	Scott a Lawrence 1980 Deriváty LA, cyklické EA
ODS – Hypersil (250 × 4,6)	ACN – 10 mmol/l (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> , 1 : 1 ACN – 50 mmol/l heptansulfonát sodný s 10 ml kys. Octové, 1 : 1, izokraticky	1,5	Fluoresc. 328 ex. 389 em.	Edlung 1981 Cyklické EA

Stacionární fáze - kolona (délka × I. D. mm)	Mobilní fáze	Průtok [ml/min]	Detekce λ [nm]	Odkazy (cit. v Review 1997 <sup>21</sup> )
Lichrosorb RP-8 (250 × 4,6)	ACN - (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> ve vodě nebo 0,1 mol/l KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> – 0,1 mol/l NaOH 50 : 44, izokraticky	1,1 – 1,5	Fluoresc. 235 ex. 370 em.	Scott a Lawrence 1982 Cyklické EA
Spheri 5RP-8	Gradient: ACN z 28-29% na 43% v roztoku 200mg/l (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> nebo 0,1 mol/l KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> – 0,1 mol/l NaOH 50 : 44 Z 32% na 45% ACN v 25 mmol/l KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> – 0,1 mol/l NaOH	1,1 – 1,5	Fluoresc. 235 ex. 370 em.	Scott a Lawrence 1982 Cyklické EA
Lichrosorb RP-18 (250 × 4,6)	ACN – 20 mmol/l fosfátový pufr (pH = 7,0)	1,0	UV 280 310	Magg a Ballschmiter 1985, retenční index cyklických EA
Nukleosil 5 C18 (300 × 3,9)	1 : 1, izokraticky			
ODS Hypersil (100 × 5) Silica (50 × 4,5)	MetOH – fosfátový pufr (pH = 8,1) 6 : 4, izokraticky	2,0	UV 220 Fluoresc. 312 ex. 400 em.	Gill a Key 1985 LSD, cyklické EA, dihydro cyklické EA
μBondapak C18 (300 × 3,9)	MetOH – fosfátový pufr (pH = 3) 2 : 1	1,5	UV 254, 280, 313	Ruiter <i>et al.</i> 1987 LSD, diethyllysergamid, methylpropylamid
Aquapore RP-300 (30 × 2,1)	10 mmol/l (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> ve vodě (A) – ACN (B) (pH = 8,5)	1,8	Fluoresc. 296 ex. 355 em.	Humbert <i>et al.</i> 1987 Dihydroergotamin, dihydroergocornin, 8-hydroxydihydro- ergotamin
Perkin Elmer LC kolona HS 3 C18 (83 × 4,6)	Grad.: 100% A, z 0 na 22% B (1,5 min); z 22% na 34% B (3 min kolona I Ze 34% na 40% B (9,4 min) kolona II			
Zorbax ODS (250 × 4,6)	ACN – 0,1 mol/l pufr octanu amonného (pH = 7,6) 35 : 65	0,8	Fluoresc. 310 ex. 360 em.	Yates a Powell 1988 Cyklické EA, isomery
Zorbax C8 (25 × 4,6)	Grad.: z 35% na 50% ACN (30 min); z 50% na 100% ACN (10min); ze 100% na 35% ACN (35 min); konec 100 min			
Zorbax ODS – hlavní kolona Adsorbosil (250 × 4,6) předkolona				
Octasilica BST Si 100 S 5 C8 (150 × 4)	ACN – 5.10 <sup>-3</sup> mol/l vodný tetrabutylammonium hydroxid	0,8	UV 280	Papp 1990 Dihydro - cyklické EA
Lichrosorb Si-100 (30 × 4) předkolona	45-55 : 55-45, izokraticky			
Perkin Elmer cartridge C18 (83 mm)	ACN - (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> ve vodě 33% : 200 mg/l, izokraticky	1,0	Fluoresc. 250 ex. 420 em.	Rottinghaus <i>et al.</i> 1991 ergotamin, ergovalin

ACN acetonitril.

LA lysergová kyselina (z angl. *Lysergic acid*).

LSD

ODS

diethylamid kyseliny lysergové

SiO<sub>2</sub>-C<sub>18</sub> (z angl. *Octadecyl Silane*).

Ve článku: **Simultaneous determination of six major ergot alkaloids and their epimers in cereals and foodstuffs by LC-MS-MS<sup>22</sup>** je využívána kapalinová chromatografie s tandemovou hmotnostní spektrometrií ke kvantifikaci šesti námelových alkaloidů a jejich epimerů, mezi nimi také ergometrinu a ergometrininu. Článek jsme prostudovali a napomohl nám ve výběru vhodné mobilní fáze a porovnání opublikovaných výsledků s našimi předpoklady. V práci bylo použito bazické pH.

Podmínky stanovení:

- *Chromatografický systém:* Waters Alliance 2695 HPLC, Micromass Quattro Ultima a Quattro Ultima Platinum tandem quadrupole instrument [ESI (+)-MS-MS];
- *Kolona:* Phenomenex Gemini C<sub>18</sub>, 2 mm × 150 mm, zahrnující předkolonu 4 mm × 2 mm Gemini C<sub>18</sub>;
- *Náplň:* částice velikosti 5 μm;
- *Detekce:* MS–MS provedení s pozitivní elektrosprejovou ionizací za použití selektivního záznamu jedné nebo více iontových reakcí (Selected Reaction Monitoring, SRM): prvním analyzátozem je vybrán ion prekursoru, který je potom v kolizní cele podroben fragmentaci a sleduje se pouze vybraný charakteristický fragmentový ion. Dusík byl při stanovení použit jako nebulizér i kolizní plyn;
- *Průtoková rychlost:* 0,5 ml/min;
- *Teplota v kolonovém prostoru:* 30 °C;
- *Teplota v autosampleru:* 15 °C;
- *Nástřik:* 10 μl;
- *Mobilní fáze:* C – 3,03 mmol/l (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, pH = 8,9;  
D – ACN.

- *Gradient:*

Čas (min)	Mobilní fáze C % (V/V)	Mobilní fáze D % (V/V)
0 – 1	5 → 17	95 → 83
1 – 3	17 → 47	83 → 53
3 – 10	47 → 54	53 → 46
10 – 15	54 → 80	46 → 20

**Quantitative determination of five ergot alkaloids in rye flour by liquid chromatography-electrospray ionisation tandem mass spectrometry<sup>23</sup>** je publikací popisující využití systému LC-ESI/MS/MS, neboli kapalinové chromatografie s tandemovou hmotnostní spektrometrií a elektrosprejovou ionizací. Jednou ze stanovovaných látek byl ergometrin. V této publikaci bylo použito kyselé pH při stanovení námelových alkaloidů. Námi vypracovávaná optimalizace mobilní fáze zahrnovala změny nejen organického rozpouštědla, ale také pH anorganického pufru. Tato práce dokumentuje, že je možné separovat námelové alkaloidy i při nízkých hodnotách pH.

Podmínky stanovení:

- *Chromatografický systém:* Perkin-Elmer 200 Micro Pump series system s Applied Biosystem MDS/SCIEX;
- *Kolona:* X-Terra C<sub>18</sub>, 2,1 mm × 100 mm;
- *Náplň:* částice velikosti 3,5 μm;
- *Detekce:* MS–MS provedení s pozitivní elektrosprejovou ionizací za použití selektivního záznamu jedné nebo více iontových reakcí (Selected Reaction Monitoring, SRM). Dusík byl při stanovení použit jako nebulizér i kolizní plyn;
- *Průtoková rychlost:* 300 μl/min;
- *Nástřik:* 10 μl;

- *Mobilní fáze:* A – voda s 5mM heptafluorobutanové kyseliny (HFBA), pH = 2,0;  
B – ACN s 0,1 % octové kyseliny.
- *Gradient:*

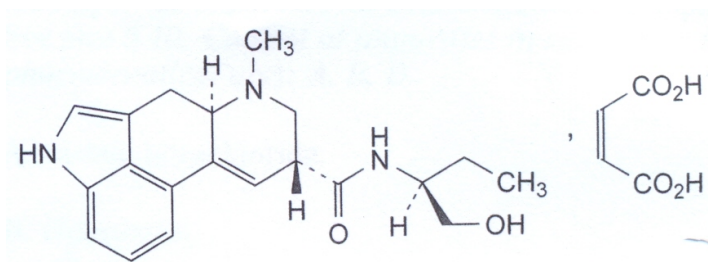
Čas (min)	Mobilní fáze A % (V/V)	Mobilní fáze B % (V/V)
0 – 2	100 → 90	0 → 10
2 – 12	90 → 35	10 → 65
12 – 13	35	65
13 – 14	35 → 0	65 → 100
14 – 19	0	100

## 2.8. Analýza methylergometrinu v odborné literatuře

### 2.8.1. Článek: Methylergometrini maleas (Český lékopis 2009)<sup>1</sup>

Strukturní vzorec:

6.0:1788



**Název:** (6aR,9R)-N-[(1S)-1-(hydroxymethyl)propyl]-7-methyl-4,6,6a,7,8,9-hexahydroindolo[4,3-fg]chinolin-9-karboxamid-(Z)-but-2-endioát.

#### Vlastnosti

*Vzhled:* Bílý nebo téměř bílý, hygroskopický, krystalický prášek.

*Rozpustnost:* Dobře rozpustný ve vodě, těžce rozpustný v ethanolu bezvodém.

#### Zkoušky na čistotu

**Příbuzné látky:** Kapalinová chromatografie (ČL Kap. 2.2.29), metoda normalizace. *Zkouška se provádí za chránění před světlem.*

*Zkoušený roztok.* 25,0 mg se rozpustí v 15ml mobilní fáze B a zředí se vodou R na 50,0 ml.

*Porovnávací roztok (a).* 1,0 ml zkoušeného roztoku se zředí vodou R na 100,0 ml. 1,0 ml tohoto roztoku se zředí vodou R na 20,0ml.

*Porovnávací roztok (b).* Obsah lahvičky methylergometrinu pro test způsobilosti CRL (obsahuje nečistoty A, B, C, D, E, F, G, H a I) se rozpustí v 1,0 ml směsi objemových dílů mobilní fáze B a vody R (30+70).

*Kolona:*

-*rozměry:* délka 0,10 m, vnitřní průměr 4,6 mm;

-*stacionární fáze:* silikagel pro chromatografii oktadecylsilylovaný s odstíněnými silanolovými skupinami R (3,5μm).

*Mobilní fáze:*

– *mobilní fáze A:* roztok amonium-karbamátu R (2 g/l);

– *mobilní fáze B:* směs objemových dílů acetonitrilu R a vody R (50 + 50).

*Gradient:*

Čas (min)	Mobilní fáze A % (V/V)	Mobilní fáze B % (V/V)
0 – 5	85 → 65	15 → 35
5 – 10	65	35
10 – 15	65 → 20	35 → 80
15 – 20	20	80

*Průtoková rychlost:* 2,0 ml/min.

*Detekce:* Spektrofotometrický detektor, 310 nm.

*Nástřik:* 20 μl.

*Identifikace nečistot.* K identifikaci piků nečistot A, B, C, D, E, F, G, H a I se použije chromatogram dodávaný s methylergometrinem pro test způsobilosti CRL a chromatogram porovnávacího roztoku (b).

Relativní retence vztažená k methylergometrinu (retenční čas je asi 11 min):

- nečistota A: asi 0,2;
- nečistota B: asi 0,5;
- nečistota C: asi 0,6;
- nečistota D: asi 0,7;
- nečistota I: asi 1,10;
- nečistota E: asi 1,14;
- nečistota F: asi 1,2;
- nečistota G: asi 1,3;
- nečistota H: asi 1,4.

Test způsobilosti, porovnávací roztok (b):

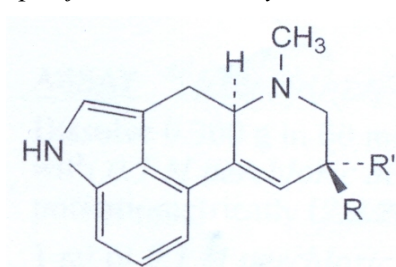
- rozlišení: nejméně 3,0 mezi píkem methylergometrinu a píkem nečistoty I, nejméně 1,5 mezi píkem nečistoty I a píkem nečistoty E.

Limity:

- nečistoty A, B, C, D, E a G: pro každou nečistotu nejvýše 0,5 %;
- součet obsahů nečistot F, H a I: nejvýše 1,0 %;
- nespecifikované nečistoty: pro každou nečistotu nejvýše 0,10 %;
- celkový obsah nečistot: nejvýše 2,0 %;
- limit zanedbatelnosti: plocha píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (a) (0,05 %).

## Nečistoty

Specifikované nečistoty: A, B, C, D, E, F, G, H a I.



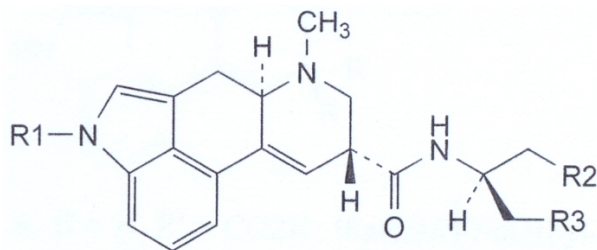
A. R = H, R' = CO<sub>2</sub>H: (6aR,9R)-7-methyl-4,6,6a,7,8,9-hexahydroindolo[4,3-fg]chinolin-9-karboxylová kyselina,

B. R = CO<sub>2</sub>H, R' = H: (6aR,9S)-7-methyl-4,6,6a,7,8,9-hexahydroindolo[4,3-fg]chinolin-9-karboxylová kyselina,

C. R = H, R' = CONH<sub>2</sub>: (6aR,9R)-7-methyl-4,6,6a,7,8,9-hexahydroindolo[4,3-fg]chinolin-9-karboxamid,

E. R = CONH<sub>2</sub>, R' = H: (6aR,9S)-7-methyl-4,6,6a,7,8,9-hexahydroindolo[4,3-fg]chinolin-9-karboxamid,

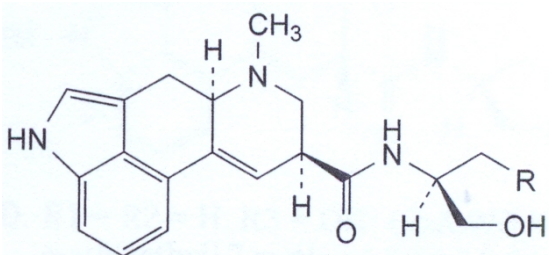




D. R1 = R2 = H, R3 = OH: (6aR,9R)-N-[(1S)-2-hydroxy-1-methylethyl]-7-methyl-4,6,6a,7,8,9-hexahydroindolo[4,3-fg]chinolin-9-karboxamid (ergometrin),

G. R1 = R2 = CH<sub>3</sub>, R3 = OH: (6aR,9R)-N-[(1S)-1-(hydroxymethyl)propyl]-4,7-dimethyl-4,6,6a,7,8,9-hexahydroindolo[4,3-fg]chinolin-9-karboxamid (methylsergid),

I. R1 = H, R2 = OH, R3 = CH<sub>3</sub>: (6aR,9R)-N-[(1R)-1-(hydroxymethyl)propyl]-7-methyl-4,6,6a,7,8,9-hexahydroindolo[4,3-fg]chinolin-9-karboxamid (1'-epi-methylergometrin),

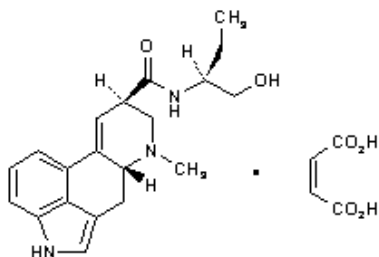


F. R = H: (6aR,9S)-N-[(1S)-2-hydroxy-1-methylethyl]-7-methyl-4,6,6a,7,8,9-hexahydroindolo[4,3-fg]chinolin-9-karboxamid (ergometrinin),

H. R = CH<sub>3</sub>: (6aR,9S)-N-[(1S)-1-(hydroxymethyl)propyl]-7-methyl-4,6,6a,7,8,9-hexahydroindolo[4,3-fg]chinolin-9-karboxamid (methylergometrinin).

### 2.8.2. Článek: *Methylergonovine Maleate (USP 32, str. 2946 – 2947)*<sup>24</sup>

Na rozdíl od stanovení příbuzných látek v Českém lékopise 2009 za využití kapalinové chromatografie, Americký lékopis využívá tenkovrstvou chromatografii.



$C_{20}H_{25}N_3O_2 \cdot C_4H_4O_4$  455,50

Ergolin-8-karboxamid, 9,10-didehydro-N-[1-(hydroxymethyl)propyl]-6-methyl-, [8 $\beta$ (S)-], (Z)-butendioát (1 : 1) (sůl).

9,10-didehydro-N-[(S)-1-(hydroxymethyl)propyl]-6-methylergolin-[8 $\beta$ ]karboxamid maleát (1 : 1) (sůl) [7054-07-1].

» Methylergonovin maleát obsahuje nejméně 97,0 % a nejvýše 103,0 %

$C_{20}H_{25}N_3O_2 \cdot C_4H_4O_4$ , počítáno na vysušenou látku.

**USP referenční standardy** <11> - USP Methylergonovine Maleate RS.

**Příbuzné alkaloidy:** Hodnocení provedeno v souladu se stanovením *Příbuzných látek* ve článku *Ergonovine Maleate*, s použitím methylergonovin maleátu místo ergonovin maleátu.

**Stanovení příbuzných alkaloidů (postup ze Článku: Ergonovine Maleate):**

*Zkouška se provádí co nejrychleji, za chránění před světlem. Zkoušený roztok a porovnávací roztoky (Standardní roztoky) se připravují těsně před použitím!*

**Adsorbent:** 0,25 mm – vrstva chromatografického silikagelu;

**Rozpouštědlo:** směs – ethanol : hydroxid amonný (9 : 1);

**Zásobní roztok standardu:** 10 mg/ml USP Methylergonovine Maleate RS v rozpouštědle;

**Standardní roztok A:** 0,20 mg/ml Zásobního roztoku v rozpouštědle;

**Standardní roztok B:** 0,10 mg/ml Zásobního roztoku v rozpouštědle;

**Standardní roztok C:** 0,05 mg/ml Zásobního roztoku v rozpouštědle;

**Zkoušený roztok:** 10 mg/ml methylergonovin maleátu v rozpouštědle;

**Reakční postřík:** 10 mg/ml dimethylaminobenzaldehydu v chlazené směsi ethanolu a kyseliny chlorovodíkové (1 : 1);

**Aplikovaný objem:** 5  $\mu$ l;

**Vyvíjecí systém:** chloroform : methanol : voda (75 : 25 : 3), 30 minut je systém ekvilibrován;

**Provedení analýzy:**

**Vzorky:** Zásobní roztok standardu, Standardní roztoky A, B, C a Zkoušený roztok.

*Chromatografický systém* (USP Kap. *Chromatografie* <621>). Na vrstvu se nanese odděleně po 5  $\mu$ l každého roztoku a ihned se vyvíjí vyvíjecím systémem po dráze přesahující 14 cm. Vrstva se vysuší, postříká se dimethylaminobenzaldehydem a 2 min se suší v proudu dusíku: hodnota  $R_F$  hlavní skvrny na chromatogramu Zkoušeného roztoku odpovídá hlavní skvrně v chromatogramu Zásobního roztoku standardu. Odhadnout koncentrace ostatních skvrn na chromatogramu Zkoušeného roztoku lze porovnáním s chromatogramy jednotlivých Standardních roztoků (A, B, C).

**Akceptovaná rozmezí - Individuální nečistoty:** Skvrny Standardních roztoků A, B, C jsou ekvivalentní 2,0%, 1,0% a 0,5% velikosti příslušné skvrny nečistot v chromatogramu Zkoušeného roztoku.

### 2.8.3. Odborné články zaměřené na methylergometrin

Laboratoř analytické chemie Farmaceutické fakulty Univerzity ve Francouzském Rennes se zabývala, ve článku: **Stability of oral liquid preparations of methylergometrine**<sup>25</sup>, stabilitním stanovením této látky po 47 dnech v různých teplotních podmínkách (5 °C a 21 °C) za ochrany před světlem.

Vzorky byly během časové periody pravidelně vizuálně kontrolovány (na změnu zbarvení, srážení či krystalizaci) a byla jim měřena hodnota pH. Ke konci období byla koncentrace methylergometrinu ve vzorcích 96%, zbylé 4 % odpovídaly koncentraci vznikajících degradačních produktů.

K analýze methylergometrinu po této časové periodě využili HPLC metodu s DAD - detektorem. Stanovovaný vzorek byl podroben degradaci působením suchého tepla (50 °C). Píky všech degradačních produktů byly odděleny od píku hlavní látky, a co je podstatné, vycházely ze systému v různých retenčních časech.

Tato studie dokázala, že orální léčivé přípravky s methylergometrinem předem připravené ve formě roztoků (0,05 mg/ml) – Methergin® mohou být uchovávány po dobu delší než jeden měsíc při pokojové teplotě, chráněny před světlem<sup>25</sup>.

#### Podmínky chromatografického stanovení:

- *Stanovovaný vzorek:* 5 ml, získaný rozpuštěním orálního roztoku Metherginu® (0,25 mg/ml) v glycerolo-alkoholickém základu.
- *Standard:* zásobní roztok – 20mg methylergometrinu maleátu ve 20 ml ethanolu, vnější standard – připravený ze zásobního roztoku smísením s ethanolom na koncentraci 0,04 – 0,06 mg/ml.
- *HPLC metoda:* použita z USP Pharmacopoeia (U.S. Pharmacopoeia, USP 28-NF 23, 2000) s malými modifikacemi.
- *HPLC systém:* autoinjektor, pumpa 325, ultrazvukový filtr 0,45 µm, heliový degasser, kolona – Hypersil 250 × 3,9; detektor – fotodiodového pole (DAD Kontrol 550), software – Kroma 2000.
- *Podmínky:* stacionární fáze – reverzní, oktadecylsilanizovaná-C<sub>18</sub>, 5 µm, mobilní fáze – 0,015 mol/l KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (pH = 4,6) a ACN, 80 : 20 (V/V), průtok – 1 ml/min.

Ve článku vypracovaném vědeckými pracovníky Univerzitní nemocnice Sind Radboud, Nijmegen v Nizozemsku pro Světovou zdravotnickou organizaci (WHO – z angl. *World Health Organization*) v roce 1994: **Stability of oral oxytocics in tropical climates - Results of simulation studies on oral ergometrine, oral methylergometrine, buccal oxytocin and buccal desamino-oxytocin**<sup>26</sup> jsou monitorovány podmínky zacházení s těmito léčivými v tropických podmínkách. Vzorky byly vystaveny teplotám 6 – 40 °C, vlhkosti 25 – 83 % a uskladněny v temnu nebo na denním světle – D, L (z angl. *Dark, Light*). Tropické klima bylo simulováno na 7 připravených kombinacích podmínek – D, L, při určité teplotě/vlhkosti:

- D 6/83, D 20/75, D 30/45, D 30/75, D 40/25, D 40/75, L 20/30.

#### V publikaci byl kromě jiných vzorků zkoumán:

- Methylergometrine maleate 0,125 mg obalené tablety; 95mg volné base.

### Podmínky chromatografického stanovení ergometrinu a methylergometrinu:

- *Chromatografický systém:* SP8800 HPLC pumpa, Spectra Physics UV detektor 757 andan SP 4290 integrátor.
- *Referenční vzorky:* Čerstvě připravované před každým setem stanovení, vzorky s rostoucí koncentrací.
- *Kolona:* Spherisorb 5 ODS (250 × 4.6 mm) chrompack.
- *Mobilní fáze:* A – ACN  
B – 0,067 mol/l KH<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> : 0.05% diethylamin  
A = 60%; B = 40%; (1:1).
- *Detekce:* UV – 240 nm.
- *Průtoková rychlost:* 1,2 ml/min.
- *Nástřik:* 100 µl.
- *Retenční čas:* 6,8 min.

Výsledky prokázaly, že methylergometrin v tabletách uchovávaný za nevhodných podmínek je velmi nestabilní, účinná látka podléhá rychlému rozkladu (racemizaci) a není proto bezpečné léčivo uchovávané za tropických podmínek používat. K poklesu obsahu účinné látky ve vzorku docházelo během celého procesu vystavování různým podmínkám. Po 21 týdnech za podmínek D 6/83 (nízká teplota, vysoká vlhkost) došlo k poklesu obsahu pod 90 %. Po 21 týdnech vystavení D 40/75 (vysoká teplota i vlhkost) zbylo v přípravku pouze 63,2 % účinné substance a pouze 50 % pokud byla látka vystavena působení denního světla (L 20/30) po dobu 52 týdnů.

## 2.9. Závěr po prostudování odborné literatury

Po pečlivém prostudování, publikací týkajících se separace námelových alkaloidů (viz kapitola 2.7) a methylergometrinu (viz kapitola 2.8.3), poznatků o zirkoniových stacionárních fázích (viz kapitola 2.2.4) a lékopisných podmínek stanovení *Příbuzných látek* ve článku Methylergometrini maleas (viz kapitola 2.8.1), jsme se rozhodli zvolit počáteční mobilní fázi o složení: 20 mmol/l  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ , pH = 7,9 a acetonitril 50% za lékopisného gradientu<sup>1</sup>.

### 3. Cíl diplomové práce

Chromatografická stanovení námelových alkaloidů jsou důležitou součástí jejich studia. V diplomové práci jsem se zaměřila na syntetický námelový alkaloid methylergometrin, používaný v porodnictví jako uterotonikum. Ke stanovení nečistot v Evropském lékopisu je použita metoda HPLC s využitím silikagelové oktadecylsilanizované kolony.

Cílem diplomové práce je studium separace methylergometrinu a jeho nečistot na alternativních zirkoniových reverzních stacionárních fázích.

Má práce se zaměřuje na:

- výběr vhodné stacionární fáze pro separaci methylergometrinu a jeho příbuzných látek;
- vliv experimentálních podmínek na separaci jednotlivých epimerů (typ organické složky, vliv pH a druhu pufru, vliv teploty);
- optimalizaci chromatografických podmínek HPLC.

## 4. Experimentální část

### 4.1. Chromatografický systém a kolony, pomůcky, chemikálie

#### Chromatografický systém:

Kapalinový chromatograf Shimadzu Europa GmbH, Duisburg, Německo.

- Odplyňovač, typ DGU 20 A<sub>3</sub>.
- Pumpa, typ LC 20 AD – A.
- Pumpa, typ LC 20 AD – B.
- Autosampler, typ SIL-20AC.
- Řídící jednotka, typ CBM-20A.
- Detektor, typ SPD-M20A.
- Kolonový prostor, typ CTO-20AC.
- Software – LC Solution Version 1.22 SP1.

#### Kolony:

- Symmetry<sup>®</sup> - C<sub>18</sub>, 150 × 4,6 mm: Waters, Česká republika.
- ZirChrom<sup>®</sup> - PBD, 150 × 4,6 mm: ZirChrom Separations, Inc., Anoka, MN, USA.
- ZirChrom<sup>®</sup> - PS, 150 × 4,6 mm: ZirChrom Separations, Inc., Anoka, MN, USA.
- ZirChrom<sup>®</sup> - CARB, 150 × 4,6 mm: ZirChrom Separations, Inc., Anoka, MN, USA.
- ZirChrom<sup>®</sup> - MS, 150 × 4,6 mm: ZirChrom Separations, Inc., Anoka, MN, USA.
- Diamondbond<sup>™</sup>, 150 × 4,6 mm: ZirChrom Separations, Inc., Anoka, MN, USA.

#### Přístroje:

- Analytické váhy, Sartorius, ČR.
- Acidimetr 333, Druopta Praha, ČR.
- Ultrazvuková lázeň K10, Krainek, Slovensko.
- Vakuové filtrační zařízení, Agilent, HPST Praha, ČR.

#### Pomůcky:

- Laboratorní sklo.
- Mikropipeta.
- Vialky z tmavého skla.

#### Chemikálie:

- (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, Lachner, Česká republika.
- (NH<sub>4</sub>)H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, Lachner, Česká republika.
- Tetramethylamonium chlorid, Sigma-Aldrich, Německo.
- Tetrabutylamonium bromid, Sigma-Aldrich, Německo.
- Methanol (MetOH), Merck, Česká republika.
- Acetonitril (ACN), Merck, Česká republika.
- Tetrahydrofuran (THF), Merck, Česká republika.
- Deionizovaná voda, čištěná Milli-Q systémem, Millipore, Bedford, MA, USA.
- 10% roztok NH<sub>3</sub>.
- 8,5% roztok H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>.

### Standardy námellových alkaloidů a jejich derivátů:

V rámci diplomové práce byly použity látky uvedené v Tab. 5, které poskytla TEVA Czech Industries s.r.o.

Většina z těchto standardů odpovídá nečistotám uvedeným ve článku Methylergometrini maleas v Českém lékopise (ČL 2009)<sup>1</sup>, kromě (-)methylergometriniu, který není uveden v lékopise, ale standard byl poskytnut. Veškeré údaje týkající se standardů jsou shrnuty v Tab. 5. Vlastnosti byly získány z chemické databáze<sup>27</sup>.

**Tab. 5:** Standardy námellových alkaloidů a jejich vlastnosti.

<b>Standard</b>	<b>Zkratka</b>	<b>pKa (basic)</b>	<b>pKa (acidic)</b>	<b>Log P</b>	<b>H akc.</b>	<b>H don.</b>
Lysergová kys.	LA	9,18 ± 0,20	3,09 ± 0,20	2,134 ± 0,500	4	2
Isolysergová kys.	isoLA	9,18 ± 0,20	3,09 ± 0,20	2,134 ± 0,500	4	2
Ergometrin	ERM	7,69 ± 0,40	14,46 ± 0,10	1,114 ± 0,573	5	3
Ergometrinin	ERMin	7,69 ± 0,40	14,46 ± 0,10	1,114 ± 0,573	5	3
Methylergometrin	MeERM	7,69 ± 0,40	14,46 ± 0,10	1,675 ± 0,573	5	3
Methylergometrinin	MeERMin	7,69 ± 0,40	14,46 ± 0,10	1,675 ± 0,573	5	3
(-)methylergometrin	(-)MeERM	7,69 ± 0,40	14,46 ± 0,10	1,675 ± 0,573	5	3
(-)methylergometrinin	(-)MeERMin	7,69 ± 0,40	14,46 ± 0,10	1,675 ± 0,573	5	3
Ergin	ERGIN	7,68 ± 0,40	15,87 ± 0,20	1,185 ± 0,518	4	3
Erginin	ERGININ	7,68 ± 0,40	15,87 ± 0,20	1,185 ± 0,518	4	3
Methylsergid	MSE	7,48 ± 0,40	14,46 ± 0,10	2,073 ± 0,584	5	2



## 4.2. Příprava vzorků

Standardy byly uchovávány v lednici, chráněny před světlem a vyššími teplotami. Každé látky bylo naváženo přibližně 0,500 mg a rozpuštěno ve 2 ml 15% acetonitrilu (ACN) ve vialce z tmavého skla, tyto zásobní roztoky byly uchovány v lednici (konkrétní navážky a koncentrace viz Tab. 6).

Z každého zásobního roztoku bylo odebráno 20  $\mu$ l do 10ml odměrné baňky a zředěno 15% ACN, tímto rozpouštědlem se doplnila baňka po rysku (výsledná koncentrace se tedy pohybovala okolo 0,0005 mg/ml = 500 ng/ml).

V Tab. 6 jsou uvedeny i referenční retenční časy standardů naměřené na silikagelové reverzní stacionární fázi dle Evropského lékopisu 5.0<sup>28</sup>.

**Tab. 6:** Navážky a koncentrace standardů, referenční retenční časy.

Standard (zkr.)	Č. vialky	m [mg]	c [mg/ml]	Refer. t <sub>R</sub> [min]
LA	31	0,479	0,240	3,33
isoLA	32	0,551	0,276	4,46
ERGIN	33	0,554	0,263	7,75
ERM	34	0,525	0,277	9,53
MeERM	35	0,518	0,259	12,95
(-)MeERM	36	0,511	0,256	13,42
ERGININ	37	0,494	0,247	13,77
ERMin	38	0,492	0,246	14,51
MSE	39	0,536	0,268	15,38
(-)MeERMin	40	0,518	0,259	15,55
MeERMin	41	0,530	0,265	15,81

### 4.3. Příprava mobilní fáze

Mobilní fáze byla složena ze dvou roztoků:

- Organického rozpouštědla (mobilní fáze B – ACN, MetOH, THF, jejich směsi (podle fáze vývoje chromatografických podmínek)).
- Anorganického pufru (mobilní fáze A –  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$  upravený na požadovanou hodnotu pH pomocí 10% roztoku  $\text{NH}_3$  nebo 8,5% roztoku  $\text{H}_3\text{PO}_4$ ).

**Mobilní fáze A:** Anorganický pufr byl připravován z pevné suroviny, která byla navážena na analytických vahách. Navážka byla vypočtena na základě potřebného výsledného objemu a koncentrace 20 mM ( $M_{(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4} = 132 \text{ g/mol}$ ). Surovina byla rozpuštěna v malém množství deionizované vody na ultrazvukové lázni a kvantitativně převedena do odměrné baňky. Baňka byla doplněna vodou po rysku, pokud nebylo třeba upravovat hodnotu pH (byla rovna přibližně 7,9) nebo téměř po rysku s následnou úpravou pH.

*Úprava pH:* Roztok z téměř naplněné odměrné baňky byl přelit do kádinky a byla změřena hodnota pH. Poté byla upravena několika kapkami 10% roztoku  $\text{NH}_3$  (pH = 8,0; 8,51; 9,0) nebo 8,5% roztoku  $\text{H}_3\text{PO}_4$  (pH = 3,0; 4,05; 5,98; 6,98; 7,0; 7,5). Po ustálení pH byl roztok přelit zpět do odměrné baňky a ta byla doplněna vodou po rysku.

Anorganický pufr byl přefiltrován za použití vakua přes nylonový filtr (0,45  $\mu\text{m}$ ).

**Mobilní fáze B:** Organické rozpouštědlo bylo naředěno na požadovanou koncentraci deionizovanou vodou a bylo ponecháno po dobu 5 minut na ultrazvukové lázni (deaerizace).

#### 4.4. Finální chromatografické podmínky

Separace nečistot a rozkladných produktů methylergometrinu byla náročná z hlediska změn využívaných stacionárních i mobilních fází, vhodných pro stanovení těchto chemicky specifických látek. Po celou dobu měření standardů byl zachován reverzní mód. Docházelo ke změnám kolon a tím stacionárních fází, iontové síly (pH) a složení mobilní fáze. Zkoušeli jsme stanovení izokratická i gradientová pro dosažení optimální separace.

Finálních podmínek bylo dosaženo po řadě měření, která nám napomohla určit vlastnosti stacionárních a mobilních fází, které měly největší vliv na rozdělování jednotlivých standardů ve vzorku.

##### Finální podmínky:

- *Chromatografický systém:* LC-20A Prominence.
- *Kolona:* ZirChrom® - PBD, 150 × 4,6 mm.
- *Náplň:* částice velikosti 5 μm.
- *Detekce:* UV-DAD, 310 nm.
- *Průtoková rychlost:* 1,0 ml/min.
- *Teplota:* 30 °C.
- *Nástřik:* 20 μl směsi methylergometrinu s obsahem nečistot a příbuzných látek,
- *Mobilní fáze:* A - 20mmol/l (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH = 8,50.  
B - 10% ACN (odpovídá 5% čistého ACN).
- *Gradient:*

Čas (min)	Mobilní fáze A % (V/V)	Mobilní fáze B % (V/V)
0 – 5	90 → 80	10 → 20
5 – 10	80	20
10 – 15	80 → 70	20 → 30
15 – 30	70	30
30 – 31	70 → 90	30 → 10
31 - 35	90	10

## 5. Výsledky a diskuse

### 5.1. Výběr vhodné stacionární fáze

- Podmínky a gradient:

Kolona: Symmetry-C<sub>18</sub>, 150 × 4,6 mm s částicemi velikosti 5 μm,

Průtok: 1,5 ml/min,

Teplota: 30 °C,

Mobilní fáze: A – 20 mmol/l (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH = 7,93;

B – 50% ACN,

Detekce: 310 nm,

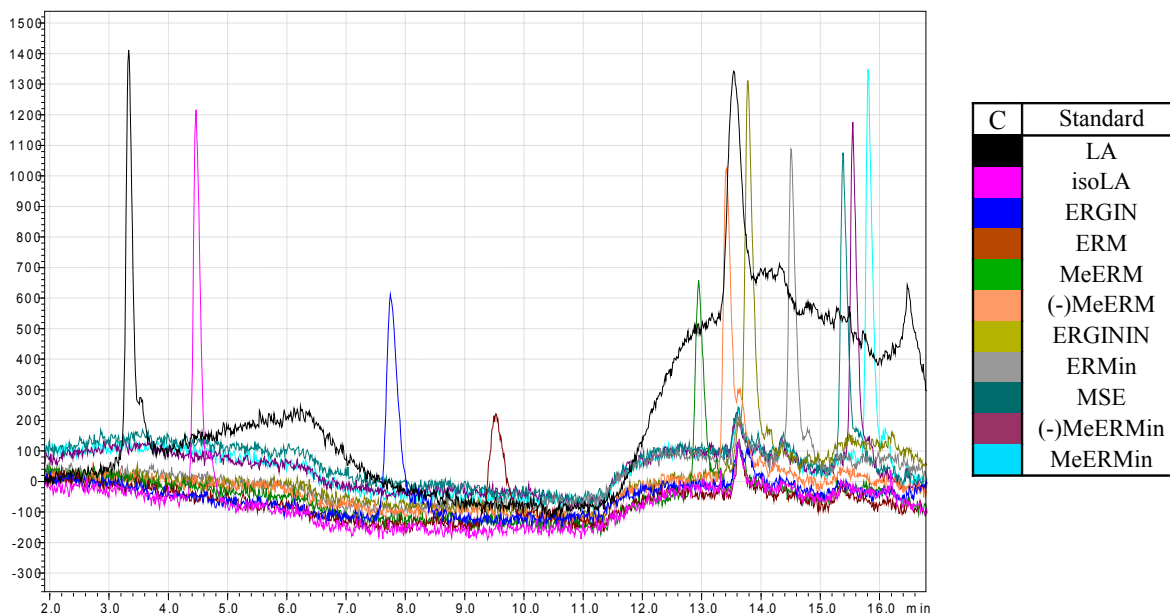
Injekovaný objem: 20 μl.

**Lékopisný gradient:**

Čas (min)	Mobilní fáze A % (V/V)	Mobilní fáze B % (V/V)
0 – 5	85 → 65	15 → 35
5 – 10	65	35
10 – 15	65 → 20	35 → 80
15 – 20	20	80

HPLC chromatogram proměřených standardů za výše uvedených chromatografických podmínek je na Obr. 6. Hodnoty retenčních časů jsou zaznamenány v Tab. 7.

**Obr. 6:** HPLC chromatogram proměřených standardů na koloně Symmetry-C18 (C – z angl. *Color*, barva píku).



**Tab. 7:** Hodnoty retenčních časů.

Pořadí	Č.vialky	Standard	t <sub>R</sub> [min]
1.	31	LA	3,33
2.	32	isoLA	4,46
3.	33	ERGIN	7,75
4.	34	ERM	9,53
5.	35	MeERM	12,95
6.	36	(-)MeERM	13,41
7.	37	ERGININ	13,77
8.	38	ERMin	14,51
9.	39	MSE	15,38
10.	40	(-)MeERMin	15,55
11.	41	MeERMin	15,81

Posloupnost standardů ve všech následujících výsledkových tabulkách zůstává stejná, mění se hodnoty t<sub>R</sub> jednotlivých standardů a tím i jejich pořadí. Tabulky jsou zobrazovány tak, aby byl patrný rozdíl v separaci vůči koloně Symmetry-C<sub>18</sub>, proměřené za lékopisného gradientu.

Byla proměřena substance methylergometrinu spolu se standardy jeho nečistot a příbuzných látek podle stanovení *Příbuzných látek* ve článku Methylergometrinu maleas v Českém lékopise 2009 – viz kapitola 2.8.1<sup>1</sup>. Před vlastní optimalizací analýzy na zirkoniových kolonách byly proměřeny standardy na silikagelové koloně.

● Podmínky a gradient:

Kolona: Zirchrom® - PBD, 150 × 4,6 mm s částicemi velikosti 5 μm (Zr-PBD),

Průtok: 1,5 ml/min,

Teplota: 30 °C,

Mobilní fáze: A – 20 mmol/l (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH = 7,93;

B – 50% ACN,

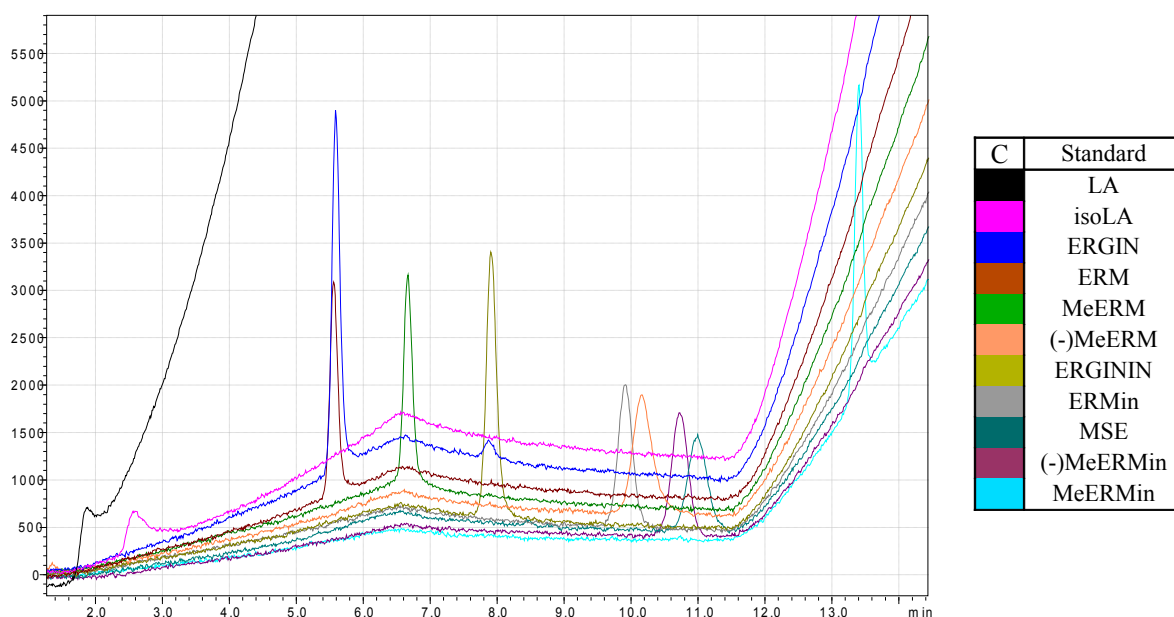
Detekce: 310 nm,

Injikovaný objem: 20 μl,

**Lékopisný gradient.**

HPLC chromatogram proměřených standardů za výše uvedených chromatografických podmínek je na Obr. 7. Hodnoty retenčních časů jsou zaznamenány v Tab. 8.

**Obr. 7:** HPLC chromatogram proměřených standardů na koloně Zr-PBD.



**Tab. 8:** Hodnoty retenčních časů.

Pořadí	Č.vialky	Standard	t <sub>R</sub> [min]
1.	31	LA	1,88
2.	32	isoLA	2,59
4.	33	ERGIN	5,58
3.	34	ERM	5,55
5.	35	MeERM	6,66
8.	36	(-)MeERM	10,16
6.	37	ERGININ	7,90
7.	38	ERMin	9,91
10.	39	MSE	10,99
9.	40	(-)MeERMin	10,72
11.	41	MeERMin	13,40

První zkoušenou zirkoniovou kolonou byla Zr-PBD. Chromatograficky byly separovány jednotlivé standardy za shodných podmínek a gradientu jako v případě silikagelové kolony. Cílem bylo zjistit rozdílnost v interakci látek se stacionární fází na bázi oxidu zirkoničitého. V Tab. 8 ve sloupci Pořadí je patrné, jak se odlišuje separace standardů na silikagelové a zirkoniové koloně Zr-PBD. Na chromatogramu na Obr. 7 také můžeme pozorovat průběh gradientu. Pozitivními prvky v chromatogramu jsou především: volný prostor před a za píkem hlavní látky, vysoká symetrie píků, jejich malá šířka v základně a kratší celkový čas stanovení. Jako problematické se ukázalo zasahování píku LA do nástřiku a překrývání ERMinu a ERGINu jako i dalších látek. Tato kolonu byla podrobena nejvyššímu počtu analýz za rozdílných chromatografických podmínek (viz Kap. 5.3).

- Podmínky a gradient:

Kolona: Zirchrom® - PS, 150 × 4,6 mm s částicemi velikosti 5 μm (Zr-PS),

Průtok: 1,5 ml/min,

Teplota: 30 °C,

Mobilní fáze: A – 20 mmol/l (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH = 7,93;

B – 50% ACN,

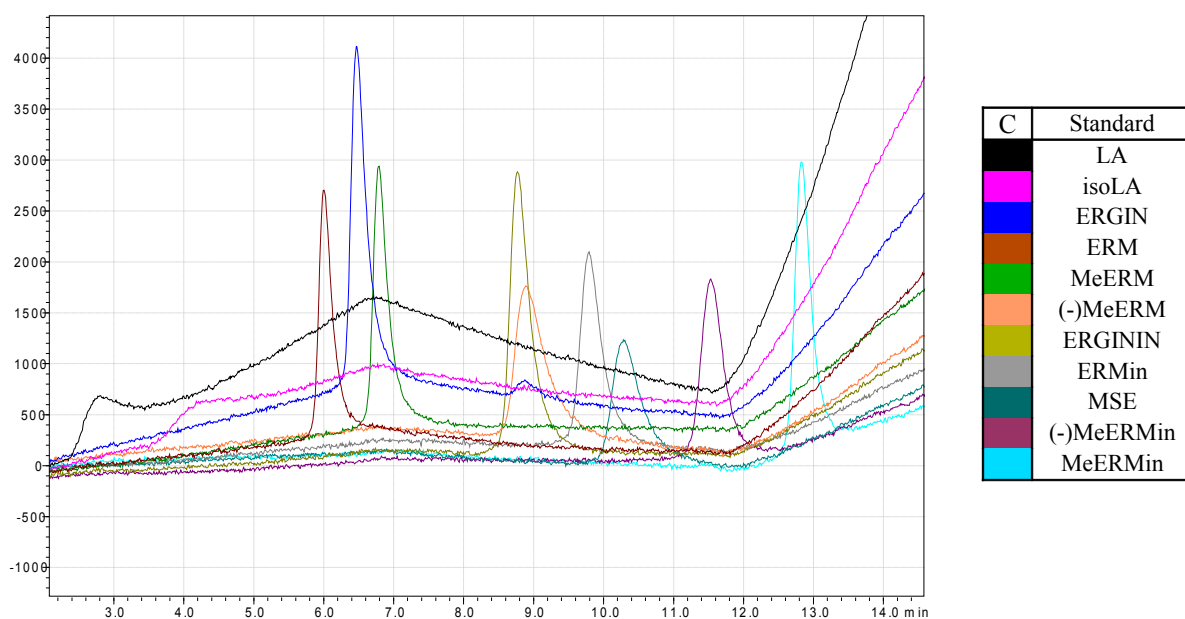
Detekce: 310 nm,

Injekovaný objem: 50 μl,

**Lékopisný gradient.**

HPLC chromatogram proměřených standardů za výše uvedených chromatografických podmínek je na Obr. 8. Hodnoty retenčních časů jsou zaznamenány v Tab. 9.

**Obr. 8:** HPLC chromatogram proměřených standardů na koloně Zr-PS.



**Tab. 9:** Hodnoty retenčních časů.

Pořadí	Č.vialky	Standard	t <sub>R</sub> [min]
1.	31	LA	2,80
2.	32	isoLA	4,31
4.	33	ERGIN	6,46
3.	34	ERM	6,00
5.	35	MeERM	6,79
7.	36	(-)MeERM	8,88
6.	37	ERGININ	8,76
8.	38	ERMin	9,78
9.	39	MSE	10,28
10.	40	(-)MeERMin	11,52
11.	41	MeERMin	12,82

Jedním z našich prvních úkolů byl výběr nejuvhodnější chromatografické kolony pro další měření, proto jich bylo testováno několik. Zirkoniová kolona Zr-PS se ukázala z počátku také jako perspektivní (viz Obr. 8 a hodnoty  $t_R$  v Tab. 9).

Rozdíl v pořadí separovaných složek oproti silikagelové koloně není tak výrazný jako u Zr-PBD a i čas analýzy působí příznivě, avšak pík hlavní látky v chromatogramu nemá dostatečný prostor, dokonce splývá s píkem ERGINu. Řada látek se navzájem překrývá, píky jsou méně symetrické a mají širší základnu oproti měření za shodných podmínek a gradientu na koloně Zr-PBD.

#### Další proměřené kolony:

##### **ZirChrom<sup>®</sup> - MS, 150 × 4,6 mm:**

1. 50% ACN : 20 mmol/l (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH = 9,0; 15 : 85 (V/V), průtok 1,0 ml/min, nástřik 100 µl, detekce 310 nm, izokraticky.
2. 50% ACN : 20 mmol/l (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH = 8,51; 15 : 85 (V/V), průtok 1,0 ml/min, nástřik 100 µl, detekce 310 nm, izokraticky.

Stacionární fáze odpovídá Zr-PBD s povrchem deaktivovaným EDTPA (z angl. *N,N,N',N'-Ethylenediaminetetra (methylenephosphonic acid)*). Dosahuje stejných hydrofobních vlastností jako silikagelové kolony s vázanými řetězci C<sub>18</sub>.

Problémy: Nepokračovali jsme v měření na této koloně, protože LA se eluovala v mrtvém objemu, celková délka analýzy se navíc dvojnásobně prodloužila, což vedlo k rozmývání píků ke konci chromatogramu.

##### **Diamondbond<sup>™</sup>, 150 × 4,6 mm:**

1. ACN : 20 mmol/l (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH = 7,98; 25 : 75 (V/V), průtok 1,0 ml/min, nástřik 100 µl, detekce 310 nm, izokraticky.
2. THF : ACN : 20 mmol/l (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH = 7,93; 25 : 25 : 50 (V/V/V), průtok 1,0 ml/min, nástřik 100 µl, detekce 310 nm, izokraticky.

Problémy: V prvním případě vyšly z kolony pouze LA a isoLA. Byla zvýšena síla organické fáze a proměřen pouze standard methylergometrinu. Signál se neobjevil ani po 30 min měření, proto byly ukončeny zkušební analýzy na této koloně.

##### **ZirChrom<sup>®</sup> - CARB, 150 × 4,6 mm:**

1. ACN : 20 mmol/l (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH = 7,93; průtok 1,0 ml/min, nástřik 50 µl, detekce 310 nm, gradientová eluce:

0 – 15 min	40 : 60
15 – 21 min	40 → 20 : 60 → 80
21 – 25 min	20 : 80
25 – 26 min	20 → 40 : 80 → 60
26 – 30 min	40 : 60.
2. ACN : 20 mmol/l (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH = 7,93; průtok 1,0 ml/min, nástřik 50 µl, detekce 310 nm, gradientová eluce:

0 – 15 min	35 : 65
15 – 21 min	35 → 15 : 65 → 85
21 – 30 min	15 : 85
30 – 35 min	15 → 35 : 85 → 65.



Zadržování látek na této koloně je zprostředkováno kromě jiných vazeb také  $\pi$  -  $\pi$  interakcemi. Povrch je vysoce hydrofobní a hodí se pro separace polárních i nepolárních geometrických izomerů látek.

Problémy: Původní gradient byl nevyhovující, látky byly zadržovány v koloně velmi silně a vycházely ve vysokých retenčních časech. Proto byly zkoušeny jeho obměny. Při měření nejméně hydrofobního standardu – erginu (ERGINu) nedošlo k jeho uvolnění z vazby na povrch stacionární fáze do 45 min.

Na základě srovnání chromatogramů získaných proměřením všech potencionálně vhodných kolon na bázi oxidu zirkoničitého, byly vybrány dvě nejperspektivnější pro další měření: Zr-PS a Zr-PBD.

## 5.2. HPLC analýzy na koloně Zr-PS

**ZirChrom® - PS, 150 × 4,6 mm:** celkový přehled analýz za použití různých chromatografických podmínek a vyhodnocení dosažených výsledků.

1. ACN : 20 mmol/l (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH = 8,0; 15 : 85 (V/V), průtok 1,0 ml/min, nástřik 100 µl, detekce 310 nm, izokraticky.
2. ACN : 20 mmol/l (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH = 4,05; 15 : 85 (V/V), průtok 1,0 ml/min, nástřik 100 µl, detekce 310 nm, izokraticky.
3. ACN : 20 mmol/l (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH = 4,05; 30 : 70 (V/V), průtok 1,0 ml/min, nástřik 100 µl, detekce 310 nm, izokraticky.
4. ACN : 20 mmol/l (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH = 7,0; 15 : 85 (V/V), průtok 1,0 ml/min, nástřik 100 µl, detekce 310 nm, izokraticky.
5. ACN : 20 mmol/l (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH = 3,0; 30 : 70 (V/V), průtok 1,0 ml/min, nástřik 100 µl, detekce 310 nm, izokraticky.
6. MetOH : 20 mmol/l (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH = 7,93; 25 : 75 (V/V), průtok 1,0 ml/min, nástřik 100 µl, detekce 310 nm, izokraticky.

### Vyhodnocení:

Problémy: V obou případech měření v oblasti kyselého pH (3,0; 4,5) nedošlo do 40 min k uvolnění LA a isoLA z kolony. Kyseliny jsou při této iontové síle mobilní fáze velmi silně zadržovány na koloně. Bazické pH snižuje schopnost stacionární fáze vázat kyseliny tak silně a tyto vycházejí těsně po nástřiku s navzájem překrytými píky. Problémem při použití ACN při pH = 7,0 je zasahování píku LA do nástřiku, nedostatečný prostor před a za píkem hlavní látky a překrývání píků navzájem: LA – isoLA, MeERM – ERGIN, ERMin – MSE – (-)MeERM. Při pH = 7,93 je situace podobná, jen dochází k překrývání jiných dvojic píků: LA – isoLA, ERGIN – MeERM, ERGININ – (-)MeERM, ERMin - MSE.

Methanol je nevhodnou organickou složkou mobilní fáze, prodlužuje analýzu, čímž dochází k rozmývání koncových píků.

Na základě shrnutí problémů při HPLC analýzách na koloně Zr-PS, bylo odstoupeno od dalších měření na této koloně. Pozornost byla plně zaměřena na proměření kolony Zr-PBD za různých chromatografických podmínek.

### 5.3. HPLC analýzy na koloně Zr-PBD

**ZirChrom® - PBD**, 150 × 4,6 mm: celkový přehled analýz za použití různých chromatografických podmínek. Vyhodnocení nejvýznamnějších výsledků je předmětem samostatné kapitoly 5.4.

1. ACN : 20 mmol/l (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH = 7,93; 15 : 85 (V/V), průtok 1,0 ml/min, nástřík 100 µl, detekce 310 nm, izokraticky.
2. ACN : 20 mmol/l (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH = 4,05; 30 : 70 (V/V), průtok 1,0 ml/min, nástřík 100 µl, detekce 310 nm, izokraticky.
3. ACN : 20 mmol/l (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH = 6,98; 15 : 85 (V/V), průtok 1,0 ml/min, nástřík 100 µl, detekce 310 nm, izokraticky.
4. ACN : 20 mmol/l (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH = 5,98; 15 : 85 (V/V), průtok 1,0 ml/min, nástřík 100 µl, detekce 310 nm, izokraticky.
5. MetOH : 20 mmol/l (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH = 6,99; 30 : 70 (V/V), průtok 1,0 ml/min, nástřík 100 µl, detekce 310 nm, izokraticky.
6. MetOH : 20 mmol/l (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH = 6,99; 25 : 75 (V/V), průtok 1,0 ml/min, nástřík 100 µl, detekce 310 nm, izokraticky.
7. ACN : 20 mmol/l (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH = 7,50; 15 : 85 (V/V), průtok 1,0 ml/min, nástřík 100 µl, detekce 310 nm, izokraticky.
8. ACN : 20 mmol/l (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH = 7,0; průtok 1,0 ml/min, nástřík 100 µl, detekce 310 nm, gradientová eluce:
  - a) 0 – 2 min                    10 : 90  
2 – 12 min                    10 → 40 : 90 → 60  
12 – 15 min                    40 : 60.
  - b) 0 – 2 min                    10 : 90  
2 – 7 min                      10 → 40 : 90 → 60  
7 – 15 min                      40 : 60.
  - c) 0 – 0,5 min                    10 : 90  
0,5 – 5 min                    10 → 40 : 90 → 60  
5 – 15 min                      40 : 60.
9. ACN : 20 mmol/l (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH = 9,0; 15 : 85 (V/V), průtok 1,0 ml/min, nástřík 100 µl, detekce 310 nm, izokraticky.
10. ACN : 20 mmol/l (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, pH = 9,01; 10 : 90 (V/V), průtok 1,0 ml/min, nástřík 100 µl, detekce 310 nm, izokraticky.
11. ACN : 20 mmol/l (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH = 8,51; 15 : 85 (V/V), průtok 1,0 ml/min, nástřík 100 µl, detekce 310 nm, izokraticky.
12. ACN : 20 mmol/l (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH = 8,51; průtok 1,0 ml/min, nástřík 100 µl, detekce 310 nm, lékopisný gradient.
13. ACN : 20 mmol/l (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH = 7,50; průtok 1,0 ml/min, nástřík 100 µl, detekce 310 nm, lékopisný gradient.
14. ACN : 20 mmol/l (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> + 5 mmol/l (CH<sub>3</sub>)<sub>4</sub>N<sup>+</sup>Cl<sup>-</sup>, pH = 7,50; průtok 1,0 ml/min, nástřík 100 µl, detekce 310 nm, lékopisný gradient.
15. ACN : 20 mmol/l (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> + 10 mmol/l (C<sub>4</sub>H<sub>9</sub>)<sub>4</sub>N<sup>+</sup>Br<sup>-</sup>, pH = 7,49; průtok 1,0 ml/min, nástřík 100 µl, detekce 310 nm, lékopisný gradient.

16. THF : 20 mmol/l  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ , pH = 7,98; 10 : 90 (V/V), průtok 1,0 ml/min, nástřik 100  $\mu\text{l}$ , detekce 310 nm, izokraticky.
17. THF : 20 mmol/l  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ , pH = 6,99; 10 : 90 (V/V), průtok 1,0 ml/min, nástřik 100  $\mu\text{l}$ , detekce 310 nm, izokraticky.
18. THF : ACN : 20 mmol/l  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ , pH = 7,98; 5 : 10 : 85 (V/V/V), průtok 1,0 ml/min, nástřik 100  $\mu\text{l}$ , detekce 310 nm, izokraticky.
19. THF : 20 mmol/l  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ , pH = 7,98; průtok 1,0 ml/min, nástřik 100  $\mu\text{l}$ , detekce 310 nm, gradientová eluce:
- a) 0 – 1 min                    10 : 90  
 1 – 6 min                    10 → 30 : 90 → 70  
 6 – 20 min                    30 : 70.
- b) 0 – 1 min                    10 : 90  
 1 – 6 min                    10 → 20 : 90 → 80  
 6 – 25 min                    20 : 80.
20. ACN : 20 mmol/l  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ , pH = 7,50; průtok 1,0 ml/min, nástřik 100  $\mu\text{l}$ , detekce 310 nm, gradientová eluce:
- a) 0 – 5 min                    15 → 35 : 85 → 65  
 5 – 10 min                    35 : 65  
 10 – 15 min                    35 → 70 : 65 → 30  
 15 – 20 min                    70 : 30.
- b) 0 – 5 min                    15 → 35 : 85 → 65  
 5 – 10 min                    35 : 65  
 10 – 15 min                    35 → 60 : 65 → 40  
 15 – 20 min                    60 : 40.
21. ACN : 20 mmol/l  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ , pH = 7,0; průtok 1,0 ml/min, nástřik 100  $\mu\text{l}$ , detekce 310 nm, gradientová eluce:
- 0 – 5 min                    10 → 35 : 90 → 65  
 5 – 15 min                    35 : 65  
 15 – 20 min                    35 → 80 : 65 → 20  
 20 – 25 min                    80 : 20.
22. ACN : 20 mmol/l  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ , pH = 8,5; průtok 1,0 ml/min, nástřik 100  $\mu\text{l}$ , detekce 310 nm, gradientová eluce:
- a) 0 – 5 min                    10 → 20 : 90 → 80  
 5 – 10 min                    20 : 80  
 10 – 15 min                    20 → 40 : 80 → 60  
 15 – 20 min                    40 → 80 : 60 → 20  
 20 – 25 min                    80 : 20.
- b) 0 – 5 min                    10 → 20 : 90 → 80  
 5 – 10 min                    20 : 80  
 10 – 15 min                    20 → 30 : 80 → 70  
 15 – 25 min                    30 : 70.

## Vyhodnocení:

Problémy: Využití této kolony bylo nejperspektivnější především proto, jak se ukázalo při použití lékopisného gradientu, že pik hlavní látky měl dostatečný prostor. Velkým problémem a zároveň úkolem se však stalo oddělení navzájem se překrývajících kyselin vycházejících v nástřiku nebo těsně po něm. Za izokratických podmínek byly proměřeny standardy při různých hodnotách pH: 4,05; 5,98; 6,98; 7,50; 7,93; 8,50; 9,0. Výsledky srovnání retenčních časů v závislosti na pH jsou shrnuty v Tab. 10, v kapitole 5.4. Za izokratických podmínek nebylo dosaženo optimálních výsledků, proto byla kolona podrobena, především kvůli oddělení kyselin, různým gradientovým podmínkám (viz výše).

Zároveň v rámci dosažení co nejlepší separace, tvarů píků a zkrácení doby analýzy byla proměřena kolona za použití vyšší síly organické mobilní fáze, ať již při použití čistého THF nebo směsi THF + ACN. Výsledky nebyly tak uspokojivé, jak jsme doufali, především nedošlo k ovlivnění separace látek, navzájem se některé píky stále překrývaly, a proto byla další měření s těmito organickými fázemi přerušena. Methanol použitý za izokratických podmínek vykazoval stejnou selektivitu separace, jaké bylo dosaženo při použití ACN, ale došlo k prodloužení času analýzy a píky byly širší v základně.

Přidání tetramethylamonium chloridu a tetrabutylammonium bromidu k pufru mohlo přispět k oddělení píků LA a isoLA od nástřiku na základě vytváření iontových párů s těmito dvěma standardy. Efekt přídavek k pufru byl však zanedbatelný.

#### 5.4. Vybrané výsledky a chromatogramy – kolona Zr-PBD

V Tab. 10 a na Obr. 9 je zaznamenána a zobrazena vzájemná závislost  $t_R$  na pH.

Kolona: ZirChrom® - PBD, 150 × 4,6 mm s částicemi velikosti 5 μm,

Průtok: 1,5 ml/min,

Teplota: 30 °C,

Mobilní fáze: A – 20 mmol/l (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>

B – 15% ACN (při pH < 6,99; 30% ACN),

Detekce: 310 nm,

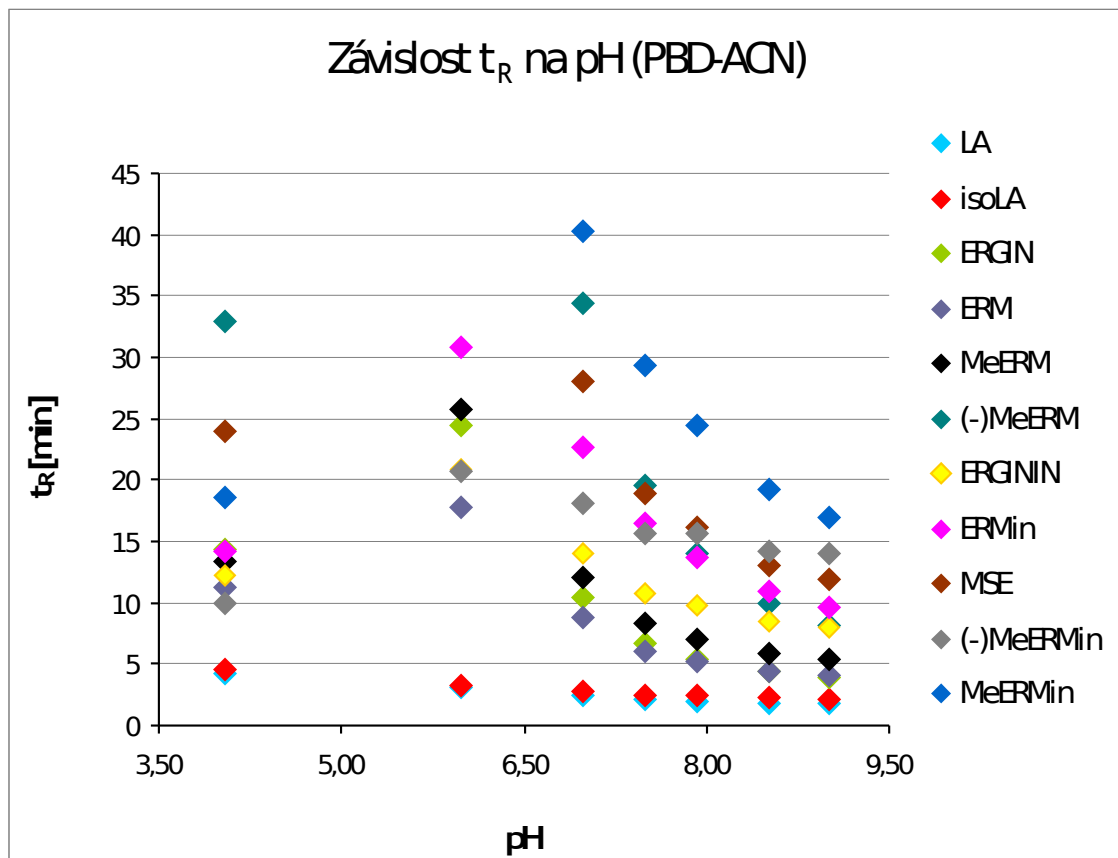
Injikovaný objem: 100 μl.

Tab. 10: Závislost  $t_R$  na pH.

Standard	$t_R$ [min]						
	pH [4,05]	pH [5,98]	pH [6,98]	pH [7,50]	pH [7,93]	pH [8,51]	pH [9,00]
LA	4,19	3,07	2,41	2,10	1,99	1,80	1,73
isoLA	4,52	3,19	2,75	2,52	2,51	2,28	2,13
ERGIN	14,30	24,41	10,37	6,74	5,39	4,41	3,99
ERM	11,20	17,84	8,87	6,07	5,16	4,36	4,02
MeERM	13,43	25,70	12,09	8,35	6,98	5,82	5,36
(-)MeERM	32,90	SN*	34,36	19,51	14,10	10,02	8,08
ERGININ	12,26	20,91	14,01	10,76	9,76	8,48	8,00
ERMin	14,13	30,86	22,69	16,47	13,65	10,97	9,70
MSE	23,93	61,78	28,06	18,88	16,13	13,10	11,94
(-)MeERMin	9,89	20,65	18,02	15,71	15,66	14,26	14,05
MeERMin	18,57	SN*	40,25	29,35	24,46	19,32	16,90

\* SN = signál nezachycen

Obr. 9: Graf závislosti  $t_R$  na pH.



V kyselém prostředí bylo potřeba zvýšit sílu organické části mobilní fáze. Měření probíhalo za izokratických podmínek a sloužilo pro orientační přehled o rozdílech v separaci jednotlivých látek v závislosti na změně pH mobilní fáze. Po zpracování získaných údajů o retenčních časech v závislosti na pH do grafické podoby jsme mohli porovnat míru vzájemného překrývání kolidujících píků a vybrat podmínky pro další analýzy i podle přibližného celkového času stanovení při dané hodnotě pH.

- Podmínky a gradient: (také viz odrážky 13. a 20.b) v kapitole 5.3)

Kolona: Zirchrom® - PBD, 150 × 4,6 mm s částicemi velikosti 5 µm,

Průtok: 1,0 ml/min,

Teplota: 30 °C,

Mobilní fáze: A – 20 mmol/l (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH = 7,50;

B – 50% ACN,

Detekce: 310 nm,

Injikovaný objem: 100 µl,

**a) Lékopisný gradient.**

b) 0 – 5 min                    15 → 35 : 85 → 65

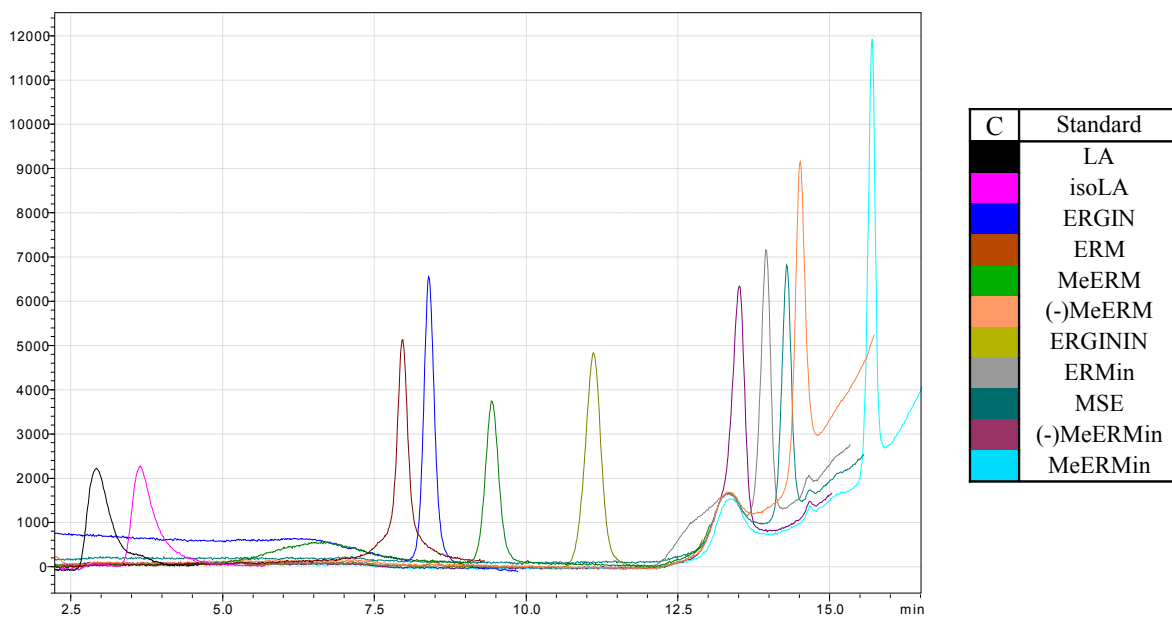
5 – 10 min                    35 : 65

10 – 15 min                   35 → 60 : 65 → 40

15 – 20 min                   60 : 40.

HPLC chromatogramy proměřených standardů za výše uvedených chromatografických podmínek jsou na Obr. 10, 11. Hodnoty retenčních časů jsou zaznamenány v Tab. 11, 12.

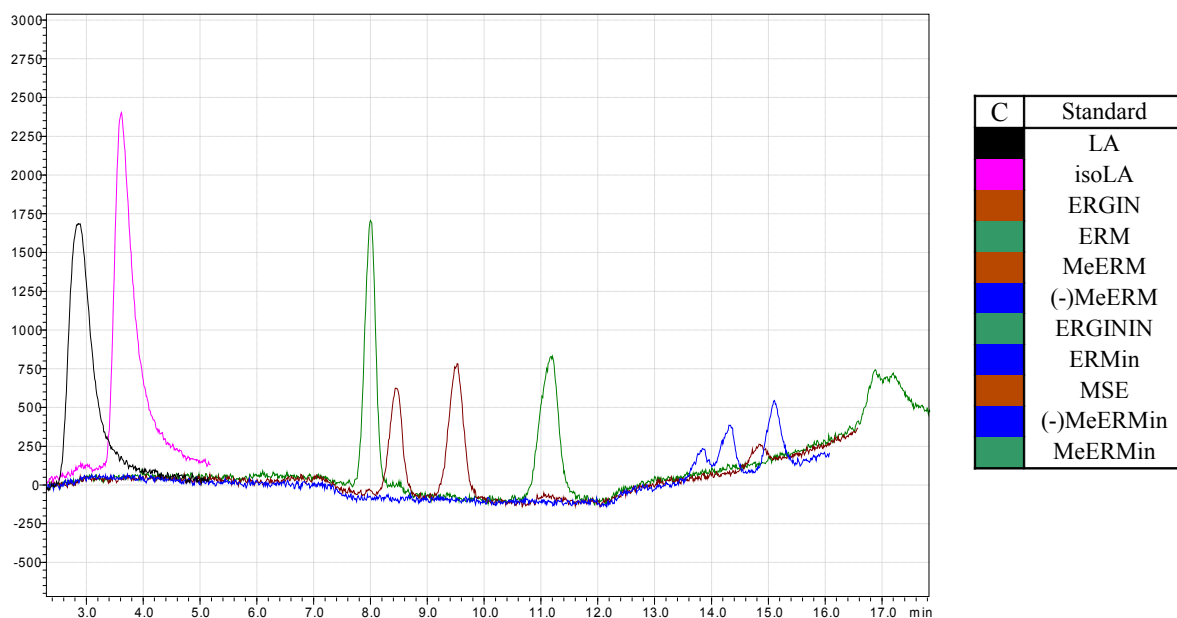
**Obr. 10:** HPLC chromatogram proměřených standardů na koloně Zr-PBD, pH = 7,50 za gradientu a).



**Tab. 11:** Hodnoty retenčních časů.

Pořadí	Č.vialky	Standard	t <sub>R</sub> [min]
1.	31	LA	2,92
2.	32	isoLA	3,64
4.	33	ERGIN	8,37
3.	34	ERM	7,96
5.	35	MeERM	9,43
10.	36	(-)MeERM	14,51
6.	37	ERGININ	11,10
8.	38	ERMin	13,95
9.	39	MSE	14,29
7.	40	(-)MeERMin	13,51
11.	41	MeERMin	15,69

Grafické zobrazení závislosti retenčního času na pH umožnilo vybrat perspektivní hodnoty pH pro další stanovení. Jako nejlepší se zdálo pokračovat při pH = 7,50 a 8,50. Byly použity shodné chromatografické podmínky a lékopisný gradient (viz Obr. 10), aby bylo možné srovnat výsledky s chromatogramem získaným na koloně Zr-PBD při pH = 7,93. Píky ergininu a ergometrinu se navzájem oddělily. Ve skupině píků v pořadí 7. - 10. došlo ke změnám v separaci a píky MSE a (-)MeERM byly navzájem překryty. V rámci optimálnějšího využití času pro měření byly standardy pro další analýzu odměřeny po třech do jedné vialky: 43 – (-)MeERM + ERMin + (-)MeERMin, 44 – ERGIN + MeERM + MSE, 45 – ERM + ERGININ + MeERMin. LA a isoLA byly ponechány samostatně.

**Obr. 11:** HPLC chromatogram proměřených standardů na koloně Zr-PBD, pH = 7,50 za gradientu b).



**Tab. 12:** Hodnoty retenčních časů.

Pořadí	Č.vialky	Standard	t <sub>R</sub> [min]
1.	31	LA	2,85
2.	32	isoLA	3,61
4.	44	ERGIN	8,44
3.	45	ERM	8,00
5.	44	MeERM	9,53
10.	43	(-)MeERM	15,10
6.	45	ERGININ	11,17
8.	43	ERMin	14,30
9.	44	MSE	14,84
7.	43	(-)MeERMin	13,84
11.	45	MeERMin	16,88

Byla navržena malá změna gradientu a standardy proměřeny znovu při pH = 7,50. Píky nebyly tak symetrické jako v případě proměření jednotlivých standardů, ale z výsledků se dalo usoudit, že snížení síly organické části mobilní fáze přibližně od 10. minuty, vedlo k prodloužení analýzy a jen nevýraznému ovlivnění separace a koeluci píků MSE a (-)MeERM, v pořadí 9. a 10. (viz Obr. 11). Další úpravy gradientu za této hodnoty pH nebyly provedeny, protože pokud by došlo ke snížení síly mobilní fáze přibližně od 10. minuty, vedlo by to pravděpodobně k prodloužení analýzy a rozmývání píků ke konci chromatogramu.

- Podmínky a gradient: (také viz odrážky 12. a 22.a) v kapitole 5.3)

Kolona: Zirchrom® - PBD, 150 × 4,6 mm s částicemi velikosti 5 µm,

Průtok: 1,0 ml/min,

Teplota: 30 °C,

Mobilní fáze: A – 20 mmol/l (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH = 8,50;

B – 50% ACN,

Detekce: 310 nm,

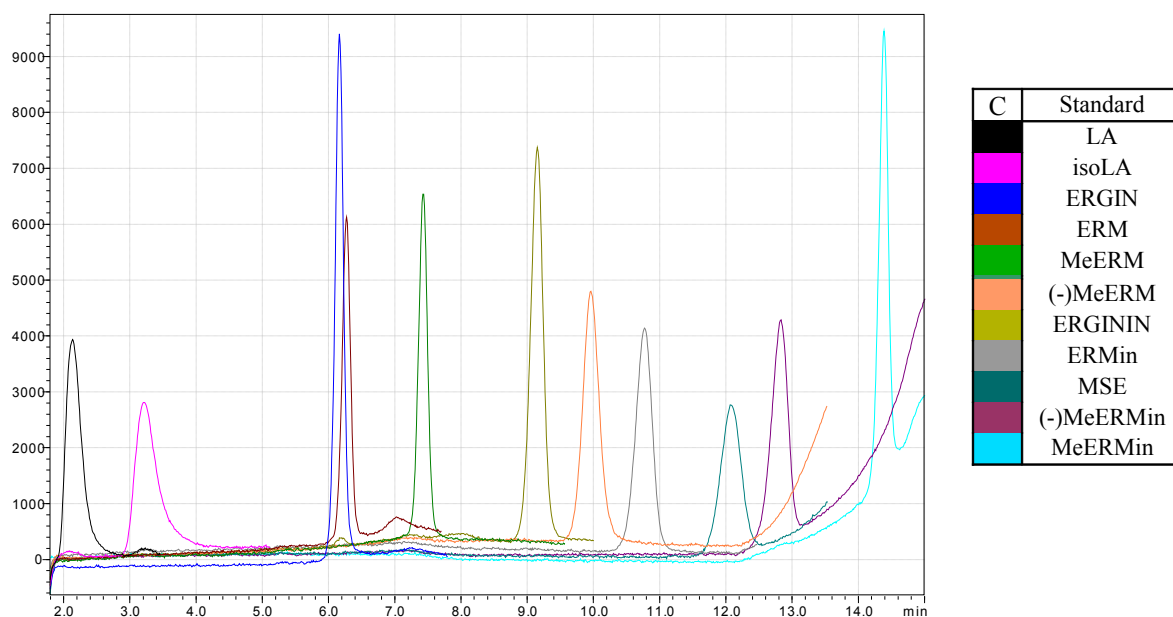
Injikovaný objem: 100 µl,

**a) Lékopisný gradient.**

- b) 0 – 5 min                    10 → 20 : 90 → 80  
5 – 10 min                    20 : 80  
10 – 15 min                   20 → 40 : 80 → 60  
15 – 20 min                   40 → 80 : 60 → 20  
20 – 25 min                   80 : 20.

HPLC chromatogramy proměřených standardů za výše uvedených chromatografických podmínek jsou na Obr. 12, 13. Hodnoty retenčních časů jsou zaznamenány v Tab. 13, 14.

**Obr. 12:** HPLC chromatogram proměřených standardů na koloně Zr-PBD, pH = 8,50 za gradientu a).



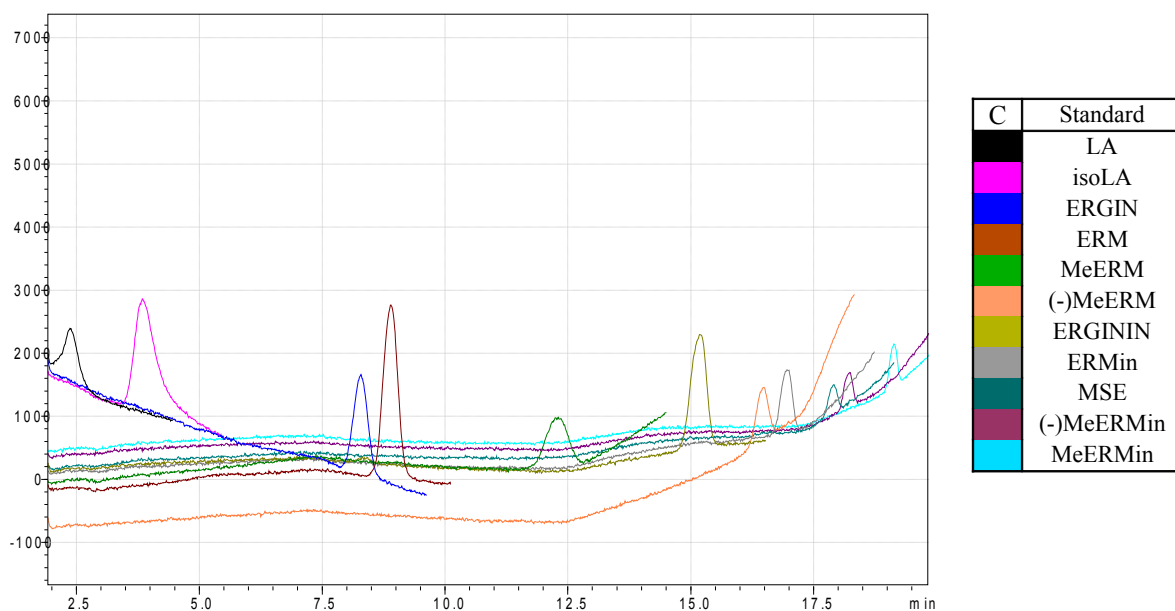
**Tab. 13:** Hodnoty retenčních časů.

Pořadí	Č.vialky	Standard	$t_R$ [min]
1.	31	LA	2,37
2.	32	isoLA	3,84
3.	33	ERGIN	8,28
4.	34	ERM	8,89
5.	35	MeERM	12,31
7.	36	(-)MeERM	16,48
6.	37	ERGININ	15,18
8.	38	ERMin	16,96
9.	39	MSE	17,91
10.	40	(-)MeERMin	18,24
11.	41	MeERMin	19,13

Druhou hodnotou pH, která se zdála jako perspektivní pro další měření bylo pH = 8,50. Standardy byly proměřeny za stejných podmínek jako v případě stanovení na koloně Zr-PBD při pH = 7,93 a za použití lékopisného gradientu, aby bylo možné získané chromatogramy navzájem srovnat. V porovnání s chromatogramem při pH = 7,93 došlo ke vzájemnému oddělení všech látek v pořadí 6.–11. (viz Obr. 12).

Separace při pH = 8,50 se zdála nejlepší z hlediska vzájemného oddělení téměř všech píků, dostatečného prostoru před a za píkem hlavní stanovované látky, symetrie píků a jejich malé šířky v základně a krátkého celkového času analýzy. Svou pozornost jsme zaměřili na dosažení oddělení dvou koeluujících látek v pořadí 3. a 4., erginu a ergometrinu (viz Obr. 13).

**Obr. 13:** HPLC chromatogram proměřených standardů na koloně Zr-PBD, pH = 8,50 za gradientu b).



**Tab. 14:** Hodnoty retenčních časů.

Pořadí	Č.vialky	Standard	$t_R$ [min]
1.	31	LA	2,13
2.	32	isoLA	3,21
3.	33	ERGIN	6,16
4.	34	ERM	6,27
5.	35	MeERM	7,42
7.	36	(-)MeERM	9,96
6.	37	ERGININ	9,15
8.	38	ERMin	10,77
9.	39	MSE	12,07
10.	40	(-)MeERMin	12,82
11.	41	MeERMin	14,38

Gradient byl upraven tím způsobem, aby bylo dosaženo oddělení píků erginu a ergometrinu. Byla snížena síla mobilní fáze od 5. do 15. minuty, a aby nedošlo k prodloužení analýzy zvýšena síla mobilní fáze od 15. do 25. minuty.

Koeluující píky erginu a ergometrinu se za těchto podmínek navzájem oddělily (Obr. 13). Pro optimalizaci však chybělo vyřešit zasahování píky lysergové kyseliny do nástřiku a upravení symetrie píků. Proto byla kolona Zr-PBD podrobena při pH = 8,50 dalším změnám gradientu.

- **Podmínky a gradient:** (také viz odrážka 22.b) v kapitole 5.3).

Kolona: Zirchrom® - PBD, 150 × 4,6 mm s částicemi velikosti 5 μm,

Průtok: 1,0 ml/min,

Teplota: 30 °C,

Mobilní fáze: A – 20 mmol/l (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH = 8,50;

B – 50% ACN,

Detekce: 310 nm,

Injekovaný objem: 100 μl,

**Gradient:**

0 – 5 min                      10 → 20 : 90 → 80

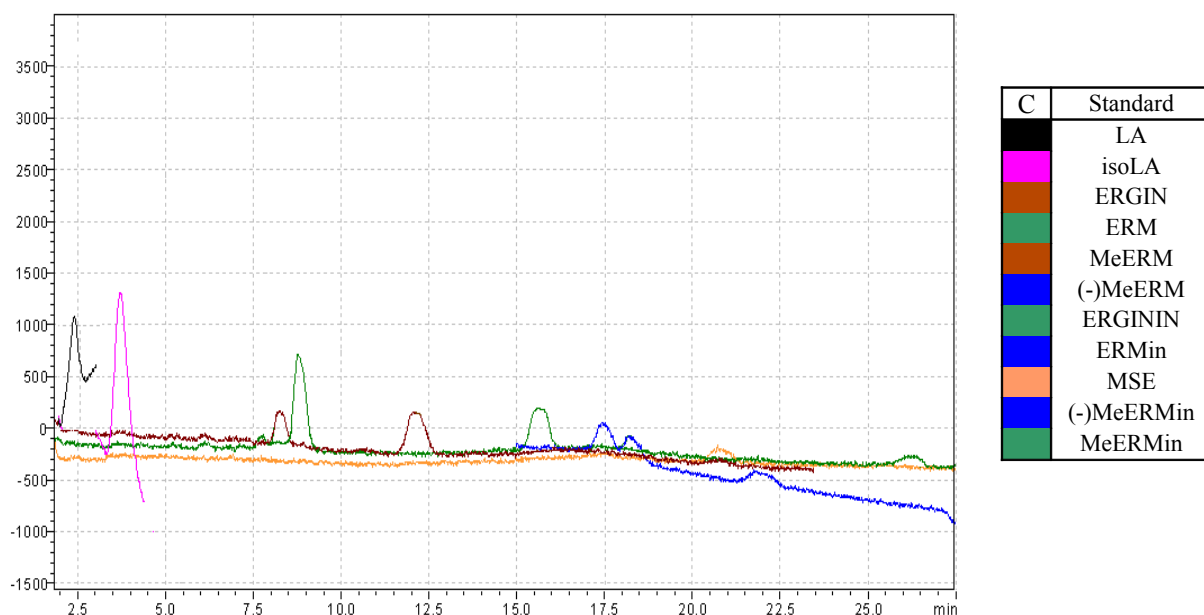
5 – 10 min                    20 : 80

10 – 15 min                 20 → 30 : 80 → 70

15 – 25 min                 30 : 70.

HPLC chromatogram proměřených standardů za výše uvedených chromatografických podmínek je na Obr. 14. Hodnoty retenčních časů jsou zaznamenány v Tab. 15. V rámci optimálnějšího využití času pro měření byly standardy pro tuto analýzu odměřeny po třech do jedné vialky: 43 – (-)MeERM + ERMin + (-)MeERMin, 44 – ERGIN + MeERM + MSE, 45 – ERM + ERGININ + MeERMin. LA a isoLA byly ponechány odděleně. Při měření se neprojevil signál MSE. Pro zesílení odezvy byl proměřen samostatně.

**Obr. 14:** HPLC chromatogram proměřených standardů na koloně Zr-PBD, pH = 8,50.



**Tab. 15:** Popis standardů v chromatogramu a hodnoty retenčních časů.

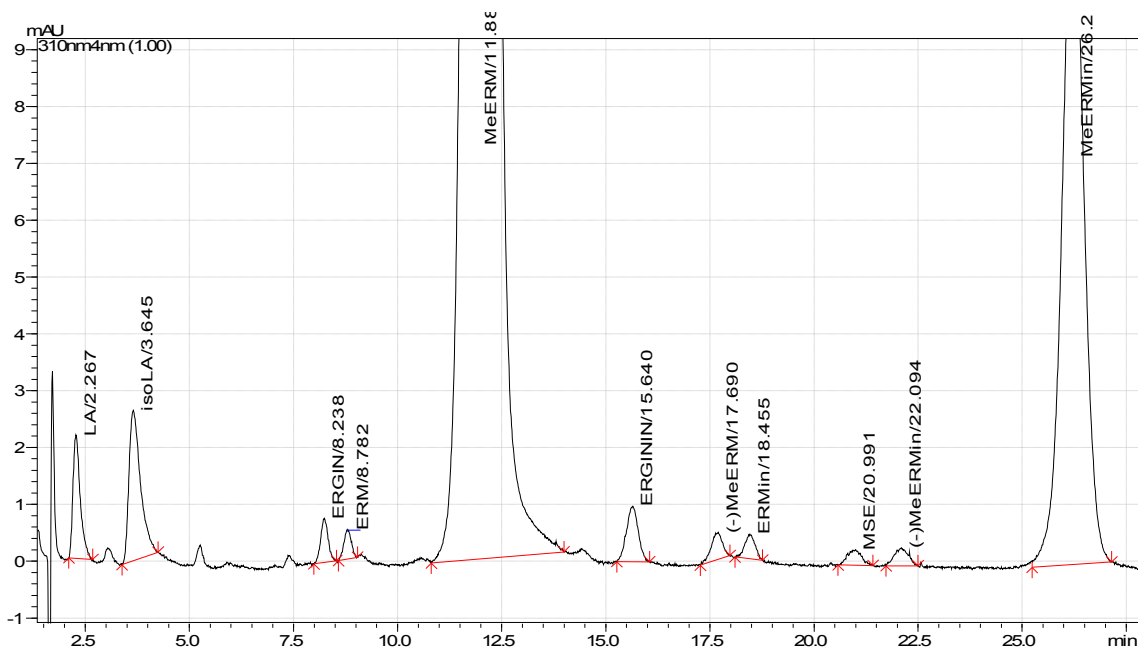
Pořadí	Č.vialky	Standard	t <sub>R</sub> [min]
1.	31	LA	2,33
2.	32	isoLA	3,70
3.	44	ERGIN	8,22
4.	45	ERM	8,78
5.	44	MeERM	12,11
7.	43	(-)MeERM	15,51
6.	45	ERGININ	17,43
8.	43	ERMin	18,19
9.	39	MSE	20,72
10.	43	(-)MeERMin	21,76
11.	45	MeERMin	26,01

Proměřením standardů za podmínek výše zmíněného gradientu, který nebyl příliš odlišný od finálního, bylo dosaženo dostatečného oddělení píku LA od nástřiku. Pík MeERMinu vycházel z kolony až při ekvilibraci, proto byl gradient prodloužen ve svém závěru z 15 – 25 min na 15 – 30 min (viz Kap. 4.5). Symetrie píku byla ovlivněna opotřebením kolony. Při měření za finálních podmínek jsme použili novou kolonu a symetrie píku odpovídala požadavkům.

## 5.5. Finální výsledky a chromatogram – kolona Zr-PBD

HPLC chromatogram směsi methylergometrinu a jeho nečistot získaný při měření na koloně Zr-PBD při 310 nm za chromatografických podmínek uvedených v kapitole 4.5 je zobrazen na Obr. 15. Hodnoty retenčních časů jednotlivých standardů jsou zaznamenány v Tab.16.

**Obr. 15:** HPLC chromatogram proměřených standardů na koloně Zr-PBD za finálních chromatografických podmínek, uvedených v kapitole 4.5.



**Tab. 16:** Popis standardů v chromatogramu a hodnoty retenčních časů.

Pořadí	Zkratka	$t_R$ [min]
1.	LA	2,27
2.	isoLA	3,65
3.	ERGIN	8,24
4.	ERM	8,78
5.	MeERM	11,89
7.	(-)MeERM	15,64
6.	ERGININ	17,69
8.	ERMin	18,46
9.	MSE	20,99
10.	(-)MeERMin	22,09
11.	MeERMin	26,21

Výsledný gradient splňuje požadavky na optimalizaci separace methylergometrinu, jeho nečistot a příbuzných látek, které byly vytyčeny v cíli diplomové práce.

V chromatogramu je zobrazen pík nástřiku a píky jednotlivých látek jsou popsány jejich zkratkou s údajem o retenčním čase. Z tabulky je patrné, že pořadí píků je téměř totožné jako při použití kolony Symmetry-C<sub>18</sub> (viz Kap. 5.1, Obr. 6 a Tab. 7), pouze píky (-)methylergometrinu a ergininu jsou prohozeny. Celkový čas analýzy je do 30 minut.

*Poznámka:* Bylo provedeno měření i při 50 °C, což zkrátilo dobu separace a neovlivnilo selektivitu, tzn. oddělování jednotlivých standardů ve směsi.

## 6. Závěr

Hlavním cílem této diplomové práce bylo dosažení optimalizace chromatografických podmínek při použití zirkoniové stacionární fáze pro stanovení methylergometrinu a 10 jeho nečistot, které mohou být přítomny v jeho léčivých přípravcích.

Výsledných chromatografických podmínek bylo dosaženo na koloně ZirChrom® - PBD, 150 × 4,6 mm: ZirChrom Separations, Inc., Anoka, MN, USA (5µm). Použitá mobilní fáze byla složena z acetonitrilu : fosfátového pufru (20mmol/l (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH = 8,50) a stanovení probíhalo za gradientu: 0 – 5 min 10 : 90 → 20 : 80, 5 – 10 min 20 : 80, 10 – 15 min 20 : 80 → 30 : 70, 15 – 30 min 30 : 70, ekvilibrace: 30 – 31 min 30 : 70 → 10 : 90, 31 – 35 min 10 : 90 (V/V). Průtoková rychlost byla 1,0 ml/min, teplota 30°C. Injikované množství činilo 20 µl směsi methylergometrinu a limitního množství nečistot. Pro detekci látek byl použit UV spektrofotometrický detektor diodového pole při 310 nm.

Optimalizací chromatografických podmínek byly splněny i další cíle této diplomové práce: před i za píkem methylergometrinu zůstal dostatečný prostor, který byl důležitý z hlediska zabránění koeluce přilehlých píků s píkem methylergometrinu, kvůli jeho vysoké koncentraci vzhledem k ostatním látkám. Látky byly separovány na základní linii, píky dosáhly dostatečné symetrie. Všechny epimery byly navzájem odděleny. Analýza proběhla celkově do 30 minut, 5 minut v závěru bylo využito pro ekvilibraci před dalším stanovením.

Během optimalizace bylo testováno široké spektrum různých chromatografických podmínek, než bylo dosaženo finálních parametrů. Hodnota pH hrála velkou roli, protože její změny byly provázány významnými posuny v retenčních časech methylergometrinu a jednotlivých testovaných nečistot (viz Kap. 5.4, Tab. 10 a Obr. 9). Nejvhodnější se ukázala hodnota pH = 8,50, při které nedocházelo k tolika koelucím testovaných látek.

Separace za izokratických podmínek byla opuštěna kvůli opakovaným neúspěšným pokusům o vzájemné oddělení píků LA a isoLA. Vhodný gradient tento problém vyřešil a také umožnil zkrácení doby analýzy. Organická část mobilní fáze byla vhodně zvolena již na počátku testování (ACN), přesto byly zkoušeny i další organické látky. Methanol vykazoval stejnou selektivitu jako ACN, ale jeho použití vedlo k prodloužení analýzy. Vyšší síla organické mobilní fáze, ať již volbou čistého THF nebo směsi THF + ACN, která byla použita s úmyslem dosažení co nejlepší separace, tvarů píků a zkrácení doby analýzy, nevedla k uspokojivým výsledkům.

Vliv vyšší teploty byl ozkoušen za finálních podmínek. Při 50 °C (zvýšení o 20 °C) nedošlo k ovlivnění separace látek. Doba analýzy se zkrátila.

Výsledek testování může být po vhodné validaci v budoucnosti využit i pro kvantitativní vyhodnocení příbuzných látek v substanci methylergometrinu.

## 7. Abstrakt

### Využití HPLC v analýze léčiv IV.

Diplomová práce

Tereza Krejčí

Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové,

Katedra farmaceutické chemie a kontroly léčiv

Heyrovského 1203, Hradec Králové.

Tato diplomová práce je zaměřena na využití vysokoúčinné kapalinové chromatografie v oblasti kontroly léčiv. Methylergometrin je derivátem ergometrinu, který patří mezi námelové alkaloidy. Tyto látky přírodního původu mají velmi silné farmakologické účinky na různé systémy lidského těla již v nízkých koncentracích.

Účinné složky z námele jsou získávány extrakcí a následnou separací jednotlivých látek ze směsi. Tyto látky jsou dále přečištěny. Vyprodukovat dokonale čisté složky je velmi nákladné, proto mohou obsahovat definované nečistoty a příbuzné látky v určitých daných koncentracích.

V případě methylergometrinu jsou stanovovány *Příbuzné látky* podle platného Evropského lékopisu. Ve výčtu možných analyzovaných složek se nachází 9 látek, 10. složka (-)methylergometrinin není v lékopise popsána.

Tato práce se zabývá návrhem optimálních chromatografických podmínek kvalitativní separace methylergometrinu a jeho nečistot s využitím zirkoniových stacionárních fází. Během optimalizace bylo vyzkoušeno široké spektrum stacionárních fází: Zr-PBD, Zr-PS, Zr-MS, Zr-CARB a DiamondBond, ale také variant mobilních fází: s různou eluční silou, pH, poměrem organického rozpouštědla a pufru, gradientem.

Všechny složky se podařilo navzájem oddělit na koloně ZirChrom® - PBD, při gradientové eluci a využití mobilní fáze o složení acetonitril : fosfátový pufr (20mmol/l (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH = 8,50).

Výsledky je možno v budoucnu použít i pro hodnocení čistoty substance methylergometrinu.



## 8. Abstract

### Employment of HPLC in the field of drug analysis IV.

Diploma thesis

Tereza Krejčí

Charles University in Prague, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové,  
Department of Pharmaceutical Chemistry and Drug Control  
Heyrovského 1203, Hradec Králové.

The diploma thesis is targeted to usage of High Performance Liquid Chromatography in the field of Quality control of drug substances. Methylergometrine is a derivative of ergometrine that belongs to Ergot alkaloids. These native origin substances have strong pharmacological effects on different human body systems already in low concentrations.

Active components from ergot are acquired by extraction and subsequent separation of individual components from a mixture. These substances are repurified. It is very expensive to produce totally pure substances and thus final substances may contain defined amount of impurities.

In case of methylergometrine *Related substances* are analysed according to the valid European pharmacopoeia. Nine substances are in the specification of possible analysed components, tenth component (-)methylergometrinine has not been described in the pharmacopoeia so far.

This thesis deals with development of chromatographic conditions for qualitative separation of a mixture of methylergometrine and its impurities on zirconia based stationary phases. Various stationary phases, e.g. Zr-PBD, Zr-PS, Zr-MS, Zr-CARB, and DiamondBond were tested during the experiments and different mobile phases as well.

A successful separation of all analytes were reached under following conditions, column ZirChrom<sup>®</sup> - PBD, gradient elution, mobile phase – acetonitrile : phosphate buffer (20mmol/l (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH = 8,50).

The results are supposed to be used for impurity determination of a methylergometrine substance.

## 9. Literatura

- 1 Ministerstvo zdravotnictví ČR. *Český lékopis 2009 (ČL 2009)*, 1. vydání. Praha: Grada, 2009. 3968 s. ISBN 978-80-247-2994-7.
- 2 KLIMEŠ, Jiří, *a kol. Kontrola léčiv I*. 1. vydání. Praha: Univerzita Karlova v Praze, Karolinum, 2002. 141 s. ISBN 9788024616131.
- 3 MOKRÝ M. *Vysokoučinná kapalinová chromatografie (přednáška v ppt)* [online]. Hradec Králové: Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Katedra farmaceutické chemie a kontroly léčiv, Kontrola léčiv II., 2005. [cit. 2010-02-01].  
<<http://www.faf.cuni.cz/studium/Materialy/Forms/AllItems.aspx>>.
- 4 COUFAL, Pavel. *High Performance Liquid Chromatography, HPLC (přednáška v pdf)* [online]. Praha: Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta, Katedra analytické chemie, 2006. [cit. 2010-02-01].  
<<http://web.natur.cuni.cz/~pcoufal/hplcA.pdf>>.
- 5 ŠÍMA, Jan. *Vybrané kapitoly a aplikace HPLC* [online]. České Budějovice: Jihočeská univerzita, Přírodovědecká fakulta, Ústav chemie a biochemie, 2009. [cit. 2010-02-01].  
<[http://tomcat.prf.jcu.cz/sima/vybrane\\_kapitoly/kapal\\_chrom\\_vyber.htm](http://tomcat.prf.jcu.cz/sima/vybrane_kapitoly/kapal_chrom_vyber.htm)>.
- 6 BOSÁKOVÁ, Zuzana. *Vysokoučinná kapalinová chromatografie II. (přednáška v pdf)* [online]. Praha: Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta, Katedra analytické chemie, 2008. [cit. 2010-02-01].  
<<http://web.natur.cuni.cz/analchem/bosakova/hplc2.pdf>>.
- 7 KARASOV P. *Chromatografické metody – základní rozdělení a instrumentace* [online]. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Fakulta potravinářské a biochemické technologie, Ústav biochemie a mikrobiologie, 2008. [cit. 2010-02-01].  
<<http://biomikro.vscht.cz/isolacebmm/prednaska3.pdf>>.
- 8 DOUŠA, Michal. *Teorie HPLC – Adsorbenty a chemicky vázané fáze v systému kapalina-tuhá fáze (LSC)* [online]. 2009. [cit. 2010-02-01].  
<<http://www.hplc.cz/>>.
- 9 NAWROCKI J., DUNLAP C., McCORMICK A., CARR P.W. Part I. Chromatography using ultra-stable metal oxide-based stationary phases for HPLC. *J. Chromatogr. A*, 2004; 1028(1):1 – 30. Review.
- 10 Waters. *Care and use manual – Symmetry columns (soubor pdf)* [online]. Milford, MA, USA: 2008. [cit. 2010-02-01].  
<<http://www.waters.com/webassets/cms/support/docs/WAT047278.pdf>>.
- 11 NAWROCKI J., DUNLAP C., LI J., ZHAO J. Part II. Chromatography using ultra – stable metal oxide – based stationary phases for HPLC. *J. Chromatogr. A*, 2004; 1028(1):31 – 62. Review.
- 12 GANTENBERG, Marcus, Shimadzu Europa GmbH. *Specification Sheet – DGU-20/20A<sub>5</sub> (soubor pdf)* [online]. Duisburg, 2006. [cit. 2010-02-01].  
<[http://www.shimadzu.eu/specs/spec\\_dgu-20a35\\_a01.pdf](http://www.shimadzu.eu/specs/spec_dgu-20a35_a01.pdf)>.

- 
- 13 GANTENBERG, Marcus, Shimadzu Europa GmbH. *Specification Sheet – LC-20AD (soubor pdf)* [online]. Duisburg, 2006. [cit. 2010-02-01].  
< [http://www.shimadzu.eu/specs/spec\\_lc-20ad\\_a01.pdf](http://www.shimadzu.eu/specs/spec_lc-20ad_a01.pdf)>.
  - 14 LUDWIG, Robert, Shimadzu Europa GmbH. *Specification Sheet – SIL-20A /20AC (soubor pdf)* [online]. Duisburg, 2006. [cit. 2010-02-01].  
< [http://www.shimadzu.eu/specs/spec\\_sil-20ac\\_a01.pdf](http://www.shimadzu.eu/specs/spec_sil-20ac_a01.pdf)>.
  - 15 Shimadzu Scientific Instruments. *Product – CBM-20A/CBM-20Alite* [online]. 2009. [cit. 2010-02-01].  
< <http://www.ssi.shimadzu.com/products/product.cfm?product=cbm-20>>.
  - 16 LUDWIG, Robert, Shimadzu Europa GmbH. *Specification Sheet – SPD-M20A (soubor pdf)* [online]. Duisburg, 2006. [cit. 2010-02-01].  
< [http://www.shimadzu.eu/specs/spec\\_spd-m20a\\_a01.pdf](http://www.shimadzu.eu/specs/spec_spd-m20a_a01.pdf)>.
  - 17 GANTENBERG, Marcus, Shimadzu Europa GmbH. *Specification Sheet – CTO-20A/20AC (soubor pdf)* [online]. Duisburg, 2006. [cit. 2010-02-01].  
< [http://www.shimadzu.eu/specs/spec\\_cto-20ac\\_a01.pdf](http://www.shimadzu.eu/specs/spec_cto-20ac_a01.pdf)>.
  - 18 HEGERD. *Kvalitativní analýza v chromatografii - Úloha č. 1* [online]. 2005. [cit. 2010-02-01].  
< [http://cheminfo.chemi.muni.cz/chem\\_sekce/predmety/C7300/GC/kvalita\\_gc.pdf](http://cheminfo.chemi.muni.cz/chem_sekce/predmety/C7300/GC/kvalita_gc.pdf)>.
  - 19 LÜLLMANN H., MOHR K., *et al. Farmakologie a toxikologie*. Překlad 15., zcela přepracované vydání. Praha: Grada, 2004. 725 s. ISBN 8024708361, 9788024708362.
  - 20 LINCOVÁ D., FARGHALI H., *et al. Základní a aplikovaná farmakologie*. 2. vydání. Praha: Galén, 2007. 672 s. ISBN 978-80-7262-373-0.
  - 21 FLIEGER M., WURST M., SHELBY R. Ergot alkaloids – Sources, Structures and Analytical Methods. *Folia microbiol. (Praha)*, 1997; 42(1):3 – 29. Review.
  - 22 KRSKA R., STUBBINGS G., MACARTHUR R. Simultaneous determination of six major ergot alkaloids and their epimers in cereals and foodstuffs by LC–MS–MS. *Anal. Bioanal. Chem.*, 2008; 391:563–576.
  - 23 MOHAMED R., GREMAUD E., RICHOZ-PAYOT J. Quantitative determination of five ergot alkaloids in rye flour by liquid chromatography–electrospray ionisation tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A*, 2006; 1114 (1):62–72.
  - 24 United States Pharmacopoeial Convention. *United States Pharmacopoeia 32 National Formulary 27*. USP, 2008. ISBN-13: 9781889788692.
  - 25 MARIGNY K., LOHEZIC – LEDEVEHAT F., AUBIN F. Stability of oral liquid preparations of methylergometrine. *Pharmazie*, 2006; 61 (8):701 – 5.
  - 26 DE GROOT A. N. J. A., VREE T. B., HOGERZEIL H.V. Stability of oral oxytocics in tropical climates – Results of simulation studies on oral ergometrine, oral methylergometrine, buccal oxytocin and buccal desamino-oxytocin. World Health Organization, Geneva: *WHO/DAP/94.13*. 1994. [cit. 2010-02-01].  
<<http://apps.who.int/medicinedocs/en/d/Js2231e/>>

- 
- 27 Advanced Chemistry Development (ACD), Software Solária V 8.14 (1994 – 2009).
- 28 Council of Europe (COE) - European Directorate for the Quality of Medicines.  
*European Pharmacopoeia 5.0 (Ph.Eur. 5.0) – Volumes I and II.*  
London: The Stationery office/Tso, 2004. ISBN 9789287152817.