

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ
KATEDRA ANALYTICKÉ CHEMIE

RIGORÓZNÍ PRÁCE

Optimalizace HPLC separace
bazických látek ze skupiny
betablokátorů - využití nových typů
stacionárních fází.

Hradec Králové, 22.11.2010

Mgr. Antonín Svoboda

PODĚKOVÁNÍ

Děkuji PharmDr. Lucii Novákové, Ph.D. za odborné vedení, velkou ochotu pomoci při objevování vědeckého poznání a hledání výsledků, při realizaci i následném zpracovávání této rigorózní práce. Velice děkuji za její velmi vstřícný přístup a za mnoho věnovaného času! Mé poděkování patří i všem kolegům na Katedře analytické chemie, kteří mi byli významnou odbornou i lidskou oporou.

Motto:

Hledáme, abychom nacházeli, ale nacházíme, abychom hledali - tedy hledáme, abychom hledali. (sv. Augustýn)

ABSTRAKT

Univerzita Karlova v Praze

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra: **Katedra analytické chemie**

Kandidát: Mgr. Antonín Svoboda

Konzultant: PharmDr. Lucie Nováková, Ph.D.

Název rigorózní práce:

Optimalizace HPLC separace bazických látek ze skupiny betablokátorů – využití nových typů stacionárních fází

Betablokátory jsou farmakologicky účinné látky, které působí na betaadrenergní systém v lidském těle. Jako léky jsou používány ve více indikacích, zejména na léčbu hypertenze a srdeční arytmie. Chemicky se jedná o bazické převážně nepolární molekuly. V této práci byla vyzkoušena separace 7 betablokátorů pomocí HPLC – vysokoúčinné kapalinové chromatografie na různých stacionárních fázích. Byly hledány optimální podmínky pro separaci zkoumaných látek změnami ve složení a pH mobilní fáze nebo v gradientové eluci. Různé separační podmínky byly srovnány v parametrech retence, rozlišení a symetrie píků. Nalezené podmínky byly hodnoceny testem způsobilosti systému.

Výsledky byly vyhovující na analytických kolonách Zorbax Eclipse XDB s upravenou stacionární fází C18. Analytická kolona Zorbax Extend C18 s dvojitým endcappingem a bidentátovou vazbou poskytla uspokojivé výsledky při pH 7,4, ale při pH 10 již došlo k výraznému chvostování píků a analýza při vyšším pH nebyla proto vhodná. Hybridní stacionární fáze (Gemini a X-Bridge) umožnily analýzu s dobrými výsledky i při vyšším pH (pH 10). Zejména na analytické koloně X-Bridge bylo dosaženo vynikajících výsledků s nejlepší symetrií píků při pH 10. Velmi dobré výsledky separace byly také zaznamenány na monolitickém sorbentu Chromolith C18. Při zachování účinné separace byla výrazně snížena doba analýzy.

Celkově nejlepší výsledky v širokém rozmezí pH byly zaznamenány na hybridní stacionární fází X-Bridge, proto byla změřena opakovatelnost retenčních časů zkoumaných látek za optimálních podmínek a metoda byla přenesena z HPLC do UHPLC systému s výrazným urychlením doby analýzy.

ABSTRACT

Charles University in Prague

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department: **Department of Analytical Chemistry**

Candidate: Mgr. Antonín Svoboda

Consultant: PharmDr. Lucie Nováková, Ph.D.

Title of thesis:

Optimization of HPLC separations of basic molecules of betablockers - application of new types of stationary phases

Beta blockers are pharmaceutically active substances, which affect on betaadrenergic system of human bodies. These drugs are used for various indications, particularly for the management of hypertension and cardiac arrhythmias. The substances are chemically mostly basic non-polar compounds. In this thesis HPLC separation of seven betablockers on different stationary phases was tested. The optimal conditions for separation were found by changing composition, pH and elution mode of mobile phases. In some cases temperature was also optimized as a variable. The different conditions were compared in terms of retention, resolution and symmetry of peaks. The stationary phases were compared by System suitability test under the optimal found conditions.

The results were acceptable on the Extra Densely Bonded and Double Endcapped C18 stationary phase Zorbax Eclipse-XDB. Zorbax Extend C18 column incorporating a patented bidentate silane with double-endcapping protection enabled measurements with good results even at pH 7.4 but at pH 10 the results were impaired by tailing of the peaks. The hybrid stationary phases (Gemini and X-Bridge) enabled analysis even at higher pH. Especially on X-Bridge column it was possible to make a repeatable analysis under high pH conditions. Very good results were observed also on monolithic stationary phase Chromolith C18. The separation was efficient and the time of analysis was reduced. The best results under the different pH conditions were observed on hybrid stationary phase X-Bridge, therefore the repeatability was measured and the method transfer from HPLC method to UHPLC to speed up the analysis was performed.

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

ACN	acetonitril
ACE	acebutolol
Ar	část molekuly s aromatickým jádrem
A _s	faktor symetrie
ATE	atenolol
BB	betablokátory
BEH	hybridní sorbent s ethylenovými můstky
BOP	bopindolol
BOP-dp	degradační produkt bopindololu
C18	stacionární fáze s navázanými osmnáctiuhlíkatými řetězci
C8	stacionární fáze s navázanými osmiuhlíkatými řetězci
ČL 2009	Český Lékopis 2009
DEAE	diethylaminoethyl
DNA	deoxyribonukleová kyselina
EDMA	ethylendimethakrylát
HEMA	2-hydroxylethylmethakrylát
HETP	výškový ekvivalent teoretického patra
HILIC	chromatografie hydrofilních interakcí
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
HTLC	kapalinová chromatografie za vysoké teploty
ISA	vnitřní sympatomimetická aktivita (částečná excitace beta-receptorů převážně sympatolyticky aktivních látek)
LAB	labetalol
MET	metoprolol
MF	mobilní fáze

NYHA	funkční klasifikace srdečního selhání dle New York Heart Association
OBD	optimální hustota vazeb
PB(PBD)	polybutadien
PIN	pindolol
PL	Polymer Laboratories
PRO	propranolol
PS	polystyren
QA	kvarterní amin
R	rozlišení
RP	reverzní fáze
s.	strana
SF	stacionární fáze
SB	stable bond
SST	test způsobilosti systému
TEA	triethylamin
THF	tetrahydrofuran
tzn.	to znamená
UHPLC	ultra vysokoúčinná kapalinová chromatografie
UPLC	chromatograf firmy Waters pro UHPLC
USP	Lékopis Spojených Států Amerických
XDB	vysoká hustota vazeb

Obsah

1.	ÚVOD.....	9
2.	CÍL PRÁCE.....	10
3.	TEORETICKÁ ČÁST.....	11
3.1.	Vysokoučinná kapalinová chromatografie.....	11
3.2.	Stacionární fáze pro reverzní chromatografii.....	18
3.2.1.	Stacionární fáze na bázi silikagelu.....	20
3.2.2.	Stacionární fáze na bázi hybridní technologie.....	21
3.2.3.	Polymerní stacionární fáze.....	25
3.2.4.	Stacionární fáze na bázi oxidu zirkoničitého.....	26
3.2.5.	Stacionární fáze na bázi oxidu hlinitého.....	30
3.2.6.	Monolitické stacionární fáze.....	31
3.2.7.	Stacionární fáze modifikované betulinem.....	34
3.3.	Inovace v technologiích HPLC.....	35
3.3.1.	Urychlení analýzy kapalinové chromatografie.....	35
3.3.2.	Stacionární fáze pro UHPLC.....	36
3.3.3.	Transfer metody HPLC - UHPLC.....	40
3.3.4.	Stacionární fáze s pevným jádrem.....	41
3.4.	Betablokátory.....	42
3.4.1.	Beta - receptory adrenergního systému.....	42
3.4.2.	Terapeutické využití látek ovlivňující beta-receptory.....	43
3.4.3.	Rozdělení terapeuticky využívaných betablokátorů.....	44
3.4.4.	Chemická struktura betablokátorů.....	46
4.	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	51
4.1.	Použití standardní látky.....	51
4.2.	Příprava roztoků standardů.....	51
4.3.	Pufry.....	52
4.4.	Chromatografický systém.....	53
4.5.	Mobilní fáze.....	53
4.6.	Analytické kolony.....	54
5.	VÝSLEDKY A DISKUZE.....	56
5.1.	Analytické kolony C18 částicové.....	59
5.1.1.	Výsledky a diskuze při pH 4,5.....	59
5.1.2.	Výsledky a diskuze při pH 7,4.....	62
5.1.3.	Výsledky a diskuze při pH 10,0.....	64
5.2.	Monolitická analytická kolona Chromolith C18.....	68
5.2.1.	Výsledky a diskuze při pH 4,5.....	68
5.2.2.	Výsledky a diskuze při pH 7,4.....	73

5.3.	Betulinová analytická kolona	75
5.3.1.	Výsledky a diskuze při pH 4,5 a 7,4.....	75
5.4.	Zirkoniové analytické kolony	77
5.4.1.	Výsledky a diskuze.....	77
5.5.	Analytická kolona Gemini	78
5.5.1.	Výsledky a diskuze při pH 4,5.....	78
5.5.2.	Výsledky a diskuze při pH 7,4.....	81
5.5.3.	Výsledky a diskuze při pH 10,0.....	82
5.6.	Analytická kolona X-Bridge	86
5.6.1.	Výsledky a diskuze při pH 4,5.....	86
5.6.2.	Výsledky a diskuze při pH 7,4.....	87
5.6.3.	Výsledky a diskuze při pH 10,0.....	89
5.7.	Výsledky na analytické koloně UPLC BEH Acquity C18	94
6.	ZÁVĚR	97
7.	LITERATURA	100

1. ÚVOD

Betablokátory jsou látky odvozené od molekuly isoprenalinu a působí v lidském organismu antagonisticky na betaadrenergních receptorech. První betablokátory byly objeveny na přelomu 50. a 60. let 20. století a pro jejich farmakologické účinky byly využity v léčbě anginy pectoris. V roce 1964 byly publikovány důkazy antihypertenzního účinku prvního terapeuticky významného betablokátoru propranololu. Za objev betablokátorů byla v roce 1988 udělena Nobelova cena Siru Jamesi Blackovi. Betablokátory jsou i v současnosti hojně využívány v léčbě hypertenze, určitých typů arytmií nebo srdečního selhání. Betablokátory se liší selektivitou vůči jednotlivým typům a podtypům adrenergních receptorů. Terapeuticky nejvíce používaný je metoprolol. Jeho účinky a terapeutický přínos je dokladován velkým množstvím klinických studií.

Naprostá většina používaných betablokátorů jsou látky lipofilní povahy. V této práci byly zkoumány acebutolol, atenolol, bopindolol, labetalol, metoprolol, pindolol a propranolol. Atenolol je zástupce hydrofilní povahy, chemicky se jedná o acetamid. Bopindolol je chemickou povahou ester, není dostatečně stabilní, dochází u něj k hydrolýze esterové vazby.

Separace betablokátorů pomocí reverzní kapalinové chromatografie je velmi vhodnou metodou zejména pro lipofilní zástupce této terapeuticky významné skupiny léčiv. Metodou HPLC může být současně analyzováno více betablokátorů nebo mohou být analyzovány betablokátory a jiné molekuly látek ze skupiny antihypertenziv, například ze skupiny blokátorů kalciových kanálů.

2. CÍL PRÁCE

Cílem práce bylo porovnat různé separační podmínky pro směs farmaceuticky aktivních látek ze skupiny betablokátorů na různých typech sorbentů metodou HPLC. Byla hledána taková analytická metoda, která by umožnila dostatečnou separaci zkoumaných látek v jedné analýze a která by poskytovala výsledky s dostatečnou citlivostí pro všechny zkoumané látky s ohledem na přiměřenou dobu analýzy. Byly analyzovány betablokátoři různé chemické povahy, polární i nepolární molekuly. Byly zkoumány vlivy stacionární a mobilní fáze, vliv pH a u specifických analytických kolon také vliv teploty a vliv průtoku mobilní fáze analytickou kolonou.

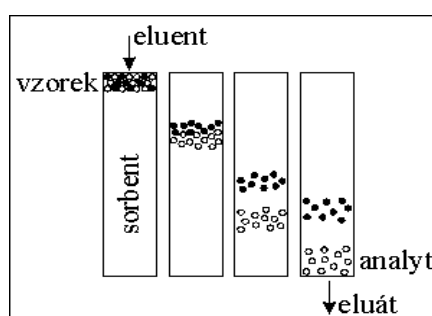
3. TEORETICKÁ ČÁST

3.1. Vysokoúčinná kapalinová chromatografie

Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC – high performance liquid chromatography) je velmi rozšířená separační analytická metoda, která poskytuje kvalitativní a kvantitativní informaci o vzorku. Využívá distribuce látek mezi dvě fáze – mobilní (pohyblivou, kapalnou) a stacionární (nepohyblivou, pevnou). (1)

Vzorky látek rozpuštěné ve vhodném rozpuštědle jsou nadávkovány do systému za určitého průtoku mobilní fáze pod vysokým tlakem. Na chromatografické koloně dochází k dělení směsi na jednotlivé složky. Rozdílné analyty mají různou afinitu k sorbentu, tzn., že jsou jím různě zadržovány, jak je znázorněno na Obrázku 1. Stacionární fáze je definována jako nepohyblivý materiál naplněný do chromatografické kolony. Mobilní fáze má odlišný charakter než stacionární a jednotlivé látky mají vyšší afinitu k jedné nebo ke druhé fázi. Interakce analytů s mobilní a stacionární fází může být ovlivňována změnami ve složení jak mobilní fáze, tak obměnou různých typů stacionárních fází. Výsledkem je velmi široká rozmanitost chromatografických systémů a jejich schopnost separovat široké množství chemických směsí. (1,2)

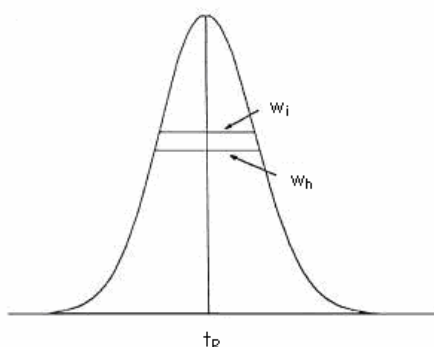
Obrázek 1 Princip separace v kapalinové chromatografii (1)



Po průchodu analytickou kolonou jsou látky detekovány vhodným detektorem a je změřena doba retence látek na analytickém sorbentu. Separace látek je vyhodnocena pomocí chromatogramu, který představuje grafický nebo jiný záznam odezvy detektoru, koncentrace eluované látky nebo jiné veličiny použité jako měřítko této koncentrace v závislosti na čase, objemu nebo vzdálenosti. Idealizovaný chromatogram představuje řada gaussovských píků na základní linii. Pík může být definován plochou píku (A) nebo výškou píku (h) a šířkou píku (w , w_1 - šířka píku v bodě inflexe, w_h - šířka píku

v poloviční výšce). Měření šířky píku je znázorněno na Obrázku 2. Významný je i tvar píku, jak moc se liší reálný pík od ideálního gaussovského píku. (1,2,3)

Obrázek 2 Znázornění charakteristik chromatografického píku. (4)



Retenční charakteristiky

Retenční čas (t_r) je důležitou kvalitativní charakteristikou látky a je definován jako vzdálenost podél základní linie od bodu nástřiku ke kolmici spuštěné z vrcholu píku odpovídající dané látce. (1,4)

Retenční čas je možné také definovat jako čas, který látka setrvá v separační koloně. Závisí na distribuci látky mezi MF a SF. Při hledání MF volíme takové složení, aby látky kolonu neopouštěly ani příliš brzy (a nedaly se tak jednotlivé odezvy látek od sebe odlišit) ani příliš pozdě (neboť potom dochází ve značné míře k difúzi látky). Látky s nízkou retencí by měly kolonu opustit s určitým časovým odstupem od tzv. mrtvého objemu, tedy objemu, který projde od nástřiku kolonou k detektoru, aniž by byl na koloně zadržován. Jeho množství přibližně odpovídá poloze prvního píku na chromatogramu, který přísluší rozpouštědлу vzorků. Píky málo zadržovaných látek jsou ostré. Naopak pokud jsou látky na koloně zadržovány příliš dlouho, dojde k většímu rozptylu látky na koloně a detektorem prochází delší dobu v nižší koncentraci, což vede k neostrému píku na chromatogramu. (1,4)

Retenční objem (V_r) je vypočítán podle vzorce: (3)

$$V_r = t_r \cdot v$$

t_r – retenční čas

v – průtoková rychlost mobilní fáze

Kapacitní faktor, hmotnostní distribuční poměr nebo retenční faktor (k' , D_m) vyjadřuje míru separace látky od mrtvého retenčního času. Čím vyšší je jeho hodnota, tím více je látka zadržována na koloně, eluuje později a tím lépe je tedy oddělena od mrtvého retenčního času. (5,6)

Hmotnostní distribuční poměr je definován dle platného lékopisu vzorcem: (4)

$$D_m = K_c \frac{V_s}{V_m}$$

K_c - rovnovážný distribuční koeficient (distribuční konstanta)

V_s - objem stacionární fáze

V_m - objem mobilní fáze

Z chromatogramu lze hmotnostní distribuční poměr neboli retenční faktor určit ze vzorce (4):

$$D_m = \frac{t_R - t_M}{t_M}$$

t_R - retenční čas

t_M - mrtvý čas vyjádřený vzdáleností podél základní linie od bodu nástřiku ke kolmici spuštěné z vrcholu píku odpovídajícího nezadržované složce

Relativní retence (r)

Slouží k porovnání analýzy zkoumaného vzorku (látky) s analýzou referenčního vzorku (látky). (4)

$$r = \frac{t_{R2} - t_M}{t_{R1} - t_M}$$

t_{R2} - retenční čas sledovaného píku

t_{R1} - retenční čas referenčního píku

Účinnost chromatografického systému

Mírou účinnosti chromatografické kolony je počet teoretických pater kolony.

Zdánlivý počet teoretických pater dané kolony je dán vzorcem (4)

$$N = 5,54 \left(\frac{t_R}{w_h} \right)^2$$

t_R retenční čas

w_h šířka píku v polovině jeho výšky

Zdánlivý počet teoretických pater se mění se stanovovanou složkou, analytickou kolonou a retenčním časem. (4)

výškový ekvivalent teoretického patra (HETP – height equivalent to a theoretical plate) je důležitý pro porovnávání analytických kolon různé délky a je vyjádřen vzorcem (1,7)

$$H = \frac{L}{N} = \frac{L}{5,54} \times \left(\frac{w_h}{t_R} \right)^2$$

L délka kolony

N zdánlivý počet teoretických pater

w_h šířka píku v polovině jeho výšky

t_R retenční čas

Protože závislost výškového ekvivalentu teoretického patra (H) na počtu teoretických pater je nepřímo úměrná, menší hodnoty H značí vyšší účinnost analytické kolony.

Van Deemterova teorie

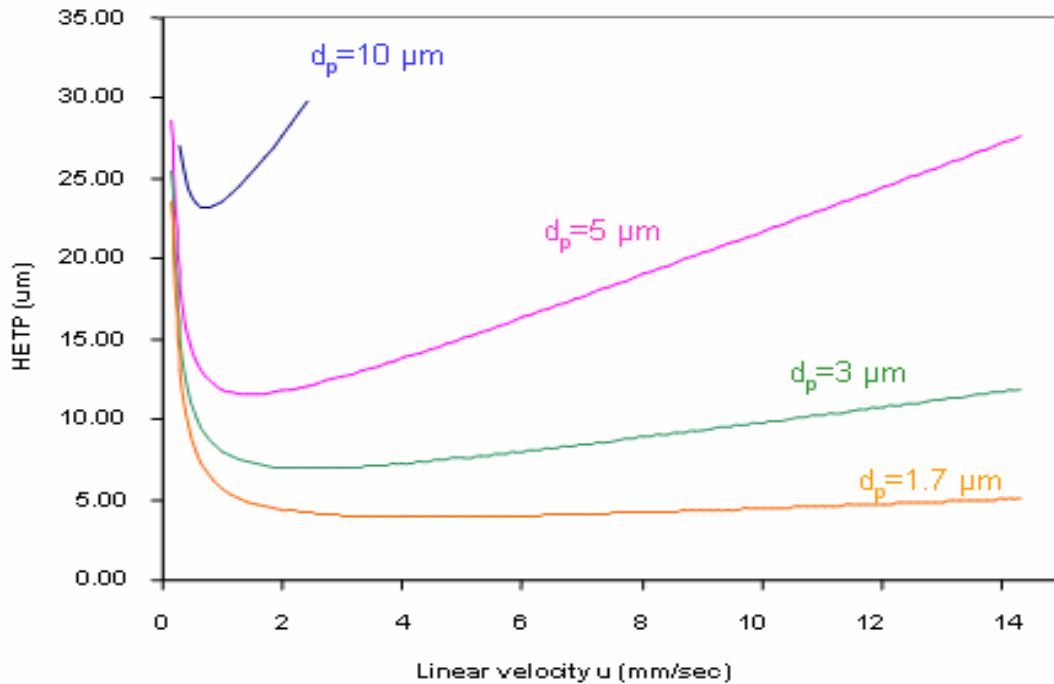
Van Deemterova teorie umožňuje popsat děje, které přispívají k rozmývání zón separovaných látek. (1,2,8)

Příčiny rozšiřování zón jsou:

1. Vířivá difúze
 - různé molekuly musí urazit různé vzdálenosti
2. Podélná molekulární difúze
 - molekuly putují z místa o vyšší koncentraci do místa o nižší koncentraci
3. Odpor proti převodu hmoty ve stacionární fázi
 - různé molekuly difundují různě hluboko do stacionární fáze
4. Odpor proti převodu hmoty v mobilní fázi
 - rychlostní profil mobilní fáze uvnitř kanálku je parabolický

Tvar van Deemterovy křivky závisí na velikosti částic, jak je znázorněno na Obrázku 3.

obrázek 3 Tvar van Deemterovy křivky v závislosti na velikosti částic. (8)



Účinnost analytické kolony vyjádřená výškovým ekvivalentem teoretického patra (HETP) závisí na lineárním průtoku mobilní fáze a je ovlivněna velikostí částic stacionární fáze. (8,9)

Rozlišení

Rozlišení je mírou separace mezi píky dvou látek. Látky, které mají podobnou retenci na analytické koloně při dané analytické metodě, mohou být nedostatečně separovány a při detekci nejsou na chromatogramu zaznamenány dva zcela oddělené píky. Rozdělení píků na základní linii odpovídá rozlišení větší než 1,5, což je také minimální lékopisné rozlišení pro splnění požadavků SST. (4,10)

Rozlišení mezi píky dvou složek se může vypočítat podle vzorce: (4)

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

kde $t_{R2} > t_{R1}$

t_{R1}, t_{R2} – retenční časy

w_{h1}, w_{h2} – šířky píků v poloviční výšce

Rozlišení píků ovlivňuje řada faktorů (1,10)

faktor účinnosti

- a) rychlost toku MF
- b) délka kolony
- c) průměr kolony, teplota, viskozita

faktor selektivity (poměr retenčních faktorů sousedních píků)

- a) změna SF
- b) změna MF
- c) rychlost toku MF

faktor kapacity

- a) množství SF
- b) změna SF nebo MF
- c) teplota

Symetrie píku

Při separaci může docházet k nestejnému zadržování molekul téže látky a následně k detekci nesymetrické odezvy. Faktor symetrie se vypočítá podle vzorce: (4)

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

$w_{0,05}$ – šířka píku v jedné dvacetině jeho výšky

d - vzdálenost mezi kolmicí spuštěnou z vrcholu píku a vzestupnou částí píku v jedné dvacetině jeho výšky

Ideální pík je symetrický, hodnota faktoru symetrie je rovna 1,0. Podle tvaru píku je rozlišováno chvostování píku (tailing), kdy je faktor symetrie vyšší než 1,0 a pík je na chromatogramu „rozmytý vzadu“ (s chvostem), a frontování (fronting), kdy je faktor symetrie nižší než 1,0 a pík je „rozmytý vpředu“. Pro splnění SST musí být faktor symetrie v rozmezí 0,8 – 1,5. (1,2,4)

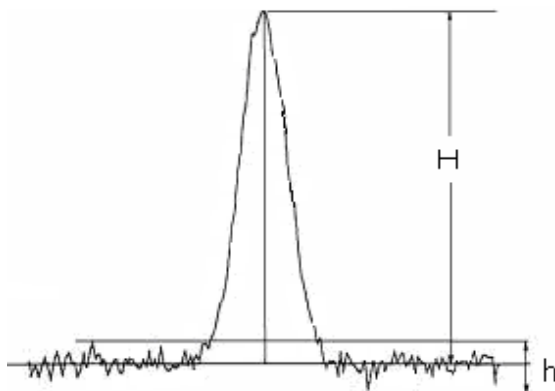
Poměr signálu k šumu

Poměr signálu k šumu (S/N) se používá zejména k výpočtům parametrů citlivosti chromatografického systému, limitu detekce a limitu kvantifikace. Poměr signálu k šumu je znázorněn na Obrázku 4 a vypočítá se ze vzorce: (4)

$$\frac{S}{N} = \frac{2H}{h}$$

- H – výška píku odpovídajícího dané látky na chromatogramu předepsaného porovnávacího roztoku měřená od vrcholu píku k extrapolované základní linii signálu, který se sleduje ve vzdálenosti rovné dvacetinásobku šířky píku v polovině jeho výšky
- h - rozpětí šumu pozadí na chromatogramu získaného při slepé zkoušce a zaznamenávaného na vzdálenosti rovné dvacetinásobku šířky píku v polovině jeho výšky na chromatogramu předepsaného porovnávacího roztoku, pokud možno rovnoměrně na obě strany od místa, kde by se měl nacházet sledovaný pík.

obrázek 4 Určení poměru signálu k šumu. (4)



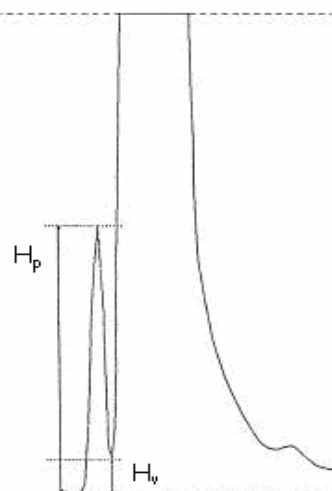
Poměr výšky píku k sedlu

Pokud pík stanovované látky není zcela oddělen od píku jiné látky na základní linii, slouží jako kritérium způsobilosti systému parametr „poměr vyšky píku k sedlu“ (p/v) (Obrázek 5): (4)

$$\frac{p}{v} = \frac{H_p}{H_v}$$

- H_p – výška píku stanovované látky nad extrapolovanou základní linií
- H_v – výška nejnižšího bodu křivky oddělující píky dvou látek (sedlo) nad extrapolovanou základní linií

Obrázek 5 Určení poměru výšky píku k sedlu.



Test způsobilosti systému

Pro hodnocení účinnosti chromatografické separace se používají výše popsané parametry: zdánlivá účinnost, retenční faktor (hmotnostní distribuční poměr), rozlišení, relativní retence a faktor symetrie. Pokud není v předpisech či požadavcích uvedeno jinak, platný lékopis vyžaduje hodnoty rozlišení $R_s > 1,5$ faktoru symetrie A_s v rozmezí 0,8 - 1,5, mez detekce píku odpovídající poměru signálu k šumu ≥ 3 a mez stanovitelnosti píku odpovídající poměru signálu k šumu ≥ 10 . Požadavky na účinnost kolony uvádí USP $N > 2000$ teoretických pater a faktor kapacity (retenční faktor) $k > 2$. (4,5)

3.2. Stacionární fáze pro reverzní chromatografii

HPLC separace jsou založeny na povrchových interakcích a významně proto závisí na typu sorbentu neboli stacionární fáze. Vzhledem k důležitosti povrchového působení jsou částice stacionární fáze malé rigidní porézní nebo monolitické částice s velkým povrchem. Nejrozšířenější jsou stacionární fáze z materiálu na bázi silikagelu, ale do popředí se dostávají polymerní, kombinované (hybridní) stacionární fáze a nové typy sorbentů umožňující analýzu ve vodném prostředí (HILIC). Jsou vyvíjeny i zcela nové sorbenty, například na bázi oxidu zirkoničitého či hlinitého. Velikost částic se zpravidla pohybuje od 1,8 do 5 μm . Menší částice sorbentu jsou výhodnější, protože tolik neklesá účinnost separace se zvýšeným průtokem. Optimální sorbent by měl umožňovat práci

v širokém rozmezí pH, být odolný vůči teplotě a rozpouštědlům, které jsou součástí mobilní fáze. (2,11)

Materiály na bázi silikagelu jsou charakteristické vysokou účinností, limitující je však rozsah hodnot pH 2 - 7, ve kterém mohou být použity. Naopak polymery jsou stabilní v širokém rozmezí pH, avšak zpravidla s nižší účinností separace oproti silikagelových sorbentům. Hybridní stacionární fáze jsou založeny na bázi polymerizovaného methylsilikonu, mají zvýšenou teplotní a pH stabilitu se zachovanou účinností a selektivitou podobnou C18 sorbentům. Chemickými obměnami SF vznikají sorbenty s větší odolností a měřicím rozsahem v širokém rozmezí pH. (11)

Základní typy stacionárních fází jsou shrnuty v Tabulce 1.

Tabulka 1 Srovnání typů stacionárních fází (12)

Typ částic stacionární fáze	Výhody	Nevýhody
Silikagel	mechanická odolnost reprodukovatelnost výsledků vysoká účinnost separace	omezený rozsah pH chemická aktivita
Polymer	širší rozsah pracovního pH chemická stabilita	nižší účinnost separace nižší mechanická odolnost menší reprodukovatelnost
Hybrid	široký rozsah pracovního pH (1-12) vyšší účinnost separace a vyšší mechanická odolnost než polymer	nižší účinnost separace než silikagel nižší kapacita než silikagel

3.2.1. Stacionární fáze na bázi silikagelu

Jedná se o nejčastěji používané materiály. Jejich hlavní omezení spočívá v limitovaném rozsahu pH 2-7. Při pH 8 – 9 dochází k jejich rozpouštění. To je jejich nevýhodou v HPLC analýze vyžadující mobilní fázi o vyšším pH. Například při stanovení bazických látek může být vhodné použití MF o vyšším pH, aby eluované látky nebyly ionizovány a byly na analytické koloně dostatečně zadržovány. Pro chromatografii na reverzní fázi jsou na silikagelové částice vázány uhlíkaté řetězce, nejčastěji s 8 (C8) nebo 18 (C18) atomy uhlíku. Mezi postranními řetězci zůstávají volné silanolové skupiny, které mohou být stále ionizovány a jsou příčinou stoupající retence a chvostování píků zejména bazických látek. Obsah reziduálních silanolových skupin bývá kolem $4 \mu\text{mol}/\text{m}^2$ a přitom typický obsah ligandových skupin se pohybuje kolem $3,5 \mu\text{mol}/\text{m}^2$, tedy obsah reziduálních skupin může být vyšší než obsah ligandů. (3,10,11)

Pro zlepšení vlastností těchto analytických kolon byly vyvíjeny různé metody:

1 **endcapping** – pokrytí volných silanolových skupin

snížení počtu volných silanolových skupin na C18 je dosaženo použitím trichlormethylsilanu, který se naváže na tyto skupiny.

2 **sterické stínění** –OH skupin

delší organické řetězce, zvýšený obsah vázaného uhlíku, nevýhodou je rostoucí retence analyzovaných látek

3 **modifikace ligandu**

začleněním polární skupiny (např. karbamátovou skupinu) do organického postranního řetězce

K dispozici je řada konkrétních komerčních analytických kolon, které využívají výše uvedené metody ke stabilizaci stacionární fáze, přesný způsob stabilizace je patentově chráněný. Pro separaci bazických látek jsou takto upravené stacionární fáze nezbytné, vhodné jsou analytické kolony, jejichž technologie umožňuje měření a dlouhodobou životnost při vyšším pH. Pro velmi rychlé analýzy s vysokým rozlišením jsou vhodné analytické kolony se stacionární fází s částicemi s průměrem do $2 \mu\text{m}$. (2)

Dále je uveden přehled základních typů analytických kolon Zorbax. Různě obměněné SF umožňují variabilní separační podmínky při zkoumání a stanovování látek různé chemické povahy. (13,14)

1 **Zorbax SB** (Stable Bond)

- modifikace spočívá ve sterickém stínění objemnými postranními skupinami - diisobutylovými (u analytických kolon C18) respektive diisopropylovými (u C8, C3, Phe, CN řetězců)
- dobrá životnost, teplotní a chemická stabilita pro kyselou oblast pH 1 – 6

2 **Zorbax Eclipse XDB** (Extra Density Bonded)

- stabilita díky vyšší hustotě navázání postranních řetězců a dvojitému endcappingu
- vhodné pro oblast pH 2 – 9, rozšířeno pro bazickou oblast (pH 7 - 9)

3 **Zorbax Extend**

- dvojitý endcapping ochraňuje kolonu při vyšším pH (až do pH 11,5)
- odolnost je zvýšena tzv. bidentátovou vazbou
- vhodné pro bazické látky, pro látky s nízkým retenčním časem v kyselém prostředí a nebo pro látky lépe rozpustné při vyšším pH
- výrobce doporučuje např. pro analýzu bazických peptidů a proteinů metodou LC/MS

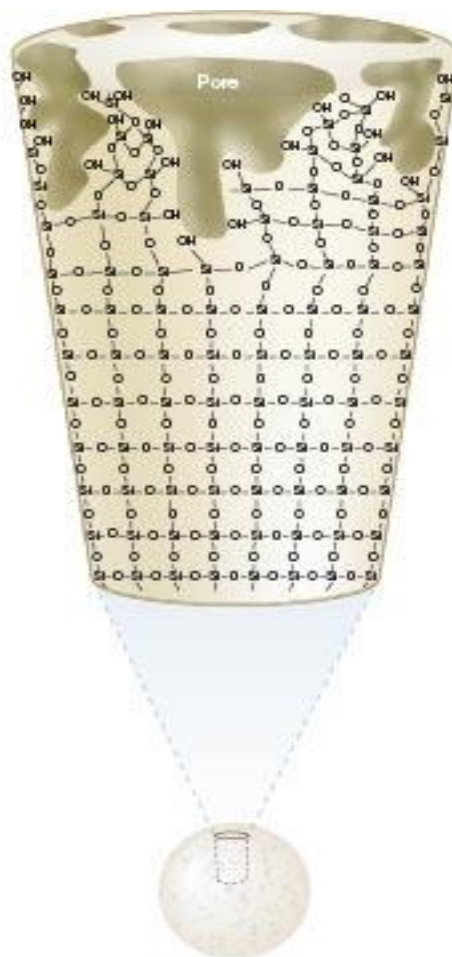
3.2.2. Stacionární fáze na bázi hybridní technologie

Hybridní stacionární fáze obsahují podíl anorganické složky (silikagel) i organické (organosiloxany), poskytující výhody obou materiálů. Při zachování vysoké účinnosti je zvýšena chemická, mechanická a termální odolnost těchto stacionárních fází. Počet volných silanolových skupin je minimálně o třetinu nižší ve srovnání se silikagelovou stacionární fází. Proto dochází k podstatně slabším interakcím – což se projeví zejména v bazickém prostředí, kdy jsou silanolové skupiny ionizovány. Hlavní výhodou hybridních sorbentů je tedy možnost analýzy v širokém rozsahu pH. Hybridní stacionární fáze jsou vhodné pro detekci a stanovení léčiv – tedy látek převážně bazické povahy. (11)

Analytická kolona Gemini (Phenomenex)

Analytická kolona Gemini je vytvořená tzv. twin technologií. Twin je zkratka z anglického two in one. Jedná se o analytickou kolonu na bázi silikagelu, která může pracovat v rozmezí pH 1-12 při zachování účinnosti a životnosti kolony. Odolnost stacionární fáze je dána organickou složkou na povrchu, zatímco vysoká účinnost je dána silikagelovým jádrem, ke kterému se analyzované látky dostanou díky četným pórům ve struktuře povrchové vrstvy. Struktura hybridní částice je znázorněna na Obrázku 6. Z již používaných aplikací je uvedeno stanovení estradiolu (dle USP), lokálních anestetik, kofeinu a cefalosporinových antibiotik. (12)

obrázek 6 Struktura hybridní částice získaná twin technologií firmy Phenomenex (12)



Analytická kolona Pathfinder (Shimadzu)

Analytická kolona Pathfinder využívá technologii polymerní enkapsulace. Spojuje výhody chemicky inertního (pH stabilního) polymeru a vysoce účinného a tlakově stabilního silikagelu. Polymerní složkou jsou sníženy interakce silanolových skupin, analytická kolona je vhodná pro analýzu kyselých i bazických látek. Výrobce nabízí více druhů stacionárních fází, přesné chemické modifikace však nejsou výrobcem zveřejněny. (15)

Pathfinder AP je fáze určená pro separace při podmínkách se sterickou selektivitou. Vnější část je primárně hydrofobní (C18), ale v blízkosti povrchu se nacházejí i hydrofilní skupiny (C=O).

Pathfinder AS je optimalizovaná jako klasická C18. Vhodná jako výchozí analytická kolona při vývoji analytické metody.

Pathfinder EP je vhodná pro separaci polárních látek, zejména v kyselém prostředí. Na povrchu jsou přítomny funkční skupiny NH₂.

Pathfinder MR obsahuje hydrofilní vnější část (funkční skupiny NH₂). Analytická kolona je vhodná pro polární látky, aminy, proteiny či peptidy.

Analytická kolona X-TERRA (Waters)

Analytická kolona je používána pro separace kyselých, neutrálních i bazických látek. Stabilita sorbentu je dána patentově chráněnou technologií OBD (optimal bed density), chemie sorbentu je znázorněna na Obrázku 7. K výhodám uváděných výrobcem patří vysoká separační účinnost při velké chemické a mechanické odolnosti sorbentu s rozsahem měření při pH 1-12. (16)

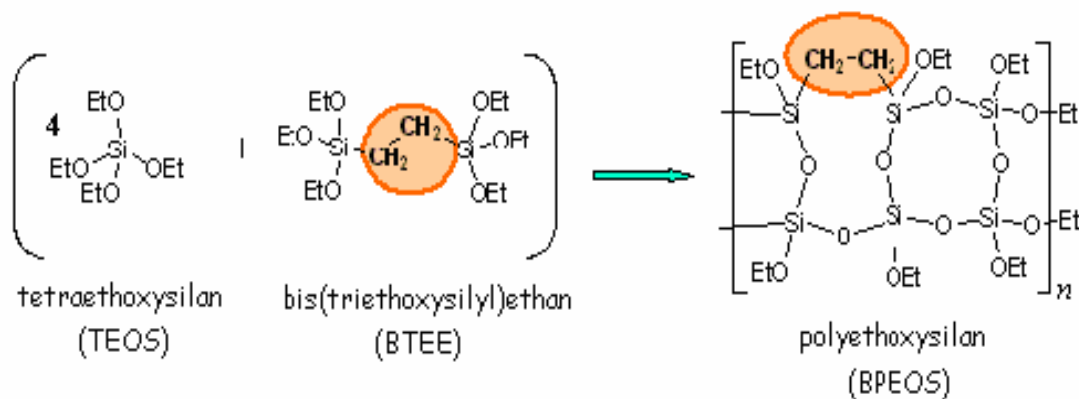
obrázek 7 Struktura částice hybridního sorbentu X-Terra.



Analytická kolona X-Bridge (Waters)

Tento sorbent vychází ze sorbentu X-Terra, proto lze v literatuře najít i označení X-Terra 2. generace, a využívá patentově chráněnou BEH technologii (bridged ethyl hybrid) znázorněnou na Obrázku 8. Tyto sorbenty mají výbornou tlakovou odolnost a byly vyvinuty rovněž k použití pro UHPLC. (17)

obrázek 8 Struktura částice sorbentu X-Bridge. (2)



Pro zvýšení separační účinnosti byla stacionární fáze Acquity BEH vyvinuta s částicemi o velikosti 1,7 μm . Jak vyplývá z Van Deemterovy teorie, separace na této stacionární fázi by měla mít vyšší účinnost i rozlišení. (9,16)

Na stacionární fázi X-Bridge mohou být navázány různé funkční skupiny. K dispozici jsou analytické kolony s vázanou C18 a C8 stacionární fází s endcappingem. Stacionární fáze Shield RP C18 obsahuje vložené polární skupiny s uplatněním při separacích v bazické oblasti pH. Pro analyty s aromatickým jádrem je k dispozici stacionární fáze s fenylovým ligandem, který je na silikagel navázán C6 alkylovým spojovacím řetězcem. (16,17)

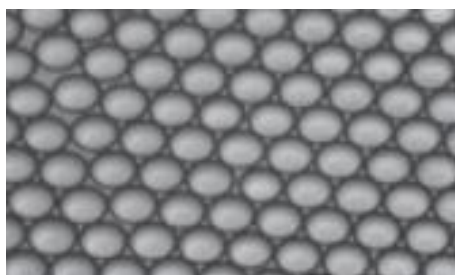
Ve farmaceutickém průmyslu a kontrole je velmi žádoucí taková stacionární fáze, která umožňuje robustní a stabilní analytické výsledky při různých podmínkách (např. při měření o různém pH mobilní fáze). Analytická kolona X-Bridge má dlouhou životnost v kyselé i bazické oblasti pH při zachování účinnosti typické pro silikagelové stacionární fáze. (18)

3.2.3. Polymerní stacionární fáze

Polymerní stacionární fáze se vyznačují velkým adsorpčním povrchem a stabilitou v širokém rozmezí pH 1 - 14 a teplotní stabilitou až do 200°C. Polymerní analytické kolony lze snadno regenerovat nebo sterilizovat. Nevýhodou polymerních stacionárních fází je, že jejich částičky obsahují mikropóry o velikosti asi 1 nm, což neumožňuje převod hmoty u malých molekul. Maximální pracovní tlak na koloně je pro polymerní sorbenty do 20 MPa. Stabilita polymerních stacionárních fází je omezena stabilitou funkčních skupin polymeru. Další nevýhodou polymerních fází je závislost jejich účinnosti na organické složce mobilní fáze. Vhodné jsou MF s obsahem THF nebo ACN. Naopak špatnou separaci poskytuje MF methanol/voda. Pro úpravu pH lze použít širokou škálu pufrů. Důležitou vlastností polymerového sorbentu je zesíťování. Čím více je zesíťovaný, tím tvrdší, ale křehčí je polymer. (11,19,20)

Mezi polymerní stacionární fáze patří zejména sorbenty na bázi polystyren-divinylbenzenu nebo polymethakrylátové sorbenty. Polymerní sorbenty našly své uplatnění i v monolitické technologii. Polymerní stacionární fáze pod mikroskopem je znázorněna na Obrázku 9. Přehled dostupných analytických kolon s polymerní stacionární fází je uveden v Tabulce 2. (12,20,21,22,23)

Obrázek 9 Struktura monodisperzní polymerní stacionární fáze analytické kolony Hi-Plex pod mikroskopem.



Tabulka 2 Přehled dostupných analytických kolon s polymerní SF

Analytická kolona	výrobce	Chemie SF	rozsah pH	aplikace
Polymer X	Phenomenex	polystyrendivinylní benzen	1 - 13	tetracykliny, peptidy (bradykinin, angiotensin)
PRP	Hamilton	polystyrendivinylní benzen	1 - 13	proteiny (inzulin)
PL Hi-Plex	Varian-Polymer Laboratories	polystyrendivinylní benzen	1 - 14	organické kyseliny, sacharidy, cukerné alkoholy
apHera	Astec	vinylalkohol kopolymer s vázanými C18, C8, C4	2 - 12	peptidy, malé proteiny
Hema Separon, Hema Separon Bio	Tessek	Polymetakrylát (kopolymer HEMA +EDMA), Bio-vázané amoniové a epoxy skupiny	2 - 12	proteiny

3.2.4. Stacionární fáze na bázi oxidu zirkoničitého

Zirkoniové analytické kolony jsou stabilní v širokém rozmezí pH 1-14 a jsou rovněž stabilní za vysokých teplot (až 200°C). Zirkoniové analytické kolony mohou být uplatněny při separaci bazických látek, např. proteinů, nukleových kyselin, vzorků ze životního prostředí či řady léčiv. (24,25)

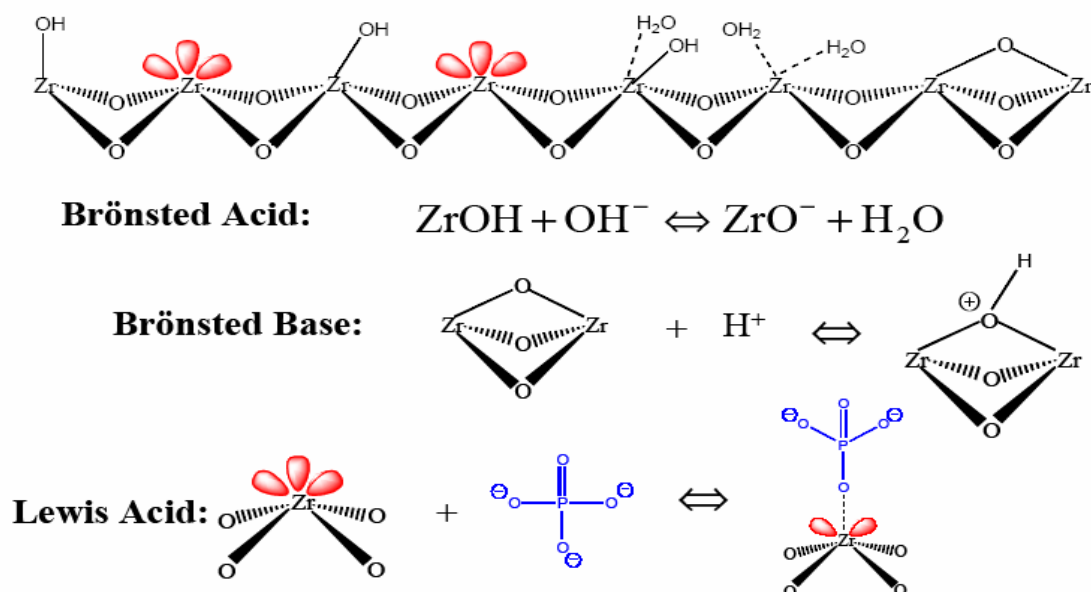
Porézní oxid zirkoničitý je kovový oxid, který může existovat v mnoha krystalických podobách nebo může být amorfní. Proto je nutná kontrolovaná polymerizace a slinutí za vysoké teploty (900°C) k získání standardního sorbentu krystalické formy oxidu zirkoničitého. Sorbent se vyznačuje obrovskou mechanickou, teplotní a acidobazickou stabilitou. (26,27)

Na rozdíl od silikagelových sorbentů je možné při použití zirkoniových kolon nastavit pH ve velmi širokém rozmezí. Výhodné je to zejména u bazických molekul, které

nejsou při vyšších hodnotách pH ionizovány. Zirkoniové částice nejsou náchylné k acidobazické hydrolyze a proto mají prakticky neomezený rozsah pH. Atom zirkonia má zcela odlišnou strukturu než atom křemíku, proto vazba Zr-O-Zr má odlišnou strukturu elektronů. Interakce s povrchem oxidu zirkoničitého probíhá na základě teorie Lewisových kyselin a zásad. Na povrchu oxidu zirkoničitého jsou tři reaktivní místa – Brønstedova kyselina, Brønstedova zásada a Lewisova kyselina (viz Obrázek 10). Na povrchu je přítomno velké množství vazebných míst typu Lewisovy kyseliny, se kterými reaguje mobilní fáze. Látky typu Lewisovy zásady s volným elektronovým párem (např. fosfátová skupina) jsou přitahovány. Silné zásady mohou být nevratně adsorbovány na povrchu sorbentu. (28,29)

Zirkoniová stacionární fáze může být modifikována navázáním tenké vrstvy polymeru (polybutadien – PBD, polystyren - PS) nebo navázáním vrstvy atomárního uhlíku (Zr-Carb). Modifikací zirkoniového povrchu kovovým chelátem, který deaktivuje místo Lewisovy kyseliny, byly vyvinuty deaktivované zirkoniové sorbenty s kompatibilitou s látkami typu Lewisových bází, ale s nižším rozsahem pH (pH 1-10). Byly vyvinuty rovněž zirkoniové sorbenty pro normální fáze a sorbenty pro iontově výměnnou chromatografii – anionaktivní nebo kationaktivní. (26,28)

Obrázek 10 Povrch zirkoniové stacionární fáze (26)



Výhody zirkoniových stacionárních fází jsou uvedeny v Tabulce 3.

Tabulka 3 Výhody sorbentu na bázi oxidu zirkoničitého (26,27,28,29)

Vlastnost zirkoniové kolony	Výhody v praktickém používání
Stabilita v širokém rozmezí pH (1-14)	Metodu lze optimalizovat s ohledem na acidobazické vlastnosti analytů
Stabilita při vyšších teplotách (150-200°C)	Možnost rychlejší analýzy
Acidobazická stabilita, jedinečná selektivita	Separace zejména bazických látek, která by jinými metodami nebyla možná nebo byla značně obtížná.
Menší drift retenčních časů	Robustnost metody

Vliv teploty na separaci

Separace na zirkoniových stacionárních fázích může probíhat za vyšší teploty, což přináší výhody z hlediska účinnosti separace. Kinetika sorpce je zvýšená, klesá retence a šířka píku. Viskozita mobilní fáze je snížena, umožňuje vyšší průtok a vyšší účinnost. Vyšší teplota nemůže být použita u teplotně citlivých sorbentů jako je silikagel s omezením maximálně do 60°C. U sorbentu na bázi oxidu zirkoničitého však může dosahovat 100°C a na speciálním přístroji až 200°C. Při analýze na zirkoniových sorbentech je doporučeno temperovat kolonu alespoň na 50°C. (29,30)

Přehled ZirChrom reverzních stacionárních fází (26,29)

Americká firma ZirChrom nabízí dva typy zirkoniových kolon, tradiční a novou řadu tzv. deaktivovaných sorbentů (modifikace kovovým chelátorem, který deaktivuje místo Lewisovy kyseliny, chemická stabilita je v rozmezí pH 1-10).

ZirChrom EZ – je deaktivovaná stacionární fáze vhodná pro kyseliny i baze, deaktivace umožňuje použití běžných aditiv pro LC/MS jako je octan a mravenčan, stále je zde velká chromatografická selektivita pro bazické látky ve srovnání s konvenční C18 stacionární fází. Kolona je stabilní v rozmezí pH 1–10, při teplotě do 50 °C

ZirChrom PS – je vhodná pro mobilní fáze s vysokým obsahem vody, alternativní k C18, je stabilní v rozmezí pH 1-13, teplota do 150 °C

ZirChrom PBD - má podobné vlastnosti jako C18 nebo C8, je vhodná pro bazické látky, zejména neiontové povahy, pro zlepšení tvaru píků je výhodné používat fosfátový pufr, stabilní v rozmezí pH 1-14, teplota do 150 °C

ZirChrom CARB – je vhodná pro separace diastereomerů, geometrických izomerů, selektivita je bližší fázi fenylové a kyanové než C18, stabilní v rozmezí pH 1-14, teplota do 200 °C

ZirChrom MS – je deaktivovaná stacionární fáze selektivitou podobná C18, vhodná pro spojení s LC-MS pro separaci farmaceuticky aktivních látek odlišné acidobazické povahy.

Zirkoniové analytické kolony firmy **Sigma-Aldrich** (25)

Firma Sigma-Aldrich vyrábí analytické kolony Discovery se sorbentem na bázi oxidu zirkoničitého. Na sférických, porézních částicích o velikosti 3 a 5 µm jsou navázány čtyři typy stacionárních fází (Zr-PBD, Zr-PS, Zr-Carbon, Zr-CarbonC18).

Discovery Zr-PBD

Částice ZrO₂ jsou pokryty polybutadienem. Sorbent je svými separačními vlastnostmi nejvíce podobný oktadecylovým kolonám se silikagelovým nosičem. Na rozdíl od nich má ale výhodu v tepelné a pH stabilitě. Je určena pro separace bází, především aminů.

Discovery Zr-PS

Částice ZrO₂ jsou pokryty zesíťovaným polystyrenem. Fáze je určena pro analýzy hydrofobních látek, pro látky bazické (aminy), pro mobilní fáze s nízkým obsahem organických rozpouštědel. Doporučuje se jako alternativa k oktadecylové fázi (C18).

Discovery Zr-Carbon

Částice ZrO₂ jsou pokryty souvislou vrstvou uhlíku. Fáze je určena pro RP separace geometrických izomerů a diastereomerů. Povrch je vysoce hydrofobní, takže je vlastnostmi velice podobný grafitizovanému uhlíku. Nedoporučuje se pro analýzu aromatických sloučenin s planární strukturou, které jsou zadržovány příliš silně.

Discovery Zr-CarbonC18

Částice ZrO₂ jsou pokryty souvislou vrstvou uhlíku. Uhlíková vrstva je následně modifikována kovalentně vázanými oktadecylovými skupinami. Tato fáze je hodnocena jako univerzální, ideální pro separace látek kyselých, bazických i neutrálních. Její selektivita je naprosto odlišná od oktadecylových kolon se silikagelovým nosičem.

3.2.5. Stacionární fáze na bázi oxidu hlinitého

Oxid hlinitý (Alumina) je anorganická krystalická látka se specifickým povrchem 100 až 200 m²/g, objemem pórů 0,2 až 0,3 ml/g a průměrem pórů 10 až 20 nm. Hydroxylové skupiny se aktivují zahříváním na 200 °C, při zahřívání nad 900 °C ztrácí oxid hlinitý aktivitu. Komerčně dodávaný oxid hlinitý jako sorbent HPLC se aktivuje při teplotě mezi 500 a 800 °C. (31)

Vedle hydroxylových skupin jsou na povrchu oxidu hlinitého centra s elektronakceptorovými vlastnostmi, které mohou vstupovat do interakce s molekulami bohatými na elektrony (Lewisovy báze). Tyto interakce jsou příčinou určitých rozdílů v selektivitě oxidu hlinitého ve srovnání se silikagelem. Primární použití SF s oxidem hlinitým je v separaci nasycených a nenasycených alifatických uhlovodíků a separaci polyaromatických uhlovodíků. Oproti silikagelu je však méně používána, protože na jeho povrchu dochází ke katalytickému štěpení a rozkladu nebo ireverzibilní adsorpci chromatografovaných látek. (32,33,34)

Pro chromatografii se nejlépe hodí neutrální oxid hlinitý, který byl připraven neutralizací kyselinou. Bazický i kyselý oxid hlinitý vykazují vlastnosti měniče iontů, což vyvolává nepříjemné komplikace při adsorpční chromatografii. (32)

K dispozici jsou analytické kolony Aluspher firmy Merck. Byla publikována separace fytosterolů a cholesterolu na analytické koloně Aluspher. Při zvýšení teploty až na 75°C se zlepšila separace sterolů, byly odseparovány zkoumané steroly podle stupně nenasycenosti. (35)

3.2.6. Monolitické stacionární fáze

Monolitické analytické kolony jsou tvořeny jedním kusem monolitního porézního materiálu. Neobsahují tedy částice jako klasické sorbenty. Mohou být založeny na bázi silikagelu nebo jiného polymeru. Mezi prvními polymerními monolitickými stacionárními fázemi byl použit polyuretan. (36,37) Následovaly polyakrylamidové, polyakrylátové a polystyrendivinylbenzenové stacionární fáze. Polymerní monolitické analytické kolony měly však nižší účinnost ve srovnání se silikagelovými analytickými kolonami. Výhodami polymerních monolitických kolon jsou možnost vyššího průtoku, rychlejší analýza a širší oblast pH pro separaci. (38)

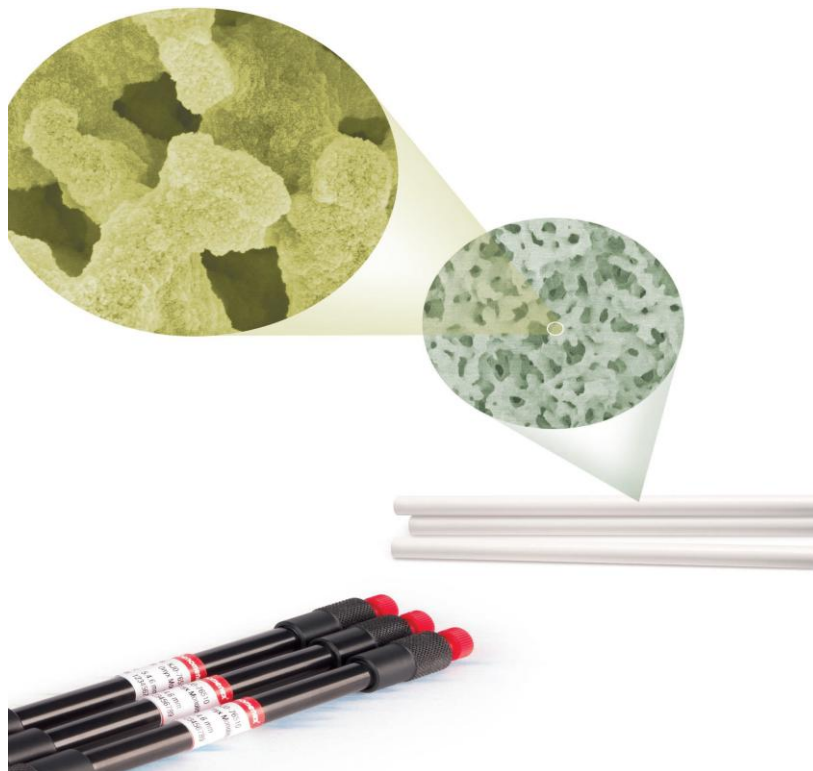
Ze silikagelu se monolity získávají polykondenzací tetraalkylsiloxanů za přítomnosti síťovadel a porogenních rozpouštědel. Sorbenty se připravují sol-gel technologií, při níž vstupní materiál ve formě roztoku je technologicky zpracován na pevnou hmotu (respektive gel). (39)

Výsledný sorbent obsahuje dva typy pórů (viz obrázek 11). Větší póry se nazývají **makropóry** (1-2 μ m) a umožňují vyšší průtok mobilní fáze, aniž by navyšovaly zpětný tlak na koloně. Menší póry se nazývají **mezopóry** (12-13 nm) a poskytují účinný povrch sorbentu pro separaci látek. Stacionární fáze sestávají z pospojovaných mikroglobulí, mezi nimiž se nachází makropóry. (40)

Při použití vyššího průtoku mobilní fáze nedochází na monolitických analytických kolonách ke ztrátě účinnosti separace ani k navýšení zpětného tlaku na koloně. Hlavní výhodou monolitických analytických kolon je tedy rychlost separace při zachování účinnosti a dobrého rozlišení píků na chromatogramu. (40,41,42,43)

Úpravami monolitické stacionární fáze lze docílit dobré životnosti při širokém rozmezí pH (pH 2-13). K dispozici jsou analytické sorbenty pro reverzní chromatografii i iontově výměnnou chromatografii. (42)

obrázek 11 Stacionární fáze monolitické analytické kolony Onyx - dva typy pórů makropóry a mezopóry. (40)



Komerčně dostupné jsou monolitické kolony firmy **Merck** dodávané pod názvem **Chromolith** ve variantách RP-18 nebo RP-8. Oba typy jsou na silikagelové bázi a jsou povrchově upravené tzv. endcappingem pro eliminaci volných silanolových skupin. Praktické využití našla analytická kolona Chromolith RP-18 při stanovení sulfonamidů, karbidopy/levodopy, alkaloidů, kofeinu či kortikoidů. Dalším typem je analytická kolona Chromolith CapRod, která je založena na koloně RP-18 se specifikací pro kapilární nebo nano-kapalinovou chromatografii. Analytická kolona Chromolith Si je určena pro separace na normální fázi. (42)

Firma **Phenomenex** dodává monolitické analytické kolony na bázi silikagelu pod značkou **Onyx**. V nabídce jsou monolitické stacionární fáze modifikované pro reverzní chromatografii řetězci C8 a C18 a zároveň chráněné endcappingem. Popsané jsou např. separace farmakologicky aktivních látek ze skupiny steroidních látek a sulfonamidů. (12)

Od firmy **Dionex** je v nabídce polymerní analytická kolona **ProSwift-RP-1S**. Je určena pro separace nízkomolekulárních peptidů a proteinů. Proteiny jsou látky s velkou molekulovou hmotností, které obtížně prochází póry tradičních sorbentů, jsou proto zadržovány a jejich píky na chromatogramech neostré. Separace na monolitické

analytické koloně s porózní stacionární fází probíhá při vyšší průtokové rychlosti a píky na chromatogramu jsou ostřejší. (44)

Pro iontově výměnnou chromatografii a separaci proteinů jsou v nabídce monolitické polymerní stacionární fáze firmy **Agilent** – analytické kolony **Bio-Monolith**. Analytické disky Bio-Monolith jsou shrnuty v Tabulce 4. (45)

Tabulka 4 Analytické disky firmy Agilent

Typ analytického disku	Funkční skupina / použití / rozsah pH
Bio-Monolith QA	Kvarterní amin, silně anionaktivní Anionvýměnná chromatografie vhodná pro biomolekuly se silnějším negativním nábojem (DNA, proteiny) Rozsah pH 2-13
Bio-Monolith DEAE	Diethylaminoethylová skupina, slabě anionaktivní Biomolekuly se slabším negativním nábojem (bakteriofág, DNA plazmidy) Rozsah pH 3-9
Bio-Monolith SO ₃	Sulfonylové skupiny, silně kationaktivní Biomolekuly s kladným nábojem (proteiny, protilátky) ⁺ Rozsah pH 2-13

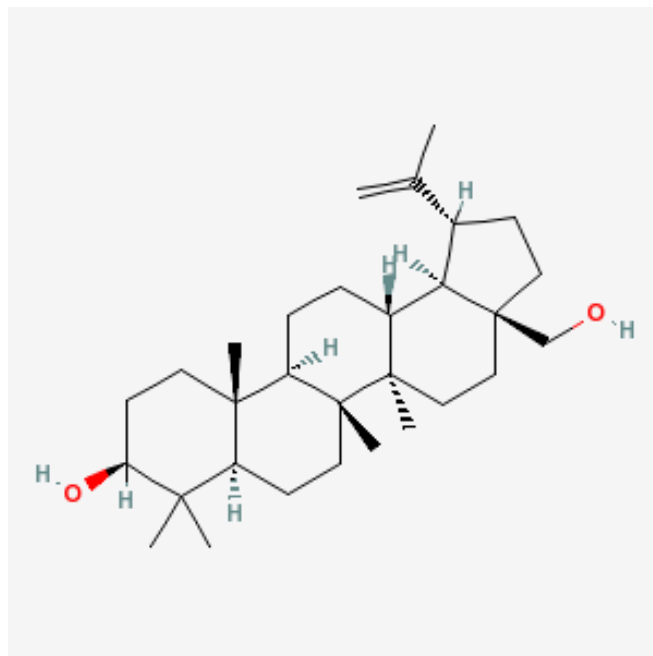
3.2.7. Stacionární fáze modifikované betulinem

Navázáním betulinu na silikagel vzniká rigidní reverzní chirální fáze. Na hydroxylových skupinách betulinu může být sorbent modifikován reakcí s fenylthiokarbamovou kyselinou. Takto modifikovaná kolona může být využita jako chirální selektor pro separaci enantiomerů. (2)

Separace enantiomerů je významná např. u farmakologicky aktivních látek, u nichž nositelem terapeutického účinku je jeden enantiomer (např. antihypertenziva, antihistaminika). Z chirálních stacionárních fází jsou často používány stacionární fáze s enzymem cellobiohydrolázou nebo antibiotikem teikoplaninem. (46)

Strukturální vzorec betulinu je znázorněn na Obrázku 12. Analytická kolona se stacionární fází tvořenou betulinem je laboratorně vyráběná stacionární fáze vyvíjená ve spolupráci s Akademií věd v Praze.

Obrázek 12 Strukturální vzorec molekuly betulinu. (47)



3.3. Inovace v technologiích HPLC

3.3.1. Urychlení analýzy kapalinové chromatografie

K urychlení analýzy při zachování nebo zlepšení účinnosti jsou zaměřeny inovace v technologiích HPLC. Již výše byla popsána monolitická stacionární fáze se dvěma typy pórů, která umožňuje navýšení průtoku mobilní fáze při zachování účinnosti. Další možností je navýšení teploty na analytické koloně. Ne všechny sorbenty jsou odolné při vyšší teplotě a také ne všechny zkoumané látky jsou termostabilní. Tzv. high temperature liquid chromatography (HTLC) je využívána k rychlejším analýzám při teplotě nad 60°C. Při vyšší teplotě je snížena viskozita mobilní fáze a zpětný tlak. (48,49)

Ke zvýšení účinnosti vede snížení velikosti částic stacionární fáze. (9,36) UHPLC využívá stacionární fáze s částicemi menšími než 2 μm , zvyšuje se počet interakcí zkoumané látky se stacionární fází, zvyšuje se tedy účinnost a také rychlost analýzy. Na druhé straně použití malých částic vede ke zvýšení zpětného tlaku. Při optimálním průtoku může stacionární fáze s velikostí částic 1,7 μm vytvořit až 27x větší zpětný tlak ve srovnání s 5 μm částicemi. Přístrojové vybavení a parametry analytických kolon musí být uzpůsobeny vyššímu tlaku při analýze. (50,51)

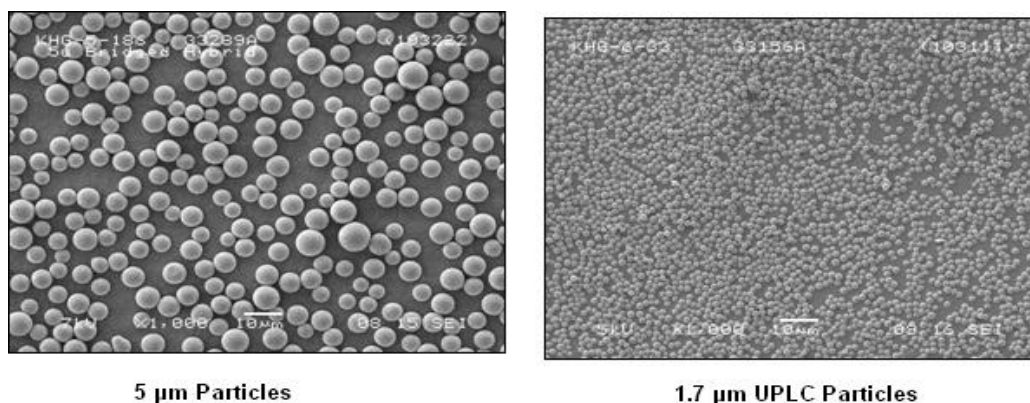
K zahřívání mobilní fáze na analytické koloně může docházet nepravidelně se vznikem radiálního a longitudinálního teplotního gradientu. Radiální teplotní gradient může snížit účinnost separace, vzhledem k rozdílné distribuci látek při rozdílné teplotě. Podélný teplotní gradient snižuje retenční faktor analyzovaných látek. Analytické kolony musí mít proto užší průměr kvůli omezení vzniku teplotních gradientů v koloně. UHPLC může být s úspěchem využita k rychlým analýzám směsi analyzovaných látek v isokratickém nebo gradientovém módu, s nízkou spotřebou mobilní fáze a nízkou spotřebou analytu se zkoumanými látkami. UHPLC oproti HPLC přináší výhody ve vyšší účinnosti, rozlišení a zrychlení času analýzy až 7x. (48,50,52)

3.3.2. Stacionární fáze pro UHPLC

UHPLC (Ultra High Performance Liquid Chromatography) je separační metoda odvozená od HPLC využívající analytických kolon o malém vnitřním průměru naplněných částicemi o velikosti menší než 2 μm k dosažení vyšší účinnosti separace a urychlení analýzy. Srovnání velikosti částic HPLC a UHPLC sorbentu je znázorněno na Obrázku 13. Pro urychlení analýzy jsou nutné úpravy chromatografického systému, jsou minimalizovány systémové objemy, je zvýšena rychlost sběru dat, jsou použity speciální kapilární spoje. Pro UHPLC se používají SF odvozené od moderních sorbentů pro HPLC, založené na upraveném silikagelovém nebo hybridním sorbentu. Výhodou hybridních stacionárních fází je chemická stabilita v široké oblasti pH. To umožňuje analýzu bazických látek při pH vyšším než je jejich hodnota pKa. (53)

K zamezení vlivu volných hydroxylových skupin silikagelu a ke zvýšení jeho mechanické odolnosti (vůči zpětnému tlaku na koloně) je použito ethylenových můstků ve struktuře sorbentu (obrázek 8).

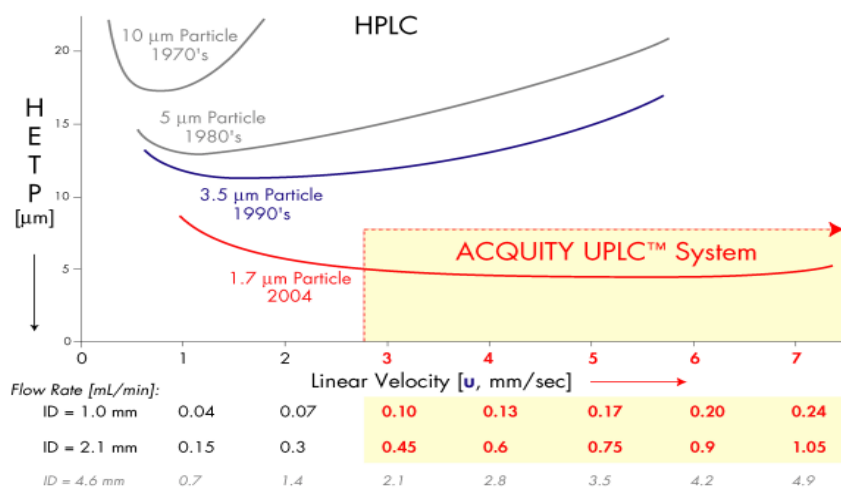
obrázek 13 Srovnání velikosti částic sorbentů používaných pro HPLC a UPLC (17)



UHPLC systém má proti HPLC výhodu v tom, že i při vyšší lineární průtokové rychlosti mobilní fáze, dosahuje vysokou separační účinnost. Téměř lineární je van Deemterova křivka pro 1,7 μm částic, které obsahuje i sorbent BEH-C18 určený např. pro UPLC Acquity.

Srovnání van Deemterových křivek u částicových sorbentů používaných v HPLC s 1,7 μm částicemi sorbentu pro UHPLC je znázorněno na Obrázku 14. (17)

obrázek 14 Vliv lineární rychlosti mobilní fáze na výškový ekvivalent teoretického patra v závislosti na velikosti částic sorbentu, srovnání HPLC a UHPLC sorbentů



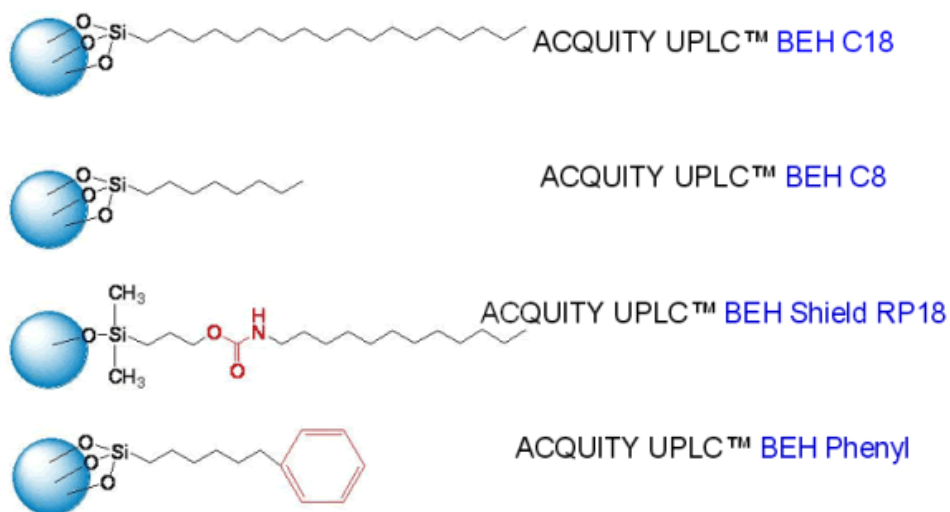
Příklady sorbentů s částicemi o velikosti průměru menší než 2 μm jsou uvedeny v Tabulce 5.

Tabulka 5 Přehled některých komerčně dostupných stacionárních fází s částicemi o velikosti menší než 2 μm , jejich rozsah pH a teploty. (53,54)

Analytická kolona	Typ stacionární fáze	Velikost částic	Rozsah pH	Teplota separace [°C]	Výrobce
Acquity BEH	hybrid	1,7	1-12	20 – 90	Waters
Acquity HSS	silikagel	1,8	2-8	20 – 45	
Pathfinder	hybrid	1,5	1-12	Až do 250	Shimadzu
Zorbax	silikagel	1,8	1-6 (Stable Bond) 2-9 (Eclipse XDB) 2-11 (Extend)	Do 60 Stable Bond 80 – 100	Agilent
Platinum	silikagel	1,5	2-8	20 – 60	Alltech
Pinnacle DB	silikagel	1,9	2,5 – 7,5	Až do 80	Restek

Stacionární fáze pro UHPLC mohou být podobně jako pro potřeby HPLC různě modifikovány pro lepší selektivitu, případně odolnost vůči různému pH mobilní fáze. Příklad obměny hybridní stacionární fáze Acquity BEH pro lepší selektivitu stacionární fáze jsou znázorněny na Obrázku 15.

obrázek 15 Druhy stacionárních fází pro UPLC kolony Acquity (17)



První komerčně dostupný přístroj s technologií UHPLC byl vyvinut firmou Waters v roce 2004. Na obrázku 16 je fotografie přístroje UPLC Acquity. Skládá se ze 4 modulů – automatického dávkovače vzorků (autosampler, sample manager), kolonového termostatu, binární pumpy (binary solvent manager) a detektoru. Volitelným modulem je organizér vzorků (sample organizer), který umožňuje zvýšení kapacity UHPLC analýz a možnost zpracování více vzorků. (16)

Obrázek 16 Chromatografy UPLC Acquity a UPLC nanoAcquity určené pro UHPLC od firmy Waters



Analytický systém nanoAcquity

Analytická kolona pro nanoAcquity je uzpůsobena separaci při velmi nízkém průtoku mobilní fáze v rozmezí od 200 nL/min do 100 μ l/min. Takto nízký průtok umožňuje zlepšení tvaru píků i jejich rozlišení. Rozšiřuje možnosti vysoce citlivých analýz v oblasti hmotnostní spektrometrie.

Uplatnění je například v identifikaci biomarkerů a separaci proteinů. (55)

3.3.3. Transfer metody HPLC-UHPLC

Přenos metod z klasické HPLC do UHPLC vyžaduje nejprve optimalizaci selektivity a účinnosti kolony pro požadovanou aplikaci. Poté dle výpočtu zvolíme délku kolony, nástřikový objem a průtok mobilní fáze. (54,56)

Pro výpočet **délky analytické kolony** lze použít vzorec: (54)

$$L_{c2} = L_{c1} \times \frac{dp_2}{dp_1}$$

L_c - délka kolony (column length)

dp - velikost částic

Vzhledem k menším částicím stacionární fáze lze při zachování účinnosti snížit délku kolony. (56)

Pro optimalizaci **nástřikového objemu** lze použít rovnice: (54)

$$V_{i2} = V_{i1} \times \frac{d_{c2}^2}{d_{c1}^2} \times \frac{L_{c2}}{L_{c1}}$$

V_i - objem nástřiku (Injection Volume)

d_c - průměr analytické kolony (Column Diameter)

L_c - délka kolony (Column Length)

Vzhledem ke snížení celkového objemu kolony je důležité, aby byla zajištěna kompatibilita rozpouštědla vzorku se složením mobilné fáze. (56)

Aby byla zachována lineární rychlost, tj. vzdálenost, kterou dosáhne mobilní fáze za časovou jednotku, musí být snížen průtok mobilní fáze, tj. objem mobilní fáze, který prochází chromatografickou kolonou za jednotku času.(56)

Nastavení **průtoku** lze vypočítat dle rovnice:

$$F_{c2} = F_{c1} \times \frac{d_{c2}^2}{d_{c1}^2}$$

F_c - průtok mobilní fáze (Column Flow)

Vzhledem k tomu, že částice o velikosti 2 μ m snesou vyšší průtok mobilní fáze ve srovnání s většími částicemi (5 μ m), může být průtok mobilní fáze zvýšen a tím může být zrychlena doba analýzy. Je možno použít i gradientovou eluci po přepočtu dle vzorce: (54)

$$t_{g2} = t_{g1} \times \frac{F_{c1} L_{c2}}{F_{c2} L_{c1}} \times \frac{d_{c2}^2}{d_{c1}^2}$$

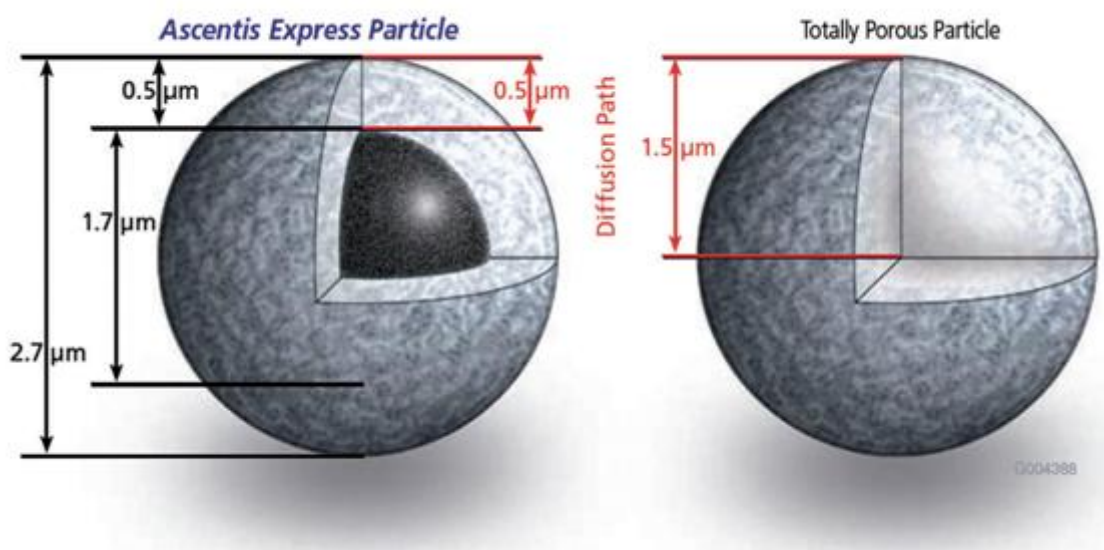
t_g - doba gradientu (Gradient Time)

3.3.4. Stacionární fáze s pevným jádrem

Stacionární fáze je tvořena pevným neporézním jádrem („fused-core“) a vrstvou porézního materiálu. Proces výroby malých částic s porézním povrchem byl představen v roce 1992 a později uveden pod firemním názvem HALO. (57,58)

Stacionární fáze byla tvořena jádrem o průměru 1,7 μm potažená 0,5 μm vrstvou porézního silikagelu, celkově tedy částice stacionární fáze byly o průměru 2,7 μm . Následovaly stacionární fáze Ascentis firmy Sigma-Aldrich a Kinetex firmy Phenomenex. Struktura částic stacionární fáze Ascentis je znázorněna na Obrázku 17. (59,60)

Obrázek 17 Struktura částic stacionární fáze Ascentis (59)



Pevné neporézní jádro snížilo axiální difúzi mobilní fáze, bylo umožněno použít vyšší průtok mobilní fáze a zrychlit analýzu bez snížení účinnosti separace. (61)

Byla porovnávána účinnost stacionární fáze HALO C18 s hybridní částicovou stacionární fází BEH C18 s velikostí částic 2 μm . Srovnávány byly rychlost analýzy a účinnost separace, vyjádřená jako počet teoretických pater. Účinnost stacionární fáze HALO C18 byla téměř shodná při polovičním zpětném tlaku na koloně. (62)

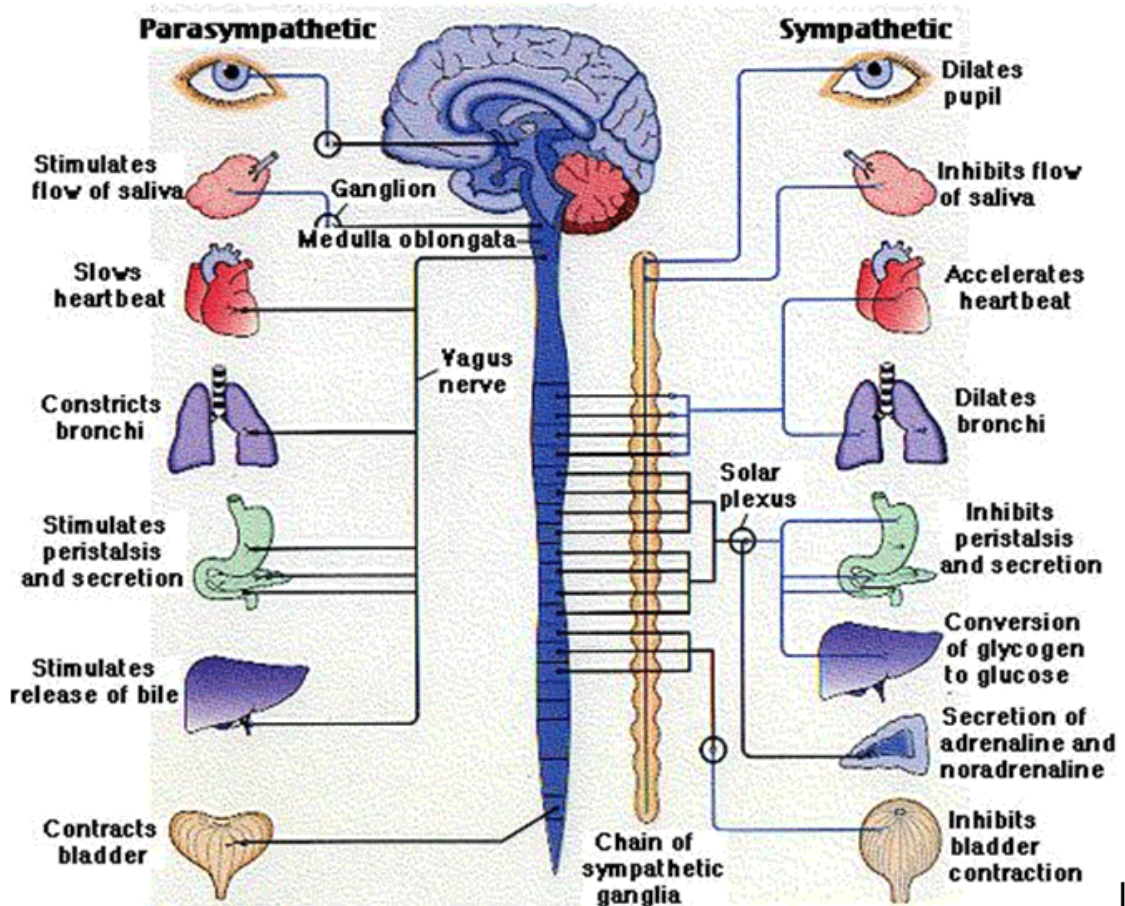
Výhodou povrchově porézních částic je dobrá účinnost ve vysokorychlostních HPLC analýzách, aniž by docházelo ke vzestupu zpětného tlaku jako v případě UHPLC, která vyžaduje speciální přístroj. (63)

3.4. Betablokátory

3.4.1. Beta - receptory adrenergního systému

Pojmem betablokátory se označují látky, které blokují adrenergní receptory beta. Tyto receptory se nachází v řadě orgánů a tkání, např. v oku, srdci, plicích a v cévní stěně. Orgány s výskytem adrenergních receptorů jsou zobrazeny na Obrázku 18.

obrázek 18 Schéma autonomního nervového systému savců, a účinku sympatické a parasympatické stimulace. (64)



Adrenergní receptory jsou rozděleny na dva typy alfa a beta, které každý mají ještě několik podtypů. **Beta-1 receptory** se nachází v srdci, krevních destičkách a rovněž v juxtaglomerulárních buňkách ledvin. Aktivací receptorů dochází k pozitivně inotropnímu, chronotropnímu a dromotropnímu účinku v srdci, tzn. ke zvýšení stažlivosti myokardu, četnosti systol a rovněž ke zvýšení vzrušivosti srdeční tkáně a tím ke zrychlení přenosu vzruchu. Krevní destičky jsou stimulovány ke zvýšené srážlivosti

a juxtaglomerulární buňky uvolňují renin, který metabolickou kaskádou renin-angiotenzinového systému vede k vazokonstrikci.

Beta-2 receptory se nachází v hladké svalovině cévní, bronchiální, střevní i děložní a stimulací dochází k relaxaci svaloviny. Buňky pankreatu na základě stimulace beta 2 receptorů uvolňují inzulín z Langerhansových ostrůvků.

Beta-3 receptory se nachází v játrech, tukové tkáni a rovněž příčně pruhované svalovině. Jejich excitace vede ke zvýšené glykogenolýze, lipolýze a třesu.

Látky, ať už stimulatory (agonisté, mimetika) nebo inhibitory (antagonisté, blokátory) se liší selektivitou k jednotlivým typům a podtypům adrenergických receptorů, neexistuje však selektivita absolutní a tato selektivita klesá se vzrůstající koncentrací látky. (65,66)

3.4.2. Terapeutické využití látek ovlivňující beta-receptory

Mezi látky, které ovlivňují beta-receptory, patří mnoho terapeuticky významných léčiv. Z **agonistů** je terapeuticky významná skupina beta2-mimetik, které působí lokální terapií (inhalací) na uvolnění hladké svaloviny bronchů. (65)

Z **inhibitorů beta-receptorů** je ve farmakoterapii zastoupena poměrně rozsáhlá skupina tzv. betablokátorů s antihypertenzním nebo antiarytmickým účinkem. Terapeutickým cílem je zejména inhibice beta-1 receptorů, která vede ke snížení srdeční frekvence, síly stahu myokardu a následném snížení spotřeby kyslíku myokardem. Snížením dráždivosti je léčena řada srdečních arytmií. Mezi hlavní indikace patří hypertenze, arytmie, ischemická choroba srdeční a hypertrofická kardiomyopatie, z nekardiologických indikací například terapie glaukomu. Kontraindikací betablokátorů je bradykardie, hypotenze, atrio-ventrikulární blok vyššího stupně, akutně zhoršené pokročilé stadium srdeční nedostatečnosti (NYHA IV), bronchiální astma či chronická obstrukční choroba bronchopulmonální s výraznější bronchiální obstrukcí. Mezi relativní kontraindikace patří diabetes s častými hypoglykémiami, metabolická acidóza, Raynaudův syndrom a období laktace. Opatrnosti je třeba u variantní anginy pectoris, diabetu, ischemické choroby dolních končetin a v graviditě. (66,67)

Z nežádoucích účinků dominuje hypotenze, bradykardie, bronchospasmus, periferní vazokonstrikce (syndrom chladných končetin), únava, nespavost, deprese, sexuální poruchy (erektilní dysfunkce). Nebezpečné je zastření příznaků hypoglykémie (pocení, tachykardie) u nemocných diabetem. Nutné je pravidelné podávání léčiva. Náhlé

přerušení aplikace vede k rebound fenoménu, který se projevuje tachykardií (rychlou tepovou frekvencí srdce) a prohloubením ischemie myokardu.

Závažné lékové interakce se mohou objevit při kombinaci s blokátory vápníkových kanálů verapamilového typu, či s některými antiarytmiky. Rizikem je bradykardie, převodní porucha nebo srdeční nedostatečnost. (67,68,69)

3.4.3. Rozdělení terapeuticky využívaných betablokátorů

Neselektivní betablokátory bez ISA

Účinek neselektivních betablokátorů bez vnitřní sympatomimetické aktivity (ISA) vede ke zpomalení srdeční frekvence v závislosti na výši podané látky. Mezi zástupce patří **metipranolol** se středně dlouhým biologickým poločasem a **propranolol** s kratším biologickým poločasem. (66,67)

Neselektivní betablokátory s ISA

Bezprostředně po podání působí agonisticky, následně však vedou k beta-sympatolytickému účinku. Jejich podání vede ke snížení krevního tlaku, oproti betablokátorům bez ISA způsobují nižší pokles tepové frekvence i minutového srdečního výdeje, avšak zátěžová tepová frekvence bývá snížena stejně. Vnitřní sympatomimetická aktivita nevede ke zlepšení prognózy ischemické choroby srdeční. Mezi zástupce patří **pindolol** a **bopindolol**. (66, 67,69,70)

Kardioselektivní betablokátory

Ve srovnání s neselektivními betablokátory jsou mnohem významnější terapeutickou skupinou. Po jejich podání se nevyskytuje tolik nežádoucích účinků vyvolaných blokádou beta-2 receptorů (bronchokonstrikce, vazospastické reakce, zvýšení triglyceridů apod.). Mohou se opět dělit podle přítomnosti vnitřní sympatomimetické reakce (ISA):

Kardioselektivní betablokátory bez ISA

Jejich podání vede ke snížení krevního tlaku i ke zpomalení srdeční frekvence v závislosti na dávce. Do této skupiny patří jednoznačně největší podíl léčiv ze skupiny betablokátorů. Komerčně dostupné přípravky buď obsahují jednotlivá léčiva nebo jsou v kombinaci s diuretikem. Mezi zástupce patří **atenolol**, **betaxolol**, **bisoprolol**,

metoprolol a **esmolol** s velmi krátkým biologickým poločasem (9 minut). Biologický poločas atenololu, solí betaxololu a bispoprololu dovoluje podávání léčivého přípravku v jedné denní dávce. Přípravky s obsahem vianu metoprololu se buď podávají ve dvou denních dávkách, nebo jedné denní dávce ve speciální lékové formě s pozvolným uvolňováním. (65,66)

Kardioselektivní betablokátory s ISA

Jejich podání vede ke snížení krevního tlaku, mají však poněkud nižší efekt na zpomalení srdeční frekvence. Jediný terapeuticky významný zástupce **acebutolol** má relativně nízkou sympatomimetickou aktivitu, proto vede ke zlepšení prognózy a snížení kardiovaskulární mortality. (65,66)

Betablokátory s vazodilatačním účinkem

Vazodilatační efekt betablokátorů je dán jejich působením na různých receptorech. **Celiprolol** má vedle antagonistického působení na beta-1 receptorech vnitřní sympatomimetickou aktivitu na beta-2 receptorech, částečně antagonizuje alfa-2 receptory. V dávce 200-400mg se užívá 1x denně k léčbě hypertenze. **Betaxolol**, kardioselektivní beta-1 blokátor, má rovněž vazodilatační účinek vyvolaný blokádou vápníkových kanálů. Dlouhý biologický poločas umožňuje pohodlné dávkování 1x denně při dobré kontrole tepové frekvence a minutového srdeční výdeje po celých 24 hodin. Dalším zástupcem je **nebivolol**, jeho pravotočivá forma působí antihypertenzně a levotočivá forma vazodilatačně prostřednictvím uvolnění oxidu dusnatého a částečně pravděpodobně též antagonistickým působením na alfa-2 receptorech. (66)

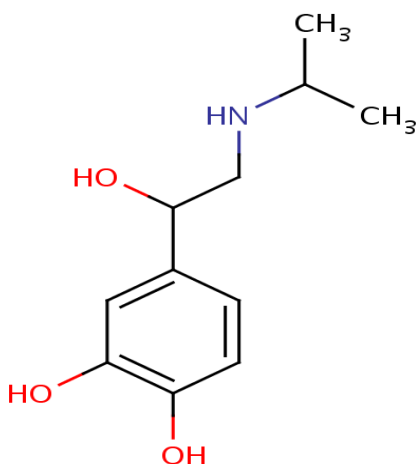
Léčiva blokující alfa- i beta-receptory

Současná blokáda alfa i beta receptorů se projevuje výraznějším hypotenzním efektem, vazodilatací, menším bradykardizujícím účinkem a nižší tendencí k bronchospazmům. Mezi zástupce patří **labetalol** a **karvedilol**. Neprojevují vlastní sympatomimetickou aktivitu, díky aktivitě na alfa receptorech působí vazodilatačně. Biologický poločas 6-8 hodin, obvyklé je dávkování 2x denně v terapii hypertenze, ICHS a levostranné srdeční nedostatečnosti. (66)

3.4.4. Chemická struktura betablokátorů

Skupina betablokátorů zahrnuje látky odvozené od molekuly isoprenalinu, jehož struktura je znázorněna na Obrázku 19. Základem struktury je skupina $\text{Ar}-\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_2\text{NH}-$. Uskupení $-\text{CH}(\text{OH})-$ musí být v konfiguraci R, aby molekula byla farmakologicky účinná.

obrázek 19 Struktura isoprenalinu (71)



Obměnou aromatické části isoprenalinu vzniknou betablokátoři – např. labetalol a sotalol. Izomer (1R, 1'R) má betaadrenolytickou aktivitu, izomer (1S, 1'R) má aktivitu alfaadrenolytickou, ostatní izomery jsou neúčinné. Pro zachování účinku je též nezbytná alkoholická skupina $-\text{OH}$, obměny jsou možné pouze formou proléčiva za účelem prodlouženého účinku (např. benzoylesterová vazba v molekule bopindololu). (72)

Převážná většina prakticky používaných betaadrenolytik vznikla prodloužením spojovacího řetězce vsunutím $-\text{OCH}_2-$ skupiny mezi aromatickou část molekuly a uhlík s alkoholickou skupinou. Touto obměnou se zvyšuje farmakologická účinnost látek. Stereochemicky musí molekula stále odpovídat přírodním adrenergním mediátorům. Názvoslovím se však jedná o konfiguraci S na C1, neboť uskupení $-\text{O}-\text{CH}_2-$ má názvoslovnou prioritu před $-\text{CH}_2-\text{NH}-$ podle Cahn-Ingold-Prelogovy metody. V této skupině aminopropanolové řady jsou S-izomery 50-100x účinnější než jejich enantiomery. Přesto se používají převážně racemické směsi z důvodu stability a ceny. Vyjímkou je např. S-timolol, nechráněným mezinárodním názvem též esmolol, s velmi

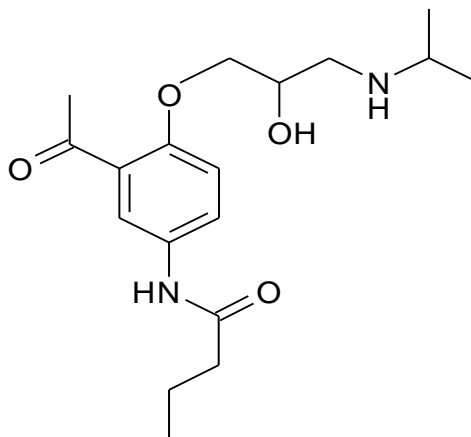
rychlým nástupem účinku, používaný v urgentních případech ventrikulární a supraventrikulární arytmie. Dusík postranního řetězce má vždy charakter sekundární aminoskupiny se substitucí odpovídající isoprenalinu, tj. s isopropyllovou skupinou, kterou je možno obměnit za terc.-butylovou (celiprolol) nebo fenylalkylovou skupinou (karvedilol). Aromatická část může být rozmanitě substituována, pro účinek na beta-1 receptorech je důležitá substituce v poloze 4 na benzenovém jádře. V poloze 4 může být vázána skupina acetamidová (atenolol), alkyletherová skupina (metoprolol) či amidová vazba (acebutolol). V případě labetalolu je v poloze 4 hydroxylová skupina a v poloze 3 skupina karbamová. V poloze 2 na aromatickém jádru acebutololu je navázána acetylová skupina. Pindolol a propranolol mají na aromatickém jádře místo jednoduchého substituentu přilehlý další aromatické respektive heterocyklické jádro, což způsobuje jejich neselektivní působení na beta receptorech. (72)

Chemická struktura a vlastnosti zkoumaných látek

1. Acebutololi hydrochloridum (hydrochlorid acebutololu) (73,74,75)

Vzhled:	bílý nebo téměř bílý krystalický prášek
Rozpustnost:	snadno rozpustný ve vodě a v ethanolu 96% velmi těžce rozpustný v acetonu a dichlormethanu
pKa:	9,40
logP:	1,77

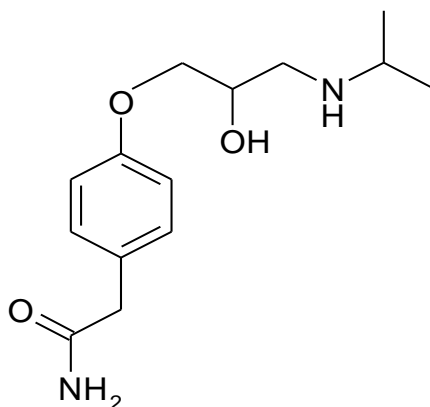
Obrázek 20 Struktura acebutololu.



2. Atenolol (atenolol) (74,75,76)

Vzhled:	bílý nebo téměř bílý prášek
Rozpustnost:	mírně rozpustný ve vodě, dobře rozpustný v ethanolu 96% těžce rozpustný v dichlormethanu
pKa:	9,43
logP:	0,34

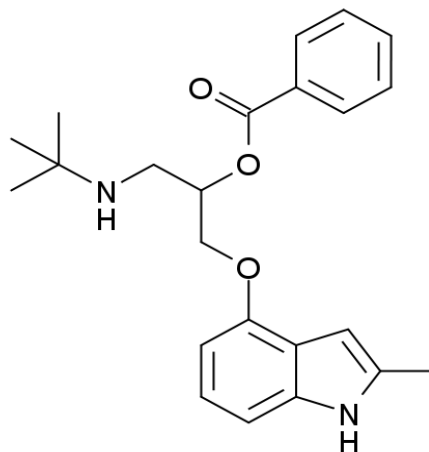
Obrázek 21 Struktura atenololu.



3. Bopindolol hydrogenmalonas (hydrogenmalonát bopindololu) (77,78,79)

Vzhled:	bílý nebo téměř bílý prášek
Rozpustnost:	rozpustný ve vodě (3,3 mg/ml)
pKa:	8,62
logP:	4,9

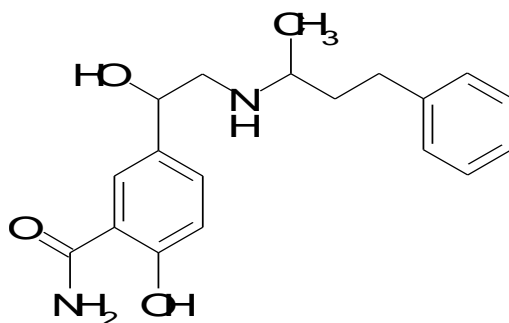
Obrázek 22 Struktura bopindololu.



4. Labetaloli hydrochloridum (hydrochlorid labetalolu) (75,80,81)

Vzhled:	bílý nebo téměř bílý prášek
Rozpustnost:	mírně rozpustný ve vodě a v ethanolu 96% prakticky nerozpustný v dichlormethanu
pKa:	9,45
logP:	2,73

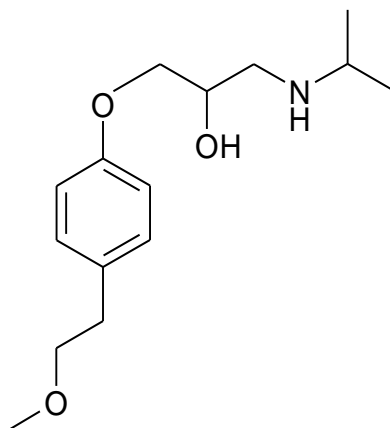
Obrázek 23 Struktura labetalolu.



5. Metoprololi tartras (vínan metoprololu) (75,79,82)

Vzhled:	bílý nebo téměř bílý krystalický prášek nebo bezbarvé krystaly
Rozpustnost:	velmi snadno rozpustný ve vodě a snadno v ethanolu 96%
pKa:	9,70
logP:	2,90

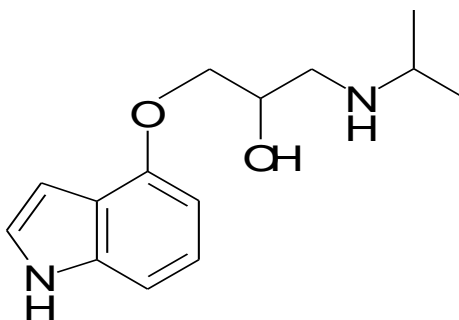
Obrázek 24 Struktura metoprololu.



6. Pindololi (pindolol) (74,75,83,84)

Vzhled:	bílý nebo téměř bílý krystalický prášek
Rozpustnost:	prakticky nerozpustný ve vodě a těžce rozpustný v methanolu, rozpouští se ve zředěných minerálních kyselinách
pKa:	9,54
logP:	1,68

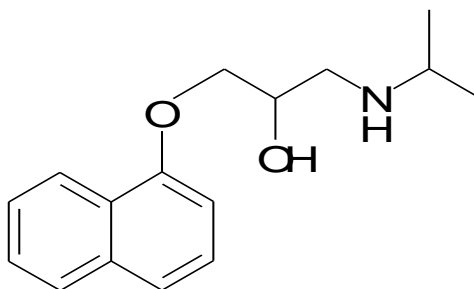
obrázek 25 Struktura pindololu.



7. Propranololi hydrochloridum (hydrochlorid propranololu) (74,75,85)

Vzhled:	bílý nebo téměř bílý prášek
Rozpustnost:	dobře rozpustný ve vodě a v ethanolu 96%
pKa:	9,50
logP:	2,90

Obrázek 26 Struktura molekuly propranololu.



4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 Použité standardní látky

Byly použity standardní látky od firmy Sigma-Aldrich (ČR):

Acebutolol hydrochlorid

Atenolol

Bopindolol hydrogenmalonát (čistota 99,76%)

Labetalol hydrochlorid

Vínan metoprololu (čistota 99%)

Pindolol (čistota 97%)

Propranolol hydrochlorid (čistota 99%)

Jejich chemická struktura a vlastnosti látek jsou popsány v kapitole 3.4.4 Chemická struktura betablokátorů.

4.2 Příprava roztoků standardů

Roztoky betablokátorů (acebutolol, atenolol, bopindolol, labetalol, metoprolol, pindolol, propranolol) byly připraveny rozpuštěním jednotlivých látek v methanolu, ve kterém jsou všechny tyto látky rozpustné, jak vyplývá z údajů ČL 2009. (73,76,80,82,83,85)

Koncentrace látek byly voleny podle absorbance v měřených vlnových délkách – tedy 230 a 270 nm. Jsou uvedeny v Tabulce 6.

Tabulka 6 Koncentrace jednotlivých betablokátorů v zásobním roztoku v mg/ml

BB	ACE	ATE	BOP	LAB	MET	PIN	PRO
Koncentrace 1	1	2	2	2	5	2	1
Koncentrace 2	0,25	0,5	0,5	0,5	1,25	0,5	0,25

Směs byla připravena smícháním 100 µl všech zásobních roztoků standardů (7x100 µl) a doplněním methanolem na objem 1 ml. Pro měření na zirkoniové koloně a na UPLC byly použity zásobní roztoky s 4x nižší koncentrací vzorků.

4.3 Pufry

1. Octanový pufr 4,5 (dále pufr 4,5)

- a) Pufr připravený dle ČL 2009 (86): tlumivý roztok s octanem sodným o pH 4,5: 63g octanu sodného bezvodého R se rozpustí ve vodě R, přidá se 90ml kyseliny octové R. pH se upraví na hodnotu 4,5 a zředí se vodou R na 1000ml. Tento pufr je asi 0,8 molární (Mr = 82,03) – pro měření byl použit pufr 10 krát naředěný (0,08 molární). K dispozici byl trihydrát octanu sodného. Po jednoduchém přepočtu bylo pro přípravu acetátového pufru naváženo 6,38g octanu sodného (trihydrátu), přidáno 4,5ml kyseliny octové ledové a doplněno vodou na 500ml.
- b) Těkvavý acetátový pufr pH 4,5 (byl použit pro UHPLC) byl připraven přidáním 285 µl kyseliny octové 99% do 50 ml přefiltrované vody pro HPLC, titrováním roztokem hydroxidu amonného na požadovanou hodnotu pH a doplněním přefiltrovanou vodou pro HPLC na 100ml. Byl připraven pufr 0,05 molární.

výpočet objemu kyseliny octové:

$$m = n * M, \quad m = 0,05 * 60,05 \quad m = 3,0 \text{ g (na přípravu 1000 ml pufru)}$$

při přípravě 100 ml byla spočtena navážka $m = 0,3 \text{ g}$

$$V = m / \rho (\rho_{\text{kys.octová}} = 1,055 \text{ g.cm}^{-3}) \quad V = 0,3 / 1,055$$

$$V_{\text{kys.octová}} = 0,285 \text{ ml}$$

2. Fosfátový pufr 7,4 (dále pufr 7,4)

Fosfátový pufr byl připraven o molaritě 10x menší než uvádí ČL 2009 (tlumivý roztok o pH 7,4) (85) rozpuštěním 0,24 g hydrogenfosforečnanu sodného R, 0,02 g dihydrogenfosforečnanu draselného R a 0,8 g chloridu sodného R ve vodě R. Výsledné pH bylo zkontrolováno pH-metrem. Roztok byl doplněn vodou na objem 1000ml.

3. Amoniakální pufr 10,0 (dále pufr 10,0)

- a) Pufr byl připraven o molaritě 20x menší než dle ČL 2009 (tlumivý roztok o pH 10,0) (85) rozpuštěním 2,7 g chloridu amonného R v 10 ml vody R, přidáním asi

12,0 ml amoniaku 25% RS na požadované pH měřené pomocí pH-metru a doplněním vodou R na 100,0 ml.

- b) Amoniakální pufr pH 10,0 pro UHPLC byl připraven jako 0,01 molární pufr rozpuštěním 0,077 g octanu amonného v 1,36 g 25% roztoku amoniaku, úpravou na požadované pH měřenou pomocí pH-metru a zředěním vodou R na 100ml. Do roztoku bylo přidáno 0,1g triethylaminu.

4.4 Chromatografický systém

HPLC

Shimadzu Prominence LC20

- kolonový termostat SIL-20 AC
- autosampler CTO-20
- software Lab Solution
- detektor diodového pole SPD-M20A
- kontrolní modul CBM-20A
- 2 binární čerpadla LC-20A

UHPLC

UPLC Acquity Waters

- binární pumpa – umožňující nastavení průtoku 0,01 – 2,00 ml/min, mrtvý objem menší než 150 μ l, výběr ze 4 solventů
- odplyňovač (degasser) – 6 komůrkový
- autosampler – automatický dávkovač v rozsahu 0,1 – 50 μ l (temperování +4 až 40 °C)
- kolonový termostat (4 až 65 °C)
- UV-VIS detektor

4.5 Mobilní fáze

Acetonitril a pufr pH 4,5, 7,4 nebo 10,0 v počátečním poměru zpravidla 10:90. Gradientová eluce poté postupovala k různým poměrům ACN : pufr. Experimenty s jinými mobilními fázemi, např. methanol-pufr nebo THF-ACN-pufr nevedly

k dobrým separačním výsledkům pro směs zkoumaných látek. Experimentální část byla zaměřena na porovnání různých sorbentů a různých hodnot pH mobilní fáze.

4.6 Analytické kolony

Pro separaci zkoumaných látek byly vyzkoušeny stacionární fáze pro reverzní chromatografii na bázi silikagelu s navázanými uhlíkatými řetězci. Analytické kolony se sorbentem C8 v počátečním průzkumu nebyly dostatečně účinné v separaci zkoumaných látek, proto byla další hledání vhodných separačních podmínek zacílena na sorbenty s uhlíkatými řetězci C18. Pro analýzu v neutrálním a bazickém prostředí byly využity modifikované stacionární fáze s ochranou silanolových skupin pomocí vázaných organických složek a metodou endcappingu. Byly vyzkoušeny částicové stacionární fáze, monolitické i hybridní sorbenty a nové stacionární fáze s ještě neznámým potenciálem (betulinová stacionární fáze). Pokud to typ stacionární fáze dovozoval, byly zkoumány vlivy rozdílného pH mobilní fáze, případně teploty (u zirkoniových sorbentů). Byly vyzkoušeny hybridní stacionární fáze, kombinující organickou a anorganickou strukturu a vytvářející specifický povrch sorbentu odolný měření při velkém rozsahu pH.

1) Analytické kolony C18

a) Zorbax Eclipse XDB C18 (eXtra Densely Bonded)

Rozměry: 4,6 x 50 mm

Velikost částic: 1,8 μm

b) Zorbax Extend C18

Rozměry: 4,6 x 75mm

Velikost částic: 3,5 μm

2) Gemini 3 μm C18

Rozměry: 2,0 x 50 mm

Velikost částic: 3 μm

3) Monolitická analytická kolona Chromolith C18

Rozměry: 4,6 x 100 mm

4) Betulinová analytická kolona

Rozměry: 4,6 x 150 mm

Velikost částic: 5 μm

5) Zirkoniové analytické kolony

a) Discovery Zr-CarbonC18

Rozměry: 4,6 x 75 mm

Velikost částic: 3 μm

b) Discovery Zr-PBD

Rozměry: 4,6 x 150 mm

Velikost částic: 5 μm

6) Analytická kolona X-Bridge C18

Rozměry: 3,0 x 150 mm

Velikost částic: 3 μm

7) Analytická kolona Acquity BEH C18

Rozměry: 2,1 x 100 mm

Velikost částic: 1,7 μm

5 VÝSLEDKY A DISKUZE

Byla naměřena absorpční spektra zkoumaných látek, podle kterých byla zvolena vhodná vlnová délka pro měření absorbance detekovaných látek v detektoru. Absorpční spektra jsou uvedena v Tabulce 7 a absorpční maxima zkoumaných látek jsou uvedena v Tabulce 8. Byly zvoleny vlnová délka 230 nm a 270 nm, protože v blízkosti těchto vlnových délek měla většina zkoumaných látek dílčí maxima absorpčního spektra.

Tabulka 7 Přehled naměřených spekter analyzovaných betablokátorů (v případě betablokátoru v podobě soli je látka upřesněna v kolonce vpravo vedle jména léčiva), zkratky názvů látek jsou uváděné v chromatogramech u píku odpovídající látky.

Acebutolol	Acebutolol hydrochlorid
Zkratka	ACE
Spektrum	<p>Spektrum Acebutololu (ACE) ukazuje absorpční maxima při 228 nm (4.88/1.00), 233 nm, 284 nm a 323 nm. Osa y představuje mAU (0-2000) a osa x představuje vlnovou délku v nm (225.0-300.0).</p>
Atenolol	
Zkratka	ATE
Spektrum	<p>Spektrum Atenololu (ATE) ukazuje absorpční maxima při 228 nm (1.54/1.00), 251 nm, 273 nm, 306 nm a 323 nm. Osa y představuje mAU (0-500) a osa x představuje vlnovou délku v nm (225.0-300.0).</p>

Bopindolol	Bopindolol hydrogenmalonát
Zkratka	BOP
Spektrum	<p>UV-Vis spectrum of Bopindolol hydrogenmalonate (BOP). The y-axis represents mAU (0 to 500) and the x-axis represents nm (225.0 to 300.0). The spectrum shows a sharp peak at 11.31 nm (mAU 1.00) and broader peaks at 234 nm, 252 nm, and 267 nm.</p>

Labetalol	Labetalol hydrochlorid
Zkratka	LAB
Spektrum	<p>UV-Vis spectrum of Labetalol hydrochloride (LAB). The y-axis represents mAU (0 to 400) and the x-axis represents nm (225.0 to 300.0). The spectrum shows a sharp peak at 7.28 nm (mAU 1.00) and broader peaks at 235 nm, 266 nm, and 302 nm.</p>

Metoprolol	Vínan metoprololu
Zkratka	MET
Spektrum	<p>UV-Vis spectrum of Metoprolol (MET). The y-axis represents mAU (0 to 75) and the x-axis represents nm (225.0 to 300.0). The spectrum shows a sharp peak at 5.21 nm (mAU 1.00) and broader peaks at 226 nm, 244 nm, 274 nm, 307 nm, and 324 nm.</p>

Pindolol	
Zkratka	PIN
Spektrum	
Propranolol	Propranolol hydrochlorid
Zkratka	PRO
Spektrum	

Tabulka 8 Přehled absorpčních maxim zkoumaných látek v UV oblasti (v rozmezí 200 - 400 nm)

BB	absorpční maximum 1	absorpční maximum 2
acebutolol	233	---
atenolol	228	273
bopindolol	234	267
labetalol	235	302
metoprolol	226	274
pindolol	---	263
propranolol	231	289

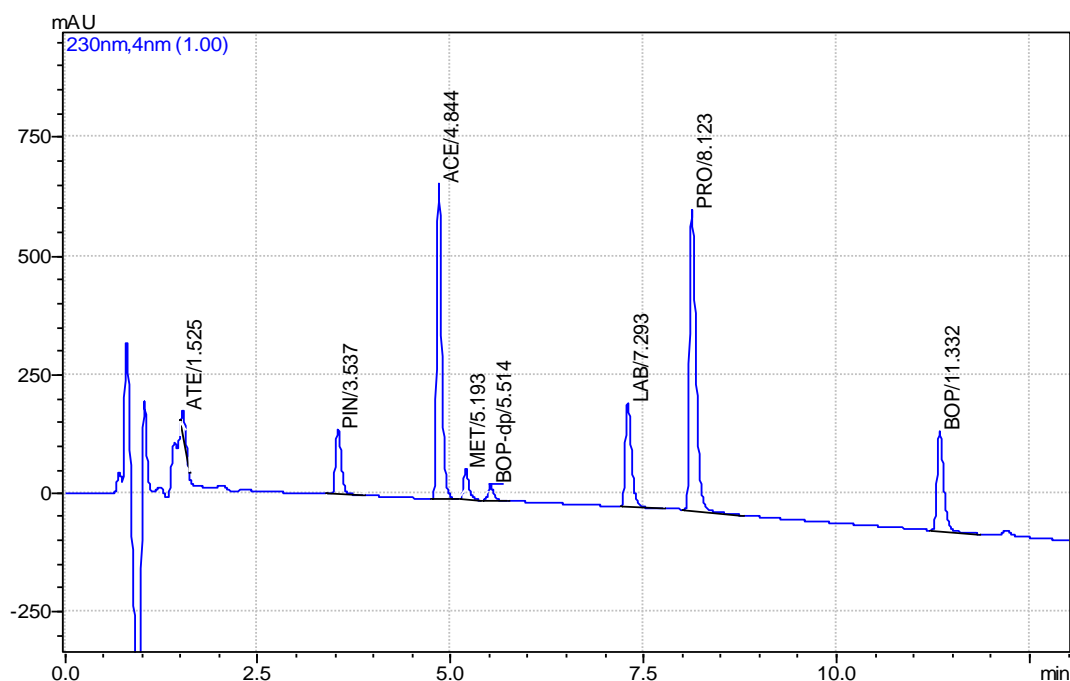
5.1 Analytické kolony C18

Na analytické koloně C18 byla hledána vhodná mobilní fáze pro separaci směsi 7 betablokátorů. Zároveň bylo pozorováno chování směsného vzorku při různých pH. Pro nižší pH byla použita analytická kolona C18 Zorbax Eclipse XDB, pro měření při vyšším pH kolona C18 Zorbax Extend.

5.1.1 Výsledky a diskuze při pH 4,5

Byla použita gradientová eluce s MF ACN / PUFR pH 4,5 v poměru 10:90 na počátku s lineárním gradientem k MF v poměru 50:50 v 15. minutě. Výsledky jsou znázorněny na Obrázku 27.

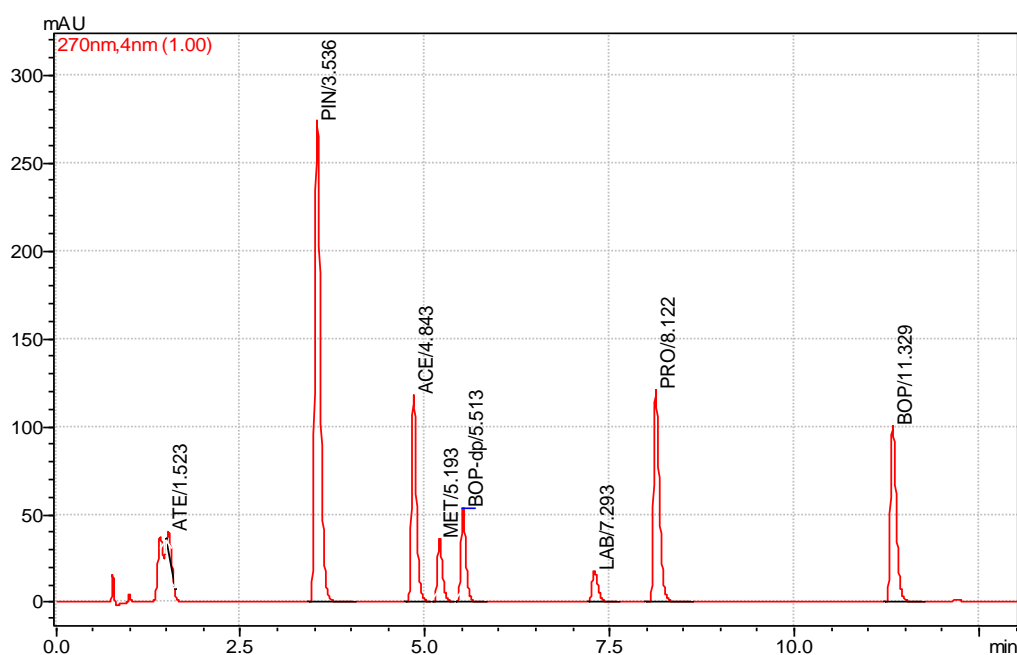
Obrázek 27 Chromatogram směsi BB na analytické koloně C18 Zorbax Eclipse XDB, pH 4,5, MF ACN / PUFR 4,5 10:90, gradient 10-50%ACN, Detekce při vlnové délce 230 nm, průtok 1ml/min, nástřik 10 μ l.



Analyty jsou na analytické koloně C18 zadržovány rozdílně a bylo nutné použít gradientovou eluci pro jejich analýzu. Zatímco relativně polární molekula atenololu není na sorbentu příliš zadržována ani při použití mobilní fáze s nižší eluční schopností (MF ACN / PUFR 4,5 10:90), molekula bopindololu je na sorbentu silně zadržována a k eluci je zapotřebí mobilní fáze s mnohem silnější eluční schopností (MF s vyšším podílem – alespoň 40% ACN). Při použití lineárního gradientu (s MF ACN / PUFR 4,5

10:90 až 50:50 v čase 15 min) eluovaly analyty do 12 minut. Chromatogram při detekci analytů při vlnové délce 270nm je znázorněn na Obrázku 28. V čase 5,5 min eluuje pík, který nebyl patrný při předchozích analýzách. Bylo zjištěno, že pík eluuje u jednotlivého nástřiku standardu bopindololu a jedná se proto o jeho degradační produkt. Plocha píku degradačního produktu bopindololu byla při delším stání vzorku stále větší oproti ploše píku bopindololu. Bopindolol je chemicky ester a dochází k jeho kyselé hydrolýze.

Obrázek 28 Chromatogram směsi BB na analytické koloně Zorbax Eclipse XDB C18, MF ACN / PUFR 4,5, počáteční poměr MF 10:90, gradient 10-50% ACN (15 min), detekce při 270 nm, průtok 1 ml/min, nástřik 10 μ l.



Látky byly dobře separované, pouze atenolol je eluován příliš blízko mrtvého retenčního objemu. Rozdíly ve velikosti píků jsou mj. dány rozdílnými maximy absorpčních spekter. Vhodná vlnová délka je 230 nm nebo 270 nm, kde nejsou tolik zastoupeny nečistoty a některé látky (zejména pindolol, ale i bopindolol a propranolol) při této vlnové délce absorbují lépe. Základní linie při vlnové délce 270 nm je rovnější, nedochází tolik k absorpci MF a není tedy tolik ovlivněna měnícím se složením MF při gradientové eluci jako při vlnové délce 230 nm.

V dalších experimentech bylo cílem změny separačních podmínek prodloužení retenčního času atenololu, respektive jeho oddělení od mrtvého objemu. V Tabulce 9

jsou uvedeny SST parametry, tučně jsou zvýrazněny hodnoty, které neodpovídají lékopisným požadavkům.

Tabulka 9 SST chromatogramu znázorněného na Obrázku 28.

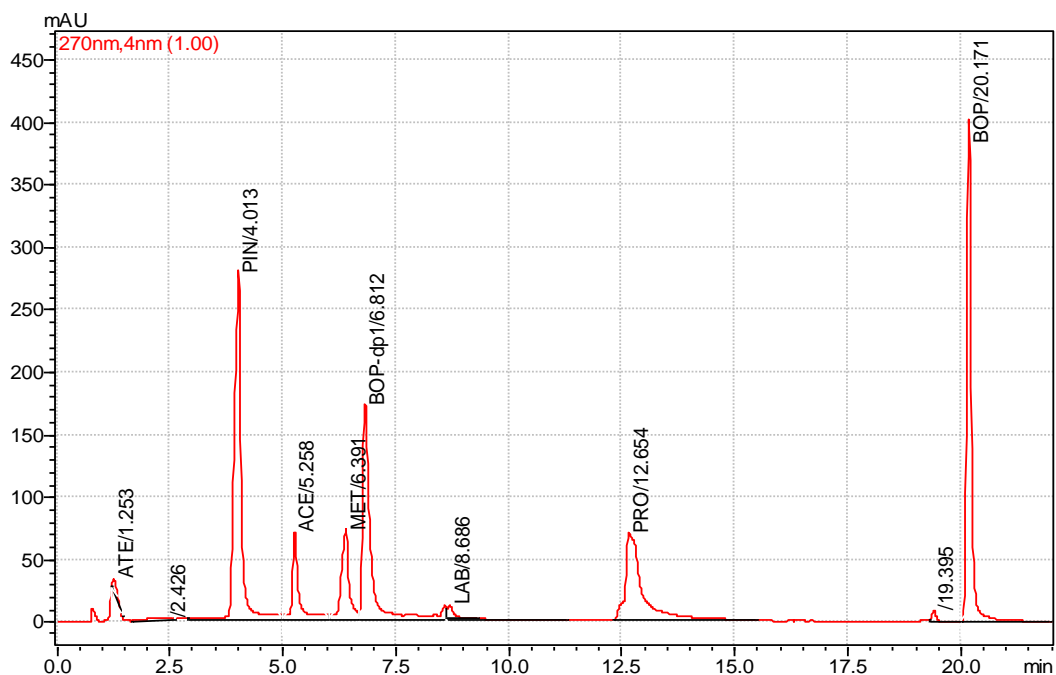
BB / SST	t_R	R_s	N	HETP	A_s	k
Atenolol	1,52	--	4325	11,56	2,48	0,00
Pindolol	3,54	17,09	9791	5,11	1,39	1,32
Acebutolol	4,84	9,73	23714	2,11	1,39	2,18
Metoprolol	5,19	2,72	24838	2,01	1,40	2,41
Bopindolol-dp	5,51	2,46	29400	1,70	1,30	2,67
Labetalol	7,29	12,84	38493	1,30	1,41	3,79
Propranolol	8,12	5,60	48512	1,03	1,50	4,33
Bopindolol	11,33	21,66	92896	0,54	1,46	6,44

Retenční faktor ani faktor symetrie nevyhovoval u polárního atenololu. Ostatní zkoumané látky splňovaly limit daný lékopisem. Rozlišení mezi zkoumanými látkami bylo vyšší než 1,5. Počet teoretických pater a tedy účinnost analytické kolony pro separaci směsi zkoumaných betablokátorů za výše uvedených podmínek byla vynikající. Částice stacionární fáze Zorbax Eclipse XDB mají velikost 1,8 μm . Malé částice stacionární fáze poskytují vynikající účinnost, jak vyplývá z tvaru van Deemterových křivek na Obrázku 3.

5.1.2 Výsledky a diskuze při pH 7,4

Pro měření při pH 7,4 byla použita analytická kolona C18 XDB, vhodná i pro měření v oblasti pH 5 – 9, při kterém by endcappingem upravená analytická kolona měla minimalizovat chvostování píků. Prakticky však k chvostování píků docházelo a faktor symetrie nebyl u více látek v limitním rozmezí požadovaném lékopisem. Vzhledem k větší retenci bopindololu bylo potřeba zvýšit podíl organické složky MF až na 65% podíl ACN ve 20. minutě. Chromatogram je znázorněn na Obrázku 29.

Obrázek 29 chromatogram směsi na analytické koloně Zorbax Eclipse XDB C18, pH 7,4, MF ACN / PUFR 7,4, gradientová eluce 15% ACN až 30% (10 min) a 30% ACN až 65% (20 min), detekce při vlnové délce 270 nm, průtok 1 ml/min, nástřik 10 μ l



Výrazně se změna pH projevila u bopindololu, který při původním gradientu nebylo možné detekovat ani do 30. minuty analýzy. Bylo proto nutné přidat podíl organické složky do mobilní fáze během gradientové eluce. Druhým problémem byla zhoršená symetrie píků a bylo pozorováno mírné chvostování. Bylo proto nutné zvýšit eluční sílu MF až poté, co byly eluovány analyty s relativně blízkými retenčními časy. Řešení vhodné separace přineslo rozdělení gradientové eluce, přičemž zpočátku (počátečních 10 minut) byl gradient mírnější (vzestup podílu organické složky z 15% na 30%)

a od 10. do 20. minuty byl gradient strmější (vzestup podílu acetonitrilu z 30% na 65%). Z důvodu snížené aktivity H^+ iontů jsou bazické analyty méně disociovány a více se tak zadržují na SF. Výsledkem je horší symetrie píků na chromatogramu vyjádřená hodnotou faktoru symetrie. Spolu s dalšími SST parametry zkoumaných látek je uvedena v Tabulce 10. Pro zachování dostatečného rozlišení mezi všemi zkoumanými látkami byl gradient zpočátku mírnější než v analýze provedené při pH 4,5. Ve druhé fázi analýzy byla zvýšena eluční síla MF kvůli větší retenci bopindololu. Bopindolol byl použit ve formě soli bopindolol hydrogenmalonátu a je pravděpodobné, že došlo k neutralizaci molekuly bopindololu a tím ke zvýšené retenci neutrální molekuly bopindololu na analytické koloně. I při pH 7,4 dochází k bazické hydrolyze esterové vazby bopindololu za vzniku degradačního produktu bopindololu a benzoátu sodného.

Tabulka 10 SST chromatogramu znázorněného na Obrázku 29.

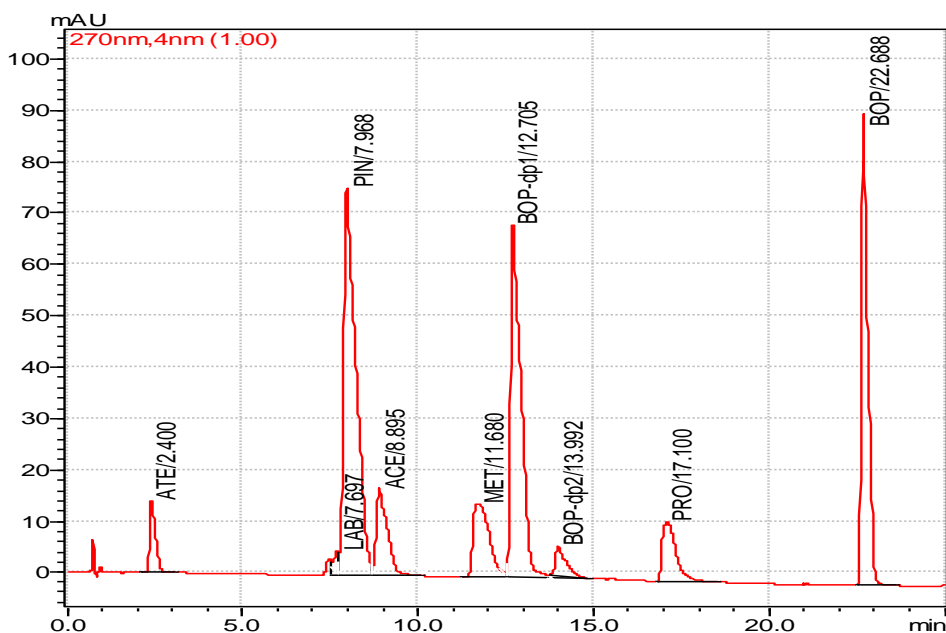
BB / SST	t_R	R_s	N	HETP	A_s	k
Atenolol	1,25	--	575	86,97	2,81	0,00
Pindolol	4,01	1,64	3362	14,87	0,94	2,20
Acebutolol	5,26	5,07	9685	5,16	1,65	3,20
Metoprolol	6,39	4,40	7220	6,92	1,21	4,10
Bopindolol-dp	6,81	1,48	10468	4,78	1,87	4,44
Labetalol	8,69	6,22	10668	4,69	1,96	5,93
Propranolol	12,65	10,05	12474	4,01	1,19	9,10
Bopindolol	20,17	3,85	191546	0,26	1,46	15,10

Hlavním problémem zůstává nízká retence atenololu a vysoká retence bopindololu na sorbentu C18 při pH 7,4. Symetrie píků jednotlivých zkoumaných látek byla při pH 7,4 horší než při pH 4,5, tím se zhoršilo i rozlišení mezi zkoumanými látkami s podobnou retencí na SF. Nevyhovující byl faktor symetrie u atenololu, acebutololu a labetalolu. Tučně je v tabulce zvýrazněna hodnota retenčního faktoru bopindololu. Hodnota retenčního faktoru by neměla přesáhnout hodnotu 10, aby byly separační podmínky pro zkoumanou látku považovány za vhodné.

5.1.3 Výsledky a diskuze při pH 10,0

Při pH 10 dochází k větší retenci zkoumaných látek na analytické koloně, neboť pH přibližně odpovídá pKa zkoumaných látek. Molekuly nejsou tolik disociovány. K vyšší retenci labetalolu však nedošlo, protože při pH 10 dochází k ionizaci fenolické skupiny a fenolát je pak zadržován méně. Retenční čas labetalolu je však při pH 10 podobný retenčnímu času pindololu. Byly proto hledány takové podmínky, které by dovolily účinně odseparovat tyto dva betablokátory. Byl zvolen mírnější gradient MF do 10. minuty analýzy, poté byl gradient strmější až k 70% podílu organické složky v MF ve 25. minutě. Výsledný chromatogram je znázorněn na Obrázku 30. Namísto analytické kolony Zorbax Eclipse XDB C18 byla použita analytická kolona Zorbax Extend C18 s velikostí částic 3,5 μm , vhodná pro měření v bazické oblasti.

Obrázek 30 chromatogram směsi na koloně C18 Extend, pH 10,0, MF ACN / PUFR 10,0, gradientová eluce 15% - 25% ACN (do 10 min) a 25% - 70% ACN do 25 min, detekce při 270 nm, průtok 1 ml/min, nástřik 10 μl .



Při pH 10 dochází k výraznému chvostování píků a separace se stává méně účinnou. Je patrné chvostování píků bazických látek na stacionární fázi v důsledku interakce bazických center s hydroxylovými (silanolovými) skupinami stacionární fáze založené na modifikovaném silikagelu. Na chromatogramu při pH = 10 došlo ke změně selektivity eluovaných látek. K výraznému nárůstu retence došlo u většiny látek - pindololu, acebutololu, metoprololu, propranololu i bopindololu. Hodnoty pKa jsou uvedeny u zkoumaných látek v kapitole 3.4.4 Chemická struktura betablokátorů a pro lepší názornost jsou shrnuty v následující Tabulce 11.

Tabulka 11 Hodnoty pKa zkoumaných látek

<i>betablokátor</i>	<i>pKa</i>	<i>betablokátor</i>	<i>pKa</i>
acebutolol	9,40	metoprolol	9,70
atenolol	9,43	pindolol	9,54
bopindolol	8,62	propranolol	9,50
labetalol	9,45		

U všech zkoumaných látek bylo pH mobilní fáze vyšší než je jejich hodnota pKa. K posunu nedošlo u labetalolu, přestože jeho pKa je také nižší než bylo pH mobilní fáze. To mohlo být dáno ionizací fenolické skupiny molekuly labetalolu, která naopak vedla ke snížení retence na stacionární fázi. Celkově tak nebyl při pH 10 patrný posun retenčního času labetalolu ve srovnání s měřením při pH 7,4. SST parametry chromatogramu znázorněného na Obrázku 30 jsou uvedeny v Tabulce 12.

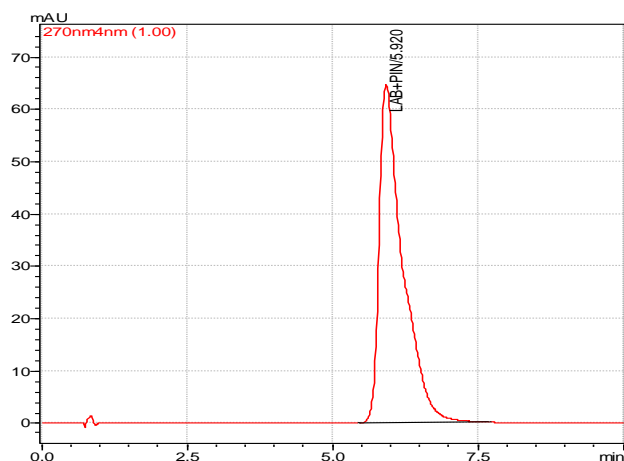
Tabulka 12 SST parametry chromatogramu znázorněného na Obrázku 30.

BB / SST	t_R	R_s	N	HETP	A_s	k
Atenolol	2,40	--	750	66,70	1,91	0,00
Labetalol	7,70	8,40	1142	43,87	---	2,21
Pindolol	7,97	0,33	1974	25,30	2,23	2,32
Acebutolol	8,90	1,37	3159	15,80	---	2,71
Metoprolol	11,68	3,90	3444	14,50	2,31	3,87
Bopindolol-dp	12,71	1,46	7062	7,10	2,32	4,29
Bopindolol-dp2	13,99	2,44	15259	3,30	2,19	4,83
Propranolol	17,10	5,55	10533	4,70	1,77	6,12
Bopindolol	22,69	11,30	78945	0,60	1,81	8,45

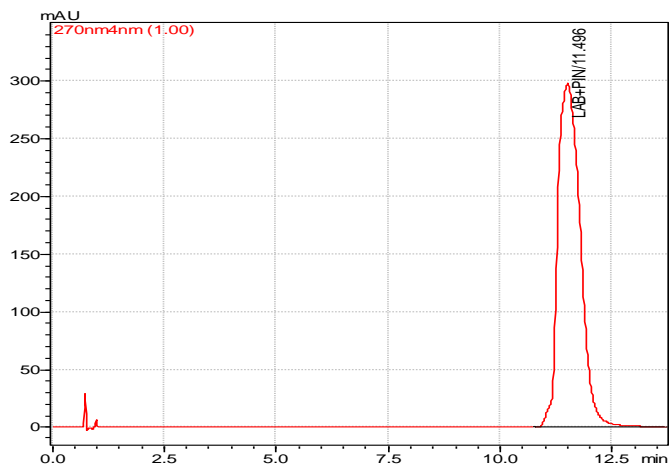
V parametru faktoru symetrie píku nevyhovuje lékopisným požadavkům žádná ze zkoumaných látek. Rozlišení nevyhovuje zejména mezi labetalolem a pindololem, nedostatečné rozlišení je dále mezi pindololem a acebutololem a metoprololem a degradačním produktem bopindololu. Použití vyššího pH pro lepší separaci bazických látek na analytické koloně C18 nebylo prakticky užitečné pro výraznou asymetrii píků zkoumaných látek a pro sblížení retenčního času labetalolu, pindololu a acebutololu.

Při pH 10,0 je labetalol zadržován stejně jako při nižším pH, jeho pík je však méně ostrý a dochází k jeho štěpení. To potvrzuje předpoklad částečné ionizace fenolické skupiny labetalolu. Problematická je jeho separace od pindololu. Na Obrázku 31 je chromatogram směsi labetalolu a pindololu při isokratické eluci MF ACN / PUFR 10.0 v poměru 20:80. Při těchto podmínkách nedochází k separaci těchto dvou látek. Ani využití isokratické eluce 15% ACN v pufru pH=10 po dobu 5 minut a následné gradientové eluce se zvyšováním podílu organické složky MF nevedlo k účinné separaci. Chromatogram je znázorněn na Obrázku 32.

Obrázek 31 chromatogram směsi labetalolu a pindololu na koloně C-18 Extend, pH 10,0, MF ACN / PUFR 10,0, isokratická eluce 20%ACN, detekce při vlnové délce 270 nm, průtok 1 ml/min, nástřik 10 μ l.

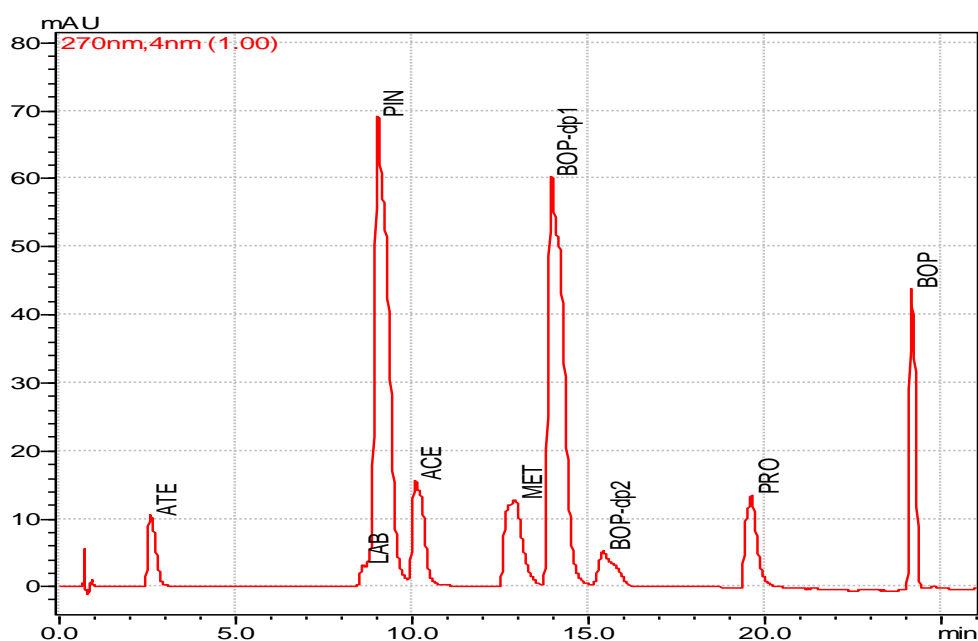


Obrázek 32 chromatogram směsi labetalolu a pindololu na koloně C-18 Extend, pH 10,0, MF ACN / PUFR 10,0, 5 min isokratická eluce 15%ACN, od 5 do 15 min gradient 15-25% ACN v pufru 10,0, detekce při vlnové délce 270 nm, průtok 1 ml/min, nástřik 10 μ l.



Nebyly nalezeny podmínky umožňující separaci labetalolu a pindololu. Další chromatogram, uvedený na Obrázku 33, zobrazuje výsledek po úpravě separačních podmínek, které vedly k lepšímu rozlišení mezi pindololem a acebutololem použitím počáteční isokratické eluce po dobu 2 minut. Následovala gradientová eluce v intervalu 2 – 15 min s počáteční MF ACN/PUFR 15:85 s gradientem k MF ACN/PUFR 30:70 a v intervalu 15 – 25 min s koncovou MF ACN/PUFR 70:30. SST parametry jsou uvedeny v Tabulce 13.

Obrázek 33 chromatogram směsi na koloně C-18 Extend, pH 10,0, MF ACN / PUFR 10,0, isokratická eluce 15% ACN 2 min, od 2 min do 15 min gradientová eluce 15% - 30% ACN, od 15 do 25 min 30% - 70% ACN, detekce při 270 nm, průtok 1 ml/min, nástřik 10 µl.



Tabulka 13 Parametry chromatogramu znázorněného na Obrázku 33.

BB / SST	t_R	R_s	N	HETP	A_s	k
Atenolol	2,60	--	628	79,70	1,74	0,00
Labetalol	8,64	8,11	1042	48,00	---	2,31
Pindolol	9,06	0,48	2824	17,70	1,94	2,47
Acebutolol	10,12	<u>1,71</u>	5309	9,40	1,77	2,88
Metoprolol	12,95	4,23	4396	11,40	<u>1,15</u>	3,96
Bopindolol-dp1	13,99	1,44	5899	8,50	2,17	4,36
Bopindolol-dp2	15,44	1,76	4482	11,20	1,99	4,92
Propranolol	19,65	5,73	20603	2,40	<u>1,28</u>	6,53
Bopindolol	24,18	10,52	94864	0,50	1,56	8,27

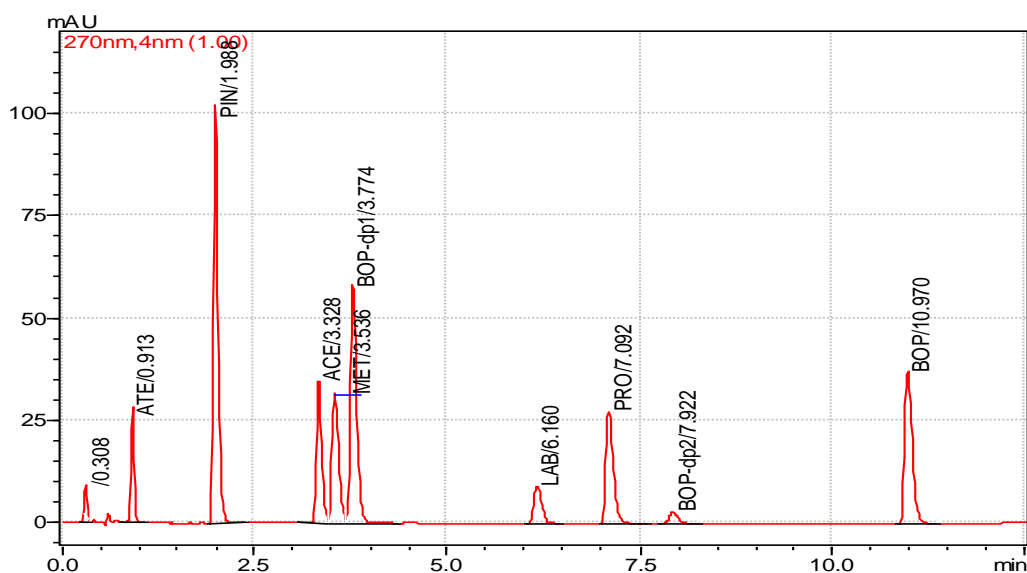
Při těchto separačních podmínkách došlo ke zvýšení rozlišení acebutololu a metoprololu z hodnoty $R_s = 1,37$ na $R_s = 1,71$, tato hodnota již splňuje lékopisné požadavky. Faktor symetrie při těchto podmínkách vyhovuje u metoprololu a propranololu.

5.2 Monolitická analytická kolona Chromolith C18

5.2.1 Výsledky a diskuze při pH 4,5

Separace zkoumaných látek na monolitické analytické koloně Chromolith C18 byla dostatečně účinná při gradientové eluci 10-50% ACN v pufru pH = 4,5. Chromatogram je znázorněn na Obrázku 34, parametry SST jsou vyjádřeny v Tabulce 14. Všechny zkoumané látky za těchto podmínek byly detekovány do 12 minut analýzy při průtoku mobilní fáze 3 ml/min. Píky zkoumaných látek vyhovují požadavkům na symetrii, pouze u metoprololu byl faktor symetrie o 0,01 za limitem požadovaným platným lékopisem. Zkoumané látky jsou dobře separovány, rozlišení mezi jednotlivými látkami splňuje lékopisné požadavky kromě dvojice acebutolol – metoprolol a metoprolol – degradační produkt bopindololu, které vykazovaly podobnou retenci na sorbentu.

Obrázek 34 chromatogram směsi na monolitické analytické koloně Chromolith C18, pH 4,5, mobilní fáze ACN / PUF 4,5, gradientová eluce 10 - 50% ACN (20 min), průtok 3,0 ml/min, nástřik 10 μ l. Vlnová délka 270 nm.

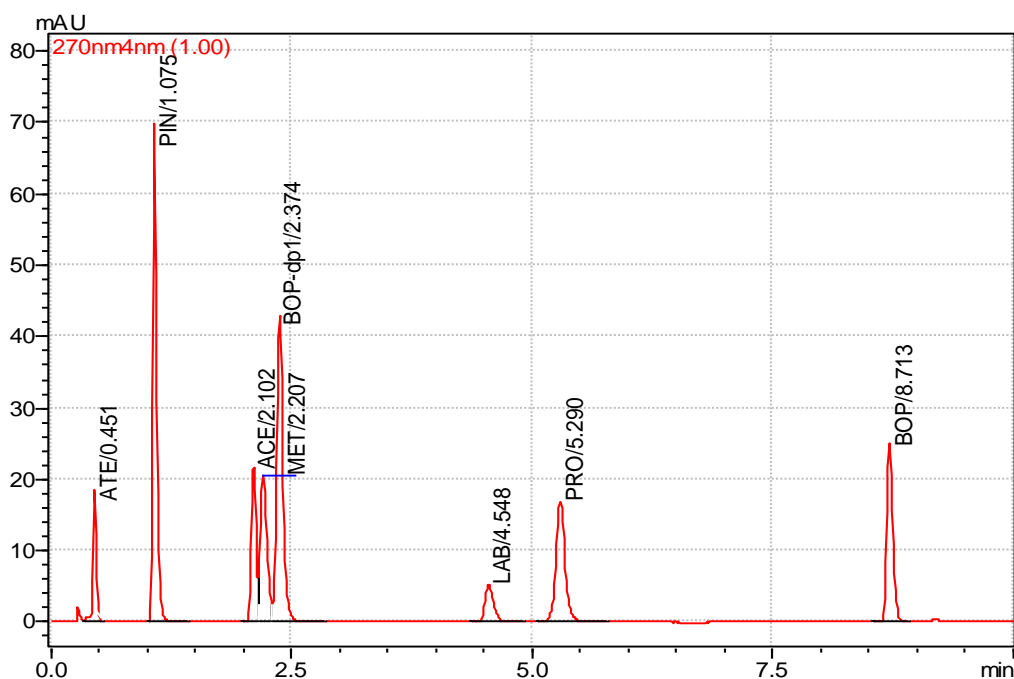


Tabulka 14 Parametry chromatogramu na Obrázku 34.

BB / SST	t_R	R_S	N	HETP	A_s	k
Atenolol	0,91	6,89	1756	28,47	1,33	1,97
Pindolol	1,99	9,92	3761	13,30	1,44	5,46
Acebutolol	3,33	9,64	8052	6,21	1,44	9,82
Metoprolol	3,54	1,26	6050	8,27	1,51	10,50
Bopindolol-dp1	3,77	1,35	7992	6,26	1,38	11,27
Labetalol	6,16	12,33	12729	3,93	1,42	19,03
Propranolol	7,09	4,46	20163	2,48	1,47	22,06
Bopindolol-dp2	7,92	3,65	15479	3,23	1,36	24,76
Bopindolol	10,97	13,34	47055	1,06	1,40	34,66

Na monolitické analytické koloně byly nalezeny takové separační podmínky, které umožnily separaci všech zkoumaných BB v jedné analýze a zároveň byl pík atenololu dostatečně vzdálen od mrtvého objemu kolony. U atenololu byl v této analýze téměř splněn požadavek na hodnotu kapacitního faktor $k > 2$. Retenční faktor atenololu měl hodnotu 1,97 při retenčním čase $t_R = 0,913$ min. Velkou výhodou analýzy byl její krátký čas při velmi dobré separaci většiny BB. Byla vyzkoušena strmější gradientová eluce, která by ještě zrychlila analýzu. Výsledný chromatogram je znázorněn na Obrázku 35.

Obrázek 35 chromatogram směsi na monolitické analytické koloně, MF ACN / PUFR 4,5, gradientová eluce 10 - 25% (7,5 min) – 40% (10 min), průtok 6,0 ml/min, nástřik 10 μ l.



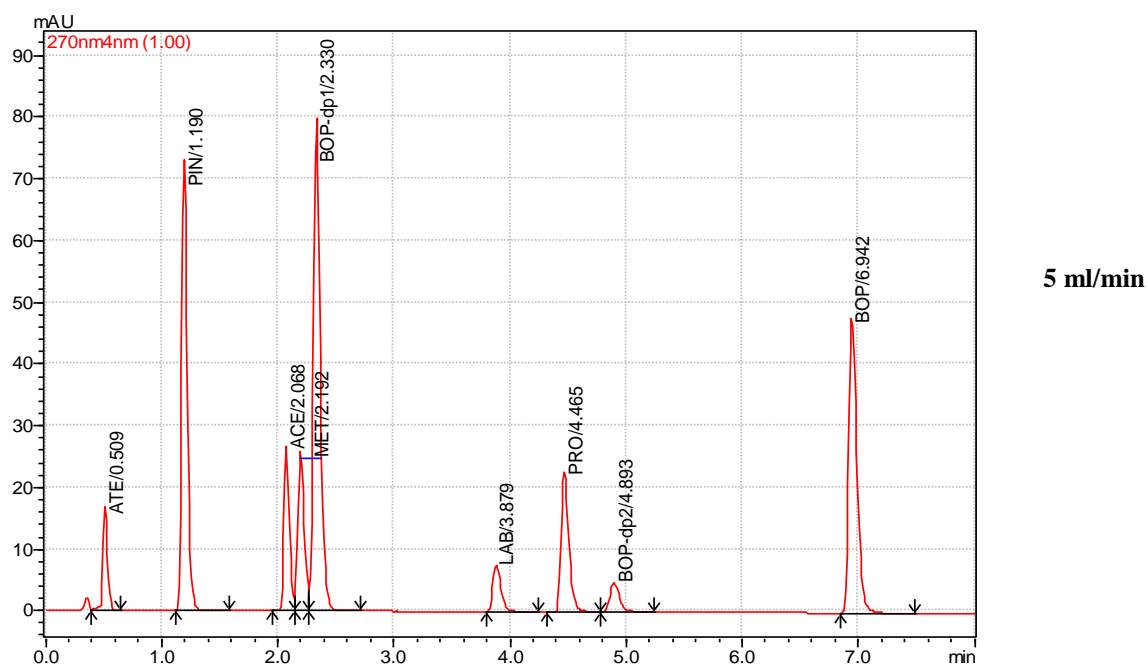
Rozlišení dvojic acebutolol - metoprolol a metoprolol - degradační produkt bopindololu nebyla dostatečná. Byla vyzkoušena separace při různém průtoku MF. Srovnání rozlišení výše zmíněných dvojic betablokátorů v závislosti na průtoku MF analytickou kolonou je uvedeno v Tabulce 15.

Tabulka 15 Rozlišení píků acebutololu-metoprololu a metoprololu-bopindololu-dp v závislosti na průtoku MF monolitickou analytickou kolonou při metodě gradientové eluce mobilní fází ACN / PUFR 4,5 v koncentraci ACN 10 – 35% ACN po dobu 8 minut.

Průtok	$R_{\text{acebutolol-metoprolol}}$	$R_{\text{metoprolol-bopindolol-dp}}$
5,0	1,01	1,10
4,0	1,24	1,10
3,0	1,37	1,16

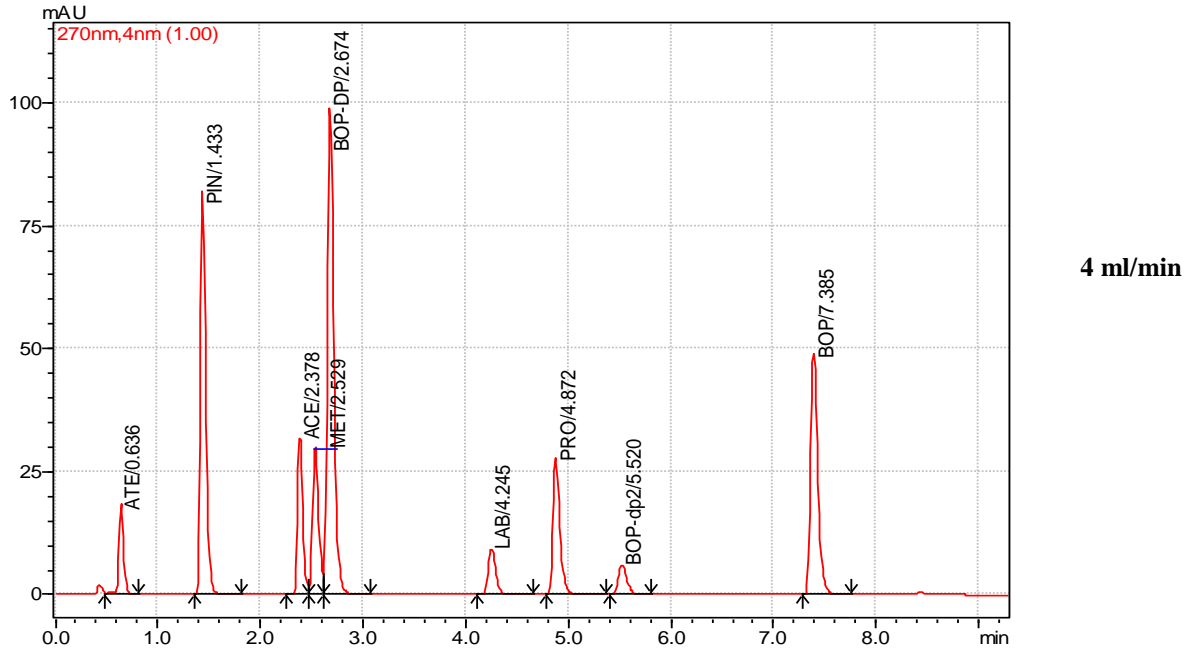
Při průtoku MF rychlostí 3 ml/min bylo rozlišení nejlepší, nespĺňovalo však lékopisný požadavek na hodnotu rozlišení $R_s > 1,5$. Jednotlivé chromatogramy jsou uvedeny dále na Obrázcích 36, 37 a 38.

Obrázek 36 chromatogram směsi na monolitické analytické koloně, MF ACN / PUFR 4,5, gradientová eluce 10 - 35% (8 min), průtok 5,0 ml/min, nástřik 10 μ l.

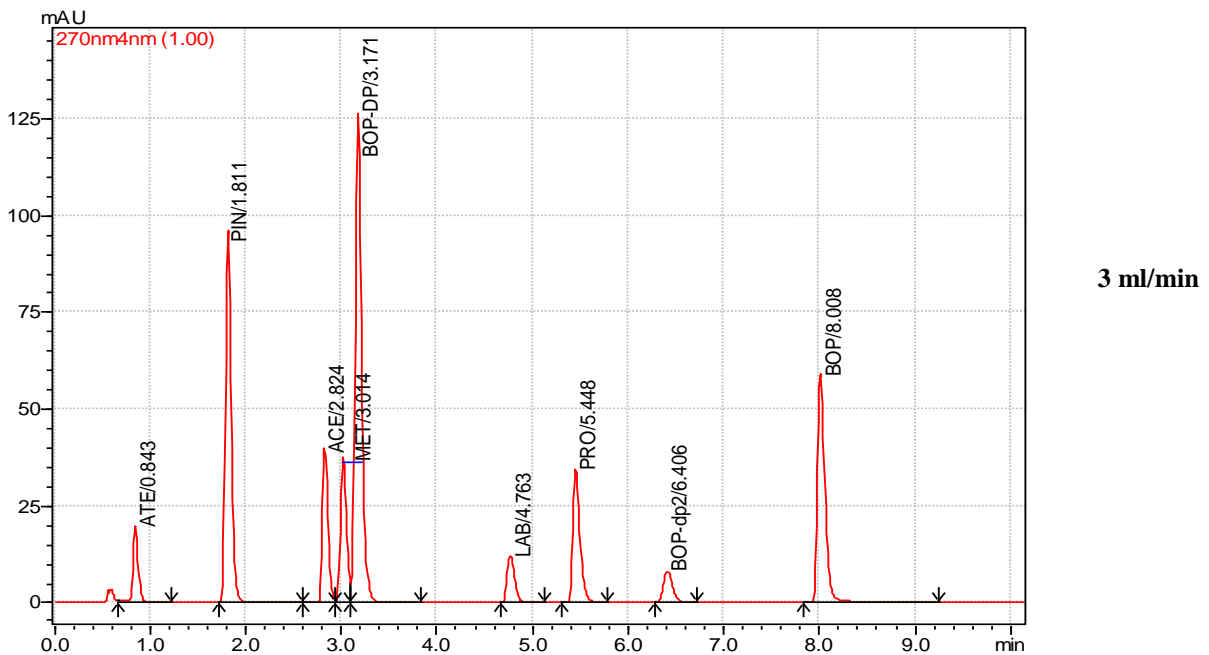


V čase 4,98 byl detekován pík, který se objevil rovněž po nástřiku jednotlivého standardu bopindololu. Jedná se o druhý rozkladný produkt bopindololu.

Obrázek 37 chromatogram směsi na monolitické analytické koloně, MF ACN / PUFR 4,5, gradientová eluce 10 - 35% (8 min), průtok 4,0 ml/min., nástřik 10 μ l.

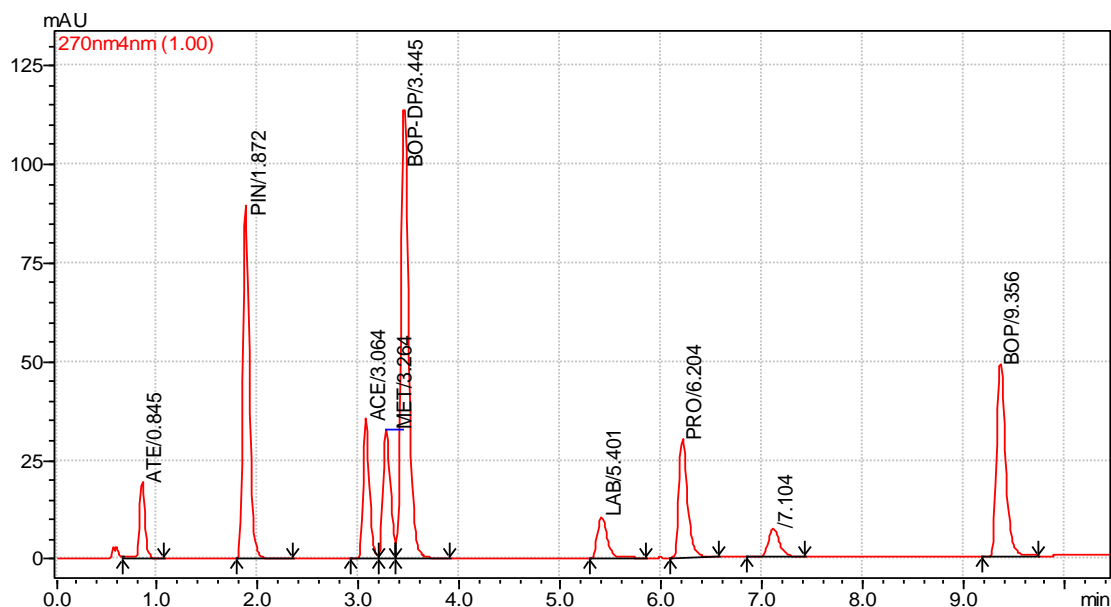


Obrázek 38 chromatogram směsi na monolitické analytické koloně, MF ACN / PUFR 4,5, gradientová eluce 10 - 35% (8 min), průtok 3,0 ml/min., nástřik 10 μ l.



Pro lepší rozlišení mezi látkami ACE-MET a MET-BOP-dp byl zvolen mírnější gradient při průtoku 3 ml/min. Doba analýzy byla 10 minut. Chromatogram je znázorněn na Obrázku 39, SST parametry jsou shrnuty v Tabulce 16.

Obrázek 39 chromatogram směsi na monolitické analytické koloně, pH 4,5, MF ACN / PUF 4,5, gradientová eluce 10 - 35% (10 min), průtok 3,0 ml/min, nástřik 10 μ l.



Tabulka 16 SST parametry chromatogramu na Obrázku 39.

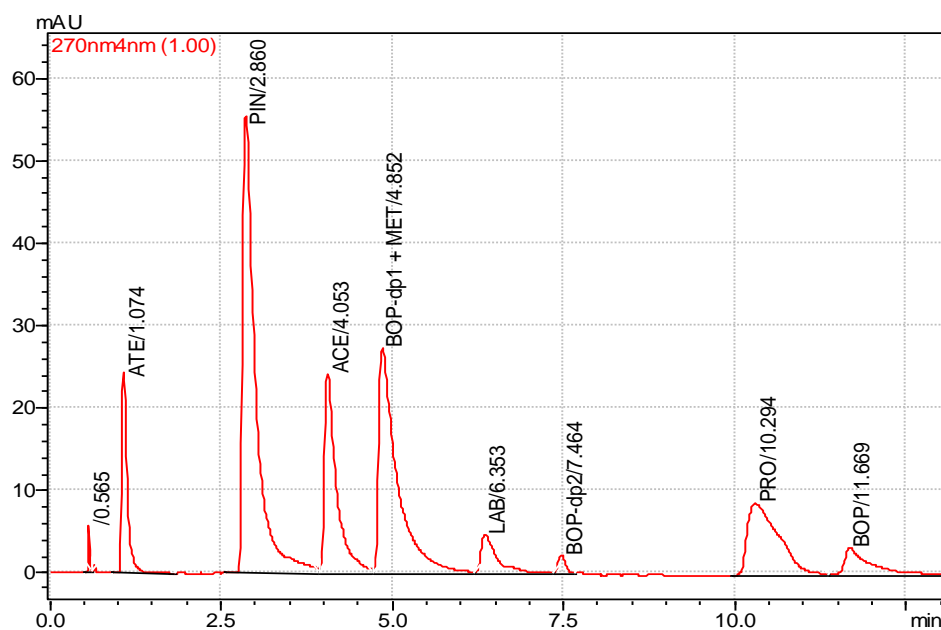
BB / SST	t_R	R_S	N	HETP	A_s	k
Atenolol	0,85	---	920	54,35	1,35	0,00
Pindolol	1,87	8,36	3107	16,09	1,39	1,22
Acebutolol	3,06	8,87	8285	6,04	1,42	2,63
Metoprolol	3,26	1,37	6927	7,22	---	2,86
Bopindolol-dp1	3,45	1,16	7805	6,41	1,39	3,08
Labetalol	5,40	11,36	13178	3,79	1,43	5,39
Propranolol	6,20	4,40	19766	2,53	1,46	6,34
Bopindolol-dp2	7,10	4,55	16872	2,96	1,36	7,41
Bopindolol	9,36	11,37	44502	1,12	1,41	10,08

Rychlejší analýza by byla možná pro většinu analyzovaných látek při zachování účinné separace. Problém je u degradačního produktu bopindololu, který má podobou retenci na sorbentu jako metoprolol. Rozlišení acebutololu a metoprololu také nesplňuje lékopisné požadavky. Celkově byla na monolitické analytické koloně pozorována výborná separace zkoumaných látek při pH = 4,5 s dobrým tvarem píků na chromatogramu při výrazném snížení doby analýzy.

5.2.2 Výsledky a diskuze při pH 7,4

Při pH 7,4 byla na chromatogramu pozorována výrazně horší symetrie píků a na monolitické analytické koloně při pH 7,4 docházelo k vyšší retenci zkoumaných látek. Bylo to dáno nižší disociací zkoumaných látek. Lékopisem požadovaná hodnota faktoru symetrie nebyla splněna u žádného píku. Chromatogram je znázorněn na Obrázku 40.

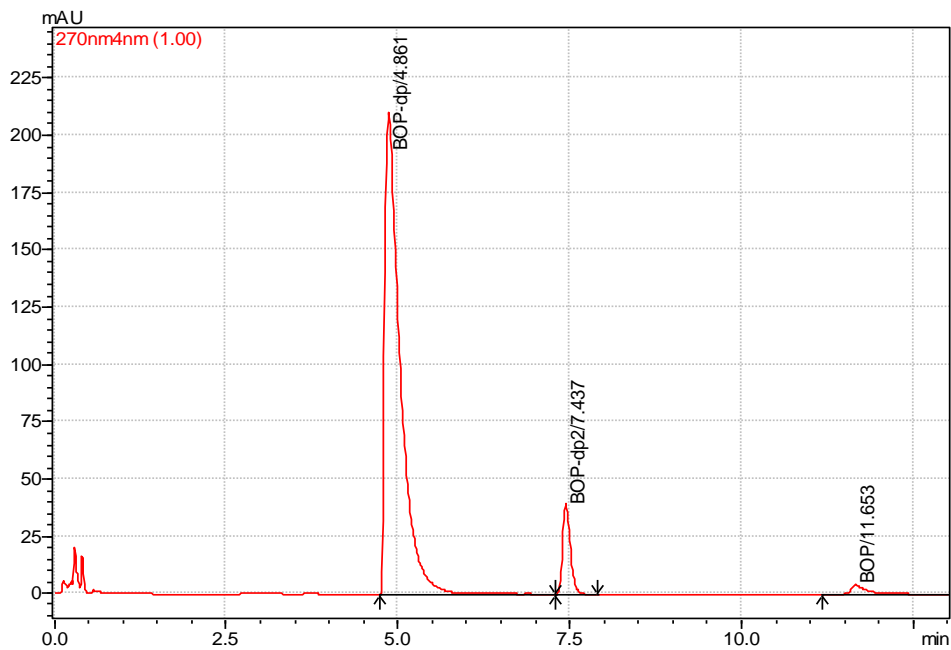
Obrázek 40 chromatogram směsi na monolitické analytické koloně, MF ACN / PUFR 7,4, gradientová eluce 10 - 35% (10 min), průtok 3,0 ml/min, nástřik 10 μ l.



Po nástřiku metoprololu byl zjištěn jeho retenční čas 5,04. V chromatogramu směsi znázorněném na Obrázku 40 je v čase 4,85 asymetrický pík, který odpovídá degradačnímu produktu bopindololu a zároveň metoprololu. Ani další pokusy změnit separační podmínky nevedly ke zlepšení separace a k lepšímu rozlišení. Při pH 7,4 docházelo na monolitické analytické koloně Chromolith C18 k výraznému chvostování píků a obtížné separaci látek. Monolitická analytická kolona není vhodná pro analýzu při vyšším pH.

Při pH 7,4 byla pozorována rychlejší hydrolýza esterové vazby bopindololu. Měření bylo provedeno s roztokem po několika dnech uchování v chladu, chromatogram je znázorněn na Obrázku 41.

Obrázek 41 chromatogram roztoku bopindololu na monolitické analytické koloně, MF ACN / PUFR 7,4, gradientová eluce 10 - 35% (10 min), průtok 3,0 ml/min, nástřik 10 μ l.



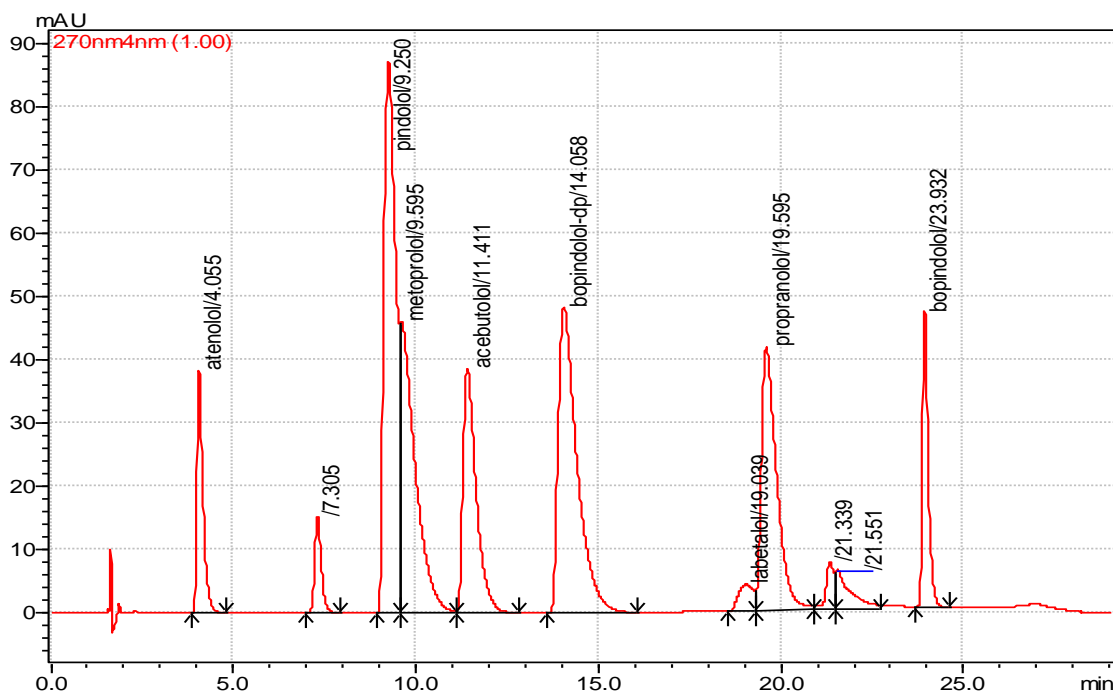
5.3 Betulinová analytická kolona

5.3.1 Výsledky a diskuze při pH 4,5 a 7,4

Separace na této analytické koloně byla pro některé látky ze směsi betablokátorů dobrá, docházelo však k výraznému chvostování. Lipofilnější molekuly byly sorbentem významně zadržovány a bylo proto nutné použít strmý gradient, aby byla zvýšena eluční síla mobilní fáze. I přesto byla analýza velmi časově náročná. Tato analytická kolona není vhodná pro separaci všech zkoumaných betablokátorů. Ani při měření při vyšším pH = 7,4 nebyly výsledky uspokojivé. Betulinová analytická kolona byla vhodná pro separaci polárnějších zástupců betablokátorů - atenololu a pindololu při pH = 4,5. Chromatogram při pH mobilní fáze 4,5 je znázorněn na Obrázku 42, při pH 7,4 na Obrázku 43. Při pH 7,4 byl použit v závěru analýzy strmější gradient MF se 70% podílem ACN již v čase 20 min (namísto 25 min v analýze při pH 4,5).

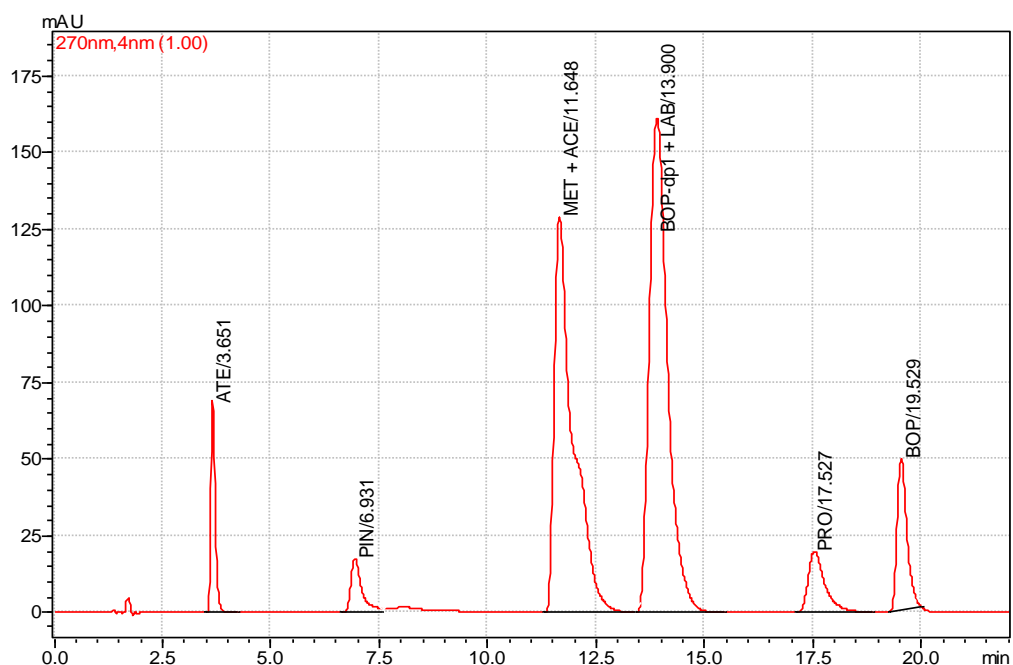
Obrázek 42 chromatogram směsi na betulinové analytické koloně, MF ACN / PUF 4,5, gradientová eluce 10 - 25% (15 min) – 70% (25 min), průtok 1,0 ml/min, nástřik 10 μ l.

pH = 4,5



Obrázek 43 chromatogram směsi na betulinové analytické koloně, MF ACN / PUFR 4,5, gradientová eluce 10 - 25% (15 min) – 70% (20 min), průtok 1,0 ml/min, nástřik 10 μ l.

pH = 7,4



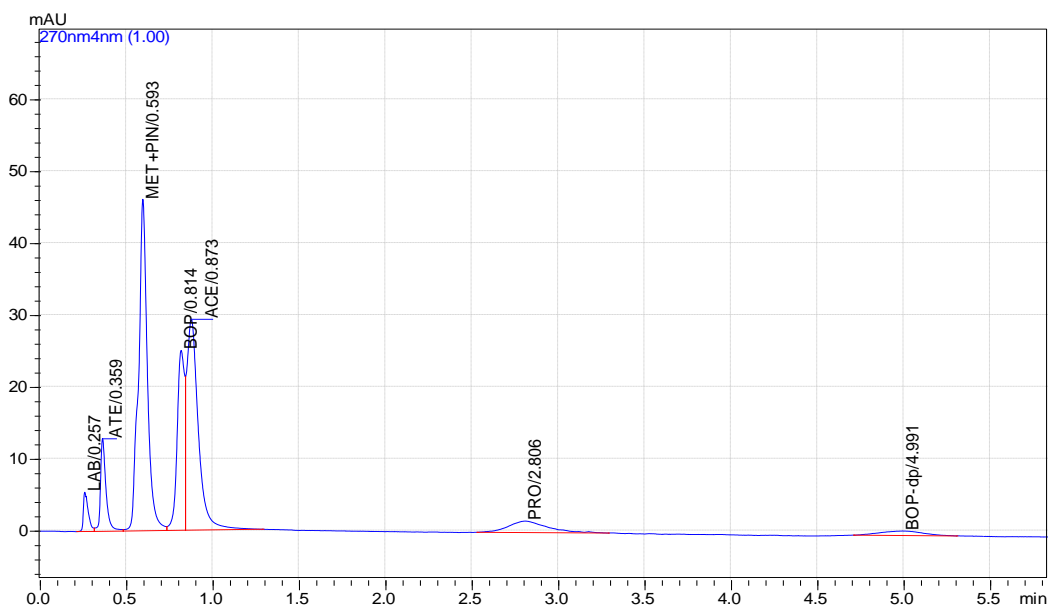
Na rozdíl od analytických kolon C18 a monolitických kolon nebyla při zvýšení pH z 4,5 na pH 7,4 pozorována zvýšená retence na SF a na chromatogramu nebyly pozorovány výraznější posuny retenčních časů. Vzhledem k velmi dlouhé analýze i při použití strmějšího gradientu MF a špatné symetrii píků analyzovaných látek, nebyla betulinová analytická kolona shledána vhodnou pro separaci látek ze skupiny betablokátorů.

5.4 Zirkoniové analytické kolony

5.4.1 Výsledky a diskuze

Sorbent na bázi oxidu zirkoničitého by měl být vhodný pro separaci bazických látek, umožňuje použití vyššího pH a vyšší teploty při měření. Prakticky byly vyzkoušeny dvě analytické kolony Discovery Zr-CarbonC18 a Discovery Zr-PBD. Došlo k výraznému zrychlení analýzy, k významně nižší retenci zkoumaných látek, avšak podmínky pro účinnou separaci jednotlivých látek nalezeny nebyly. Byly vyzkoušeny různé poměry složek mobilní fáze, včetně různě strmých gradientů a měření při vyšší teplotě (70°C). Zkoumané látky byly na sorbentu málo zadržovány a jejich separace byla problematická. Částečná separace byla dosažena na analytické koloně Discovery Zr-CarbonC18 při isokratické eluci při složení mobilní fáze ACN/pufr 50:50. Při snížení eluční síly mobilní fáze byly prodlouženy retenční časy, ale účinná separace nalezena nebyla ani při použití gradientové eluce. Chromatogram je uveden na Obrázku 44. Na analytické koloně Discovery Zr-PBD nebyly nalezeny podmínky pro lepší výsledek separace.

obrázek 44 chromatogram vzorku směsi na zirkoniové analytické koloně Discovery Zr-Carbon C18, MF ACN / PUFR 10,0, isokratická eluce 50:50. Teplota na koloně 70°C.

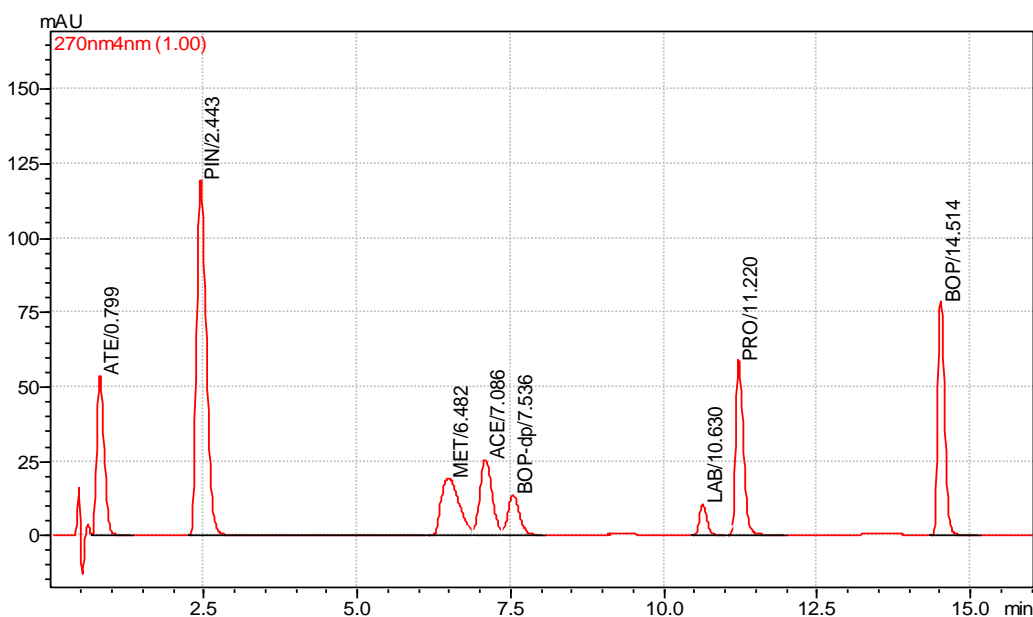


5.5 Analytická kolona Gemini

5.5.1 Výsledky a diskuze při pH 4,5

Na analytické koloně Gemini byly vyzkoušeny různé poměry mobilní fáze. Dobrá separace 7 betablokátorů byla zaznamenána při kombinaci počáteční isokratické a následně gradientové eluce. Podobné retenční časy byly zaznamenány u metoprololu, acebutololu a u degradačního produktu bopindololu, což bylo potvrzeno nástřikem jednotlivých standardů. Oproti analytické koloně Zorbax Eclipse C-18 XDB došlo ke změně pořadí eluce metoprololu a acebutololu. Byly hledány takové podmínky umožňující dobré rozlišení i těchto látek ve směsi. Analýza s 5 minutovou isokratickou a následně gradientovou elucí do 20. minuty analýzy s navýšením organického podílu v MF (od 10% až na 50% podíl ACN) je znázorněna na chromatogramu na Obrázku 45. SST parametry jsou uvedeny v Tabulce 17.

Obrázek 45 chromatogram směsi na koloně Gemini, MF ACN / PUF_R 4,5, 5min isokratická eluce (10% ACN), gradientová eluce 5 – 20 min (10 - 50%ACN), průtok 0,5 ml/min, nástřik 2 μ l.



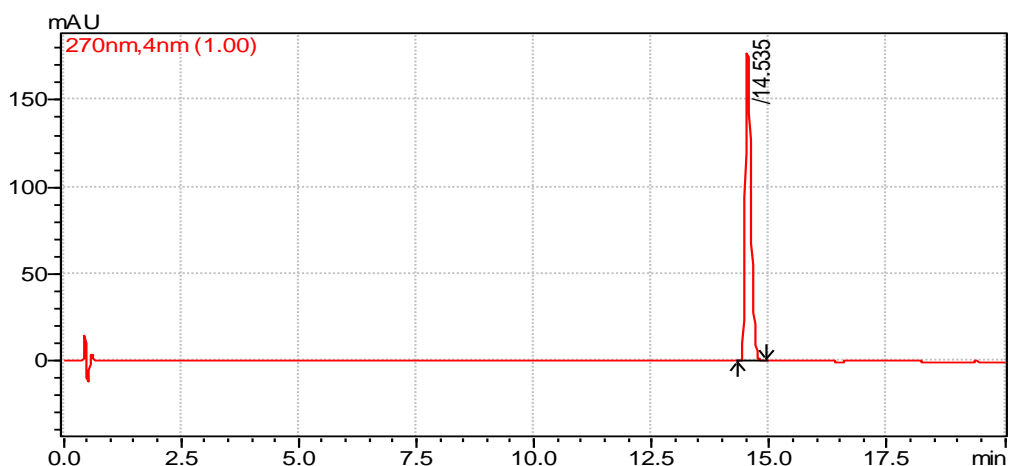
Tabulka 17 Parametry chromatogramu znázorněného na Obrázku 45.

BB / SST	t _R	R _S	N	HETP	A _s	k
Atenolol	0,80	--	181	276,07	1,35	0,00
Pindolol	2,44	6,09	1045	47,86	1,36	2,06
Metoprolol	6,48	9,43	2188	22,86	---	7,11
Acebutolol	7,09	1,29	5539	9,03	1,16	7,87
Bopindolol-dp	7,54	1,22	7049	7,09	---	8,43
Labetalol	10,63	10,42	32814	1,52	1,31	12,30
Propranolol	11,22	2,47	33938	1,47	1,41	13,04
Bopindolol	14,51	14,20	69467	0,72	1,35	17,16

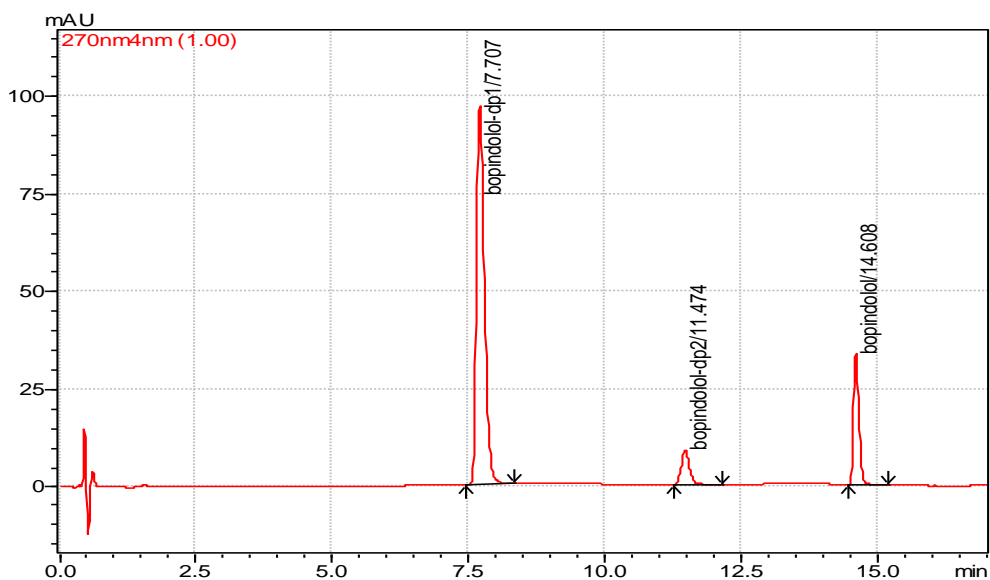
Na analytické koloně Gemini byly zkoumané látky velmi dobře separovány s vyhovující symetrií píků, která byla u všech látek lepší ve srovnání s výsledky na analytické koloně C-18. Problémem však byly malé rozdíly mezi retenčními časy metoprololu, acebutololu a degradačního produktu bopindololu a následně špatné parametry rozlišení mezi látkami MET - ACE a ACE - BOP-dp. Labetalol je na této analytické koloně podstatně více zadržován než na předchozí stacionární fázi C-18. Naopak atenolol a pindolol byly na hybridním sorbentu zadržován méně než na stacionární fázi C-18 a jejich retenční časy byly nižší. Požadavky na hodnotu retenčního faktoru nesplňoval atenolol, u pindololu byl retenční faktor těsně nad požadovanou hodnotou $k > 2,0$. V čase 7,5 min byl pozorován pík, který neodpovídal žádné ze zkoumaných látek. Jednalo se o degradační produkt bopindololu. Druhý degradační produkt měl jen velmi slabou odezvu detektoru. Na Obrázku 46 je znázorněn chromatogram po nástřiku čerstvě připraveného roztoku bopindololu. Na chromatogramu je patrný pouze jeden pík, odpovídající esteru. V roztoku dochází k rozkladu esteru. Již po několika hodinách od přípravy čerstvého standardu bopindololu se na chromatogramu objevily píky, odpovídající jeho degradačním produktům. Chromatogram nástřiku roztoku bopindololu v methanolu po pěti dnech stání je zobrazen na Obrázku 47. Pravděpodobný degradační produkt *terc*-butylamino-3-(2-methyl-1H-indol-4-yl)oxy)propan-2-ol je chemicky velmi podobný pindololu, ve své molekule navíc obsahuje 2 uhlíkové atomy, které jsou navázány v blízkosti atomu dusíku a které snižují

bazicitu aminové skupiny. Nepolární skupiny ve struktuře degradačního produktu bopindololu, kterými se liší od struktury pindololu, jsou příčinou jeho vyšší retence na nepolární stacionární fázi. Druhým degradačním produktem je pravděpodobně kyselina benzoová. Nebylo cílem práce identifikovat ani primárně hledat optimální separační podmínky pro degradační produkty bopindololu, nicméně bylo nutné při separaci zkoumaných látek s těmito odezvami na chromatogramu počítat. Byly proto hledány takové podmínky, ve kterých by byly separovány jak všechny zkoumané látky, tak i jejich degradační produkty.

Obrázek 46 Nástřik čerstvě rozpuštěného bopindololu (v methanolu) na koloně Gemini, MF ACN / PUFR 4,5, 5 min isokratická eluce (10%ACN) 5 – 20 min (50%ACN) gradientová eluce, detekce při 270 nm, průtok 0,5 ml/min, nástřik 2 μ l.



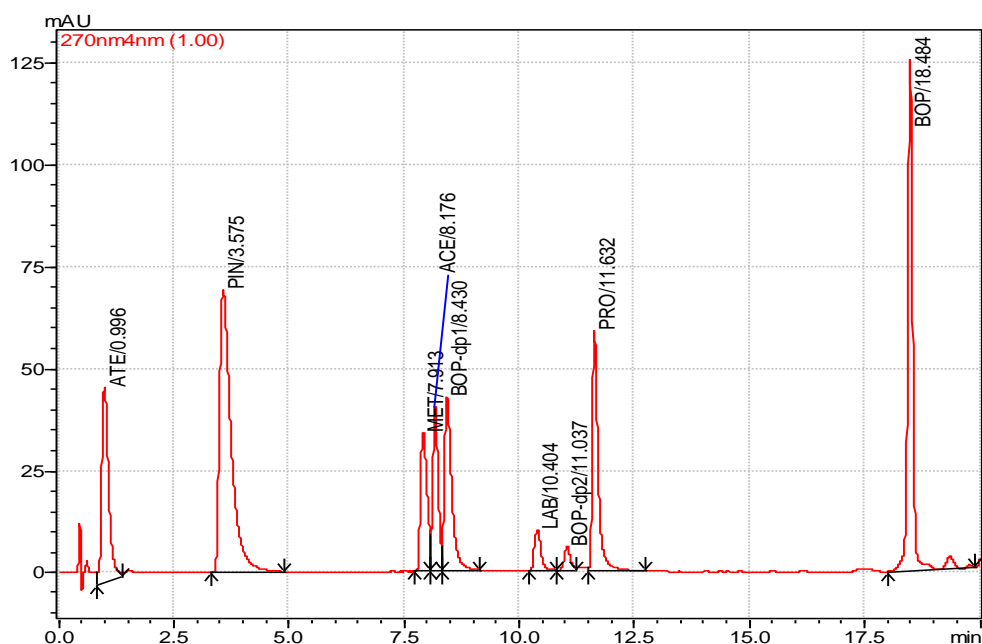
Obrázek 47 Nástřik roztoku bopindololu po 5 dnech uchovávání v chladu (do 8°C) na koloně Gemini,



5.5.2 Výsledky a diskuze při pH 7,4

Při vyšším pH byly prodlouženy retenční časy bazických látek na koloně z důvodu jejich nižší disociace v mobilní fázi. Například retenční čas pindololu byl prodloužen z $t_R = 2,4$ min na $t_R = 3,6$ min při isokratické eluci MF ACN/PUFR 7,4 v poměru 10:90 v časovém intervalu 0 – 5 min. Pro rychlejší eluci nepolárního bopindololu byl poté nastaven strmější gradient s konečným vyšším podílem organické složky v MF v čase analýzy $t = 20$ min (MF s 60% podílem ACN). Ačkoli byl v čase analýzy $t = 20$ min ve složení mobilní fáze při pH 7,4 vyšší podíl ACN ve srovnání s analýzou při pH 4,5 (60% podíl ACN místo 50%), retenční čas bopindololu byl delší $t_{R(pH\ 7,4)} = 18,5$ min (oproti $t_{R(pH\ 4,5)} = 14,5$ min). Chromatogram je uveden na Obrázku 48. Při vyšším pH byla stále nevyhovující separace metoprololu, acebutololu a degradačního produktu bopindololu. Při použití mírnějšího gradientu došlo k posunu píku acebutololu na chromatogramu a bylo pozorováno lepší rozlišení mezi látkami MET – ACE, ale hodnota rozlišení mezi ACE – BOP-dp byla horší. Při mírnějším gradientu byla pozorována téměř současná eluce a splynutí píků acebutololu a degradačního produktu bopindololu. Na koloně Gemini při pH 7,4 nebyly nalezeny takové podmínky separace, které by umožnily dobré rozlišení všech píků zkoumaných látek zahrnující i degradační produkty bopindololu.

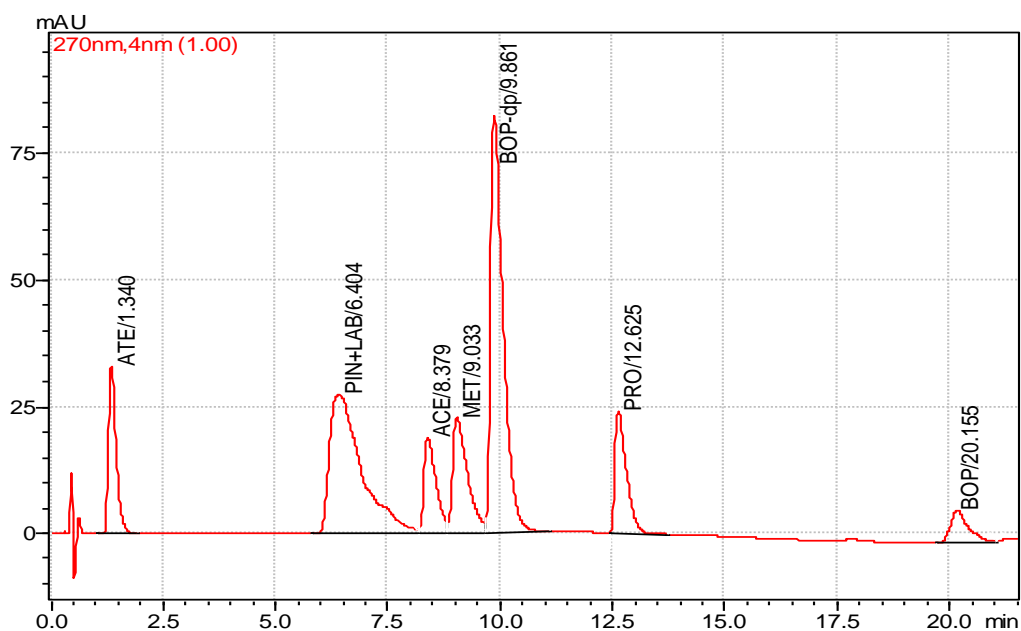
Obrázek 48 chromatogram směsi BB na analytické koloně Gemini, MF ACN / PUFR 7,4, 5 min isokratická eluce (10%ACN) 5 - 20 min (60%ACN) gradientová eluce, průtok 0,5 ml/min, nástřik 2 μ l.



5.5.3 Výsledky a diskuze při pH 10,0

Při pH 10,0 docházelo k vyšší retenci látek opět s výjimkou labetalolu, jehož fenolická skupina se ionizuje na fenolát a takto ionizovaná molekula je eluována z analytické kolony rychleji. Rozdíl je patrný, srovnáme-li retenční čas labetalolu s ostatními zástupci zkoumaných betablokátorů. Podobně jako v analýze na analytické koloně C18 bylo nutné hledat podmínky, které by umožnily separovat labetalol a pindolol, protože jejich retenční časy se při pH 10 prakticky shodují. Chromatogram je uveden na Obrázku 49.

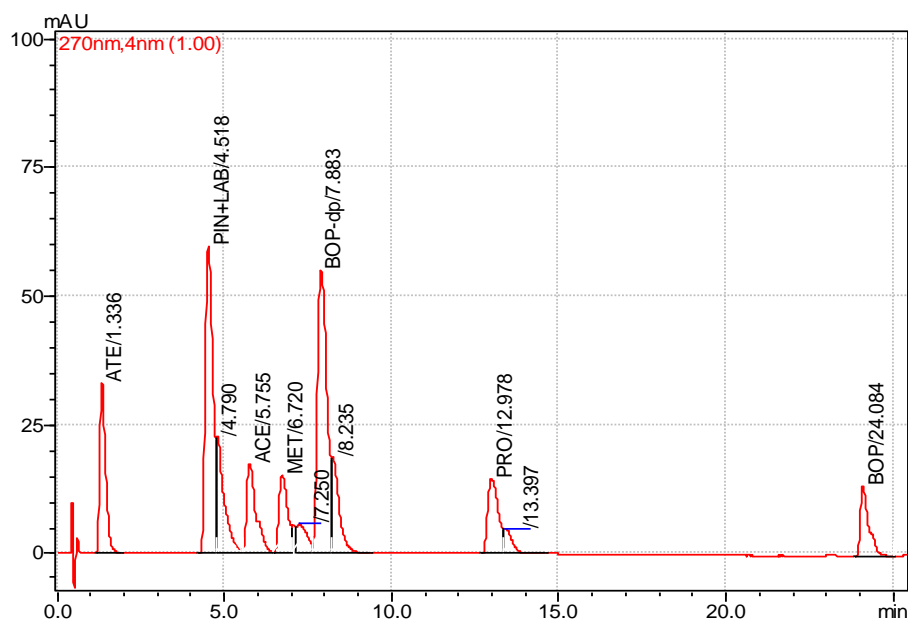
Obrázek 49 chromatogram směsi BB na koloně Gemini, MF ACN / PUFR 10,0, 5 min isokratická eluce 15% ACN, pak gradientová eluce 15 - 60% (20 min) ACN, detekce při 270 nm, průtok 0,5 ml/min, nástřik 2 μ l.



Při pH 10 je retence nejpolárnějšího atenololu vyšší, umožňující lepší rozlišení této látky od mrtvého retenčního objemu. I přes vyšší podíl organické složky v MF bylo pozorováno výrazné zadržování zkoumaných látek na analytické koloně. U pindololu se posunul retenční čas na téměř trojnásobek retenčního času změřeného v analýze při pH 4,5. Naopak u labetalolu je retence nižší ve srovnání s retencí při pH 4,5 nebo při pH 7,4 vzhledem k ionizaci fenolické skupiny. Tyto látky za výše uvedených podmínek měly podobné retenční časy, rozlišení jejich píků bylo nevyhovující. Bopindolol se na koloně zadržuje při vyšším pH velmi dlouho a je proto nutné zvýšit eluční sílu mobilní fáze

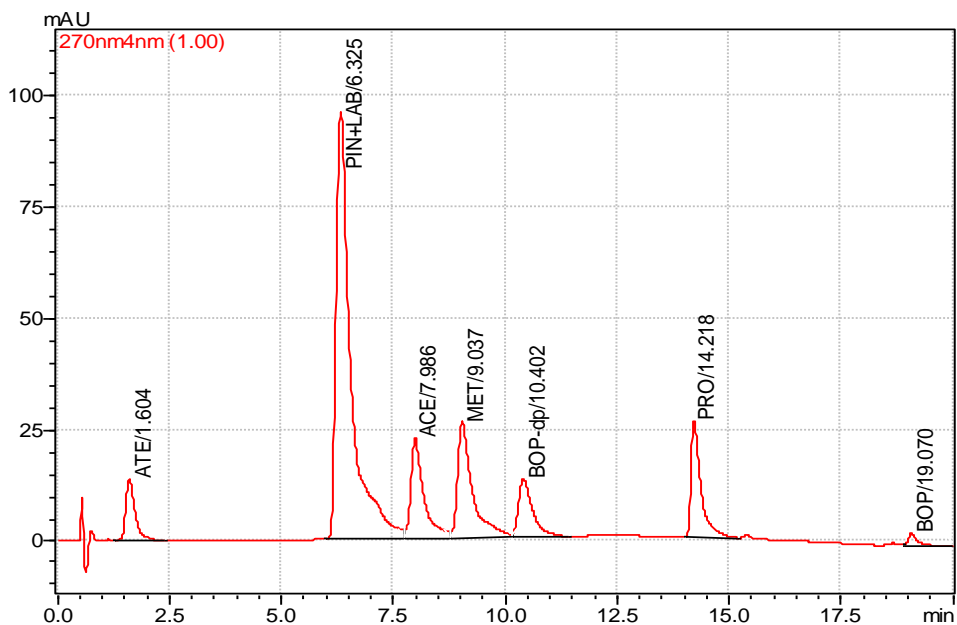
strmějším gradientem. Při strmějším gradientu pak není separace pindololu a labetalolu dostatečná. V následujících měřeních bylo cílem zlepšit separaci méně zadržovaných látek zpočátku velmi mírným gradientem a zkrátit retenci bopindololu pozdějším urychlením gradientu a výrazným zvýšení eluční síly mobilní fáze v závěru analýzy. Při vyšším pH bylo patrné výrazné chvostování píků a nevyhovující faktor symetrie píků. Na hybridním sorbentu to bylo poněkud neočekávané, neboť by měl obsahovat méně volných –OH skupin ve srovnání se sorbenty na bázi silikagelu. Byly vyzkoušeny změny gradientu MF. Byla provedena analýza s mírnějším gradientem. Chromatogram je znázorněn na Obrázku 50. V čase analýzy 20 min byl podíl ACN 40% (oproti 60% podílu ACN v předchozí analýze). Mezi 20. a 25.minutou byl urychlen gradient za účelem eluce bopindololu dosažením cílového podílu 60% ACN v MF.

Obrázek 50 chromatogram směsi BB na analytické koloně Gemini, MF ACN / PUFR 10,0, gradientová eluce 15 - 40% (20 min), 20 – 25 min: gradient 40 - 60% ACN, průtok 0,5 ml/min, nástřík 2 µl.



Nejlepší výsledky byly dosaženy použitím mírného gradientu z 15% podílu ACN v mobilní fázi na 25% podíl ACN v mobilní fázi v 10 minutách analýzy a následným zrychlením gradientu až k 65% podílu ACN v čase analýzy 20 minut za účelem urychlení eluce bopindololu. Chromatogram je znázorněn na Obrázku 51, SST parametry jsou uvedeny v Tabulce 18.

Obrázek 51 chromatogram směsi BB na analytické koloně Gemini, MF ACN / PUF 10,0, 2 min isokratická eluce 15% ACN, gradientová eluce 15-25% ACN (2-10 min) a 25-65% ACN (10-20min) průtok 0,4 ml/min, nástřik 4 μ l.



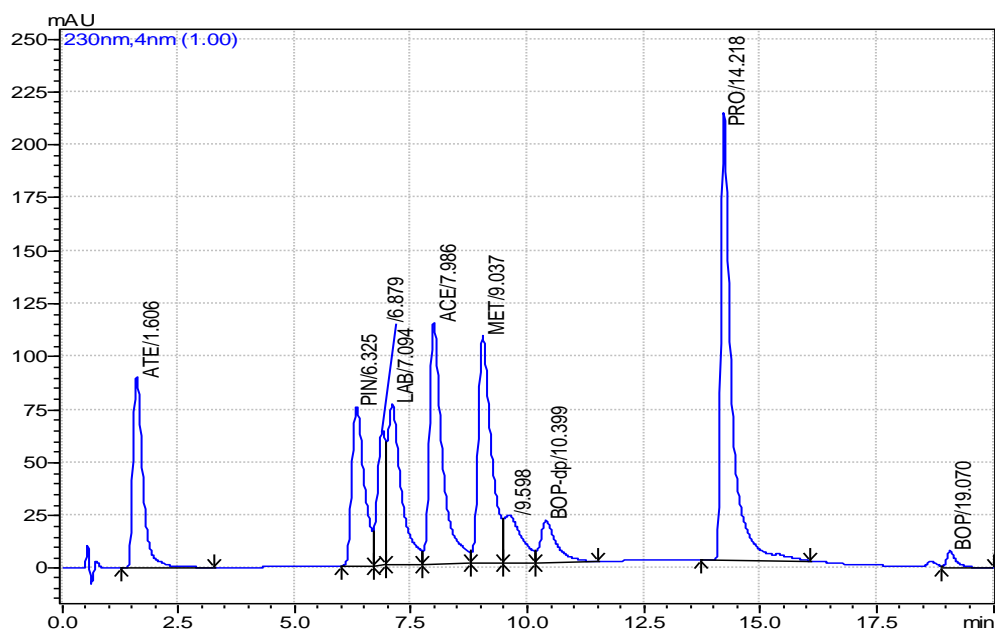
Tabulka 18 Parametry chromatogramu znázorněného na Obrázku 51.

BB / SST	t_R	R_S	N	HETP	A_s	k
Atenolol	1,60	--	304	164,21	1,57	0,00
Pindolol	6,32	10,84	2531	19,76	2,34	2,94
Labetalol	---	---	---	---	---	---
Acebutolol	7,99	3,43	4710	10,62	2,03	3,98
Metoprolol	9,04	2,15	4968	10,06	1,79	4,63
Bopindolol-dp	10,40	2,61	6068	8,24	1,79	5,50
Propranolol	14,22	8,48	24113	2,07	2,13	7,86
Bopindolol	19,07	14,06	55480	0,90	2,19	10,89

Za těchto podmínek nebyla nalezena účinná separace pindololu a labetalolu. Faktory symetrie píků u všech zkoumaných látek nesplňují lékopisné požadavky. Atenolol byl sice při vyšším pH zadržován více, nicméně retence atenololu není dostatečná, aby byly splněny lékopisné požadavky na minimální hodnotu retenčního faktoru.

Lépe je pík labetalolu zřetelný na chromatogramu při detekci při vlnové délce 230nm, znázorněném na Obrázku 52, protože má labetalol v této vlnové délce absorpční maximum.

Obrázek 52 chromatogram směsi BB na analytické koloně Gemini, MF ACN / PUF 10,0, 2 min isokratická eluce 15% ACN, gradientová eluce 15 – 25 % (2 - 10 min) a 25 – 65 % (10 – 20 min) při vlnové délce 230nm, průtok 0,4ml/min, nástřik 4µl.



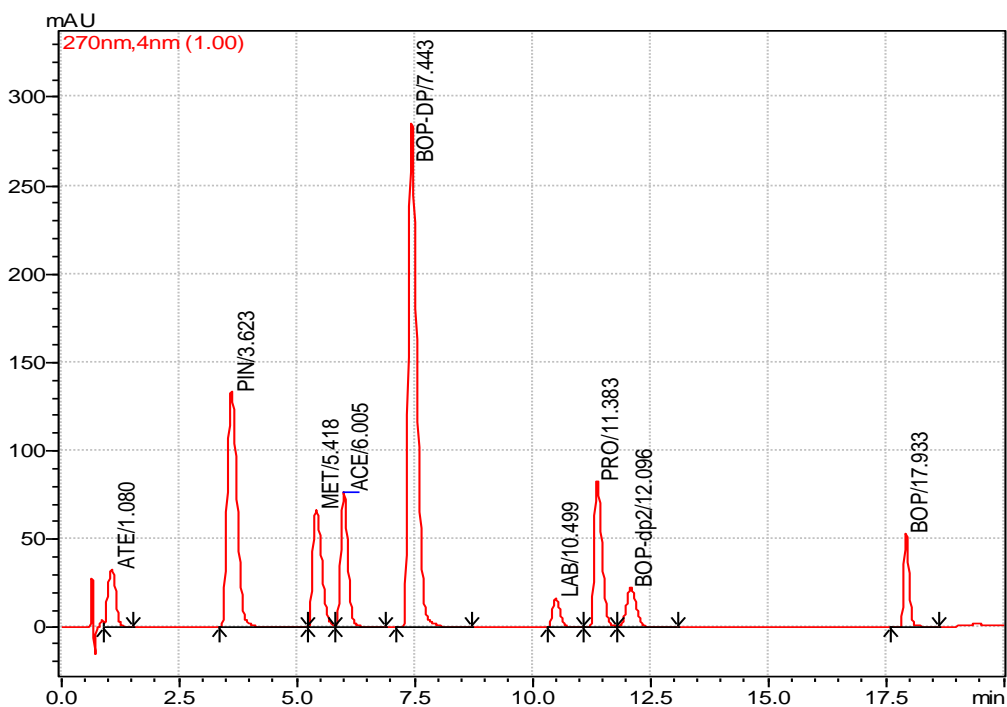
Při této vlnové délce je patrné štěpení píku labetalolu a špatné rozlišení mezi pindololem a labetalolem. Mezi těmito píky není ani dosaženo základní linie chromatogramu.

5.6 Analytická kolona X-Bridge

5.6.1 Výsledky a diskuze při pH 4,5

Na analytické koloně X-Bridge byly při pH 4,5 nalezeny velmi dobré separační podmínky. Chromatogram je znázorněn na Obrázku 53, SST parametry jsou shrnuty v Tabulce 19. Ve srovnání s výsledky na analytické koloně Zorbax XDB C18 došlo stejně jako u hybridní analytické kolony Gemini ke změně selektivity a pořadí eluce metoprololu a acebutololu. Z důvodu horšího rozlišení MET-ACE byla optimalizována eluce s mírnějším gradientem MF než v analýze na C18 sorbentu. To se projevilo delší dobou analýzy. Separační účinnost je v obou případech vyhovující, hodnoty faktoru symetrie jsou lepší v případě hybridního sorbentu X-Bridge. Pouze atenolol je zadržován na sorbentu příliš slabě a jeho odezva je blízko mrtvého objemu. Ostatní látky jsou separovány dobře, vyhovující je rozlišení i symetrie píků.

Obrázek 53 chromatogram směsi BB na analytické koloně X-Bridge, MF ACN / PUF 4,5, isokratická eluce 2 min, gradientová eluce 10 - 30% ACN v MF (2 - 15 min) 30 - 50% ACN (15 - 20 min), průtok 0,5 ml/min, nástřik 5 μ l. Detekce při vlnové délce 270 nm.



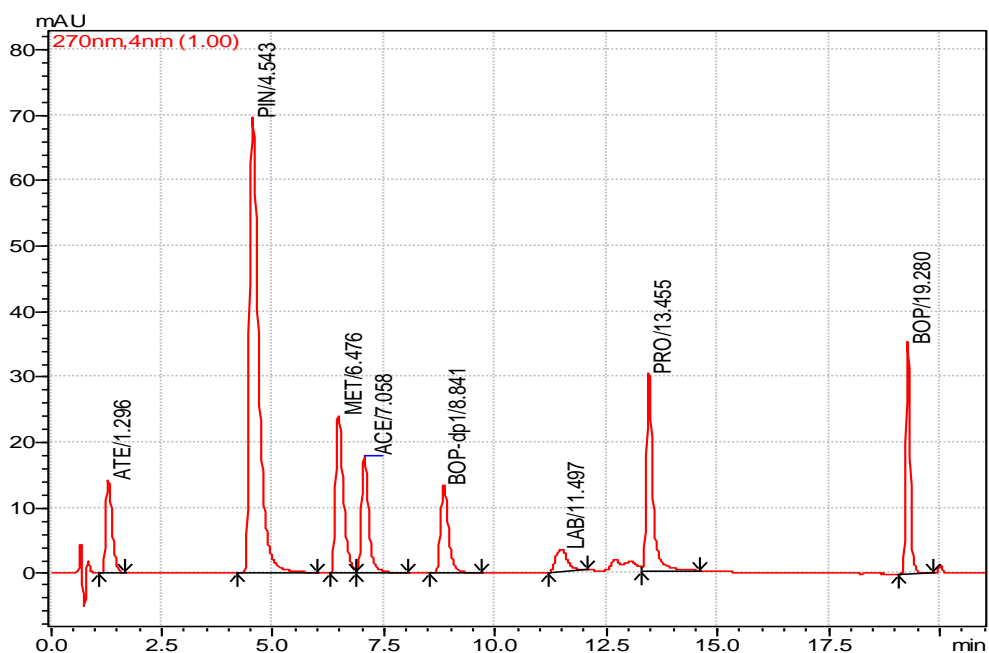
Tabulka 19 Parametry chromatogramu na Obrázku 53.

BB / SST	t_R	R_s	N	HETP	A_s	k
Atenolol	1,08	--	188	265,13	1,14	0,00
Pindolol	3,62	7,22	1384	36,14	1,25	2,35
Metoprolol	5,42	4,76	3532	14,16	1,46	4,01
Acebutolol	6,01	1,79	6802	7,35	1,24	4,56
Bopindolol-dp	7,44	4,51	7400	6,76	1,46	5,89
Labetalol	10,50	9,33	18445	2,71	1,35	8,72
Propranolol	11,38	2,86	21714	2,30	1,42	9,54
Bopindolol-dp2	12.10	2,03	15117	3,31	1,14	10,20
Bopindolol	17,93	19,29	114655	0,44	1,33	15,60

5.6.2 Výsledky a diskuze pH 7,4

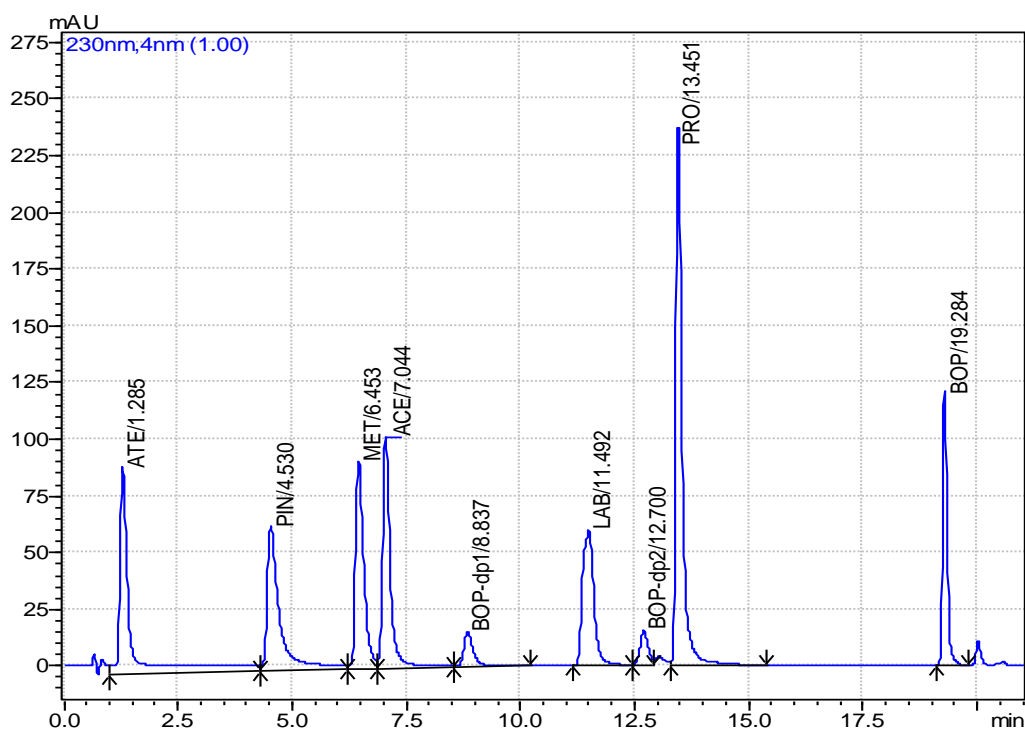
Při vyšším pH byla pozorována větší retence látek, byl zvolen strmější gradient oproti podmínkám při pH 4,5. Isokratická fáze byla snížena na dobu $t = 1$ min, poté byla nastavena gradientová eluce s 10 – 20% podílem ACN v časovém intervalu 1 - 10 min. V časovém intervalu 10 - 20 min se gradientem zvyšoval podíl ACN v MF z 20 až na 65%, aby byl eluován bopindolol s největší retencí na analytické koloně X-Bridge. Chromatogram je znázorněn na Obrázku 54.

Obrázek 54 chromatogram směsi BB na analytické koloně X-Bridge, MF ACN / PUF 7,4, isokratická eluce 1 min, gradientová eluce 10 - 20% ACN (1 - 10 min) a 20 – 65% (10 – 20 min), průtok 0,5 ml/min, nástřik 5 μ l. Detekce při vlnové délce 270 nm.



Při pH 7,4 nebyly nalezeny podmínky pro lepší separaci látek oproti pH 4,5. Bylo pozorováno zhoršení symetrie píků a následně byla snížena hodnota rozlišení mezi metoprololem a acebutololem. Na chromatogramu při vlnové délce 230 nm uvedeném na Obrázku 55 jsou lépe patrné píky labetalolu a druhého degradačního produktu bopindololu.

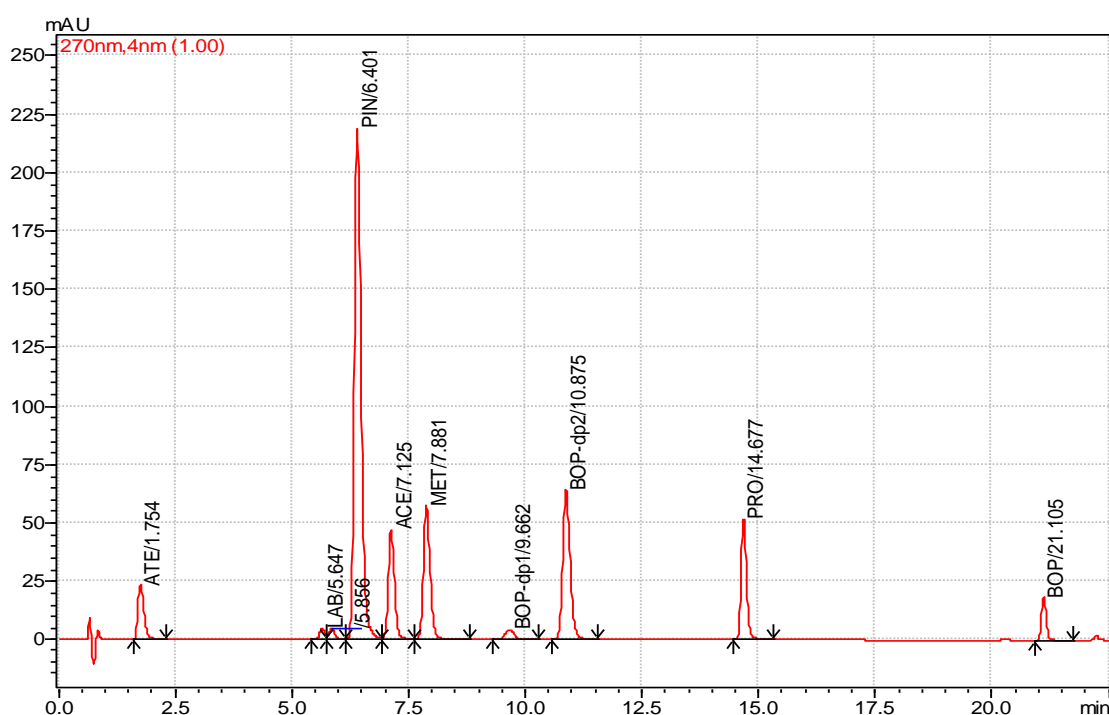
Obrázek 55 chromatogram směsi BB na analytické koloně X-Bridge, MF ACN / PUF 7,4, isokratická eluce 1 min, gradientová eluce 10 – 20 % ACN (1 – 10 min) a 20 – 65 % ACN (10 – 20 min), průtok 0,5 ml/min, nástřik 5 μ l. Detekce při vlnové délce 230 nm.



5.6.3 Výsledky a diskuze při pH 10,0

V analýze na analytické koloně X-Bridge byly nalezeny dobré separační podmínky směsi BB použitím dvoustupňové gradientové eluce. V prvních 10 minutách byl nastaven mírný gradient pro dostatečné rozlišení píků zkoumaných látek včetně degradačních produktů bopindololu a po 10. minutě byl nastaven strmější gradient pro eluci silně se zadržujícího bopindololu. Chromatogram při detekci o vlnové délce 270 nm je znázorněn na Obrázku 56, SST parametry jsou shrnuty v Tabulce 20.

Obrázek 56 chromatogram směsi BB na analytické koloně X-Bridge, MF ACN/PUFR 10,0, gradientová eluce 15 - 25% ACN (10 min) a 25 - 70% (10 - 25 min), průtok 0,5 ml/min, nástřik 5 μ l.



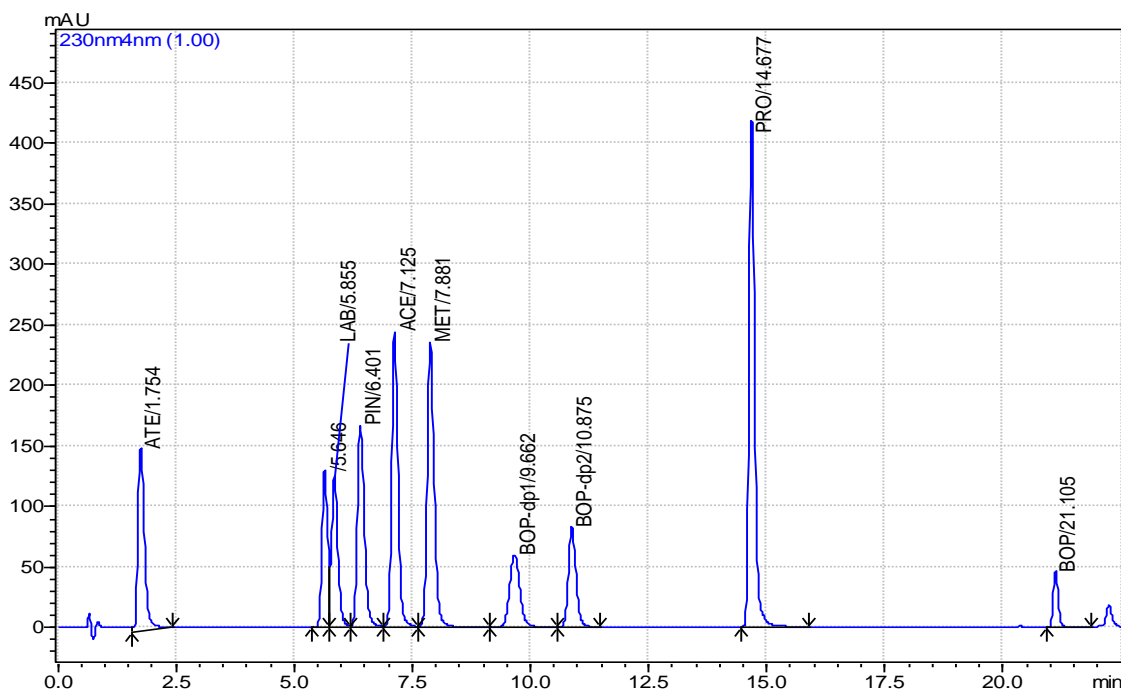
Problémem zůstává malá retence atenololu a naopak příliš velká retence bopindololu. Ostatní zkoumané látky mají vyhovující hodnotu retenčního faktoru. Také rozlišení splňuje lékopisné požadavky, přestože trojice látek pindolol – metoprolol – acebutolol mají relativně blízké retenční časy. Právě z tohoto důvodu musí být gradient zpočátku mírný. Faktor symetrie u všech píků látek splňuje lékopisné požadavky. Srovnáme-li jej s kterýmkoli měřením na různých stacionárních fázích při různé hodnotě pH, jsou v této analýze na hybridním sorbentu X-Bridge při pH 10,0 hodnoty symetrie píků nejlepší.

Tabulka 20 Parametry chromatogramu na Obrázku 56.

BB / SST	t_R	R_s	N	HETP	A_s	k
Atenolol	1,75	--	771	64,86	1,41	0,00
Labetalol	5,65	15,04	7274	6,87	---	2,22
Pindolol	6,40	2,01	8968	5,58	1,24	2,65
Acebutolol	7,13	2,79	13031	3,84	1,15	3,06
Metoprolol	7,88	2,89	13235	3,78	1,20	3,49
Bopindolol-dp1	9,66	5,27	9227	5,42	1,09	4,51
Bopindolol-dp2	10,88	3,45	20862	2,40	1,17	5,20
Propranolol	14,68	14,58	71035	0,70	1,25	7,37
Bopindolol	21,11	30,08	166079	0,30	1,20	11,03

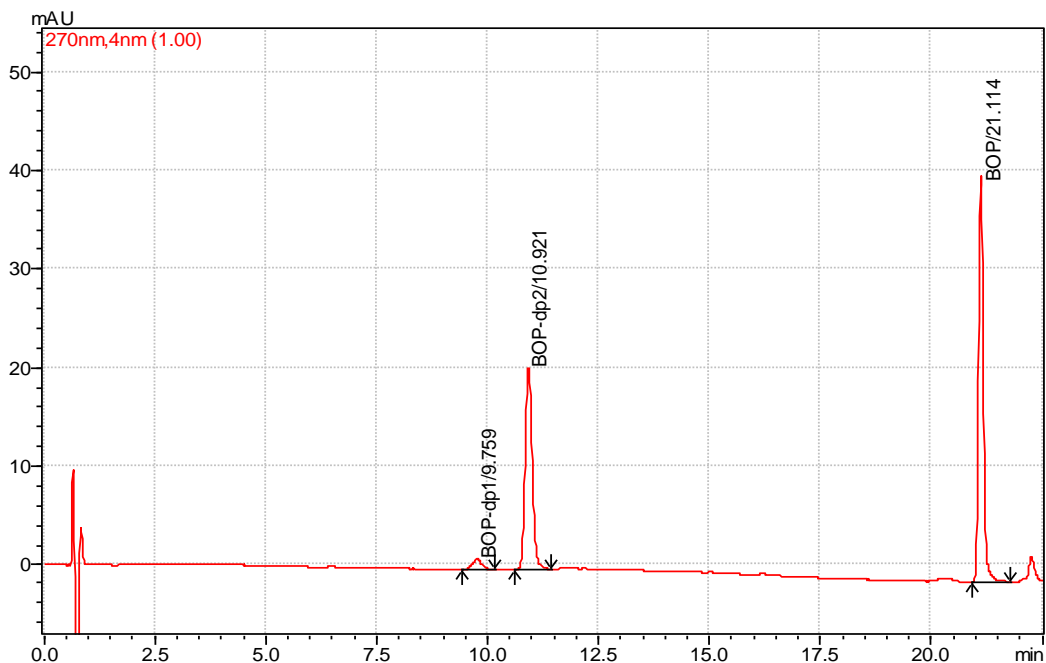
Pro lepší znázornění píku labetalolu je uveden i chromatogram na Obrázku 57 získaný při detekci o vlnové délce 230 nm.

Obrázek 57 chromatogram směsi BB na analytické koloně X-Bridge, MF ACN / PUF 10,0, gradientová eluce 15 - 25% ACN (10 min) a 25 - 70% ACN (10 - 25 min), průtok 0,5 ml/min, nástřik 5 μ l. Detekce při vlnové délce 230 nm.



Při pH 10,0 dochází k velmi rychlé hydrolyze bopindololu. Na Obrázku 58 je znázorněn chromatogram čerstvě připraveného roztoku bopindololu.

Obrázek 58 chromatogram čerstvě připraveného roztoku bopindololu na analytické koloně X-Bridge, pH 10,0, MF ACN / PUFR 10,0, gradientová eluce 15 - 25% (10 min) a 25 - 70% ACN (10 - 25 min), průtok 0,5 ml/min, nástřik 5 μ l. Detekce při vlnové délce 270 nm.



Na analytické koloně X-Bridge byly při pH 10,0 nalezeny podmínky umožňující účinnou separaci všech zkoumaných látek. Nízkou retenci vykazoval atenolol, který je svými chemickými vlastnostmi odlišný od ostatních zástupců a pro jeho účinnou separaci by byly lepší polární stacionární fáze nebo jiné separační metody (např. HILIC). Délka analýzy pro účinnou separaci všech látek včetně degradačních produktů je však poměrně dlouhá. Transferem metody HPLC na metodu UHPLC je však možné získat účinnou separaci v mnohem rychlejší analýze. Proto byla v práci nad rámec úkolu využita i metoda UHPLC.

Vzhledem k velmi dobrým výsledkům separace na hybridní analytické koloně X-Bridge bylo provedeno pět měření pro zjištění opakovatelnosti metody při pH 10,0. Výsledky jsou uvedeny v Tabulce 21.

Tabulka 21 Retenční časy látek 5 nástřiků směsi BB při pH 10,0 s MF ACN / PUFR 10,0, gradientové eluce 15 – 25 % ACN (10 min) a 25 – 70 % ACN (10 – 25 min), průtok 0,5 ml/min, nástřik 5 μ l

BB / nástřiky	Nástřik 1	Nástřik 2	Nástřik 3	Nástřik 4	Nástřik 5
Atenolol	1,75	1,74	1,74	1,74	1,74
Labetalol	5,65	5,62	5,62	5,62	5,61
Pindolol	6,40	6,39	6,39	6,39	6,38
Acebutolol	7,13	7,13	7,13	7,14	7,14
Metoprolol	7,88	7,89	7,90	7,91	7,91
Bopindolol-dp1	9,66	9,61	9,62	9,59	9,56
Bopindolol-dp2	10,88	10,87	10,88	10,88	10,87
Propranolol	14,68	14,68	14,69	14,69	14,68
Bopindolol	21,11	21,09	21,10	21,11	21,10

Dále je vyhodnocena průměrná hodnota retenčního času, směrodatná odchylka a relativní směrodatná odchylka. Pro výpočet relativní směrodatné odchylky byl použit vzorec:

$$\sigma = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N (tr_i - \bar{tr})^2}{N - 1}} * 100\%,$$

kde tr_i vyjadřuje retenční čas v jednotlivém nástřiku a \bar{tr} průměr retenčních časů z pěti nástřiků, N=5 nástřiků.

Průměrné hodnoty retenčních časů, směrodatné odchylky a relativní směrodatné odchylky jsou shrnuty v Tabulce 22.

Tabulka 22 Vyhodnocení orientační opakovatelnosti po 5 měření.

BB / parametry	t_R (min) průměr	Směrodatná odchylka	Relativní směrodatná odchylka (%)
Atenolol	1,742	0,0040	0,23
Labetalol	5,624	0,0136	0,24
Pindolol	6,390	0,0063	0,10
Acebutolol	7,134	0,0049	0,07
Metoprolol	7,898	0,0117	0,15
Bopindolol-dp1	9,608	0,0331	0,34
Bopindolol-dp2	10,876	0,0049	0,05
Propranolol	14,684	0,0049	0,03
Bopindolol	21,102	0,0075	0,04

Z hodnot směrodatných odchylek retenčních časů zkoumaných látek vyplývá velmi dobrá opakovatelnost separační analýzy s relativní směrodatnou odchylkou retenčních časů v řádu maximálně desetin procenta. Stanovení opakovatelnosti metody bylo provedeno orientačně, přesné stanovení opakovatelnosti by vyžadovalo alespoň 6 - 10 měření a vyhodnocení plochy píku. K pokusu zkrácení doby analýzy transferem metody HPLC na UHPLC byla vybrána hybridní stacionární fáze X-Bridge.

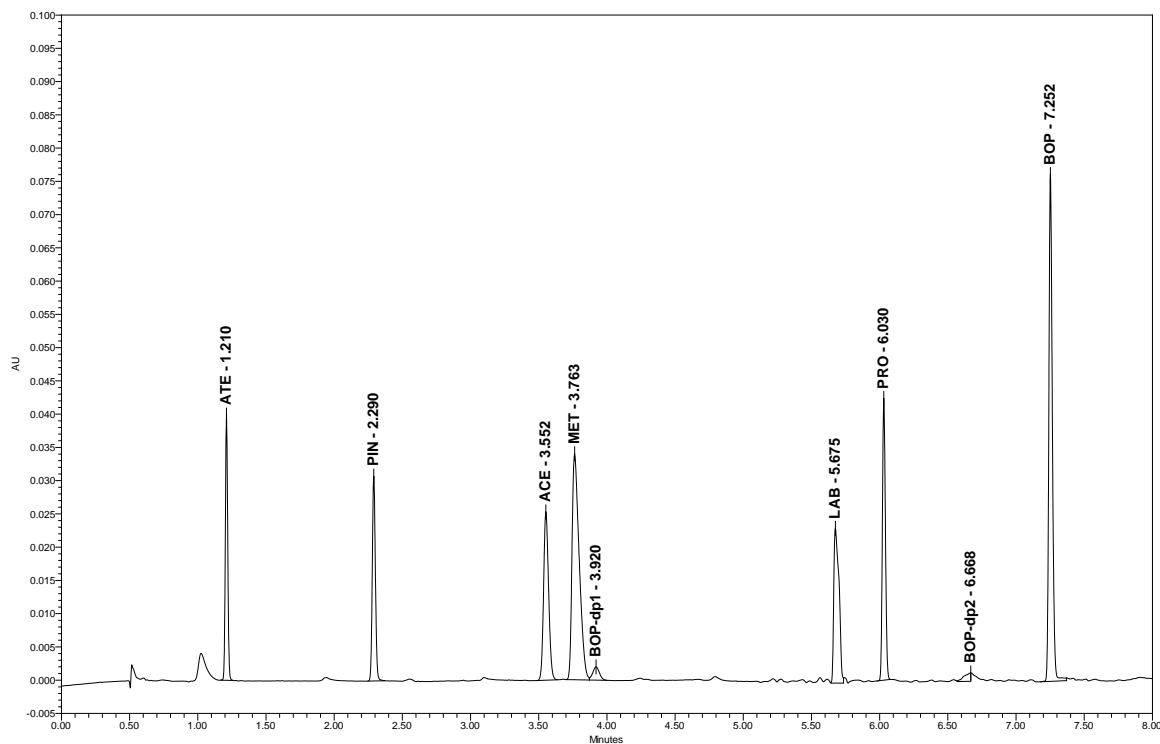
5.7 Výsledky na analytické koloně UPLC BEH Acquity C18

Pro vytvoření podmínek separace pomocí UHPLC systému se vycházelo z optimálních podmínek separace na různých analytických kolonách při různém pH. Neoptimálnější separace bylo dosaženo na sorbentu hybridního typu na analytické koloně X-Bridge při vyšším pH (pH 10). Byl proto použit sorbent stejného typu na analytické koloně Acquity BEH C18 určené pro UHPLC separaci. Mobilní fáze byla vytvořena z roztoků A a B. Roztok A byl pufr - roztok octanu amonného o pH 10 s přídavkem triethylaminu (0,1%), roztok B byl 0,1% roztok triethylaminu v acetonitrilu. Přídavkem triethylaminu do mobilní fáze bylo dosaženo lepší symetrie píků. Triethylamin je malá bazická molekula, která v bazickém prostředí kompetitivně brání volné OH- skupiny sorbentu a tím snižuje parciální retenci zkoumaných látek na stacionární fázi. Na chromatogramu je tak minimalizován efekt chvostování píků.

Jedním z hlavních problémů při hledání vhodných separačních podmínek pro analýzu polárních i nepolárních léčiv ze skupiny betablokátorů na různých analytických kolonách pro HPLC v jedné analýze byla celková doba analýzy. Výhodou UHPLC chromatografie je rychlejší analýza při zachování nebo dokonce zlepšení separačních podmínek. Při různých gradientech byly výsledky optimalizovány a byla vybrána třífázová eluce. Počáteční fáze eluce byla gradientová eluce s mobilní fází složenou z roztoků acetonitrilu (s TEA) a octanu amonného (s TEA) v počátečním poměru 5:95 s lineárním gradientem k mobilní fázi v poměru 15:85 v čase $t = 2$ min. Hydrofilní atenolol byl eluován v retenčním čase $t = 1,21$ min. Po 2 minutách byl gradient zastaven a probíhala 2 minutová fáze isokratické eluce v poměru roztoků mobilní fáze 15 : 85 (ACN / PUFR 10,0). V této fázi eluce byly detektorem zaznamenány odezvy dalších betablokátorů pindololu, acebutololu a metoprololu s dobrým rozlišením píků.

V intervalu 4 - 8 min analýzy byla nastavena gradientová eluce MF v počátečním poměru 15 : 85 lineárně se měnícím k poměru 40 : 60 (ACN / PUFR 10,0). V této fázi byly detekovány zbývající zkoumané látky v analytu. Poslední detekce byla zaznamenána v čase 7,25 min a patřila molekule bopindololu. Chromatogram je znázorněn na Obrázku 59, SST parametry jsou uvedeny v Tabulce 23. Nastavení průtoku a složení mobilní fáze je shrnuto v Tabulce 24. Bylo provedeno 5 měření a stanovena relativní směrodatná odchylka.

Obrázek 59 Záznam chromatogramu směsi BB na analytické koloně UPLC Acquity BEH C18 100 x 2,1 mm, třífázová eluce – gradientová 0 – 2 min s MF ACN / PUFR 10,0 v poměru od 5 : 95 k 15 : 85, isokratická eluce 2 – 4 min, gradientová eluce 4 – 8 min s MF ACN / PUFR 10,0 v poměru od 15 : 85 k 40 : 60.



Tabulka 23 SST parametry chromatogramu na Obrázku 59 – parametry byly získány jako průměr hodnot z 5 měření. (Area = plocha píku)

BB / SST	t_R	% RSD	Area	% RSD	R_S	N	A_s
Atenolol	1,21	0,09	48520	0,38	---	22791	1,09
Pindolol	2,29	0,05	48489	0,46	29,6	49464	1,09
Acebutolol	3,55	0,04	64823	0,56	22,8	41951	1,15
Metoprolol	3,76	0,06	124532	0,42	2,5	23617	1,58
Bopindolol-dp1	3,92	0,07	7072	3,48	1,7	28688	---
Labetalol	5,68	0,11	61833	0,28	22,9	150101	1,37
Propranolol	6,03	0,03	65755	1,31	6,9	358824	1,15
Bopindolol-dp2	6,63	0,63	1095	23,1	6,8	32433	1,00
Bopindolol	7,25	0,02	136290	2,38	19,6	346125	1,17

Tabulka 24 Nastavení průtoku a složení mobilní fáze při analýze BB na UPLC Acquity s výsledným chromatogramem uvedeným na Obrázku 59.

čas (min)	průtok (ml/min)	% A (pufr)	% B (ACN)	gradientová křivka
0,00	0,5	95,0	5,0	---
2,00	0,5	85,0	15,0	6
4,00	0,5	85,0	15,0	6
8,00	0,5	60,0	40,0	5

Byly nalezeny podmínky pro vynikající separaci zkoumaných látek, byly splněny parametry rozlišení mezi jednotlivými zkoumanými látkami a faktory symetrie dle lékopisných požadavků. Účinnost je charakterizována velmi vysokým počtem teoretických pater. Při 5 měřeních byly zjištěny velmi nízké odchylky v hodnotách retenčních časů i ploch píků (tedy s výjimkou bopindololu a jeho degradačních produktů).

6 ZÁVĚR

Bylo vyzkoušeno 9 různých analytických kolon pro analýzu směsi 7 zkoumaných látek ze skupiny BB, k nimž přibyly ještě 2 degradační produkty bopindololu. Byly zkoumány různé vlivy na separaci zkoumaných látek:

Vliv mobilní fáze

Byly vyzkoušeny mobilní fáze různého chemického složení, obsahující organickou složku – ACN, methanol, a vodnou složku. Vybrána byla mobilní fáze složená z acetonitrilu a vodné složky s obsahem příslušného pufru. Byly zkoumány různé poměry mobilní fáze a také gradienty vhodné pro optimalizaci separace.

Vliv pH

U jednotlivých typů sorbentů byl sledován vliv hodnoty pH na separaci látek. U analytických sorbentů na bázi silikagelu byly při zvýšení pH pozorovány výrazné interakce analyzovaných látek s volnými –OH skupinami, které se v chromatogramu projeví píky s nedostatečnou symetrií. Pro bazické látky byly nalezeny vhodné separační podmínky při vyšším pH na hybridních stacionárních fázích.

Typ stacionární fáze

Ze stacionárních fází byly vyzkoušeny sorbenty na bázi silikagelu modifikované C18 řetězci. Byly využity analytické kolony určené k měření v různém rozmezí pH. Výsledky byly dobré při analýze ve slabě kyselé oblasti. Při vyšším pH nebyly úpravy stacionárních fází dostatečné k zachování ostroty a symetrie píků zkoumaných látek na chromatogramu.

Z hybridních sorbentů byly vyzkoušeny analytická kolona Gemini od firmy Phenomenox a X-Bridge od firmy Waters. Analytická kolona Gemini neměla lepší separační účinnost pro betablokátory, výsledky byly obdobné výsledkům na sorbentu na bázi silikagelu s C18 řetězci ovšem s nevýhodou delší doby analýzy. Symetrie píků byly lepší u chromatogramů z analýz na hybridních sorbentech. Z tohoto hlediska byly nejlepší výsledky získány na analytické koloně X-Bridge C18.

Dalším typem stacionární fáze, která byla vyzkoušena v separaci betablokátorů, byla monolitická analytická kolona s C18 sorbentem. Její velkou výhodou byla výrazně snížená doba analýzy při zachování účinnosti separace. Zatímco u předchozích analýz byl čas nutný pro analýzu minimálně 15 minut, na monolitickém sorbentu, díky

vyššímu možnému průtoku mobilní fáze, byl čas analýzy snížen na 8 - 10 minut. Monolitická analytická kolona je velmi vhodná pro analýzu zkoumaných látek. Při vyšším pH však docházelo ke značnému chvostování píků.

Analýzy na betulinové analytické koloně byly časově náročné a výsledky byly horší než u předcházejících sorbentů. Na betulinové analytické koloně nebyly nalezeny podmínky vhodné pro separaci betablokátorů. Na zirkoniové analytické koloně rovněž nebyly nalezeny takové podmínky, které by umožňovaly dobrou separaci všech zkoumaných látek.

Stacionární fáze byly srovnávány dle splnění parametrů na chromatogramu:

Retence (retenční faktor) a rozlišení

Při hledání optimálních separačních podmínek byla problematická nízká retence atenololu vyplývající z jeho hydrofilní povahy. U této látky nebyly splněny požadavky na retenci, s výjimkou betulinové stacionární fáze. Ostatní látky byly separovány dobře na více sorbentech, někdy nebylo možné najít takové změny mobilní fáze, aby byly všechny látky dobře separovány a splňovaly parametry rozlišení. Nejlepší výsledky byly zaznamenány u klasických stacionárních fází C18, monolitické stacionární fázi C18 a také na obou hybridních stacionárních fázích.

Faktor symetrie

Symetrie byla výrazně ovlivněna pH mobilní fáze. Ačkoli jsou analytické sorbenty různě upravovány, aby umožňovaly měření při větším rozmezí pH, byly výsledné analýzy v bazické oblasti pH výrazně ovlivněny rozptylem látek na analytické koloně. Následkem byly nevyhovující hodnoty faktoru symetrie píků zkoumaných látek. Výborné výsledky v bazické oblasti byly získány u analytické kolony X-Bridge C18. Při pH 10 byla pozorována účinná separace zkoumaných látek s vynikající symetrií jejich píků.

Souhrnné srovnání je uvedeno v Tabulce 25, ve které jsou jednotlivé stacionární fáze srovnány podle toho, u kolika ze zkoumaných látek byly za optimálních nalezených podmínek splněny lékopisné požadavky základních SST parametrů – symetrie, rozlišení a retenčního faktoru.

Tabulka 25 Srovnání stacionárních fází dle splnění SST parametrů při optimálních nalezených podmínkách při daném pH (s variabilním složením, průtokem MF a gradientem eluce). Číslo v tabulce udává, pro kolik ze 7 zkoumaných látek byl SST parametr v toleranci rozmezí dle platného lékopisu.

analytická kolona / parametr SST	Rozlišení		Symetrie		Retenční	
	R>2	%	A _s <1,5	%	faktor k>2	%
Zorbax Eclipse XDB C18 , pH = 4,5	6	85,7	6	85,7	6	85,7
Zorbax Eclipse XDB C18 , pH = 7,4	5	71,4	4	57,1	6	85,7
Zorbax Extend C18 , pH = 10,0	4	57,1	2	28,6	6	85,7
Chromolith C18 pH=4,5	6	85,7	7	100	6	85,7
Betulin pH = 4,5	4	57,1	2	28,6	7	100
Zirkonia pH=4,5	3	42,9	2	28,6	5	71,4
Gemini hybrid. C18 pH=4,5	6	85,7	6	85,7	6	85,7
Gemini hybrid. C18 pH=10,0	5	71,4	0	0,0	6	85,7
X-Bridge C18 pH = 4,5	5	71,4	7	100	6	85,7
X-Bridge C18 pH = 10,0	6	85,7	6	85,7	6	85,7

Ze zkoumaných analytických kolon byly pro separaci látek ze skupiny betablokátorů nejvhodnější analytické kolony Zorbax C18 Eclipse XDB a monolitická kolona Chromolith C18. Při měření při vyšším pH byly výsledky nejlepší na analytické koloně X-Bridge C18.

Na závěr byl vyzkoušen transfer metody HPLC do UHPLC. Byly využity výsledky na analytické koloně X-Bridge C18. Analýza pomocí UHPLC na analytické koloně BEH C18 umožnila ještě lepší separaci při výrazném zkrácení doby analýzy na 8 minut. Ačkoli analýza pomocí UHPLC nebyla cílem práce, naznačila další možnosti využití naměřených výsledků. Ukázala možnosti dalšího zlepšení separace a zkrácení doby analýzy při transferu metody z HPLC do UHPLC.

7 LITERATURA

1. <http://web.natur.cuni.cz/~pcoufal> , (9/2010)
P. Coufal, Analytické separační metody, Přírodovědecká fakulta UK v Praze (2004).
2. L. Nováková, Využití nových trendů při vývoji a validaci HPLC metod pro analýze biologicky aktivních látek, dizertační práce na Farmaceutická fakultě UK v Hradci Králové (2005).
3. Y. Kazachovich, H. McNair, <http://hplc.chem.shu.edu/HPLC/index.html>, (9/2010).
4. Český Lékopis 2009, Grada Publishing a.s., (2009) 133-137.
5. M. Dong, R. Paul, L. Gershanov, Today's Chemist, Vol.10 (2001) 38-40.
6. S. Pavlovičová, Využití metody HILIC pro hodnocení stability kyseliny askorbové, Farmaceutická fakulta UK v Hradci Králové (2008).
7. D.A. Skoog, D.M. West, F.J. Holler, Fundamentals of Analytical Chemistry, 7th Edition, Sanders College Publishing (1997).
8. M. Gilar, Van Deemterovy křivky a sorbent pro UPLC, Vize (2005).
9. J.J. Van Deemter, F.J. Zuiderweg, A. Klingenberg, J.Chem.Eng.Sci.5 (1956) 272.
10. C.E. Meloan, Chemical Separations, Principles, Techniques and Experiments (1999).
11. E. Heftman, Chromatography 6th edition, Journal of Chromatography (2004).
12. <http://www.phenomenex.com> (8/2010).
13. Agilent Zorbax Column Selection Guide for Analytical HPLC (2004).
14. <http://www.chem.agilent.com/scripts/Pcol.asp?IPage=4889> (8/2010).
15. <http://eu.shimadzu.de/products/chromato/hplc/columns/pathfinder/default.aspx>(9/2010).
16. <http://www.waters.com> (9/2010).
17. Acquity UPLC Columns, Waters Corporation, Milford (2005).
18. <http://chromatographyonline.findanalytichem.com/lcgc/Application+Notes/Routine-Switching-between-High-and-Low-pH-on-Xbrid/ArticleStandard/Article/detail/458031> (7/2010).
19. B. Gawdzik, J. Osypiuk, Chromatographia 554 (2001).
20. <http://www.hamiltoncompany.com/products/hplc-columns-and-accessories/c/329/> (6/2010).
21. <http://www.varianinc.com/cgi-bin/nav?products/consum/lccolumns/hi-plex/index&cid=LLIHPQPOFI> (8/2010).
22. <http://www.sigmaaldrich.com/analytical-chromatography/hplc/columns/aphera-high-ph.html> (8/2010).

23. <http://www.tessek.com/cat4.htm> (8/2010).
24. <http://www.zirchrom.com/History.asp> (8/2010).
25. Supelco Bulletin 932, Sigma-Aldrich (2002).
26. <http://www.zirchrom.com/Intro.asp> (8/2010).
27. M.P. Rigney, E.F. Funkenbusch, P.W. Carr, Physical and Chemical Characterization of Microporous Zirconia, *J. Chromatogr.* 499 (1990) 291-304.
28. J.Nawrocki, M.P.Rigney, A.McCormick, P.W.Carr, Chemistry of Zirconia and Its Use in Chromatography, *Journal of Chromatography A* 657 (1993).
29. HPLC Column Catalog, ZirChrom Separations (2007).
30. H.A. Claessens, M.A. van Straten, Review on the Chemical and Thermal Stability of Stationary Phases for Reversed-phase Liquid Chromatography, *Journal of Chromatography A* 1060(1-2) (2004) 23-41.
31. K. Karch, I. Sebastian, I. Halász, *Journal of Chromatography* 122 (1976) 3.
32. Waters Chromatography Columns and Supplies Catalog (2008).
33. Waters Spherisorb Columns Care and Use Manual (2008).
34. http://www.sigmaaldrich.com/etc/medialib/docs/Sigma-Aldrich/Product_Information_Sheet/a9003pis.Par.0001.File.tmp/a9003pis.pdf (9/2010).
35. R. A. Moreau, K. Kohout, V. Singh, Temperature-enhanced alumina HPLC method for the analysis of wax esters, sterol esters, and methyl esters (2002).
36. J.H. Knox, P.A. Bristow, *Chromatographia* 10 (1977) 279.
37. W.D. Ross, R.T. Jefferson, *Journal of Chromatography Sci.* 8 (1970) 386.
38. D. Lubda, K. Cabrera, W. Kraas, Ch. Schaefer, D. Cunningham, New Developments in the Application of Monolithic HPLC Columns (2001).
39. K. Nakanishi, N. Soga, *Journal Non-Cryst.Solids*, 139 (1992) 1-13,14-24.
40. <http://chromservis.cz/item/ONYX-phase?lang=CZ> (9/2010).
41. F. Švec, *Chem. Listy* 98 (2004) 232.
42. ChromBook 2008-2009, Merck, Darmstadt, Německo (2009).
43. <http://www.brechbuehler.ch/fileadmin/redacteur/pdf/columns-sampleprep/lc-columns/zhonyx.pdf> (9/2010).
44. <http://www.dionex.com/en-us/webdocs/70764-DS-ProSwift-Reversed-Phase-19Mar2009-LPN2185-01.pdf> (9/2010).

45. <http://www.chem.agilent.com/en-US/Products/consumables/columns/lcandlcs/biomonolithhplc/Pages/gp66632.aspx> (2/2010).
46. P. Stašková, T. Bartl, T. Goněc, HPLC separace enantiomerních sloučenin, *Chemické Listy*, 102 (2008) 201-202.
47. <http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/summary/summary.cgi?cid=72326> (9/2010).
48. D.T.T. Nguyen, D. Guillarme, S. Rudaz, J.L. Veuthey, *J. Sep. Sci.* 29 (2006) 1836.
49. K. Hartonen, M.L. Riekkola, *Trends Anal. Chem.* 27 (2008) 1.
50. N. Wu, A.M. Clausen, *J. Sep. Sci.* 30 (2007) 1167.
51. F. Gritti, A. Cavazzini, N. Marchetti, G. Guichon, *J. Chromatogr. A* 1157 (2007) 289
52. S.M. Chesnut, J.J. Salisbury, Analytical Research and Development, Pfizer Global Research and Development, Groton, USA (2009).
53. L. Nováková, H. Vlčková, A review of current trends and advances in modern bio-analytical methods, Chromatography and sample preparation, *Analytica Chimica Acta* 656 (2009) 8-35
54. <http://www.restek.com/uhplc> (9/2010).
55. <http://www.waters.com/waters/nav.htm?cid=514210> (9/2010).
56. <http://chromservis.cz/item/scale-down-in-uhplc?lang=CZ> (9/2010).
57. J.J. Kirkland, *Anal.Chem.* 64 (1992) 1239.
58. <http://www.mac-mod.com/pb/halo-pb.html> (8/2010).
59. <http://www.sigmaaldrich.com/analytical-chromatography/hplc/columns/ascentis-express.html> (9/2010).
60. <http://chromservis.cz/item/kinetex-1-7-m-c18-100a-uhplc-column-100-x-2-1-mm?lang=CZ> (9/2010).
61. G. Guichon, *J. Chromatogr. A* 1126 (2006) 6.
62. D. Cabooter, F. Lestremau, F. Lumen, P. Sandra, G. Desmet, *J. Chromatogr. A* 1212 (2008) 23.
63. W. Song, D. Pabbisetty, E.A. Groeber, R.C. Sttenwyk, D.M. Fast, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 50 (2009) 491.
64. <http://www.theukstress-reductionconsultancy.co.uk/Portals/67/images/nervous-system.gif> (9/2010).
65. D. Lincová, H. Farghali, Základní a aplikovaná farmakologie, *Galén* (2002) 73-74, 92-96, 217, 233-234.
66. *Remedia Compendium 4, Panax* (2009) 80-90.

67. <http://www.jirivitovec.cz/publ/cz/indikace.pdf> (9/2010).
68. J. Marek, J. Widimský a spol., Farmakoterapie vnitřních nemocí, Grada (1998) 97-122.
69. J. Vlček, D. Fialová a kolektiv, Klinická farmacie I, Grada (2010) 73-86.
70. RNDr. Bohuslav Škop, AISLP, Souhrn údajů o přípravku Sandonorm 1mg (2009).
71. http://www.sigmaaldrich.com/catalog/ProductDetail.do?D7=0&N5=Product%20No.%7CBRAND_KEY&N4=I5627%7CSIGMA&N25=0&QS=ON&F=SPEC (9/2010).
72. J. Hartl, K. Palát, M. Doležal, M. Miletín, V. Opletalová, Farmaceutická chemie II/1 (2001).
73. ČL 2009, Grada Publishing (2009) 1183.
74. R. Kaliszan, Structure and Retention in Chromatography A chemometric Approach, Harwood Academic Publishers (1997) 167.
75. www.drugbank.ca/drugs (9/2010).
76. ČL 2009, Grada Publishing (2009) 1400.
77. <http://www.enzolifesciences.com/fileadmin/enzo/BML/ar100.PDF> (9/2010).
78. <http://www.scbt.com/ko/datasheet-200144-bopindolol-malonate.html> (9/2010).
79. <http://www.drugs.com/mmx/metoprolol-succinate.html> (9/2010).
80. ČL 2009, Grada Publishing (2009) 2434.
81. <http://www.chemyq.com/En/xz/xz2/11851mdpmx.htm> (9/2010).
82. ČL 2009, Grada Publishing (2009) 2618.
83. ČL 2009, Grada Publishing (2009) 2933.
84. <http://www.springerlink.com/content/x81xr13635511177/> (9/2010).
85. ČL 2009, Grada Publishing (2009) 3018.
86. ČL 2009, kapitola 4.1.3 Tlumivé roztoky, Grada Publishing (2009) 611-616.