

Errata DP Jana Vacková 2012:

Abstrakt

Univerzita Karlova v Praze
Farmaceutická fakulta v Hradci Králové
Katedra Analytické chemie

Školitel: PharmDr. Petr Chocholouš, PhD.

Kandidát: Jana Vacková

Název práce: Srovnání kolon pro separaci farmaceuticky významných látek metodou sekvenční injekční chromatografie

Tato diplomová práce se zabývá vývojem separační metody na moderních chromatografických kolonách v systému Sekvenční injekční chromatografie (SIC). Systém SIC byl založen na systému SICrom™ (FIALab®, Bellewue, WA, USA) s osmicestným ventilem z nerezové oceli (VICI® Valco Instruments, TX, USA) a pumpou S17 (Sapphire™ Engineering, MA, USA).

Použité vzorky byly připraveny rozpuštěním 25 mg různých fenolických kyselin (kyselina protokatechová, kyselina vanilová, kyselina *p*-kumarová, kyselina ferulová, kyselina *o*-kumarová, kyselina sinapová a kyselina syringová) ve 25 ml methanolu.

Použité kolony byly tři, a to kolona Ascentis Express C-18 (30 mm × 4,6 mm, 2,7 μm, Sigma – Aldrich, Supelco Analytical, Bellefonte, PA, USA), kolona Ascentis Express RP-Amide (30 mm × 4,6 mm, 2,7 μm, Sigma – Aldrich, Supelco Analytical, Bellefonte, PA, USA) a kolona Ascentis Express Phenyl-Hexyl (30 mm × 4,6 mm, 2,7 μm, Sigma – Aldrich, Supelco Analytical, Bellefonte, PA, USA). Jejich sorbent patří do skupiny částic s pevným jádrem.

Mobilní fáze byla tvořena roztokem vody a acetonitrilu v různých poměrech a její pH bylo upravováno na 2,4 pomocí 85% kyseliny fosforečné.

Podmínky pro kolonu C18 jsou následující: mobilní fáze o složení 16 dílů vody a 84 dílů acetonitrilu (pH 2,36), objem mobilní fáze 3 600 μl, průtoková rychlost 10 μl/s a množství vzorku 10 μl.

Podmínky pro kolonu RP-Amide jsou tyto: mobilní fáze o složení 22 dílů acetonitrilu a 78 dílů vody (pH 2,4), objem mobilní fáze 3 800 μl, průtoková rychlost 6 μl/s a množství vzorku 10 μl.

Podmínky pro kolonu Phenyl-Hexyl jsou následující: mobilní fáze o složení 16 dílů acetonitrilu a 84 dílů vody (pH 2,46), objem mobilní fáze 3 800 μl, průtoková rychlost 10 μl/s a množství vzorku 10 μl. Všechny analýzy proběhly za izokratických podmínek.

Absorbance byla měřena při 250 nm (kyseliny protokatechová a vanilová), 280 nm (kyseliny syringová a *o*-kumarová) a 290/325 nm (kyseliny sinapová, ferulová a *p*-kumarová) UV detekcí. Použitý UV zdroj byla Lampa UV D-1 000-CE (Analytical Instrument Systems Inc., USA) a použitý

detektor byl detektor CCD UV-VIS USB 4 000 (Ocean-optics, FL, USA). Použitá průtoková cela je Z cela Ultem[®] SMA, efektivní délka 20 mm (FIALab[®], Bellevue, WA, USA).

Separáční metoda byla vyvinuta pro každou kolonu a základní separáční charakteristiky kolon byly navzájem srovnány. Kolona RP-Amide byla v selektivitě nejlepší, separovala všechny kyseliny, ale kolony C-18 a Phenyl-Hexyl nedokázaly separovat dvě dvojice kyselin. Na kalibraci se nejvíce osvědčila kolona C18, protože její kalibrační křivky jsou velmi blízké přímce. Při vysokých koncentracích analytu vykazuje kolona C18 reziduální směrodatnou odchylku (RSD) nejnižší z všech tří kolon jak pro retenční čas, tak pro odezvu. Kolona RP-Amide má nejmenší RSD odezvy při středních koncentracích a RSD času při nízkých koncentracích ze všech tří kolon. Kolona Phenyl-Hexyl ukazuje nejmenší RSD času při středních koncentracích a nejmenší RSD odezvy při nízkých koncentracích ze všech tří kolon. Kolona RP-Amide ukazuje nejvíce souměrné píky při všech koncentracích a má nejvyšší účinnost. Nejvyšší hodnoty rozlišení byly rovněž naměřeny u kolony RP-Amide.

Podářilo se vyvinout separáční techniku na všech třech použitých kolonách. Z celkového pohledu je nejlepší pro analýzu kolona RP-Amide.

Abstract

Charles University in the city of Prag
Pharmaceutical fakulty in the city of Hradec Králové
Department of the Analytical Chemistry

Consultant: PharmDr. Petr Chocholouš, PhD.

Candidate: Jana Vacková

Name of the thesis: Comparison of columns for separation of pharmaceutically significant substances by method of Sequential Injection Chromatography

This diploma thesis deals with the development of the separation method in the system of the Sequential Injection Chromatography (SIC). The used SIC system was based on the system SICrom™ (FIALab®, Bellewue, WA, USA) with the eight port stainless steel multi-position valve (VICI® Valco Instruments, TX, USA) and with the pump S17 (Sapphire™ Engeneering, MA, USA).

The samples were prepared by dissolving of 25 mg of various phenolic acids (protocatechuic acid, vanillic acid, *p*-coumaric acid, ferulic acid, *o*-coumaric acid, sinapinic acid and syringic acid) in 25 ml of methanol.

Three fused-core particle columns were used in this thesis : the column Ascentis Express C-18 (30 mm × 4.6 mm, 2.7 μm, Sigma – Aldrich, Supelco Analytical, Bellefonte, PA, USA), the column Ascentis Express RP-Amide (30 mm × 4.6 mm, 2.7 μm, Sigma – Aldrich, Supelco Analytical, Bellefonte, PA, USA) and the column Ascentis Express Phenyl-Hexyl (30 mm × 4.6 mm, 2.7 μm, Sigma – Aldrich, Supelco Analytical, Bellefonte, PA, USA).

The mobile phase was prepared by mixing water and acetonitrile in different ratios. Its pH was adjusted by the 85% phosphoric acid to the value of 2,40.

The conditions for the column C18 are as followed: the mobile phase 16:84 (acetonitrile:water v/v; pH 2.36), the volume of the mobile phase 3 600 μl, the flow velocity 10 μl/s and the volume of the sample 10 μl.

The conditions for the column RP-Amide are as followed: the mobile phase 22:78 (acetonitrile:water, v/v; pH 2.40), the volume of the mobile phase 3 800 μl, the flow velocity 6 μl/s and the volume of the sample 10 μl.

The conditions for the column Phenyl-Hexyl are as followed: the mobile phase 16:84 (acetonitrile:water, v/v; pH 2.46), the volume of the mobile phase 3800 μl, the flow velocity 10 μl/s and the volume of the sample 10 μl.

Analyses were isocratic.

The absorbance was monitored at 250 nm (vanillic and protocatechuic acids), 280 nm (syringic and *o*-coumaric acids) and 290/325 nm (sinapinic, ferulic and *p*-coumaric acids). The used UV source was the lamp UV D-1 000-CE (Analytical Instrument Systems Inc., USA) and the used detector was the detector CCD UV-VIS USB 4 000 (Ocean-optics, FL, USA).

The used flow cell was the Z-cell Ultem[®] SMA, effective length 20 mm (FIALab[®], Bellevue, WA, USA).

The separation method was developed for each column and the basic separation features of the columns were compared to each other.

The column RP-Amide was the best one in the selectivity because it separated all seven acids. The columns C18 and RP-Amide were not able to separate two pairs of acids. The two peaks were the double peaks and it was found out that the double peaks belonged to vanillic and syringic acids and ferulic and sinapinic acids.

The column C18 was the best one in the calibration because its calibration curves approach very much to the straight line.

The column C18 exhibits the lowest relative standard deviation (RSD) for the retention time and the response in the field of the high concentrations.

The column RP-Amide has the lowest RSD of the response for the middle concentrations and the lowest RSD of the retention time for the low concentrations.

The column Phenyl-Hexyl shows the lowest RSD of the retention time for the middle concentrations and the lowest RSD of the response for the low concentrations.

The column RP-Amide reports the most symmetrical peaks for the all concentrations and it has the highest effectiveness. The highest values of the peak resolution were measured by the column RP-Amide, too.

The separation method was developed for all three columns successfully.

The column RP-Amide is the best column for the analysis in this diploma thesis.

str. 6, zkratka UPLC má být UHPLC

str. 11, název „1.2. Cíl práce“ má být „1.2. Cíl a popis zadání práce“

str. 13, 1. řádek shora má být „zajišťují“

str. 13, 10. řádek shora má být „panem profesorem Růžičkou“

str. 15, 4. řádek shora má být „sulfanilamid“

str. 15, 18. řádek shora má být „určovány“

str. 22, 1. a 2. řádek shora má být vynecháno „relativně lepší citlivostí“

str. 26, 4. řádek shora má být místo „hodně metod“ sousloví „několik metod“

str. 27, 2. řádek shora má být „Diclofenac 1,0 %“

str. 28, 1. řádek shora má být „kolonou“

str. 29, 12. řádek shora má být „reziduální“

str. 29, 13. řádek shora má být „dvěma kolonami“

str. 30, 2. odstavec, chybějící odkaz je následující: Chocholouš P., Kosařová L., Šatínský D., Sklenářová H., Solich P., Talanta 85 (2011), str. 1129

str. 31, 3. řádek shora má být „jak ukazuje obrázek 6“

str. 31, 7. řádek shora má být „jak je vidět na obrázku 7“

str. 37, obrázek 11 a dál mají být „Chromatogram“

str. 51, poslední odstavec: vlnové délky byly použity všechny tři, obrázky v této práci jsou při vlnové délce pouze 280 nm

str. 81 – 91, rozmezí faktoru symetrie v ČL 2009 je 0,8 až 1,5, pokud není stanoveno jinak, udává se na 2 desetinná místa

str. 92, 7. řádek zdola má být počet pater pro kyselinu protokatechovou 5 410

str. 93, 2 poslední věty mají být „Podařilo se vyvinout separační techniku pro separaci sedmi fenolických kyselin. Z celkového pohledu je pro analýzu fenolických kyselin nejlepší kolona RP-Amide.“