

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE  
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ  
KATEDRA FARMACEUTICKÉ CHEMIE A KONTROLY LÉČIV

**Možnosti uplatnenia nových stacionárnych fáz  
v analýze liečiv**

**DIZERTAČNÁ PRÁCA**

Hradec Králové, 2013

Mgr. Peter Kalafut

## **ČESTNÉ PREHLÁSENIE**

Prehlasujem, že táto práca je mojím pôvodným dielom, ktoré som vypracoval samostatne. Všetka literatúra a ďalšie zdroje, z ktorých som pri spracovaní čerpal, sú uvedené v zozname použitej literatúry a v práci riadne citované.

Mgr. Peter Kalafut

## POĎAKOVANIE

Touto cestou by som sa rád poďakoval školiteľovi - špecialistovi PharmDr. Radimovi Kučerovi, Ph.D. za odborné vedenie a dávku trpezlivosti počas celého štvorročného obdobia, kedy vznikala náplň práce. Ďakujem mu za pomoc a mnoho rád v laboratóriu , pri tvorbe vedeckých článkov i samotnej dizertačnej práce.

Zároveň ďakujem hlavnému školiteľovi Prof. RNDr. Jiřímu Klimešovi, CSc. za poskytnutie niekoľkých príležitostí k rozvíjaniu osobných skúseností vo farmaceutickom priemysle. Ďakujem tiež za bezproblémovú organizáciu a zabezpečenie doktorandského štúdia a rady počas tvorenia dizertačnej práce.

Moje poďakovanie patrí celému kolektívu Katedry farmaceutickej chémie a kontroly liečiv za príjemné pracovné prostredie a priateľskú atmosféru počas pracovného nasadenia ako aj mimo neho.

Ďakujem Ing. Bohumírovi Bíbovi za ústretovosť počas dokončovania dizertačnej práce.

Ďakujem rodine za veľkú podporu a všetky ďalšie prejavy spolupatričnosti, ktoré vo výsledku prispeli i k vytvoreniu dizertačnej práce.

Ďakujem priateľke Monike za pomoc pri gramatickej korektúre celej práce, za nesmiernu podporu a trpezlivosť, ktoré mi prejavovala pri písaní dizertačnej práce.

Dizertačná práca vznikla vďaka finančnej podpore Výskumného projektu MSM0021620822 a projektov SVV 263001, resp. SVV 265001 Univerzity Karlovej v Prahe.

# OBSAH

<b>ZOZNAM POUŽITÝCH SKRATIEK .....</b>	<b>8</b>
<b>1 ÚVOD.....</b>	<b>10</b>
<b>2 CIEĽ PRÁCE .....</b>	<b>12</b>
<b>3 TEORETICKÁ ČASŤ.....</b>	<b>14</b>
3.1 VYSOKOÚČINNÁ KVAPALINOVÁ CHROMATOGRAFIA .....	15
3.1.1 Separačný proces.....	16
3.1.2 Kvapalinový chromatograf .....	19
3.1.3 Chromatografické kolóny .....	20
3.1.4 HPLC detektory .....	23
3.1.5 HPLC módy .....	27
3.1.6 Interpretácia výsledkov.....	30
3.1.7 UHPLC.....	31
3.2 POPIS ZIRKÓNIOVÝCH HPLC STACIONÁRNYCH FÁZ .....	32
3.2.1 Selektivita na ZrO <sub>2</sub> .....	35
3.2.2 Stabilita ZrO <sub>2</sub> .....	39
3.2.3 Príprava sorbentu ZrO <sub>2</sub> pre HPLC .....	40
3.2.4 Modifikácie povrchu ZrO <sub>2</sub> .....	41
3.2.5 Charakteristika vybraných ZrO <sub>2</sub> kolón pre RPLC .....	45
3.2.6 Vysokoteplotná HPLC .....	47
3.3 APLIKÁCIE ZIRKÓNIOVÝCH STACIONÁRNYCH FÁZ .....	50
3.3.1 RPLC.....	51
3.3.2 Vysokoteplotná HPLC .....	55
3.3.3 SPE.....	60
3.3.4 HILIC .....	63
3.3.5 Chirálna HPLC.....	64
3.3.6 Ostatné aplikácie .....	65

3.4	VALIDÁCIA .....	65
3.4.1	Test spôsobilosti systému .....	66
3.4.2	Validačné parametre .....	67
<b>4</b>	<b>EXPERIMENTÁLNA ČASŤ 1 .....</b>	<b>70</b>
	<b>INOVATÍVNY PRÍSTUP K ANALÝZE KYSELINY 3-[4-(2-METYLPROPYL)-FENYL]PROPÁNOVEJ AKO LIEKOPISNEJ NEČISTOTY IBUPROFÉNU NA UHLÍKOM POTIAHNUTEJ ZIRKÓNIOVEJ STACIONÁRNEJ FÁZE .....</b>	<b>71</b>
4.1	PREDMET ŠTÚDIA .....	71
4.2	VYBAVENIE A PRÍPRAVA.....	73
4.2.1	Inštrumentácia .....	73
4.2.2	Chromatografické kolóny .....	73
4.2.3	Chemikálie .....	74
4.2.4	Príprava vzoriek .....	74
4.2.5	Príprava zložiek mobilných fáz.....	74
4.3	VÝSLEDKY A DISKUSIA .....	75
4.3.1	Detekcia .....	75
4.3.2	Selektivita.....	76
4.3.3	Optimalizácia metódy .....	78
4.3.4	Validácia .....	80
4.4	ZÁVER .....	83
<b>5</b>	<b>EXPERIMENTÁLNA ČASŤ 2 .....</b>	<b>84</b>
	<b>VPLYV UHLÍKOVEJ VRSTVY DEPONOVAanej NA ZIRKÓNIOVÝ POVRCH NA RETENCIU POLÁRNYCH ANALYTOV VO VYSOKO ORGANICKEJ MOBILNEJ FÁZE.....</b>	<b>85</b>
5.1	PREDMET ŠTÚDIA .....	85
5.2	VYBAVENIE A PRÍPRAVA.....	86
5.2.1	Inštrumentácia .....	86
5.2.2	Chromatografické kolóny .....	86
5.2.3	Chemikálie .....	86
5.2.4	Príprava vzoriek .....	86

5.2.5	Chromatografické podmienky.....	87
5.3	VÝSLEDKY A DISKUSIA .....	88
5.3.1	Vplyv koncentrácie ACN.....	88
5.3.2	Vplyv koncentrácie octanu.....	91
5.3.3	Vplyv pH octanu .....	92
5.3.4	Vplyv typu Lewisovej zásady.....	94
5.3.5	Vplyv teploty.....	94
5.3.6	Separácia modelových vzoriek .....	96
5.4	ZÁVER .....	98
<b>6</b>	<b>EXPERIMENTÁLNA ČASŤ 3 .....</b>	<b>100</b>
	<b>RETENČNÉ CHOVANIE KYSLÝCH, ZÁSADITÝCH A NEUTRÁLNYCH FARMACEUTICKY VÝZNAMNÝCH LÁTOK NA DEAKTIVOVANEJ POLYBUTADIÉNOVEJ ZIRKÓNIOVEJ FÁZE.....</b>	<b>101</b>
6.1	PREDMET ŠTÚDIA .....	101
6.2	VYBAVENIE A PRÍPRAVA.....	102
6.2.1	Inštrumentácia .....	102
6.2.2	Chromatografické kolóny .....	103
6.2.3	Chemikálie .....	103
6.2.4	Príprava vzoriek .....	103
6.2.5	Príprava roztokov Lewisových zásad .....	103
6.2.6	Chromatografické podmienky.....	104
6.3	VÝSLEDKY A DISKUSIA .....	105
6.3.1	Vplyv pH.....	105
6.3.2	Vplyv koncentrácie Lewisovej zásady.....	107
6.3.3	Vplyv teploty.....	110
6.3.4	Vplyv typu Lewisovej zásady.....	111
6.3.5	Separácia ondansetronu.....	115
6.4	ZÁVER .....	118
<b>7</b>	<b>ZÁVER .....</b>	<b>119</b>
<b>8</b>	<b>ABSTRAKT .....</b>	<b>122</b>

<b>9</b>	<b>ABSTRACT</b> .....	<b>124</b>
<b>10</b>	<b>ZOZNAM ODBORNÝCH PUBLIKÁCIÍ</b> .....	<b>126</b>
10.1	Publikácie v impaktovaných časopisoch .....	126
10.2	Abstrakty uvedené v zborníkoch.....	126
10.3	Prednášky.....	127
<b>11</b>	<b>ZOZNAM POUŽITEJ LITERATÚRY</b> .....	<b>128</b>
<b>12</b>	<b>PRÍLOHY</b> .....	<b>141</b>
12.1	PRÍLOHA I - An innovative approach to the analysis of 3-[4-(2-methylpropyl)phenyl]propanoic acid as an impurity of ibuprofen on a carbon-coated zirconia stationary phase.....	141
12.2	PRÍLOHA II - The influence of a carbon layer deposited on a zirconia surface on the retention of polar analytes in an organic rich mobile phase .....	149
12.3	PRÍLOHA III - The retention behavior of acidic, basic and neutral pharmaceuticals on the deactivated polybutadiene zirconia phase .....	156

## **ZOZNAM POUŽITÝCH SKRATIEK**

ACN	Acetonitril
APCI	Chemická ionizácia za atmosférického tlaku
APPI	Fotoionizácia za atmosférického tlaku
b-ZrO <sub>2</sub>	Nemodifikovaná čistá zirkóniová stacionárna fáza (ZirChrom-PHASE <sup>®</sup> )
BUDGE	1,4-Butándiol diglycidyl éter
DAD	Detektor diódového poľa
DB-C18	Zirkóniová stacionárna fáza pokrytá vrstvou uhlíku s kovalentne naviazanými C <sub>18</sub> reťazcami (DiamondBond-C18 <sup>®</sup> )
EDTPA	Etyléndiamín- <i>N,N,N',N'</i> -tetra(metylénfosfónová) kyselina
ELSD	Evaporative light-scattering detector (detektor rozptylu svetla)
ERLIC	Kvapalinová chromatografia založená na hydrofilných interakciách v dôsledku elektrostatickej repulzie
ESI	Ionizácia elektrosprejom
GC	Plynová chromatografia
HILIC	Kvapalinová chromatografia založená na hydrofilných interakciách
HPLC	Vysokoúčinná kvapalinová chromatografia
HTLC	Vysokoteplotná kvapalinová chromatografia
ICH	International Conference on Harmonisation
LOD	Detekčný limit
LLOQ	Dolný kvantifikačný limit
MeOH	Metanol
MS	Hmotnostná spektrometria
NPLC	Vysokoúčinná kvapalinová chromatografia na normálnych fázach
ODS	Oktadecylsilikagél
PAB	Kyselina 4-aminobenzoová
Ph. Eur.	Európsky liekopis
PEEK	Polyéterketón
PEI	Polyetylénimín



PHB	Kyselina 4-hydroxybenzoová
RPLC	Vysokoúčinná kvapalinová chromatografia na reverzných fázach
RSD	Relatívna smerodajná odchýlka
SPE	Extrakcia na pevnej fáze
SUL	Kyselina 4-aminobenzénsulfónová
SWLC	Subkritická vodná kvapalinová chromatografia
TFA	Kyselina trifluoroctová
THF	Tetrahydrofurán
TOF	Hmotnostný analyzátor doby letu
UHPLC	Ultravysokoúčinná kvapalinová chromatografia
USP	Liekopis USA
UV	Ultrafialová oblasť spektra
VIS	Viditeľná oblasť spektra
Zr-CARB	Zirkóniová stacionárna fáza pokrytá vrstvou uhlíku (ZirChrom-CARB <sup>®</sup> )
Zr-MS	Zirkóniová stacionárna fáza pokrytá vrstvou polybutadiénu s deaktivovaným povrchom (ZirChrom-MS <sup>®</sup> )
Zr-PBD	Zirkóniová stacionárna fáza pokrytá vrstvou polybutadiénu (ZirChrom-PBD <sup>®</sup> )
Zr-PS	Zirkóniová stacionárna fáza pokrytá vrstvou polystyrénu (ZirChrom-PS <sup>®</sup> )

# **1 ÚVOD**

Vysokoúčinná kvapalinová chromatografia (HPLC) je v dnešnej dobe vedúcou inštrumentálnou technikou chemickej analýzy a príbuzných aplikácií so schopnosťou separovať, analyzovať alebo preparatívne pripravovať v podstate akúkoľvek zmes látok. V porovnaní s ostatnými separačnými metódami ako napr. plynovou chromatografiou, chromatografiou na tenkej vrstve, kapilárnou elektroforézou atď., je HPLC výnimočná hneď v niekoľkých ohľadoch:

- Univerzálna aplikačná šírka (iba málokedy je vzorka nevhodná pre HPLC separáciu)
- Vynikajúca presnosť a robustnosť analýzy
- Šírka dostupného portfólia chromatografív, vybavenia, kolón

Tieto vybrané charakteristiky predstavujú veľmi pádne argumenty, prečo je práve HPLC technika v súčasnosti považovaná za najpoužívanejšiu a najspoľahlivejšiu inštrumentálnu analytickú metódu s ťažiskom použitia v separácii a kvantifikácii chemických zmesí látok. Vo všetkých kontrolno-analytických liekopisných monografiách sa HPLC už relatívne dávno etablovala za metódu prvej voľby pri hodnotení kvality liečivých látok a liečivých prípravkov. HPLC je v širšom pohľade nástrojom zaisťujúcim požadovanú akosť, bezpečnosť a účinnosť farmakoterapie a teda má nepriamy vplyv na skvalitňovanie zdravotného stavu ľudskej populácie.

Množstvo potrebných analýz rok od roka pribúda a na tieto aktuálne trendy je nutné pružne reagovať s cieľom hľadať a nachádzať nové riešenia zabezpečujúce neustále presnejšie, rýchlejšie a efektívnejšie spracovávanie a hodnotenie analytických vzoriek. HPLC v tomto smere aj vďaka zavádzaniu inovatívnych technológií sebaisto kráča s dobou. Sme účastníkmi neustáleho zdokonaľovania analytických postupov a inštrumentácie samotnej. Zásadnou témou je kvalita moderných stacionárnych fáz pre analytické použitie. Jednou z diskutovaných oblastí je vývoj stabilnejších a účinnejších stacionárnych fáz odvodených od silikagélu, ktoré majú v súčasnej rutinej HPLC analýze stále nenahraditeľné miesto. Na pozadí dynamického diania v silikagélovej mikročasticovej chémii prebieha udomácnovanie a podobne aktívny vývoj veľmi atraktívnych konkurenčných stacionárnych fáz na báze oxidu zirkoničitého. Zirkóniové stacionárne fázy predstavujú zaujímavú alternatívnu voľbu pre pokročilé separácie a pre erudovaných užívateľov ponúkajú široký priestor realizácie počas vývoja analytických metód.

## **2 CIEL PRÁCE**

Všeobecným cieľom tejto dizertačnej práce bude štúdium chromatografických vlastností vybraných stacionárnych fáz odvodených od oxidu zirkoničitého a možnosť ich uplatnenia vo farmaceutickej analýze.

Zirkóniové stacionárne fázy sú v mnohých ohľadoch veľmi zaujímavou alternatívou všeobecne rozšírených silikagélových kolón, keďže oproti konkurencii disponujú pozoruhodnou chemickou rezistenciou voči zloženiu mobilných fáz a dlhodobou životnosťou aj za vysokých teplôt. V snahe vyťažiť z ich nesporného potenciálu čo najviac, bude splnenie jednotlivých cieľov postavené na systematickom experimentálnom sledovaní vplyvu chromatografických faktorov, akými sú zloženie mobilnej fázy (obsah organickej zložky, druh, pH a koncentrácia pufru) a voľba separačnej teploty, na dosiahnutú retenciu, selektivitu a separačnú účinnosť. Na základe dosiahnutých výsledkov bude posúdený význam a aplikovateľnosť použitých zirkóniových kolón v rutinej analyticko-farmaceutickej praxi.

Vzhľadom k rozdeleniu experimentálnej časti dizertačnej práce na tri samostatné na seba nenadväzujúce oddiely, boli dieľčie ciele dizertačnej práce definované nasledovne:

1. Cieľom práce č. 1 bol vývoj a validácia dostatočne citlivej HPLC metódy pre stanovenie kyseliny 3-[4-(2-metylpropyl)fenyl]propánovej ako liekopisnej nečistoty F substancie ibuprofenu podľa platného Ph. Eur.
2. Cieľom práce č. 2 bol popis chromatografických vlastností hydrofóbnej Zr-CARB kolóny a štúdium interakčných mechanizmov prítomných pri použití v HILIC podmienkach. Dosiahnuté výsledky boli za identických podmienok porovnávané s chovaním Zr-PBD kolóny a kolóny obsahujúcej nemodifikovaný  $ZrO_2$ .
3. Cieľom práce č. 3 bolo štúdium chromatografických vlastností Zr-MS kolóny. Dosiahnuté výsledky boli porovnávané s referenčnou Zr-PBD kolónou, ktorá na rozdiel od Zr-MS stacionárnej fázy nemá Lewisove kyseliny zirkóniových atómov deaktivované molekulami EDTPA.

### **3 TEORETICKÁ ČASŤ**

### **3.1 VYSOKOÚČINNÁ KVAPALINOVÁ CHROMATOGRAFIA**

Objav fenoménu chromatografie sa pripisuje ruskému botanikovi Michailu Semjonovičovi Cvetovi a datuje sa do roku 1903. M. S. Cvet vo svojej priekopníckej práci ako prvý podrobne popísal a vysvetlil separáciu zmesi látok karotenoïdov a chlorofylu založenú na odlišnej schopnosti adsorpcie látok na sorbent (v jeho prípade na sklenenú kolónu naplnenú práškovanou kriedou s oxidom hlinitým). Neskôr tento jav pomenoval chromatografia [1,2].

Tento vôbec prvý koncept chromatografie ako separačnej metódy na dve desaťročia upadol do zabudnutia. Až v 30. rokoch dochádza k znovuobjaveniu pôvodných pozorovaní a myšlienok následne spojených s prudkým rozvojom chromatografických techník od papierovej chromatografie cez chromatografiu na tenkej vrstve až k počiatkom vysokoúčinnej kvapalinovej chromatografie v druhej polovici 20. storočia [2,3]. Za novodobého zakladateľa a protagonistu zavedenia HPLC techniky do komerčnej sféry na prelome 60. a 70. rokov minulého storočia sa považuje maďarský chemik Csaba Horváth, ktorý skonštruoval vôbec prvý HPLC chromatograf [4]. Odvtedy si HPLC chromatografia ako vysokoúčinná separačná technika rýchlo vybudovala a upevnila postavenie v oblasti kvalitatívnej a kvantitatívnej analýzy látok. HPLC obzvlášť vyniká pri analýzach zmesí chemicky podobných látok, kde sa iné analytické metódy (napr. spektrofotometrické) nedajú principiálne použiť.

Základným princípom kvapalinovej chromatografie je distribúcia látok medzi dvomi vzájomne nemiešateľnými fázami:

- Stacionárnou fázou, ktorá predstavuje náplň chromatografickej kolóny
- Mobilnou fázou, ktorá prúdi určitou rýchlosťou cez stacionárnu fázu

V prípade konštantného zloženia mobilnej fázy počas analýzy hovoríme o izokratickej elúcii. Separácia heterogénnych zmesí látok je za izokratických podmienok často problematická, ba aj nemožná. Vtedy je nevyhnutné využiť gradientovú elúciu vyznačujúcu sa zmenou v zložení mobilnej fázy. Typická gradientová HPLC na reverzných fázach využíva kontinuálny nárast organickej zložky mobilnej fázy v priebehu analýzy [1,3].

Využitie HPLC vo farmaceutickej analýze je širokospektrálne a v súčasnosti ťažko nahraditeľné inou technikou. HPLC sa využíva ako kontrolný mechanizmus vo fáze výskumu a chemického vývoja potenciálnych liečiv, počas priemyselnej prípravy substancií liečivých látok prírodného i syntetického pôvodu, ako aj v následnom kontrolno-analytickom hodnotení liečiv a liečivých prípravkov pred podaním do ľudského organizmu. Nezastupiteľnú úlohu má aj počas terapeutického monitorovania liekových hladín v organizme a pri sledovaní osudu liečiva činnosťou ľudského metabolizmu. Vo farmaceutickom priemysle sa široko uplatňuje pri kontrole kvality substancií liečiv i hotových liečivých prípravkov [1,3,5].

HPLC je vo všetkých rešpektovaných liekopisných monografiách (Ph. Eur., USP) využívaná pri hodnotení čistoty, obsahu a spolu s ďalšími identifikačnými metódami aj pri potvrdení totožnosti najširšieho spektra liekopisných látok [6,7].

### 3.1.1 Separačný proces

Podmienkou úspechu prakticky každej HPLC separácie je optimalizácia chromatografických podmienok, ktorá spočíva v hľadaní vhodného typu stacionárnej fázy, zloženia mobilnej fázy, prietoku mobilnej fázy a teploty. Cieľom optimalizácie separačných podmienok je, aby všetky separované zložky poskytovali ostré a symetrické chromatografické píky rozdelené až na základnú líniu [3,5].

Separácia v typickom HPLC systéme na reverzných fázach je prejavom odlišných hodnôt distribučných konštánt (hmotnostného distribučného pomeru) separovaných látok ( $K_D$ ). Distribučná konštanta stanovuje pomer koncentrácie látky v stacionárnej fáze ( $A_{SF}$ ) ku koncentrácii látky v mobilnej fáze ( $A_{MF}$ ) za rovnovážneho stavu (1). Čím je hodnota distribučnej konštanty danej látky vyššia, tým silnejšia sorpcia látky na stacionárnej fáze nastáva a tým vyšší je retenčný čas [6,8].

$$K_D = \frac{A_{SF}}{A_{MF}} \quad (1)$$



Retenčný čas látky ( $T_R$ ) udáva dobu, ktorá uplynie od nástreku látky do mobilnej fázy po maximum píku látky na chromatograme. Retenčný čas predstavuje za presne stanovených podmienok identifikačnú charakteristiku látok [3,5,8].

Výstižnejším parametrom popisujúcim mieru záchytu látky na stacionárnej fáze je retenčný faktor ( $k$ ) (2). Retenčný faktor berie do úvahy mŕtvy retenčný čas systému ( $T_M$ ), ktorý zodpovedá retenčnému času látky pohybujúcej sa cez kolónu zároveň s mobilnou fázou. Mŕtvy retenčný čas závisí na parametroch metódy (prietok mobilnej fázy) a celkovom vnútornom objeme HPLC súčastí, t.j. závisí na mŕtvom objeme HPLC systému [3,5,8].

$$k = \frac{T_R - T_M}{T_M} \quad (2)$$

Po nadávkovaní zmesi látok dochádza v priebehu separačného procesu k určitému rozmývaniu a rozširovaniu chromatografických zón. Účinnosť kolóny udáva mieru rozširovania zón a vyjadruje sa počtom teoretických priehradiek ( $N$ ). Výpočet podľa Ph. Eur. vychádza zo šírky píku v polovici jeho výšky ( $w_{1/2}$ ) (3). USP vychádza zo šírky píku na základnej línii ( $w$ ) vymedzenej tangenciálne v polovici jeho výšky (4). Počet teoretických priehradiek je lineárne úmerný dĺžke kolóny. Praktickým parametrom, na základe ktorého je možné porovnávať účinnosť stacionárnych fáz o rozličnej dĺžke ( $L$ ), je výškový ekvivalent teoretickej priehradky ( $H$ ) (5) [1,3,6,7].

$$N = 5,54 \cdot \left( \frac{T_R}{w_{1/2}} \right)^2 \quad (3)$$

$$N = 16 \cdot \left( \frac{T_R}{w} \right)^2 \quad (4)$$

$$H = \left( \frac{L}{N} \right) \quad (5)$$

Separáčnú účinnosť kolóny je možné zvýšiť voľbou optimálneho prietoku mobilnej fázy. Vplyv lineárnej rýchlosti (t.j. prietoku) mobilnej fázy ( $u$ ) na účinnosť kolóny popisuje van

Deemterova rovnica (6). Grafickým vyjadrením závislosti výškového ekvivalentu teoretickej priehradky na rýchlosti toku mobilnej fázy je van Deemterova krivka. Optimálnu rýchlosť mobilnej fázy je možné odvodiť z minima van Deemterovej krivky [3].

$$H = A + \left(\frac{B}{u}\right) + C \cdot u \quad (6)$$

A = vírivá difúzia

B = pozdĺžna molekulárna difúzia

C = súčet odporov proti prenosu hmoty v stacionárnej a mobilnej fáze

Kvalita separácie látok (x) a (y) na základe šírky pík sa vyjadruje rozlíšením ( $R_s$ ) (7). Hodnota rozlíšenia vyššia než cca 1,5 znamená dokonalú separáciu látok až na základnú líniu. Mieru separácie dvoch látok popisuje taktiež selektivita ( $\alpha$ ) (8), avšak jej hodnota nezohľadňuje účinnosť separačného procesu a preto tento parameter úplne presne nevypovedá o kvalite separácie [1,3,6].

Tvar chromatografického píku je väčšinou od ideálneho tzv. Gaussovského píku viac alebo menej odchýlený. Vo väčšine liekopisov sa popisuje na základe šírky píku v jednej dvadсятine jeho výšky tzv. tailing faktorom ( $T_f$ ) (9), [3,6,7].

$$R_s = 1,18 \cdot \left( \frac{T_{Ry} - T_{Rx}}{w_{1/2x} + w_{1/2y}} \right) \quad (7)$$

$$\alpha = \frac{k_y}{k_x} \quad (8)$$

$$T_f = \left( \frac{a+b}{2 \cdot a} \right) \quad (9)$$

a = vzdialenosť medzi kolmicou spustenou z hrotu píku a vzostupnou časťou píku

b = vzdialenosť medzi kolmicou spustenou z hrotu píku a zostupnou časťou píku

### 3.1.2 Kvapalinový chromatograf

Zostava moderného kvapalinového chromatografu býva väčšinou tvorená z jednotlivých modulov, o niečo menej bežným zjavom je kvapalinový chromatograf kompaktného typu. Základné súčasti každého moderného HPLC chromatografického systému sú:

- Zásobníky mobilnej fázy
- Degasér (odplyňovač mobilnej fázy)
- Pumpy
- Dávkovač (autosampler)
- Kolóna
- Detektor
- Komunikačná jednotka

Zásobníky mobilnej fázy umožňujú pojať dostatočný objem kvapalných zložiek mobilnej fázy a tieto zložky chrániť pred možným znehodnotením, napríklad z dôvodu odparovania do prostredia. Mobilná fáza síce môže byť v prípade izokratickej elúcie namiešaná vopred ručne, avšak väčšina užívateľov z praktických dôvodov volí variantu automatického zmiešania mobilnej fázy vo vnútri HPLC systému. Zložky mobilnej fázy, prípadne už hotová mobilná fáza, sú do chromatografického systému kontinuálne nasávané činnosťou púmp. Podľa konštrukcie HPLC chromatografu sú jednotlivé zložky mobilnej fázy nasávané buď jedinou pumpou, pričom zmiešanie zložiek v mixéri prebieha pred pumpou za nízkeho tlaku, alebo sa potrebná mobilná fáza namieša v oblasti vysokého tlaku. V tomto tzv. vysokotlakom gradiente čerpá každú zložku dedikovaná pumpa. Predtým než sú zložky mobilnej fázy privedené do priestoru ohraničeného piestami púmp, je pomocou degaséru zabezpečené účinné odstránenie rozpustených molekúl plynov z mobilnej fázy. Typickým následkom prítomnosti plynov v eluente je hrozba významného kolísania pracovného tlaku, čo potom zapríčiňuje narúšanie procesu separácie a horšiu reprodukovateľnosť analýz (kolísanie retenčných časov, disturbancie a rušivé píky na zázname detektoru).

Moderné HPLC pumpy zaisťujú vysoko konštantný a bezpulzný tok mobilnej fázy na kolónu za tlakov dosahujúcich rádovo stovky barov. Analyzované roztoky sú do toku mobilnej

fázy nanosené činnosťou šesťcestného dávkovacieho ventilu s vymeniteľnou slučkou určitého objemu. V plniacej pozícii ventilu sa požadovaný objem vzorky injikuje do slučky pomocou striekačky s dávkovacou ihlou. Samotný prenos nadávkovaného objemu do mobilnej fázy prebehne po prepnutí ventilu do dávkovacej pozície. V súčasnej inštrumentácii dominuje používanie autosamplerov schopných úplne samostatne prevádzať celý proces prenosu kvapalných vzoriek do HPLC systému. Analyzovaný roztok je spolu s mobilnou fázou unášaný do kolóny, kde sú jednotlivé látky na základe mnohonásobného ustáľovania sorpčných rovnováh od seba separované. Kolónu je vhodné umiestniť do termostátovaného priestoru, pretože kolísanie teploty môže vplývať na retenciu ako aj tvar pík.

Separované zóny s izolovanými analytmi putujú z kolóny do detektoru. Detektor na základe snímania odozvy niektorej fyzikálno-chemickej vlastnosti eluentu je schopný eluované látky zaznamenať. Výstupom detektoru je signál, ktorého intenzita je úmerná koncentrácii (množstvu) látky v analyzovanom roztoku.

Jednotlivé moduly sú medzi sebou prepojené kapilárnymi spojkami. Dĺžka kapilárnych segmentov by mala byť čo najkratšia, aby sa minimalizoval mŕtvy objem HPLC systému, a tým zbytočné rozmývanie separovaných zón. V oblastiach, kde na steny kapiláry pôsobí nižší tlak, sa prednostne používajú kapiláry z polymérov (teflón, PEEK). Vysoký tlak medzi pumpou a kolónou kladie na kapiláry väčšie nároky, preto je nevyhnutné v týchto spojovacích úsekoch používať odolné nerezové alebo PEEK kapiláry.

Komunikačná jednotka zabezpečuje synchronizáciu a on-line prepojenie aktívnych modulov HPLC chromatografu s počítačom. Chod HPLC prístroja podľa potrieb analytika je ovládaný dedikovaným chromatografickým softvérom, ktorý je spolu s hardvérom dodávaný od výrobcu chromatografickej techniky [3].

### 3.1.3 Chromatografické kolóny

V kolóne dochádza na základe interakcií molekúl analytu s povrchom stacionárnej fázy k najdôležitejšiemu chromatografickému princípu = k separácii analyzovanej zmesi. Kolóny pre HPLC sú tvorené nerezovou alebo plastovou trubicou s hladkým vnútorným povrchom. Dĺžka analytických kolón sa pohybuje obvykle v rozmedzí 5 - 30 cm pri vnútornom priemere 2 - 5 mm. Náplňou komerčných HPLC kolón je vhodný homogénny sorbent najčastejšie mikročasticového typu, prípadne monolitckej štruktúry [1,3].

Separáčna účinnosť analytických kolón závisí na kvalite materiálu použitého pri plnení kolóny, na dĺžke kolóny, na veľkosti aktívneho povrchu, na chromatografických podmienkach analýzy (mobilná fáza, teplota, prietok) atď. Menšie častice majú väčší špecifický povrch, čo následne indikuje účinnejšiu separačnú schopnosť, i keď na úkor vyššieho tlakového odporu kolóny [1,3].

#### Časticový sorbent

Sorbent väčšiny HPLC kolón je tvorený pórovitými približne sférickými časticami s priemerom najčastejšie 2 - 5  $\mu\text{m}$ . Pravidelný guľovitý tvar zrn stacionárnej fázy optimalizuje separačný výkon a životnosť kolóny. Skutočná plocha povrchu častice je vďaka jej mimoriadnej pórovitosti dramaticky zvýšená až na hodnoty okolo 400  $\text{m}^2/\text{g}$  u silikagélu [3].

V rámci problematiky poréznych sorbentov sme svedkami vrcholiaceho trendu naštartovaného koncom 90. rokov spočívajúceho v zmenšovaní veľkosti častíc a s tým súvisiacim skracovaním a zmenšovaním priemeru HPLC kolón. Okrem tradičných poréznych sorbentov boli vyvinuté vysoko účinné neporézne sorbenty (tzv. pelikulárne), perfúzne sorbenty a najmä povrchovo porézne sorbenty, u ktorých sú častice tvorené z tuhého jadra obaleného vrstvou porézneho sorbentu [3,9]. Povrchovo porézny sorbent sa vyznačuje úzkou distribúciou priemeru častíc, čím dochádza k lepšej separačnej účinnosti a nižšiemu spätnému tlaku v porovnaní s bežnými porézными sorbentami. Na uvedenom princípe založené náplňové kolóny sa tešia v poslednej dobe zvyšujúcej sa obľube [10].

#### Monolitický sorbent

Popri klasických náplňových kolónach je komerčne dostupných niekoľko monolitických kolón [1]. Monolitické kolóny nemajú časticový charakter, avšak sú vysoko porézne (až 80 % celkového objemu fázy) [3,11]. Výhodou sú hydrodynamické vlastnosti takto poréznych materiálov, ktoré aj pri vyšších prietokoch zachovávajú pomerne nízky tlakový odpor bez straty účinnosti [12,13]. Na trhu sú dostupné monolitické kolóny pripravené z polyméru i silikagélu. V rutinej laboratórnej praxi zatiaľ monolity nenaplnili také očakávania, ktoré sa do nich pri zavádzaní vkladali a ich význam v budúcnosti zatiaľ nemožno jednoznačne predvídať [3].

#### Základné typy stacionárnych fáz

Na trhu je k dispozícii viac než tisíc časticových chromatografických kolón rôznych značiek a typov. Spektrum stacionárnych fáz je pomerne široké a zahŕňa tieto typy:

- Nemodifikovaný silikagél - využitie v chromatografii na normálnych fázach.
- Chemicky viazané silikagélové sorbenty - v súčasnej analytickej praxi si vydobyli dominantné postavenie. Technológia prípravy častíc modifikovaných silikagélových sorbentov o presných parametroch (napr. rozmeroch častíc a pórov) je excelentne zvládnutá. Na povrch silikagélu sú kovalentnou väzbou naviazané stacionárne fázy hydrofóbného charakteru: alifatické reťazce (napr. oktyl a oktadecyl), aromatické jadrá (napr. fenyľ, pentafluorofenyľ), prípadne polárne funkčné skupiny (aminopropyl, kyanopropyl apod.). Kyslé hydroxylové skupiny na povrchu silikagélu sú ľahkým terčom pre kovalentnú modifikáciu, avšak ani pri najlepšej snahe nie je možné stacionárnou fázou modifikovať všetky dostupné silanoly. Reziduálne silanoly spôsobujú problémy pri analýze zásaditých látok. Ďalšou nevýhodou chemicky modifikovaných fáz na silikagéle je obmedzená stabilita prejavujúca sa hydrolyzou pri pH > 8,5 ako aj menšou životnosťou pri teplotách nad 40 °C [1,3].
- Hybridné sorbenty - zaujímavý a komerčne vcelku úspešný prístup k syntéze odolnejších silikagélových fáz využíva reakcie anorganických a organických alkoxyasilánov za vzniku hybridnej stacionárnej fázy. Matrica hybridov obsahuje hydrolyticky stabilné Si-C väzby. Z hľadiska separačného výkonu kombinujú výhodné vlastnosti silikagélu s najlepšimi vlastnosťami polymérnych sorbentov a disponujú vysokou účinnosťou a odolnosťou aj vo veľmi zásaditom pH [3,14,15].
- Polymérne zosieťované sorbenty napr. polystyrén-divinylbenzén kopolyméry - vyznačujú sa stabilitou v mobilnej fáze s pH 1 - 13 a výbornou odolnosťou voči teplotám. Nevýhodou je nižšia účinnosť separácie a čiastočné bobtnanie polymérnej fázy v prítomnosti organického rozpúšťadla, či následkom zmeny zloženia mobilnej fázy [3].
- Sorbenty na báze oxidov kovov (hlavne Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, TiO<sub>2</sub>, ZrO<sub>2</sub>) - predstavujú alternatívu voči silikagélovým a polymérnym nosičom. V praxi je najrozšírenejším kovovým nosičom oxid zirkoničitý. Detailný popis zirkóniových sorbentov je uvedený v kapitole 3.2.
- Pórovitý grafitický uhlík - extrémne hydrofóbná stacionárna fáza vhodná pri separáciách veľmi polárnych látok, ktoré sa nedostatočne zadržávajú na bežných ODS fázach. Stabilita uhlíkovej fázy voči teplote i pH je extrémne vysoká. Selektivita je diametrálne odlišná od ostatných bežných sorbentov [3,16].

- Iónomeniče - na nosiči stacionárnej fázy (silikagél, polymér,  $ZrO_2$ ) majú chemicky ukotvenú kyslú alebo zásaditú funkčnú skupinu. Funkčná skupina je buď permanentne nabitá alebo je náboj iónomeniča prítomný v závislosti na pH mobilnej fázy [1,3].
- Chirálny sorbenty - na povrch nosiča stacionárnej fázy (silikagél, polyméry,  $ZrO_2$ ) je chemicky naviazaná alebo fyzikálne ukotvená vhodná chirálna molekula. Medzi najbežnejšie využívané chirálne molekuly, ktoré sú schopné s inými chirálnymi látkami špecificky interagovať, zaradujeme aminokyseliny, polysacharidy, cyklodextríny, proteíny, makrocyclické antibiotiká atď [3,17].

### 3.1.4 HPLC detektory

Úlohou detektoru je podanie vhodných informácií (dát) o fyzikálnych či chemických vlastnostiach eluentu vytekajúceho z kolóny. Záznam vlastností eluentu sa odohráva v detekčnej cele (neplatí pre hmotnostný detektor) s objemom rádo vo desiatok mikrolitrov. Separované zóny látok vyvolávajú prechodom detekčnej cely odozvu, ktorá je po zosilení zobrazená v grafickom zázname chromatogramu. Intenzita signálu je úmerná koncentrácii látky v eluente. Z hľadiska kvalitatívnych požiadaviek na detektory sa dôraz kladie na vysokú citlivosť, linearitu a reprodukovateľnosť odozvy, pričom v ideálnej situácii by odozva nemala byť ovplyvňovaná zmenami v zložení mobilnej fázy [3].

Detektory používané v HPLC sa klasifikujú na univerzálne a selektívne, prípadne deštruktívne a nedeštruktívne. Voľba vhodného detektoru sa odvíja od charakteru látok a účelu, pre ktorý bude analytická metóda prednostne určená. V analytickej praxi dominuje používanie spektrofotometrických UV-VIS detektorov. Značnú expanziu v poslednom období zažíva vysoko citlivá univerzálna MS detekcia [3,5].

#### Spektrofotometrický detektor

Spektrofotometrické detektory sú vo farmaceutickej analýze najrozšírenejším spôsobom sledovania zloženia eluentu. Detektory registrujú absorbciu eluentu pretekajúceho cez detekčnú celú. Podľa Lambert-Beerovho zákona (10) je absorbcia (A) priamo úmerná molárnej koncentrácii látky (c) [3].

$$A = \varepsilon \cdot c \cdot l \quad (10)$$

$\epsilon$  = molárny absorpčný koeficient (l/mol.cm)

l = aktívna šírka mernej cely (cm)

Spektrofotometrický detektor je selektívny voči látkam obsahujúcim vo svojej štruktúre chromofor. Chromofor umožňuje molekulám absorbovať svetlo o vlnových dĺžkach v intervale 200 - 800 nm. V praxi sa primárne stretávame s UV absorpciou látok v rozmedzí vlnových dĺžok 190 - 400 nm (zlúčeniny s násobnými väzbami, aromatické látky atď.), prípadne VIS absorpciou nad 400 nm (zlúčeniny s výrazne konjugovaným systémom násobných väzieb, heterocyklické komplexy atď.). Zlúčeniny bez násobných väzieb v oblasti nad 200 nm takmer vôbec neabsorbujú. Pri použití vlnovej dĺžky absorpčného maxima danej látky môže citlivosť detekcie dosahovať úroveň asi  $10^{-10}$  g/ml.

Výhodou spektrofotometrických detektorov je vynikajúca kompatibilita s gradientovou elúciou a široká linearita odzvy v rozsahu  $10^5$  [3,5]. Zdrojom svetla v moderných zariadeniach je deutériová (UV oblasť) a volfrámová lampa (VIS oblasť). Spektrofotometrické detektory sa vyrábajú v rôznych prevedeniach, ktoré sa líšia hlavne v univerzálnosti použitia, citlivosti a cene [3].

- Detektor s možnosťou nastavenia ľubovoľnej vlnovej dĺžky - detektor môže byť schopný snímať aj niekoľko vlnových dĺžok súčasne. Svetlo dopadá na monochromátor (mriežka, prípadne hrano) a rozkladá sa na svetlo o jednotlivých vlnových dĺžkach. Vhodným polohovaním štrbiny je monochromatické svetlo nasmerované na detekčnú celu a po prechode celou dopadá na fotonásobič [5].
- Detektor s diódovým poľom - detektor umožňuje snímať zvolené UV-VIS spektrum eluentu v priebehu celej HPLC analýzy. Svetlo zo zdroja po prechode štrbinou prechádza najprv detekčnou celou, až potom dopadá na monochromátor a následne na fotodiódové pole [3].

#### Fluorescenčný detektor

Vysoko selektívny fluorescenčný (fluorometrický) detektor pracujúci na fyzikálnom princípe fluorescencie sa vyznačuje v závislosti na štruktúre látky vysokou citlivosťou v rozsahu  $10^{-9}$  -  $10^{-15}$  g/ml. Dynamický rozsah fluorescenčnej detekcie je látka od látky premenlivý ( $10^1$  až



$10^4$ ). Prirodzenej fluorescencie sú schopné iba látky obsahujúce určitý štruktúrny motív, tzv. fluorofor (napr. kondenzované benzénové jadrá). Absorpciou primárneho žiarenia o určitej vlnovej dĺžke dochádza k excitácii  $\pi$ -elektrónov molekúl analytu a následnému prechodu do stabilnejšieho stavu za emitovania sekundárneho žiarenia (fluorescencie) o vyššej vlnovej dĺžke. Intenzita emitovaného žiarenia je zosilená fotonásobičom umiestneným najčastejšie ortogonálne k smeru primárneho žiarenia [3].

### Elektrochemické detektory

Prvoradým benefitom elektrochemickej detekcie je vysoká citlivosť rádovo v rozsahoch  $10^{-9}$  až  $10^{-12}$  g/ml [5]. Táto detekcia je selektívna pre látky schopné oxidácie alebo redukcie, nie je však kompatibilná s chromatografiou na normálnych fázach. Elektrochemický senzor je zložený z jednej pomocnej elektródy a ďalej z mernej a referenčnej elektródy, medzi ktoré je vložené konštantné elektrické napätie a zaznamenáva sa generovaný elektrický prúd. Podľa usporiadania elektród sa rozlišujú dve základné konštrukčné varianty detektoru [3,18]:

- Coulometrický detektor - mobilná fáza preniká cez priestor referenčnej aj pracovnej elektródy celým objemom. Efektivita elektrochemickej reakcie je 100 %, a preto je coulometrický detektor v rámci skupiny najcitlivejší a najpopulárnejší [18].
- Ampérometrický detektor - mobilná fáza tečie popri stene (varianta 1) alebo kolmo na povrch (varianta 2) pracovnej elektródy. Detektor je schopný zachytiť iba 5 - 10 % elektrochemicky aktívnych molekúl látky. V porovnaní s coulometrickým detektorom sú citlivosť a použitie ampérometrického detektoru druhoradé [18].

### Konduktometrický detektor

Konduktometrický detektor je vhodný napríklad k detekcii anorganických iónov a jednoduchých organických kyselín v rámci iónovej chromatografie. Vyhodnocuje vodivosť eluentu medzi elektródami, na ktoré je vložené elektrické napätie. Detekčná cela musí byť precízne termostatovaná, pretože zmena teploty o 1 °C vedie k cca 2 % vzostupu vodivosti eluentu [19]. Príliš vodivá mobilná fáza môže stanovenie podstatne narúšať, preto v podobných situáciách je doporučené použiť vhodnú ionexovú kolónu (tzv. supresor) potláčajúcu nadmernú elektrickú vodivosť eluentu [3]. Na druhú stranu sú moderné vodivostné detektory schopné

potláčať vodivosť pozadia elektronicky a vzhľadom k nulovej základnej línii hodnotiť súčasne kladné aj záporné ióny [19].

#### Refraktometrický detektor

Univerzálna refraktometrická detekcia zaznamenáva zmeny indexu lomu eluentu. Kvôli nízkej citlivosti okolo  $10^{-6}$  g/ml, nutnosti starostlivého termostatovania a nemožnosti aplikovať gradientovú elúciu nie je v súčasnosti využitie refraktometrického detektoru v HPLC praxi príliš významné. Pokiaľ je potrebný jednoduchý univerzálny detektor, tak je vhodnejšie zaobstarať si napr. detektor rozptylu svetla [3,5].

#### Detektor rozptylu svetla

Tento univerzálny detektor je vhodný k detekcii látok bez chromoforu alebo fluoroforu. Vyžaduje sa prchavý eluent, pričom signál sa dá získať iba od menej prchavých látok než vykazuje vlastný eluent. Mobilná fáza je pôsobením inertného plynu prevedená na aerosól a ďalej v evaporačnej komôrke odparená. V optickej komôrke sa zaznamenáva rozptyl svetla na pevných časticičkách látok unášaných v prúde nosného plynu. Citlivosť ELSD detekcie je asi  $10^{-8}$  g/ml. Charakteristická je však nízkou linearitou odozvy v rozsahu jedného až dvoch rádov. V postačujúcej miere je ELSD detekcia kompatibilná aj s gradientovou elúciou [1,3,20].

#### Detektor korónového výboja

Použitie univerzálneho detektoru korónového výboja je obdobné ELSD detektoru s tým rozdielom, že disponuje asi o jeden rád vyššou citlivosťou a širším lineárnym rozsahom  $10^4$ . Po splynení eluentu analogickým ELSD dochádza ku korónovému nabíjaniu častíc látok a hodnotí sa tok náboja v prúde nosného plynu [3,21].

#### Hmotnostný spektrometer (detektor)

Hmotnostná spektrometria patrí v súčasnosti k najdynamickejšie sa rozvíjajúcim analytickým technikám. Spojenie HPLC-MS sa vďaka vynikajúcej citlivosti a aplikačnej univerzálnosti používa k identifikácii, štruktúrnej i kvantitatívnej analýze látok. Hmotnostný detektor sníma hmotnostné spektrum látok. Zariadenie má tri časti:

- Prepojenie LC-MS / Iónový zdroj
- Hmotnostný analyzátor

- Detektor

V iónovom zdroji dochádza k splynutiu mobilnej fázy a prevedeniu molekúl analytu do ionizovanej formy. Najčastejšie sa v HPLC-MS analýze používajú mäkké atmosférické ionizačné techniky - ESI, APCI, APPI. Ionizované látky sú v ďalšej fáze fokusované do analyzátoru pomocou iónovej optiky. Ióny v plynnej fáze sú vo vákuu ( $10^{-5}$  až  $10^{-6}$  Torr) separované v analyzátore na základe pomeru hmotnosti a náboja  $m/z$  buď na základe doby letu trubicou (TOF analyzátor) alebo pôsobením elektromagnetického poľa (ostatné analyzátory). Ióny podrobené hmotnostnej detekcii sú detegované na povrchu elektrónového násobiča, prípadne fotonásobiča alebo Faradayovej klietky. Výsledkom hmotnostnej detekcie je relatívna početnosť jednotlivých iónov na pomere  $m/z$  - hmotnostné spektrum.

Existuje niekoľko rôznych hmotnostných analyzátorov, z ktorých sú v spojení HPLC-MS (podľa účelu analýzy) používané hlavne kvadrupólové analyzátory (jednoduchý kvadrupól, trojitý kvadrupól), iónová pasca a analyzátor doby letu, prípadne cenovo náročnejší Orbitrap. Bezkonkurenčne najvýkonnejším, ale i najdrahším hmotnostným analyzátorom, je iónová cyklotrónová rezonancia.

Trendom v súčasnej komplexnej kvantitatívnej analýze je vzostup významu hybridných hmotnostných dizajnov, napr. už zmieňovaného trojitého kvadrupólu (QqQ). Prvý kvadrupól izoluje prekursorový ión, druhý kvadrupól slúži ako kolízna cela a tretí kvadrupól pre izoláciu fragmentových iónov. Ďalšími spojeniami sú TOF-TOF, prípadne kombinácie Q-TOF, IT-TOF apod [3,22].

### 3.1.5 HPLC módy

#### Chromatografia na normálnych fázach

Termín „normálne fázy“ odkazuje na vývojovo prekonané obdobie, keď to bol čistý silikagél ako jedna z prvých stacionárnych fáz, ktorého použitie v HPLC bolo štandardom. V súčasnosti sa v tomto móde používajú predovšetkým silikagélové sorbenty modifikované polárnymi funkčnými skupinami ( $-NH_2$ ,  $-CN$ , diol). Polárny povrch stacionárnej fázy je v kontraste k mobilnej fáze opačnej polaroty, ktorou býva nepolárne organické rozpúšťadlo (hexán, heptán apod.) s prímiesou polárnejšieho rozpúšťadla (izopropanol, terc-butanol, etanol

apod.). Retencia je výsledkom adsorpcie analytu k povrchu stacionárnej fázy, napr. prostredníctvom vodíkových mostíkov. Chromatografia na normálnych fázach sa používa pri separácii polárnych látok, no býva často spojená s problémami rozpustnosti polárnych látok v organickej mobilnej fáze [3].

#### Chromatografia na reverzných fázach

Keďže chromatografia na reverzných fázach využíva kombináciu málo polárnej stacionárnej fázy a mobilnej fázy, ktorá je omnoho polárnejšia než na normálnych fázach, pôsobí RPLC oproti jej predchodkyni akoby vymenená, t.j. reverzná. Strmý nárast popularity RPLC separácií od polovice 70. rokov súvisel so zavedením chemicky modifikovaných silikagélových sorbentov. Dnes je RPLC jednoznačne uznávaná za dominantný chromatografický mód a za prvú voľbu v separáciách neutrálnych i ionizovateľných látok. Vo farmaceutickej analýze sa takmer výlučne jedná o látky viac alebo menej kyslé či zásadité, preto sa vyžaduje použitie pufrovanej mobilnej fázy o vhodnom pH vodnej zložky. Organickú časť tvorí relatívne polárne rozpúšťadlo miešateľné s vodou (acetonitril, metanol, menej izopropanol, či tetrahydrofurán). Retencia je dôsledkom rozdeľovania separovaných molekúl z mobilnej fázy na hydrofóbny povrch stacionárnej fázy. Základným typom reverznej stacionárnej fázy je oktadecylsilikagélová kolóna, ktorá poskytuje efektívne a reprodukovateľné výsledky a je ponúkaná väčšinou výrobcov v hojnom zastúpení rozmerov a vlastností [3].

#### Ión-párová chromatografia

Separčné podmienky ión-párovej chromatografie bývajú zhodné s podmienkami typickými pre chromatografiu na reverzných fázach s jediným rozdielom, že mobilná fáza obsahuje malé množstvo tzv. ión-párového aditíva (napr. kvartérne amóniové soli, alkylsulfonáty apod.). Aditívum interaguje s opačne nabitými iónmi zo vzoriek za vzniku iónového páru o vyššej hydrofobicite. Iónový pár je následne na sorbente zadržovaný reverznými interakciami. Ión-párová chromatografia je vhodná v analýze organických kyselín a zásad, ak tieto analyty vykazujú nedostatočnú retenciu v RPLC [1,3].

#### Iónová chromatografia

Mechanizmus retencie spočíva v interakcii elektricky nabitých molekúl analytu s opačne nabitými funkčnými skupinami naviazanými na stacionárnej fáze. Podľa typu funkčnej skupiny sa stacionárne fázy rozdeľujú na kationové ionexy ( $-\text{SO}_3\text{H}$  je silný katex,  $-\text{COOH}$  slabý katex)

a aniónové ionexy ( $-NR_4^+$  je silný anex,  $-NH_2$  slabý anex). Separačné chovanie je ovplyvnené takmer výhradne nábojom povrchu sorbentu. Do výsledkov separácie sa premieta aj konkurenčné chovanie aditív pridaných do mobilnej fázy. Hlavné uplatnenie iónovej chromatografie je možné nájsť v analýze iónov anorganických kovov, niektorých organických látok nesúcich ionizovateľnú funkčnú skupinu (napr. karboxylové kyseliny) a v separáciách rozmanitých typov biomolekúl [3,23].

#### HILIC chromatografia

Chromatografia založená na hydrofilných interakciách (často spojovaná s vodnou chromatografiou na normálnych fázach [24]), je dynamicky sa rozvíjajúcim HPLC separačným módom posledného obdobia. Stacionárne fázy v HILIC sú polárne, avšak mobilná fáza na rozdiel od NPLC obsahuje vysoké percento relatívne polárneho organického rozpúšťadla (najčastejšie acetonitrilu) s prídavkom vodnej zložky (3 - 40 %). Zvýšenie retencie látok býva dôsledkom zníženia obsahu vodnej zložky v eluente. Retenčné poradie býva opačné než v RPLC usporiadaní. Základnými retenčnými mechanizmami sú rozdeľovanie a adsorpcia, avšak zastúpenie môžu mať taktiež iónové interakcie a aj ďalšie interakčné deje. Interakčné mechanizmy zúčastňujúce sa diskriminácie píkov v HILIC neboli doteraz definitívne objasnené. HILIC je určená pre separácie veľmi polárnych látok. Praktické upotrebenie nachádza napr. v analýze hydrofilných liečiv, oligosacharidov, aminokyselín, peptidov atď. [25-27].

#### Chirálna chromatografia

Tento špecifický typ HPLC chromatografie našiel významné uplatnenie pri hodnotení enantiomérskej čistoty látok. Ako sorbent sa najčastejšie používajú chirálne stacionárne fázy, avšak chirálne separovať látky je možné aj prídavkom malého množstva chirálneho selektoru do mobilnej fázy s následným použitím niektorej achirálny kolóny, prípadne derivatizáciou chirálnej látky s následným rozdelením diastereoizomérov. V závislosti na druhu chirálneho sorbentu prebieha separácia buď na normálnych fázach alebo v obrátenom usporiadaní, ojedinele je úspech možné dosiahnuť aj v polárno-organickom móde. V rámci chromatografických procesov sa uplatňujú rôznorodé interakčné mechanizmy objavujúce sa počas HPLC na normálnych fázach, na reverzných fázach i v iónovej chromatografii, vždy však špecifické voči optickým antipódom [3,17].

### Gélová chromatografia

Gélová chromatografia rozdeľuje analyzované látky v roztokoch podľa molekulevej hmotnosti na základe rýchlejšieho vylučovania väčších molekúl z pórov sorbentu (gélu). Nedochádza k žiadnym špecifickejšim interakciám medzi analytom a stacionárnou fázou. Rozdeľuje sa na gélovú filtračnú chromatografiu (hydrofilné gély - vodné roztoky) a gélovú permeačnú chromatografiu (polymérne gély - organické rozpúšťadlá). Používa sa k separácii a charakterizácii analytov podľa molekulevej hmotnosti a ako preparatívny nástroj pri získavaní purifikovaných biomateriálov [3].

### **3.1.6 Interpretácia výsledkov**

HPLC analýza umožňuje hodnotiť neznáme vzorky z kvalitatívneho aj kvantitatívneho hľadiska.

Kvalitatívna analýza slúži k identifikácii štruktúry analytu. HPLC technika nie je ideálnym nástrojom pre kvalitatívnu analýzu, avšak napriek tomu je vhodný HPLC systém schopný za definovaných podmienok poskytovať cenné informácie na základe zhody retenčných časov píku v analyzovanej vzorke s retenčným časom v roztoku štandardu. Tento postup je široko využívaný v liekopisných skúškach identity látok [6,7]. K definitívnemu overeniu totožnosti látky slúži kombinácia HPLC s vhodnou MS detekciou, prípadne infračervená spektrometria alebo nukleárna magnetická rezonancia.

Ozajstné výhody HPLC vystúpia do popredia v prípade kvantitatívnej analýzy. HPLC je suverénne najbežnejšou laboratórnou metodikou schopnou kvantifikovať obsah látok vo vzorkách. Mierou koncentrácie (množstva) látky vo vzorke je plocha píku (event. výška u stopovej analýzy), ktorá sa číselne vyjadruje vhodnou integráciou.

Spôľahlivé použitie HPLC konceptu v kvantitatívnej analýze podmieňuje zopár aspektov:

- Reprodukovateľnosť HPLC systému i prevodu signálu detektoru na odozvu v čase
- Experimentálne HPLC podmienky schopné rozlíšenia píkov na základnú líniu
- Výkon HPLC systému vyhovujúci nastaveným požiadavkám definovaným napr. v teste spôsobilosti
- Primeraná kalibrácia HPLC systému podmieňujúca stanovenie obsahu vzhľadom k známemu množstvu referenčného štandardu [3]

Kvantifikácia obsahu je možná niekoľkými prístupmi [3,5,6]:

- Metóda vonkajšieho štandardu - plocha píku v roztoku štandardu látky o presne známej koncentrácii je úmerná ploche píku v roztoku vzorky o neznámej koncentrácii. Takýto postup je v kontrolno-analytickej praxi najtypickejší. Vyžaduje sa mať k dispozícii štandard hodnotenej látky o presne známej čistote.
- Metóda vnútorného štandardu - skôr než sa roztoky štandardu a hodnotenej vzorky analyzujú, je k nim pridané presne známe množstvo vnútorného štandardu. Vnútny štandard je látka spravidla s podobným chromatografickým chovaním. V MS analýze sa často volí izotopicky značený analyt, ktorý má totožné chromatografické chovanie. Pomer plôch oboch píkov v roztoku štandardu o presne známej koncentrácii je úmerný pomeru plôch v roztoku vzorky o neznámej koncentrácii. Tento postup má svoje nezastupiteľné miesto v bioanalytickej praxi.
- Normalizačná metóda - vyjadruje percentuálny obsah danej látky z celkovej plochy píkov všetkých látok v roztoku vzorky. Zanedbávajú sa píky pochádzajúce z roztoku blanku a píky pod limitom zanedbateľnosti, ktorý obvykle zodpovedá citlivosti metódy. Použitie je orientované na aplikácie, v ktorých je znalosť relatívnej koncentrácie viac vypovedajúca než absolútny obsah. Typickým príkladom je priebežná výrobná kontrola kvality liečivých substancií. Na zreteľ je niekedy potrebné vziať rozdiely odozvočných faktorov (RF) prítomných látok. RF vyjadruje vzťah veľkosti odozvy signálu (plocha píku A) na koncentrácii látky (c) (11).

$$RF = \frac{A}{c} \quad (11)$$

- Kalibračný postup - odozva signálu sa určí na niekoľkých koncentračných hladinách látky a vypočíta sa kalibračná funkcia, ktorá posluží pri výpočte obsahu.

### 3.1.7 UHPLC

Neprehliadnuteľným trendom posledných rokov je rapidný nárast obľúbenosti analytických kolón kratších než je bežné v HPLC s priemerom častíc okolo 2  $\mu\text{m}$ . Efektivita separačného procesu na podobných mikročasticových kolónach je v dôsledku väčšieho

špecifického povrchu vyššia než u analogických HPLC kolón. U pokročilých sorbentov nie je efektívnosť separácie natoľko výrazne ovplyvnená prietokom mobilnej fázy. Potrebnú dobu analýzy je tak možné skracať vyšším prietokom pri zachovaní separačnej účinnosti.

Výhodnému použitiu dostupných časticových sorbentov o priemere zrn okolo 2  $\mu\text{m}$  však stoja v ceste tlakové limity bežných HPLC systémov schopných dlhodobo pracovať maximálne do cca 400 barov. Táto skutočnosť viedla k prudkému rozvoju ultravysokoúčinnnej UHPLC techniky konštruovanej na pracovné tlaky 600 - 1200 barov (chromatograf Shimadzu Nexera<sup>®</sup> zvláda tlak až 1300 barov [28]). V súčasnosti sú na trhu dostupné robustné UHPLC kolóny naplnené monodisperznými poréznymi časticami s priemerom 1,5 - 2,1  $\mu\text{m}$ . UHPLC kolóny nachádzajú stále viac aplikácií vo farmaceutickej, biomedicínskej a enviromentálnej analýze [29].

UHPLC chromatograf sa vyznačuje konštrukčnými opatreniami minimalizujúcimi objem extrakolónového priestoru ako napr. užšie kapiláry a menší vnútorný objem HPLC komponentov (pumpy, dávkovacie slučky, kolóny, detekčné cely). Všetky úpravy vedú k dosiahnutiu výrazne užších zón separovaných látok. Spoľahlivé zaznamenanie takto úzkých píkov v eluente kladie kvalitatívne nároky aj na schopnosti detektoru (frekvencia zberu dát). Obsluha UHPLC chromatografu je prakticky zhodná s bežným kvapalínovým chromatografom s obmedzeniami v maximálnej použiteľnej hodnote prietoku a objeme nástreku [3]. Najdôležitejšou výhodou UHPLC je niekoľkonásobne vyššia rýchlosť analýz vzhľadom k mimoriadnej separačnej kapacite UHPLC sorbentu a niekedy aj vyššia citlivosť detekcie [29-31]. Hlavným problémom býva pokles separačnej účinnosti následkom tepla vznikajúceho trením za vysokých tlakov, ktoré sa prejavuje radiálnymi teplotnými gradientami vo vnútri chromatografickej kolóny [32].

Vzhľadom k exponenciálnemu nárastu spätného tlaku ako funkciu rozmeru častice je každá ďalšia miniaturizácia zrn stacionárnej fázy (napr. pod 1  $\mu\text{m}$ ) veľmi obtiažna, avšak v literatúre už je možné nájsť zmienky o separačných aplikáciách kolón s priemerom častíc pod 1  $\mu\text{m}$  [33].

### **3.2 POPIS ZIRKÓNIOVÝCH HPLC STACIONÁRNYCH FÁZ**

Celosvetovo zaužívanou praxou z hľadiska použitia je jasná prevaha klasických HPLC stacionárnych fáz odvodených od amorfného  $\text{SiO}_2$  - silikagélu. Vzhľadom k dlhodobému štúdiu



jeho vlastností, trvajúcemu od počiatkov HPLC, je možno medzi hlavné dôvody dominancie silikagelových nosičov stacionárnych fáz zaradiť takmer dokonalú znalosť chemických vlastností silikagélu a excelentne zvládnutú technológiu reprodukovateľnej chemickej modifikácie jeho povrchu.

Ideálna HPLC stacionárna fáza môže byť definovaná týmito charakteristikami:

- Variabilný fázový pomer a následne retentivita a kapacita stacionárnej fázy
- Dlhodobá stabilita voči agresívnym mobilným fázam (nízke a vysoké pH)
- Mechanická pevnosť pri vysokotlakových aplikáciách a počas plnenia sorbentu
- Častice sférické s vysokým špecifickým povrchom a úzkou distribúciou
- Póry otvorené, poprepájané, umožňujúce rýchly prenos hmoty
- Nosič stacionárnej fázy rezistentný teplotnej a chemickej degradácii
- Povrch nosiča energeticky homogénny, avšak chemicky modifikovateľný
- Minimálne bobtnanie polymérnych fáz a polymérnych vrstiev [34,35]

Z uvedených bodov vyplýva, že silikagél nie je zďaleka ideálnym materiálom pre HPLC použitie vzhľadom k tomu, že má hneď niekoľko zjavných slabín. Bežné RPLC silikagelové fázy sú dlhodobo stabilné iba v rozsahu pH 3 - 7 [36]. V kyslom pH dochádza k hydrolyze siloxanovej väzby a následnej strate viazanej stacionárnej fázy, zatiaľ čo alkalické pH vedie k rozpúšťaniu samotnej silikagelovej kostry stacionárnej fázy. Rozklad potencujú aj niektoré bežné pufrý (fosforečnan, uhličitan). Teplota nad cca 40 °C má ďalší silný destabilizujúci efekt na silikagelovu maticu, ale aj na viazanú stacionárnu fázu. Problematickým aspektom RPLC analýzy zásaditých látok býva prítomnosť voľných silanolových skupín prejavujúca sa horšou separačnou efektívnosťou. Aj keď vývoj reverzných silikagelových fáz neustále napreduje, čoho dôkazom je zlepšenie chemickej stability v kyslom (pH 1) ako aj zásaditom prostredí (pH 12) [3,9,34], popri tomto diania sa do popredia záujmu širokej odbornej verejnosti dostávajú alternatívne materiály pre HPLC. Najnádejnejšími kandidátmi prekonávajúcimi silikagél hlavne v stabilitných aspektoch sú oxidy prechodných kovov.

Chromatografické schopnosti boli experimentálne overené u niekoľkých oxidov kovov ( $ZrO_2$ ,  $TiO_2$ ,  $Al_2O_3$ ,  $CeO_2$ ,  $HfO_2$  atď.) [37-40]. V súčasnosti sa však hlavná pozornosť venuje

predovšetkým oxidu zirkoničitému, prípadne oxidu titaničitému. HPLC sorbenty na báze  $ZrO_2$  a  $TiO_2$  sú si pomerne blízke po fyzikálno-chemickej stránke ako aj z perspektívy HPLC. Vďaka zložitejším interakčným dejom na povrchu oxidu kovov sú ich chromatografické vlastnosti iba málo podobné so silikagélom [41,42]. Porovnanie vybraných vlastností zirkóniových sorbentov so silikagélom a syntetickými polymérmi je vidieť v **Tab. 1**.

**Tab. 1** - Porovnanie chromatografických vlastností  $ZrO_2$ ,  $SiO_2$  a polymérnych nosičov (++ = vynikajúci, + = dobrý, - = slabý) [43,44].

Vlastnosť	$ZrO_2$ ( $TiO_2$ )	$SiO_2$	Polymér
Mechanická stabilita	++	++	+
Plocha špecifického povrchu	++	++	++
Kontrola pórovitosti častíc	++	++	+
Kontrola rozmerov častíc	++	++	++
Chemická flexibilita	++ (+)*	++	+
Energetická homogenita	-	-	+
Bobtnanie	++	++	-
Chemická stabilita (extrémy pH)	++	-	++
Teplotná stabilita	++	-	+

\* ++ vzhľadom k vývoju stabilnej DB-C18 zirkóniovej fázy, + pre  $TiO_2$

Dôležitým faktorom rozširujúcim stále väčšie povedomie o zirkóniových stacionárnych fázach je komerčná dostupnosť niekoľkých typov náplňových kolón pre základné chromatografické módy od výrobcu ZirChrom Separations (Anoka, USA) [45]. Pod označením Discovery<sup>®</sup> existujú na trhu zirkóniové RPLC kolóny firmy Supelco (Bellefonte, USA) [46]. Zirkóniový sorbent od oboch zdrojov sa vyznačuje 3, 5, 10 a 25  $\mu m$  priemerom monodisperzných častíc, unifikovaným špecifickým povrchom 30  $m^2/g$  a veľkosťou pórov 30 nm. Pre účely UHPLC boli nedávno pripravené Zr-PBD a b- $ZrO_2$  sorbenty o priemere častíc 1,9  $\mu m$  [45]. Všetky dostupné zirkóniové HPLC stacionárne fázy sú prehľadne uvedené v **Tab. 2**. Okrem zirkóniových kolón ponúka firma ZirChrom Separations aj dve titánové stacionárne fázy Sachtopen<sup>®</sup> (Sachtleben, Nemecko) buď pre NPLC (čistý  $TiO_2$ ) alebo pre RPLC (polyetylénom modifikovaný  $TiO_2$ ) [42,47].

Vzhľadom k primárnemu zameraniu na alternatívne RPLC zirkóniové fázy sa bude ďalšia časť dizertačnej práce orientovať takmer výhradne iba na popis stacionárnych fáz odvodených od  $ZrO_2$ .

**Tab. 2** - Komerčne dostupné zirkóniové kolóny firmy ZirChrom Separations [45].

Produkt	Použitie	Typ modifikácie $ZrO_2$	pH rozsah	Max. teplota
Zr-PBD	RPLC	fyzikálny (PBD)	1 - 14	150 °C
Zr-PS	RPLC	fyzikálny (PS)	1 - 13	150 °C
Zr-CARB	RPLC	fyzikálny (uhlík)	1 - 14	150 °C
DiamondBond C18	RPLC	väzba $C_{18}$ na Zr-CARB	1 - 14	200 °C
Zr-EZ	RPLC	koordinácia na Zr-PBD	1 - 10	50 °C
Zr-MS	RPLC	koordinácia na Zr-PBD	1 - 10	50 °C
Zr-SAX	Silný anex	fyzikálny (PEI)	1 - 12	80 °C
Zr-SHAX	Silný anex	fyzikálny (PEI)	1 - 12	80 °C
Zr-WAX	Slabý anex	fyzikálny (PEI)	3 - 9	50 °C
Zr-WCX	Slabý katex	koordinácia (fosfát)	1 - 10	50 °C
Zr-PEZ	Katex	koordinácia (EDTPA)	1 - 10	50 °C
Zr-PHASE	NPLC	čistý $ZrO_2$	1 - 14	150 °C
Zr-Chiral S(LEU)	Chirálna LC	koordinácia	N/A*	N/A*
Zr-Chiral R(NESA)	Chirálna LC	koordinácia	N/A*	N/A*
Zr-Chiral S(NESA)	Chirálna LC	koordinácia	N/A*	N/A*
Zr-Chiral S(PG)	Chirálna LC	koordinácia	N/A*	N/A*
Zr-Chiral R(PG)	Chirálna LC	koordinácia	N/A*	N/A*
Zr-CelluloZe	Chirálna LC	fyzikálny (celulóza)	N/A*	N/A*

\* Nie je aplikovateľné.

### 3.2.1 Selektivita na $ZrO_2$

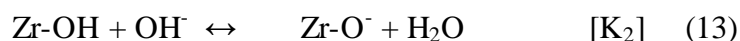
Chemické procesy odohrávajúce sa na povrchu  $ZrO_2$  sú dosť odlišné od procesov participujúcich na retencii látok na silikagéle. Vzhľadom k nízkej hodnote pH, pri ktorom je zdanlivý náboj povrchu nulový, je silikagél schopný iba výmeny katiónov, zatiaľ čo oxidy zirkónia, titánu alebo hliníku sa správajú ako amfotérne ionexy. Veľmi významný dopad na

prácu s kovovými oxidmi v HPLC má prítomnosť Lewisových kyselín  $Zr^{IV}$  na ich povrchu, ktorá vyvoláva ligandovú výmenu s Lewisovými zásadami. V tomto momente je nutné si uvedomiť, že napriek akejkoľvek snahe o úplnú eradikáciu vplyvu Lewisových kyselín nie je známy postup, ktorý zablokuje všetky aktívne miesta. RPLC zirkóniové sorbenty preto takmer vždy ponúkajú ojedinelý tzv. zmiešaný retenčný mechanizmus. Celková retencia býva výsledkom pestrých interakcií molekúl analytu s hydrofóbnou vrstvou (polymér, uhlík), ďalej iónových interakcií a interakcií Lewisova kyselina - Lewisova zásada. Ktorý z príspevkov je dominantný závisí hlavne na type analytu, type pufru (prípadne aditíva charakteru Lewisovej zásady), pH a iónovej sile a obsahu organickej zložky v eluente [44,48].

Selektivita RPLC fázy je v prípade analýzy látok bez ionizovateľných funkčných skupín ovládaná výhradne reverzno-fázovými interakciami. Napr. u Zr-PBD fázy prevláda rozdeľovací mechanizmus sprostredkovaný Van der Waalsovými silami, kým na Zr-CARB dominuje adsorpcia na planárny povrch vďaka  $\pi$ - $\pi$  interakciám [48,49]. Organické zásady môžu v závislosti na pH vykazovať zmiešaný retenčný mód so zastúpením reverzno-fázových interakcií a katiónovej výmeny [50], kým v retencii silných Lewisových zásad (organofosforečnany, karboxyláty atď.) typicky panuje ligandovo-výmennno/reverzno-fázový retenčný mechanizmus [34].

#### Iónová výmena

Podľa Brönstedovej teórie môžu mať hydroxyly na povrchu  $ZrO_2$  buď kyslé alebo zásadité vlastnosti [34,44].



V závislosti na pH mobilnej fázy je  $ZrO_2$  schopný výmeny aniónov alebo katiónov, ako dôsledku disociácie resp. protonizácie hydroxylových skupín na povrchu  $ZrO_2$ . Náboj čistého  $ZrO_2$  v kyslom prostredí je kladný kvôli ochote povrchu prijímať protóny. V zásaditom prostredí je náboj opačný, keďže hydroxylové skupiny disociujú na zirkonolové anióny. Ekvivalentné množstvo pozitívne nabitých  $Zr-OH_2^+$  a negatívne nabitých skupín  $Zr-O^-$  udáva povrchu fázy

celkový nulový náboj. Patričné pH zodpovedajúce izoelektrickému bodu sorbentu sa označuje ako  $pH_{pzc}$  a závisí na ionizačných konštantách (14) [34,44].

$$pH_{pzc} = 0,5 \cdot (pK_1 + pK_2) \quad (14)$$

Oproti silikagélu ( $pH_{pzc} = 3$ ) sa pH izoelektrického bodu oxidu zirkoničitého udáva v rozmedzí pH 6 - 8 [41,44]. Čistý  $ZrO_2$  teda funguje ako menič aniónov v kyslom pH a naopak funguje ako menič katiónov v alkalickom pH. Iónovo-výmenné vlastnosti  $ZrO_2$  sa javia byť podobné chovaniu na  $TiO_2$  ( $pH_{pzc}$  medzi pH 5 až 6), avšak pomerne rozdielne oproti oxidu hlinitému [34,51]. Do výsledkov sa výrazne premietajú zložky eluentu s vlastnosťami Lewisových zásad, pretože dynamickou modifikáciou udeľujú stacionárnej fáze záporný náboj a vlastnosti katexu. Pre zirkóniové RPLC stacionárne fázy zostávajú v platnosti všetky uvedené tvrdenia, keďže modifikovaný povrch  $ZrO_2$  stále uchováva schopnosť iónovej výmeny [50,52].

#### Ligandová výmena

Atómy prechodných kovov majú prázdne *d*-orbitály, a teda výborné elektrón-akceptorové vlastnosti, takže fungujú ako silné Lewisove kyseliny. Schopnosť ligandovej výmeny pramení z prítomnosti voľných Lewisových kyselín na atónoch  $Zr^{IV}$ . Odhadovaná koncentrácia Lewisových kyselín na povrchu čistého  $ZrO_2$  je 4 - 5 mM/mm<sup>2</sup> [53]. Kľúčovú úlohu počas ligandovej výmeny majú koordinačne viazané molekuly vody, ktoré môžu byť nahradené inou Lewisovou zásadou. Čím je konkurenčná Lewisova zásada silnejšia, tým je výmena ligandov ľahšia a rýchlejšia. Znova platí, že zavedenie polymérov alebo uhlíkovej vrstvy na polárny povrch  $ZrO_2$  nezablokuje zirkóniový povrch stopercentne a význam interakcií Lewisova kyselina-Lewisova zásada ostáva naďalej aktuálny [34,44].

Chemické rovnováhy ustalené na povrchu  $ZrO_2$  môžu byť popísané rovnicami ligandovej výmeny medzi Lewisovou zásadou rozpustenou v eluente  $L_1$  a konkurenčným analytom typu Lewisovej zásady  $L_2$  [44,54]:





Rovnice (15) a (16) charakterizujú ustálenie rovnováhy počas ekvilibračie stacionárnej fázy mobilnou fázou s obsahom zásady  $\text{L}_1$ . Ostatné rovnovážne rovnice zobrazujú ligandovú výmenu počas separácie analytu  $\text{L}_2$  s vlastnosťami Lewisovej zásady.

Ochota konkrétnej Lewisovej zásady interagovať so silnými Lewisovými kyselinami  $\text{Zr}^{\text{IV}}$  je funkciou jej elektrónovej hustoty a schopnosti polarizácie. Čím je elektrónová hustota vyššia a polarizovateľnosť nižšia, tým silnejšiu ligandovú interakciu môžeme očakávať. Najsilnejšou monovalentnou Lewisovou zásadou je hydroxylový anión [44,54,55]. Na podklade veľkého počtu derivátov kyseliny benzoovej bola vypracovaná eluotropická škála Lewisových zásad [44,55], v ktorej sila interakcie klesá v poradí:

Fosforečnan > Fluorid > Citrát > Síran > Octan > Mravenčan > Dusičnan > Chlorid.

Na rozdiel od výsledkov dosiahnutých na silnom silikagélovom anexe bola na  $\text{ZrO}_2$  pozorovaná lineárna korelácia medzi  $\log k$  a  $\text{pK}_a$  kyselín. To znamená, že retencia kyselín na  $\text{ZrO}_2$  bola vyvolaná ligandovou výmenou a nie výmenou aniónov [54].

Vzhľadom k silným ligandovým interakciám  $\text{ZrO}_2$  a následne pomalej disociačnej kinetike dochádza pri analýze Lewisových zásad k výraznému poklesu separačnej efektivity chromatografie často spojenej s reverzibilným záchytným analytu na kolóne. Riešením podobného stavu je použitie silnejšej Lewisovej zásady ako zložky eluentu, ktorá koordinačné miesta obsadí a dočasne zablokuje. Napríklad silné Lewisove zásady fluorid, fosfát, polyvalentné organické ligandy či organofosfonáty ako zložky mobilnej fázy, umožnili separáciu celého spektra kyslých, bazických a neutrálnych proteínov na čistom  $\text{ZrO}_2$ . Retencia proteínov bola výsledkom kombinácie iónových a ligandových výmien s povrchom stacionárnej fázy [34,56].

Pri práci so zirkóniovými fázami sú s výhodou uprednostňované fosfátové soli, ktoré nesú funkciu pufru a súčasne aj funkciu silnej Lewisovej zásady. Zr-PBD fáza dynamicky modifikovaná fosfátom vykazuje silný povrchový negatívny náboj, a teda zmiešaný retenčný mód aj v kyslom eluente [57], čím je umožnená efektívna separácia slabých Lewisových zásad (napr. karboxylových kyselín).

Fluoridové soli (napr.  $\text{NH}_4\text{F}$ ) poskytujú oproti iným Lewisovým zásadám zaujímavú selektivitu. Použitie fluoridu do mobilnej fázy je však limitované na  $\text{pH} > 4$ , pretože inak vzniká

kyselina fluorovodíková, ktorá rozpúšťa nosič a má korozívny vplyv na HPLC chromatograf. Úprava zloženia eluentu fluoridovými aniónmi sa často prevádza formou prímеси do pufrovanej mobilnej fázy [58,59].

Všeobecne je možné konštatovať, že výber a koncentrácia pufru, voľba jeho katiónu i iónová sila a pH eluentu sú premenné, ktorými je možné efektívne ovplyňovať selektivitu každej separácie zmesi kyslých alebo zásaditých látok [52]. Napríklad zvýšením koncentrácie pufru z 20 mM na 100 mM je možné retenciu kationických analytov znížiť aj o viac než 50 % [52]. Nezvyčajný vplyv typu pufru na selektivitu bol preukázaný na retenčnom chovaní N-metylovaných piperidínov oproti N-desmetylderivátom. Preferenčný nárast retencie N-desmetylpiperidínov v kyslom pH pri použití pufov s minimálne dvoma negatívnymi nábojmi bol pripísaný ión-párovým mostíkom medzi kladne nabitým zirkóniovým povrchom a molekulami protonizovanej zásady [60].

### 3.2.2 Stabilita ZrO<sub>2</sub>

Mimoriadna stabilita ZrO<sub>2</sub> môže byť objasnená na základe chemickej štruktúry. Oxid zirkoničitý používaný pre HPLC účely je súmerný podľa monoklinickej kryštalografickej sústavy. Energia Zr-O väzby je porovnateľná s Si-O väzbou (okolo 185 kcal/mol), avšak zatiaľ čo každý atóm kremíka sa viaže so štyrmi kyslíkmi, koordinačné číslo zirkónia je až sedem [44]. Praktické výhody vyplývajúce z vynikajúcej stability akéhokoľvek sorbentu sú [34,61]:

- Lepšia životnosť kolóny = nižšie náklady na analýzu
- Väčší využiteľný rozsah pH a teploty = flexibilita počas vývoja robustných metod
- Nižšie „krvácenie“ kolóny = efektívnejšie použitie MS alebo ELSD detekcie
- Možnosť preplachu kolóny v drsných podmienkach bez poškodenia sorbentu

Na základe mnohých stabilitných testov v kyslom, no predovšetkým alkalickom pH, je možné aj u najpokročilejších silikagélových RPLC sorbentov hovoriť o krátkodobej stabilite, avšak stabilita retencie a účinnosti na ZrO<sub>2</sub> v extrémnych hodnotách pH sa nemení dlhodobo [34,44]. Oxid zirkoničitý je absolútne stabilný v celom rozsahu pH 1-14. Stabilita čistého ZrO<sub>2</sub> ako aj Zr-PBD fázy bola demonštrovaná niekoľkohodinovou elúciou extrémne kyslou mobilnou fázou (1 M HCl) a tiež dlhodobým vystavením alkalickému prostrediu (1 M NaOH) pri teplote

100 °C. Koncentrácia zirkónia v eluente bola pod limitom detekcie atómovej spektrálnej analýzy [34,44].  $ZrO_2$  sa však rozpúšťa v niektorých silných minerálnych kyselinách (HF, koncentrovaná  $H_2SO_4$  a  $HNO_3$ ) [44].

### 3.2.3 Príprava sorbentu $ZrO_2$ pre HPLC

Aby boli vytvorené predpoklady pre praktické využitie sorbentov v modernej HPLC, je nutné vyvinúť reprodukovateľné postupy výroby monodisperzných ideálne guľovitých častíc s priemerom 2 - 5  $\mu m$  (max. 10  $\mu m$ ), aby bolo zabezpečené ich efektívne plnenie do kolón. Rozhodujúcim hľadiskom nebýva ani tak celková plocha povrchu stacionárnej fázy alebo jej poréznosť, ale skôr majoritné zastúpenie mezopórov (priemer jednotky až desiatky nanometrov) vedúce k dostatočne rýchlej difúznej kinetike. Odpor prenosu hmoty vo vnútri kolóny musí byť čo najnižší, aby sa minimalizovalo rozširovanie separovaných zón [9,34].

#### Časticový sorbent

Príprava mikročastíc  $ZrO_2$  je založená na agregácii stabilného koloidného roztoku oxidu zirkoničitého. Koloidný roztok  $ZrO_2$  je pripravený rozpustením zirkoničitej soli (napr.  $ZrCl_4$ ) vo vode pri pH, v ktorom je rozpustnosť vysoká. Precipitácia koloidného roztoku môže byť následne indukovaná náhlou zmenou pH alebo prostou hydrolyzou za vzniku pomerne monodisperzného mikrokryštalického koloidu  $ZrO_2$ , ktorý sa týmto postupom ľahko pripravuje aj pre ďalšie priemyselné spracovanie.

Príprava mezoporéznych mikročastíc agregáciou roztoku koloidu  $ZrO_2$  sa dá docieľiť niekoľkými postupmi:

- Vysušenie precipitovaného kryštalického koloidu  $ZrO_2$  (napr. sprejovým sušením), následné sintrovanie pri vysokej teplote a triedenie častíc podľa veľkosti.
- Efektívnejšou metódou prípravy sférických častíc  $ZrO_2$  s vysokým podielom mezopórov je dispergácia roztoku koloidu do olejovej fázy za vzniku emulzie. Keďže je voda z kvapôčiek koloidu extrahovaná, dochádza ku gelácii a tvorbe mezoporéznej štruktúry [62], ktorá je následne sušená a sintrovaná. Postup je možné prídavkom vhodných činidiel modifikovať za vzniku monodisperzných guľovitých častíc s veľkosťou pórov a poréznosťou šitou dokonca na mieru [34].



- Pokročilým postupom syntézy mikročastíc  $ZrO_2$  je agregácia roztoku zirkóniového koloidu indukovaná polymerizáciou. Pre vyvolanie agregácie sa s obľubou používa močovino-formaldehdyová živica syntetizovaná *in situ*, ktorá je po terminácii syntézy v rámci sintrovacieho procesu spálená. Výsledkom sú mechanicky odolné vysoko porézne častice sférického tvaru s vynikajúcou monodisperzitou [34,63].

Príprava mikroporézneho zirkóniového sorbentu s priemerom monodisperzných častíc rovným 1  $\mu m$  bola dosiahnutá metódou založenou na hydrolyze zirkóniového alkoxidu v butanole. Miera hydrolyzy alkoxidu bola zmiernená prídavkom mastnej kyseliny do primárnej zmesi. Neporézny  $ZrO_2$  sorbent obalený polybutadiénom bol získaný kontrolovaným sintrovaním. Sorbent bol naplnený do kremičitej kapilárnej kolóny a jeho UHPLC schopnosti boli porovnateľné so silikagélovým ODS materiálom rovnakej veľkosti [64].

#### Monolitický sorbent

Intenzívny rozvoj technológie prípravy monolitických kolón je zatiaľ badateľný hlavne v kapilárnej elektrochromatografii a nano-LC. Impulzom rozvoja boli elektroforetické separácie rôznych skupín látok v sklenených kapilárach s vnútornou stenou tvorenou filmom  $ZrO_2$  [65,66].

Vývojovo prvým monolitickým materiálom vyznačujúcim sa selektivitou zirkóniových stacionárnych fáz bol hybridný silikagélový monolit potiahnutý vrstvou  $ZrO_2$  vo vnútri kapilárnej kremičitej kolóny, na ktorom boli testované bazické látky, aromatické amíny a alkaloidy [67]. Výhodou monolitických kapilárnych kolón oproti náplňovým kapilárom je redukcia tvorby bubliniek a taktiež odpadá nutnosť fixovať časticovú náplň v kapiláre fritou [67]. Zo zirkóniového alkoxidu bol neskôr syntetizovaný rýdzo zirkóniový kapilárny monolit [40], okrem toho však aj monolit v podobe 2 cm tyče o priemere 2,3 mm [68]. Kapilárny zirkóniový monolit bol testovaný v nanokvapalinovej chromatografii na normálnych aj reverzných fázach [68]. Význam zirkóniových monolitických kolón je však nateraz iba experimentálny.

### **3.2.4 Modifikácie povrchu $ZrO_2$**

Dôvodom dodatočnej modifikácie zirkóniového povrchu je potreba získania stacionárnej fázy vykazujúcej vlastnosti využiteľné pre zamýšľaný účel. V prípade RPLC na  $ZrO_2$  sa jedná

o zavedenie hydrofobicity a selektivity viac alebo menej podobnej konvenčným silikagélovým fázam (ODS, fényl apod.). U zirkóniových fáz existujú tri základné modifikačné princípy:

- Permanentná kovalentná modifikácia
- Dynamická chemická modifikácia
- Fyzikálne pokrytie

#### Kovalentná modifikácia

Kovalentne viazané stacionárne fázy sú stabilnejšie než stacionárne fázy pripravené interakciou Lewisových kyselín a zásad alebo deponovaním polymérnej vrstvy na aktívny povrch.  $ZrO_2$ , na rozdiel od silikagélu, však nie je vhodný pre silanizačné reakcie vzhľadom k podstatne nižšej hydrolytickej stabilite väzby Zr-O-Si-R než je príznačné pre väzby Si-O-Si-R. Príprave stabilnej chemicky viazanej stacionárnej fázy bráni taktiež prítomnosť premostených foriem zirkóniových hydroxyskupín, ktoré vzhľadom k štruktúre a zásaditosti nie sú vhodné pre silanizačné reakcie [44,48]. Kovalentné modifikácie zirkóniovej stacionárnej fázy boli zatiaľ prevedené iba na adsorbovaných organických vrstvách.

Komerčná kolóna DB-C18 bola pripravená kovalentným ukotvením oktadecylových reťazcov na povrch Zr-CARB častíc prostredníctvom kopolácie diazóniovej soli oktadecylbenzénu s uhlíkovým filmom deponovaným na povrchu stacionárnej fázy. Podľa výrobcu je kovalentná väzba zodpovedná za vystupňovanie stability oproti ostatným zirkóniovým kolónam [45,48].

Rýchly pokrok kovalentnej chémie na hydrofobizovanom zirkóniovom povrchu ani po zavedení DB-C18 kolóny neprestáva. Analogickým postupom s pomocou vhodného diazotačného reaktantu bol priamo na uhlíkovom filme Zr-CARB stacionárnej fázy pripravený slabý aniónový menič s terciárnou aminoskupinou. Z tejto fázy bol odvodený silný anex po metylácii aminoskupiny metyljodidom [69]. Silný anex založený na kvartérnej aminoskupine bol ďalej pripravený postupom vychádzajúcim z kovalentnej modifikácie uhlíku sulfónovou zlúčeninou. Na sulfonylovú funkčnú skupinu boli elektrostatičky pripútané latexové nanočastice nesúce kladne nabitú kvartérnu aminoskupinu [70]. Reakciou kyseliny vinylfosfónovej

a polybutadiénu na povrchu Zr-PBD fázy bola laboratórne pripravená kovalentne modifikovaná Zr-PBD stacionárna fáza s vystupňovanými vlastnosťami kationového meniča [71].

#### Dynamická modifikácia

Dynamickou modifikáciou povrchu  $ZrO_2$  je dosiahnutá účinná deaktivácia silných Lewisových kyselín. Bežne sa prevádza pridaním silnej Lewisovej zásady, typicky fosfátu, fluoridu alebo chelatačného činidla (EDTPA a pod.), do eluentu. Lewisove zásady priamo interagujú s aktívnym povrchom  $ZrO_2$  za vzniku reverzibilne modifikovaného sorbentu, ktorý je stabilný až kým nie je v mobilnej fáze prítomná silnejšia Lewisova zásada ( $OH^-$  v prípade fosfátu). Dynamická forma úpravy aktívneho povrchu býva s obľubou využívaná pri analýzach chemických zlúčenín charakteru slabej Lewisovej zásady (napr. karboxylové kyseliny).

Tento vratný prístup je základom aj pre prípravu koordinačne viazaných zirkóniových stacionárnych fáz, ktorých pH stabilita nedosahuje parametrov typických pre ostatné typy zirkóniových kolón. Z komerčného pohľadu sa jedná hlavne o niektoré zirkóniové ionexy a chirálne kolóny typu Pirklových fáz. Povrch  $ZrO_2$  je u niektorých ionexov dynamicky upravený pomocou fosfátu (ZirChrom-WCX<sup>®</sup>) alebo EDTPA (ZirChrom-PEZ<sup>®</sup>, -EZ<sup>®</sup>, -MS<sup>®</sup>). V prípade zmienených chirálnych kolón je povrch častíc chelatovaný vhodnou Lewisovou zásadou, na ktorú sa chemicky viažu chirálne selektory (opticky čisté aminokyseliny) [48,72].

Laboratórne boli pripravené zirkóniové stacionárne fázy koordinačne modifikované kyselinou dodecylamín-N,N-dimetylénfosfónovou [73] a ďalšími molekulami pre použitie v reverznom aj normálnom separačnom móde [74].

#### Fyzikálne pokrytie

Vzhľadom k polárnemu charakteru čistého  $ZrO_2$  je možné za reverzných podmienok efektívne pracovať až po zavedení tenkej vrstvy hydrofóbneho plášťa na povrch nosiča. Veľký potenciál preukázala najmä kombinácia oxidov kovov so všestrannými organickými polymermi, z ktorých sa pre RPLC účely osvedčili polybutadién a polystyrén. Výhodou týchto polymérnych zlúčenín je, že po adsorpcii na povrch častice  $ZrO_2$  napodobňujú v určitej miere vlastnosti a chovanie dlhodobo zavedených silikagelových RPLC kolón. Polybutadién predstavuje analógiu bežnej ODS fázy, zatiaľ čo polystyrén je určitou analógiou silikagelových fáz s naviazanou fenylovou skupinou [48].

Proces depozície a adsorpcie polyméru je regulovaný krehkou rovnováhou medzi energetickými a entropickými faktormi. Adsorpčný proces sa vždy snaží sledovať ideálny stav, v ktorom tenká homogénna vrstva deponovaného polyméru nijak neblokuje rýchlemu prenosu hmoty v póroch a úplne pokrýva všetky nežiaduce interakčné miesta (t.j. atómy zirkónia). Počas prípravy fyzikálne modifikovaných fáz je vhodné vytitrovať optimálne množstvo polymérnej náplne. Nadbytok polyméru vo fáze síce retenčnú schopnosť zvyšuje, avšak vedie k upchávaniu pórov, čím klesá plocha aktívneho povrchu a tak aj separačná efektívnosť. Distribúcia polyméru po povrchu poréznej ZrO<sub>2</sub> častice nie je súvislá, ale jedná sa skôr o polymérne zhluky sústredujúce sa hlavne v póroch častice [48]. Účinnosť permanentného pokrytia ZrO<sub>2</sub> polybutadiénom dosahuje okolo 30 - 50 % podľa množstva použitého objemu polyméru [48,49].

Popri zirkóniových RPLC kolónach založených na vrstve polyméru našiel svoje uplatnenie aj hydrofóbny materiál Zr-CARB pripravený nanosením tenkého uhlíkového filmu na povrch ZrO<sub>2</sub>. Materiál sa priemyselne vyrába za nízkeho tlaku chemickou depozíciou pár uhlíku na povrch ZrO<sub>2</sub> pri teplote cca 700 °C. Efektívnosť pokrytia sorbentu uhlíkom je až 97 % [75].

Ďalším deponovaným polymérom na ZrO<sub>2</sub> je polyetylénimín, ktorý našiel komerčné využitie v iónovej chromatografii [76]. PEI je dobrým terčom pre dodatočnú funkcionizáciu iónomeniča. Stabilita polyméru je zvýšená zosieťovaním pomocou BUDGE a takéto kolóny fungujú ako slabé anexy (ZirChrom-WAX<sup>®</sup>). Zosieťovaním polyetylénimínu buď pomocou hydrofóbneho 1,10-dijódodekánu alebo hydrofilného 1,2-bis(2-jódoetoxy)etánu a následnou reakciou s metyljodidom je dosiahnutá permanentná kvarternizácia iónomeniča, čím sa z neho stáva silný anex [77]. Dva komerčné zirkóniové iónomeniče (ZirChrom-SAX<sup>®</sup>, ZirChrom-SHAX<sup>®</sup>) založené na tomto chovaní sú stabilné pri pH 1-12 [48]. Zosieťovaná vrstva PEI na zirkóniovej matrici bola experimentálne upravená ukotvením záporne nabitých karboxylových funkčných skupín za vzniku stabilných katexov použiteľných v analýze makromolekulárnych látok [78].

Posledným komerčne významným materiálom pripraveným fyzikálnou adsorpciou polyméru na povrch ZrO<sub>2</sub> je *tris*(3,5-dimetylfenylkarbamoyl)celulóza [79]. Je to zatiaľ jediná chirálna polysacharidová zirkóniová fáza na trhu [72].

### 3.2.5 Charakteristika vybraných ZrO<sub>2</sub> kolón pre RPLC

#### Zr-PBD

Potiahnutie ZrO<sub>2</sub> polymérom polybutadiénu dalo základ prvej úspešnej zirkóniovej reverznej stacionárnej fáze [53]. RPLC vlastnosti Zr-PBD fázy boli systematicky študované a porovnávané s chovaním konvenčných RPLC silikagélových fáz [49,50,61,80,81]. Zr-PBD disponuje vysokou chemickou (pH 1-14) a teplotnou stabilitou (minimálne do 150 °C) aj pri dlhodobej záťaži. Zr-PBD sa v analýze hydrofóbných nepolárnych látok typu alifatických a aromatických uhlíkov chová ako ozajstný reverzno-fázový sorbent, tak ako je známe na ODS. V zostávajúcich situáciách, keď je analytik konfrontovaný so separáciou ionizovateľných látok kyslej alebo zásaditej povahy, je selektivita výrazne odlišná. Retencia tu býva výsledkom zmiešaného retenčného mechanizmu s variabilným zastúpením jednotlivých interakčných zložiek v závislosti na HPLC podmienkach (typ pufru, koncentrácia, pH atď.) a type analytu. Napríklad pri pH > pKa dominujú u kyselín odpudivé Coulombické (elektrostatické) sily a ligandové interakcie, zatiaľ čo významnou retenčnou silou pri analýze zásaditých látok býva výmena kationov. Bolo potvrdené, že na retencii organických zásad majú samotné reverzno-fázové interakcie podiel menší než 20 %, avšak ich podiel v prípade silikagélovej ODS fázy je viac než 90 %. Toto diametrálne odlišné separačné chovanie ZrO<sub>2</sub> pre organické zásady v porovnaní s ODS vypovedá o úplne odlišnej selektivite a retentivite organických zásad. Chromatografia bazických látok sa pokladá za veľmi cennú devízu zirkóniových kolón [81].

#### Zr-PS

Oxid zirkoničitý modifikovaný polystyrénom je chemicky a teplotne vysoko stabilný materiál vyznačujúci sa na rozdiel od Zr-PBD zmenenou selektivitou voči aromatickým látkam [48,82]. Pripravuje sa kopolymerizáciou a zosieťovaním vhodných aromatických monomérov s následnou fyzikálnou adsorpciou na povrch ZrO<sub>2</sub>. Selektivita Zr-PS je výrazne odlišná oproti iným reverzným stacionárnym fázam (Zr-PBD, ODS, fenylosilikagél). Zr-PS fáza je síce menej hydrofóbná než Zr-PBD, avšak retencia polyaromatických uhlíkov ako aj polárnych látok je na Zr-PS obvykle vyššia. Podobne aj pri chromatografii nepolárnych izomérov líšiacich sa polohou fenylovej skupiny ukazuje Zr-PS vyššiu rozlišovaciu schopnosť, ktorá je podobná sorbentu na báze polystyrén-divinylbenzénovej živice [48].

Zmiešaný retenčný mechanizmus na Zr-PS je oproti Zr-PBD fáze bohatší o priamu interakciu  $\pi$ -elektrónov fenylového kruhu s polárnymi alebo polarizovateľnými funkčnými skupinami na planárnych analytoch [48,83,84]. Pozitívom Zr-PS je separačná efektivita v čase. Na niekoľkých príkladoch bolo dosiahnuté porovnateľné ba aj lepšie rozlíšenie v kratšom čase než na ODS. Tieto vlastnosti robia zo Zr-PS veľmi zaujímavý materiál pre náročné separácie, ktoré neboli úspešné na Zr-PBD alebo ODS [83].

### Zr-CARB

Chemicky a teplotne extrémne stabilné uhlíkové stacionárne fázy ukazujú v porovnaní s bežnými ODS niekoľko významných odlišností: vyššiu hydrofobicitu, vyššiu selektivitu voči polárnym a nepolárnym geometrickým izomérom a účasť elektrónových  $\pi$ - $\pi$  interakcií na celkovej retencii [61,83].  $ZrO_2$  je ideálnym nosičom pre efektívne pokrytie pyrogénnym uhlíkom, keďže vysoká teplota nevyvoláva žiadne významné zmeny v štruktúre pórov. Zr-CARB sa pripravuje procesom chemickej depozície uhlíku z organických pár pri teplote okolo 700 °C a tlaku okolo 1 kPa za  $Zr^{IV}$  autokatalýzy. Zdrojom elementárneho uhlíku bývajú alkány, pričom efektivita takéhoto reprodukovateľného pokrytia  $ZrO_2$  dosahuje až 97 % [48,75].

Jedinečná selektivita Zr-CARB stacionárnej fázy je zapríčinená vlastnosťami planárnej vrstvy grafitického uhlíku v kombinácii s nosičom  $ZrO_2$  vykazujúcim interakcie Lewisova kyselina-Lewisova zásada. Retencia látok je v hlavnej miere výsledkom adsorpcie na uhlíkový povrch v dôsledku  $\pi$ -elektrónových interakcií. Adsorpčný proces je teda veľmi citlivý na priestorový tvar analytu. Zr-CARB kolóny sa vynikajúco hodia počas separácií geometrických izomérov a diastereoizomérov, u ktorých bežné stacionárne fázy poskytujú nízku selektivitu [83,85]. Účinnosť kolóny býva zvyčajne nižšia než u Zr-PBD, či ODS, avšak vyššia oproti polymérnym nosičom [61,75,86].

Vlastnosti Zr-CARB fázy sa s výhodou dajú zúročiť v tandemovom usporiadaní alebo multidimenzionálnych separáciách s inou kolónou, ktorej selektivita je odlišná a viac predvídateľná (napr. ODS). Rozlišovacia schopnosť hlavne multidimenzionálnych separácií zvyčajne ľahko prekonáva možnosti jednoduchých separácií [87,88].

### DB-C18

Tento momentálne na trhu najodolnejší typ zirkóniovej RPLC fázy je prvým zástupcom novej skupiny kovalentne modifikovaných zirkóniových kolón. Pórovité častice  $ZrO_2$  sú pokryté

tenkou vrstvou grafitického uhlíku (viď Zr-CARB), na ktorý sú väzbou uhlík-uhlík pripojené hydrofóbne oktadecylové reťazce. Dizajn stacionárnej fázy je teda analogický silikagélovým ODS kolónam. Fáza je však dlhodobu stabilná v celom rozsahu pH, je možné použiť všetky bežné organické modifikátory a pufrý. V neutrálnom pH vykazuje teplotnú stabilitu minimálne do 200 °C. Výrobca dôrazne doporučuje voliť čo najvyššiu akceptovateľnú teplotu a vyšší prietok. V porovnaní s ostatnými zirkóniovými RPLC kolónami má vysoký relatívny obsah uhlíku, aj keď hydrofobicita je údajne stále nižšia než u podobných silikagélových fáz [48,89].

### Zr-MS

Posledný prírastok do skupiny zirkóniových RPLC kolón sa od predchodcov odlišuje v permanentnej deaktivácii Lewisových kyselín zirkónia vďaka chemisorpcii chelatačného činidla EDTPA. Tento chemizmus kolóny je v súlade so zameraním jej využitia na oblasť HPLC-MS, avšak na úkor obmedzenej stability sorbentu (pH 1-10, teplotný limit 50 °C). Podobne ako na Zr-PBD sú reverzné vlastnosti fázy získané pokrytím EDTPA upraveného nosiča zosieťovaným polybutadiénom. Oproti Zr-PBD je obsah polyméru aj vďaka účinnejšiemu zosieťovaniu kompaktnější. Vyšší obsah celkového uhlíku fázy má za následok vyššiu hydrofobicitu porovnateľnú s bežnými ODS kolónami. Retencia danej látky na Zr-MS je teda vyššia v porovnaní so Zr-PBD kolónou a tak pre zachovanie rovnakej miery retencie je nutné použiť eluent s vyššou koncentráciou organického modifikátoru. Vyšší obsah polyméru pozitívne ovplyvňuje citlivosť HPLC-MS analýzy.

Zr-MS fáza naďalej poskytuje zmiešaný retenčný mechanizmus (katiónová výmena a hydrofóbne interakcie) vynikajúco využiteľný pri analýze zásaditých aminozlúčenín. Navyše sa predpokladá možnosť efektívnej analýzy Lewisových zásad (napr. karboxylátov) v LC-MS kompatibilných pufrách bez potreby siahť po bazickej fosfátovej soli [90,91].

## **3.2.6 Vysokoteplotná HPLC**

HPLC býva zvyčajne realizovaná za bežnej teploty prostredia zhruba v teplotnom intervale 20 - 50 °C. Vzostup teploty na kolóne sa primárne prejaví na dvoch rovinách: zvýšením difúzivitu analytu medzi mobilnou a stacionárnou fázou a poklesom viskozity mobilnej fáze [92]. Znížená viskozita eluentu dovoľuje zvýšiť prietok cez kolónu pri zachovaní rovnakého pracovného tlaku. Zároveň vystupňovaná difúzivita analytu zachováva účinnosť separácie aj v priebehu zvyšovania prietoku, čo sa v súčte odzrkadlí na poklese potrebného času analýzy.

Skrátenie dĺžky analýzy znamená vyšší počet analýz za daný časový úsek a ďalšie pridružené ekonomické výhody [3,93].

Teplota predstavuje veľmi jednoduchý nástroj k manipulácii so selektivitou separácie. Vplyv teploty na retenčný faktor  $k$  v RPLC popisuje van't Hoffova rovnica (20), v ktorej  $\Delta H$  a  $\Delta S$  sú entalpia a entropia prechodu analytu z mobilnej do stacionárnej fázy,  $R$  je plynová konštanta,  $T$  je termodynamická teplota a  $\beta$  je fázový pomer [94].

$$\ln k = \frac{-\Delta H}{R \cdot T} + \frac{\Delta S}{R} - \ln \beta \quad (20)$$

Obvyklá závislosť  $\ln k$  danej látky na reciprokej hodnote termodynamickej teploty  $1/T$  je lineárna. Kladná hodnota smernice regresnej priamky zodpovedá zápornej hodnote zmeny entalpie  $\Delta H$  a naopak. Zmena entalpie  $\Delta H$  udáva mieru vplyvu teploty na retenčný proces konkrétnej látky. Zmena selektivity v dôsledku teploty je možná u látok s odlišnou hodnotou  $\Delta H$  [95].

Rozvoj vysokoteplotnej chromatografie donedávna stagnoval kvôli nedostatočnej stabilite stacionárnych fáz na báze silikagélu za vysokých teplôt. Do zavedenia zirkóniových sorbentov prichádzalo do úvahy nasadenie polymérnych alebo uhlíkových stacionárnych fáz. Vysoká teplotná a chemická odolnosť zirkóniových materiálov však v dnešnej dobe vedie k pomerne búrlivému rozmachu konceptu HTLC. Popri teplotnej nestabilite analytov je hlavnou potenciálnou nevýhodou prítomnosť radiálnych teplotných gradientov, ktoré sa však dajú minimalizovať utilizáciou užších kolón a predhriatím eluentu pred pasážou cez kolónu [94,95].

Vplyv vysokej teploty na selektivitu RPLC zirkóniových sorbentov bol podrobne študovaný na stacionárnej fáze Zr-PBD a Zr-CARB. Bolo potvrdené, že teplota má vcelku malý vplyv na zmenu v selektivitě, keď sú separované analyty podobnej štruktúry a s rovnakými funkčnými skupinami. Selektivita sa však dramatickejšie menila pri analýze heterogénnych zmesí látok s rôznymi funkčnými skupinami. Vysoká teplota poskytla rýchlejšie analýzy, vyšší počet teoretických priehradiek a lepší tvar píkov [83,93,96,97].

Nedávno sa objavila štúdia vyšetrujúca vplyv vysokej teploty na retenčné chovanie čistého  $ZrO_2$  na normálnych fázach. Testovacími analytmi bola veľká skupina aromatických uhlíkov pri teplotách do 200 °C. Retenčné procesy na normálnych fázach korešpondovali



s teplotným chovaním známym na reverzných fázach. Dosiahnuté hodnoty  $\Delta H$  sa pohybovali v rovnakých intervaloch ako bolo pozorované pre podobné látky v RPLC [98].

#### Subkritická vodná chromatografia

Poznanie vlastností subkritickej vody bolo východiskom pre rozvoj subkritickej vodnej chromatografie [99]. Zásadnou skutočnosťou je pokles polarítivity vody pri veľmi vysokých teplotách. Hodnota relatívnej permitivity vody je pri 20 °C rovná 80,5, ale pri 200 °C už len 34,5 [100]. Z chromatografického hľadiska je zaujímavé, že pri 200 - 250 °C má subkritická voda podobnú polaritu ako metanol (relatívna permitivita metanolu pri 25 °C je 32,5 [100]). Čistá deionizovaná voda môže byť za subkritických podmienok použitá v reverznom usporiadaní ako pomerne silné elučné činidlo [101]. Konsekventne sa rozvíja možnosť detekcie látok rozpustných v subkritickej vode v UV oblasti < 210 nm [99]. V kapilárnom merítku bola SWLC experimentálne aplikovaná až pri teplote 370 °C tesne pod kritickým bodom varu vody [102].

Netrvalo dlhú dobu a kolektív okolo P.W. Carra zhmotnil výhody aplikácie vysokej teploty v predstavení vlastnoručne skonštruovaného HPLC systému umožňujúceho sa pohotovo adaptovať na tzv. vysokoteplotnú ultrarýchlu kvapalinovú chromatografiu. V práci bola použitá Zr-PS kolóna, ktorá pri 150 °C a prietoku až 15 ml/min urýchlila analýzu piatich alkylofenónov z dvadsiatich minút na dvadsaťštyri sekúnd [103].

#### Tandemová teplotou ladená HPLC

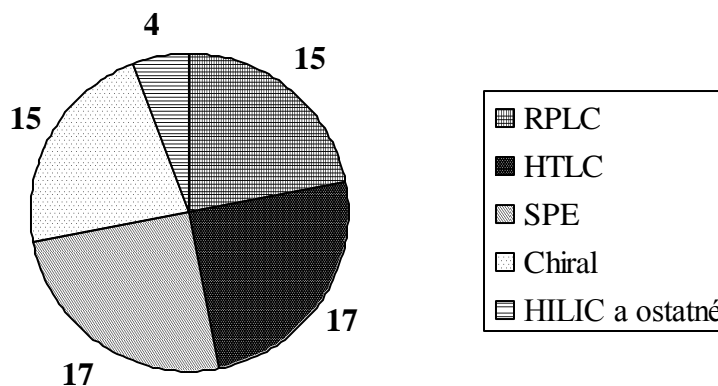
Dostupnosť zirkóniových kolón o odlišnej selektivitě (napr. Zr-PBD a Zr-CARB) bola impulzom pre rozvoj tandemového teplotou ladeného konceptu kvapalinovej chromatografie na reverzných fázach [104]. Princípom a hlavnou podmienkou tohto separačného typu je použitie dvoch sériovo usporiadaných kolón s odlišnou selektivitou v nezávisle termostatovaných kolónových priestoroch. Selektivita separácie je plynulo ladená nastavením vhodnej teploty na oboch kolónach zároveň. S výhodou je možné kombinovať akúkoľvek reverznú zirkóniovú fázu (aj za vysokých teplôt) so silikagélou (napr. ODS), keďže ich retenčný mechanizmus je výrazne odlišný predovšetkým pre ionizovateľné látky. Úspešné použitie tandemovej separácie ladenej teplotou sa očakáva v prípadoch, keď nie sú kritické páry pík na oboch kolónach rovnaké [104].

### 3.3 APLIKÁCIE ZIRKÓNIOVÝCH STACIONÁRNYCH FÁZ

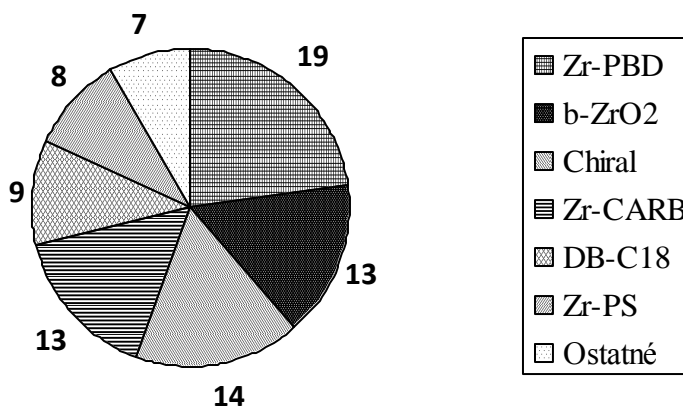
V odborných databázach nájdeme desiatky vedeckých prác (**Obr. 1**) využívajúcich výhodné vlastnosti pôvodného alebo modifikovaného zirkóniového sorbentu. Na základe nich je možné hlavné oblasti využitia hľadať vo farmaceutickej a biomedicínskej analýze, najčastejšie v RPLC móde, avšak v prípade veľmi polárnych látok sa ukazuje byť aplikovateľný aj HILIC separačný mód. Dôsledkom teplotnej stability zirkóniových materiálov je značný počet HTLC aplikácií, ktorý predstavuje prísľub rozvoja rutinných HTLC separácií v praxi. Silnou stránkou čistých zirkóniových sorbentov je využitie pri SPE extrakcii látok typu Lewisových zásad (napr. v rámci úpravy vzoriek pred LC-MS analýzou). Je predpoklad rozvoja enantioseparácií aj vďaka postupnému komerčnému zavádzaniu nových zirkóniových kolón pre oblasť chirálnej analýzy.

V tejto kapitole je uvedený prehľad aplikácií stacionárnych fáz odvodených od  $ZrO_2$  od roku 2000 až po súčasnosť (**Obr. 2**). V ideálnej situácii je použiteľnosť zirkóniových fáz priamo konfrontovaná s konkurenčnými materiálmi, hlavne silikagélom. Avšak bez ohľadu na skutočný účel konkrétnej experimentálnej práce je akákoľvek aplikačná zmienka dôkazom toho, že tieto alternatívne materiály nachádzajú svoje uplatnenie nielen pre vedecké účely, ale hlavne v reálnom analytickom prostredí.

**Obr. 1** - Zameranie aplikácii zirkóniových stacionárnych fáz. Čísla u výsečí zodpovedajú počtu dostupných publikácií.



**Obr. 2** - Použitie jednotlivých druhov zirkóniových sorbentov. Čísla u výsečí zodpovedajú počtu aplikačných zmienok v publikáciách.



### 3.3.1 RPLC

- Prvá analytická metóda schopná detegovať a kvantifikovať najúčinnšie opioidné analgetikum karfentanyl spolu s antagonistom naltrexonom v klinicky významných plazmatických koncentráciách bola založená na HPLC separácii na Zr-PBD kolóne. Optimálne rozdelenie oboch látok a vnútorného štandardu butorfanolu bolo nájdené v mobilnej fáze ACN - 10 mM octan amónny (30:70, v/v) s prídavkom 0,1 mM citrátu (výsledné pH 4,4), ktorý znížil nežiaduci tailing pík. Spojenie HPLC-ESI-MS viedlo k extrémnej citlivosti stanovenia s limitom kvantifikácie 8,5 pg/ml karfentanylu [105]. Autorská skupina použila podobný chromatografický systém v ďalšej práci zaoberajúcej sa HPLC-MS stanovením opioidného analgetika fentanylu v plazme niekoľkých druhov vyšších primátov. Metóda bola súčasne validovaná aj pre hodnotenie obsahu norfentanylu, ktorý je hlavným metabolitom fentanylu v ľudskej plazme. Senzitivita metódy opäť dosiahla hodnôt, ktoré dovtedy neboli nikdy dosiahnuté [106].
- Dve Zr-PBD kolónky tvorili separačné jadro validovanej bioanalytickej HPLC-UV metódy pre stanovenie obsahu cytostatika imatinibu mesylátu a jeho hlavného desmetylmetabolitu v rôznych biologických tekutinách. Celý automatizovaný systém pozostával

z nezávislej extrakčnej a analytickej časti. Hodnotené látky boli najprv zakoncentrované na povrchu prvej Zr-PBD fázy slúžiacej ako predkolóna. Prepnutím ventilu boli zachytené látky eluované do identickej analytickej kolóny. Dĺžka jednej analýzy trvala 40 minút vrátane prekoncentračného stupňa a postanalytickej ekvibrácie systému. Metóda sa osvedčila k rutinnému hodnoteniu plazmatických hladín imatinibu mesylátu počas klinickej štúdie. Ako lacná, ale dostatočne citlivá alternatíva finančne náročnejšej tandemovej MS detekcie, bola táto metóda aplikovaná navyše aj pri štúdiu transportných mechanizmov v bunkových membránach [107].

Uvedený dizajn inštrumentálnej separačnej techniky prevzala rovnaká autorská skupina aj k vývoju HPLC-UV metódy pre hodnotenie obsahu nilotinibu v biologickom materiáli. Po úprave biologickej vzorky bolo liečivo zakoncentrované na Zr-PBD kolóne, avšak následná HPLC analýza prebehla na silikagélovej reverznej fáze. Aj táto metóda bola úspešne zvalidovaná a použitá *in vitro* a *in vivo* [108].

- Hlavným prínosom série aplikačných článkov publikovaných Kučerom *et al.* je demonštrácia sľubného potenciálu zirkóniových kolón vo farmaceutickej analýze. V prvej práci zaoberajúcej sa analýzou substancie ibuprofenu a piatich príbuzných látok bola vyvíjaná nová separačná metóda na Zr-PS kolóne. Podmienky analýzy boli optimalizované s úmyslom dostatočne oddeliť pík ibuprofenu a nečistoty B. Finálna mobilná fáza MeOH - fosfát (50 mM, pH 4,5) - THF (21:74:5, v/v/v) bola schopná účinne analyzovať všetky hodnotené látky. Nová metóda produkuje iba päťtinové množstvo organického odpadu v porovnaní so separáciou na ODS kolóne [109].

V ďalšej práci autori nadviazali na tieto výsledky a pokúsili sa separovať heterogénnu zmes ibuprofenu, parabénov a jednotlivých rozkladných produktov. Časovo prijateľná separácia látok na ODS kolóne nebola možná i kvôli koelúcii dvojice látok. Separácia na Zr-PS bola lepšia, avšak kyselina benzoová ako hlavný degradant parabénov eluovala spolu so systémovým píkom bez ohľadu na zloženie eluentu. Dostatočná retencia problematického analytu bola zaznamenaná až na hydrofóbnejšej kolóne DB-C18. Kompromis dostatočnej retencie kyseliny benzoovej a prípustného času analýzy bol pozorovaný v mobilnej fáze MeOH - fosfát (50 mM, pH 4,8) - izopropanol (27:56:17, v/v/v), v ktorej boli všetky látky rozdelené na základnú líniu. Vyvinutá DB-C18 metóda

bola aplikovaná ku HPLC kontrole kvality farmaceutického prípravku s obsahom účinnej látky a konzervantov [110].

Ďalšia práca sa venovala vývoju rýchlej HPLC analýzy perorálneho antiemetika ondansetronu a jeho piatich liekopisných nečistôt. Kritickým bodom separácie bola nedostatočná selektivita a retencia pre nečistoty E (imidazol) a F (2-metylimidazol). Ani dve silikagélové kolóny, Zr-PS a ani DB-C18 fáza neposkytli požadovanú selektivitu. Titánová kolóna Sachtopore<sup>®</sup>-RP viedla k nádejnému výsledku, pričom na rozdiel od ostatných kolón došlo k prehodeniu elučného poradia oboch problematických analytov. Najideálnejší záznam z hľadiska selektivity a času analýzy bol však dosiahnutý na kolóne Zr-PBD. Po optimalizácii chromatografických podmienok bol najlepší výsledok nájdený v mobilnej fáze ACN - fosfátový pufr (25 mM, pH 7) (18:82, v/v) pri teplote 50 °C a prietoku 2,7 ml/min. Celková doba analýzy bola 7,5 min [111].

Detailné porovnanie termodynamiky retenčných dejov na Zr-PBD a Sachtopore<sup>®</sup>-RP kolónach bolo publikované v samostatnom článku. Retencia nečistôt E a F bola kontrolovaná entropicky, zatiaľ čo u ostatných analytov bol retenčný proces regulovaný entalpiou [112].

Poslednou liečivou látkou slúžiacou ako príklad výhodného použitia zirkóniových stacionárnych fáz bol doxazosin mesylát. Zr-PS kolóna sa ukázala byť vhodnejšou stacionárnou fázou vďaka približne polovičnej retencii hlavného píku a piatich liekopisných nečistôt oproti Zr-PBD. Optimálna separácia ( $R_s > 2$ ) na Zr-PS vychádzala z mobilnej fázy ACN - fosfát (20 mM, pH 9) (20:80, v/v) s gradientovým elučným profilom. Metóda bola dostatočne robustnou pre použitie v kontrolno-analytickej praxi [113].

- Hlavnou náplňou komparatívnej štúdie pod vedením prof. Jandery bolo porovnanie výkonu troch zirkóniových kolón (Zr-PS, Zr-CARB a DB-C18) na modelovej analýze jedenástich prírodných fenolických antioxidantov. Z porovnania retencie vyplynulo, že antioxidanty sú zadržiavané na oboch uhlíkom potiahnutých kolónach pomerne silno aj v okyslenom metanole. Dobrá separácia na DB-C18 kolóne bola pripísaná rozdeľovaniu na C<sub>18</sub> reťazoch. Najlepšie výsledky z hľadiska rozlišovacej schopnosti i trvania analýzy poskytla Zr-PS kolóna. Iónové interakcie stacionárnych fáz boli ďalej otestované

inovatívnym postupom založenom na elúcii polohových izomérov naftaléndisulfónových kyselín v čistej vode. Všetky sulfónové kyseliny eluovali iba na Zr-PS. Sila retencie sa zvyšovala so silou dipólového momentu, čím bol preukázaný význam iónových interakcií typu ión-dipól počas retenčného procesu [114].

Analogický prístup porovnávajúci retenčné deje na rovnakých typoch zirkóniových kolón tvoril základ štúdie, v ktorej bol separovaný syntetický blokový kopolymér oxyetylénu a oxypropylénu za teploty až 90 °C [115].

- V práci zaoberajúcej sa analýzou enkefálinov Soukupová *et al.* porovnávala separačnú schopnosť Zr-PBD, Zr-PS a ODS stacionárnej fázy. Separácia enkefálinov na všetkých kolónach bola vyvíjaná individuálne s nájdením najvhodnejších podmienok zloženia mobilnej fázy a teploty. Rozdielny dopad na dva odlišné druhy použitých nosičov mala v prvom rade úprava koncentrácie pufru. Výsledky potvrdili odlišnú selektivitu oboch zirkóniových fáz oproti ODS. Separáciu s najlepším rozlíšením látok dosiahla ODS kolóna, pravdepodobne vďaka účinnejšiemu prenosu hmoty počas separačného procesu. Z oboch zirkóniových fáz, ktoré boli jednotne menej hydrofóbne než ODS, sa lepšiu separáciu podarilo nájsť na Zr-PBD kolóne [116].
- Zr-CARB stacionárna fáza bola úspešne použitá pri HPLC-MS analýze niekoľkých izomérov ekvinných konjugátov estrogénu používaných v hormonálnej substitučnej terapii. Problematickým bodom analýzy na bežných reverzných fázach bola koelúcia ekvilín-3-sulfátu a  $\Delta^{8,9}$ -dehydroestron-3-sulfátu ako štruktúrnych izomérov líšiacich sa v polohe dvojitej väzby na B-kruhu estránu. Použitie silikagélu v normálnom separačnom móde nebolo možné vzhľadom k nerozpustnosti týchto látok v hydrofóbných rozpúšťadlách. Vhodná RPLC separácia bola nájdená na stacionárnych fázach založených na grafitickom uhlíku. Vyššia retencia ekvilín-3-sulfátu bola daná do súvislosti s planaritou molekuly a väčšej adsorpčnej afinite k povrchu uhlíku prostredníctvom  $\pi$  -  $\pi$  interakcií [117].

- Neúspešné použitie

Kolóny Zr-PBD, Zr-CARB a DB-C18 boli testované pri hľadaní vhodnej stacionárnej fázy pre separáciu arginínu, ibuprofenu a niektorých jeho liekopisných nečistôt. Ukázalo sa, že za východných podmienok nebola žiadna z týchto kolón schopná akejkoľvek retencie veľmi polárneho arginínu. Dobrá retencia arginínu bola získaná iba na aminosilikagélovej fáze, ktorá však postrádala retenciu ostatných analytov. Finálna separácia bola nájdená až pri tandemovom zapojení aminosilikagélovej a najvhodnejšej ODS kolóny [118].

Kolóna Zr-CARB bola testovaná pri vývoji stability indikujúcej metódy pre hodnotenie estradiolu a skupiny jeho degradantov. Na chromatograme však nebola detegovaná dvojica analytov, preto autori siahli po vhodnejšej silikagélovej kolóne [119].

### 3.3.2 Vysokoteplotná HPLC

- Na Zr-CARB kolóne bola demonštrovaná separácia skupiny voľných sterolov podobnej chemickej štruktúry pri bežnej teplote a pri 110 °C. Výsledky boli porovnané s polymérnou a uhlíkovou stacionárnou fázou. Silnú retenciu steroidných látok na rigidnom povrchu uhlíku vyriešil chloroform ako extrémne silný eluent. Zmes chloroformu s metanolom 1:1 (v/v) pri teplote 110 °C a prietoku 3 ml/min eluovala látky v krátkom čase, i keď separácia bola zaťažená koelúciou cholesterolu a beta-sitosterolu. Autori sa domnievajú, že tento nedostatok by bolo možné zlepšiť vyšším obsahom metanolu na úkor dĺžky celej analýzy. Rýchla HPLC metóda na Zr-CARB fáze bola použitá pri analýze obsahu sterolov v ovocných džúsoch [120].
- Ďalej bola publikovaná HPLC metóda pre súčasné hodnotenie 12 potenciálnych liečiv v plazme potkana využívajúca reverznú Zr-PBD fázou v spojení s APPI ionizáciou a tandemovou MS detekciou. Správnosť dosiahnutých výsledkov bola zrovnateľná s výsledkami pozorovanými po nahradení zirkóniovej kolóny klasickou ODS kolónou. Experimentálne bola demonštrovaná chromatografická zóna, v ktorej kvôli matricovým efektom bola potlačená ionizácia analytov s následným poklesom intenzity signálu. Odrazom teplotnej stability zirkóniovej kolóny bola reprodukovateľná HPLC analýza pri teplote 110 °C [121].

- Kolóna DB-C18 bola predmetom štúdie zaoberajúcej sa aplikáciou vysokoteplotnej chromatografie vo farmaceutickej analýze. Výhody použitia vysokej separačnej teploty boli demonštrované na príklade separácie perorálneho kontraktiva levonorgestrelu a jeho príbuzných látok. Z hľadiska separačnej účinnosti boli optimalizované niektoré parametre ako teplota, prietok a obsah metanolu v eluente. Optimálna metóda bola nájdená v 50 % vodnom metanole pri 150 °C a prietoku 1,5 ml/min. Izokratická separácia všetkých látok bola možná za šesť minút, čím sa viac než 20-krát skrátil čas celej analýzy [122].
- Dvojica experimentálnych prác sa zaoberala separáciou oligomérov polystyrénu na zirkóniovej a silikagélovej kolóne. V prvej práci boli objasnené rozdiely v selektivite kolón v eluente obsahujúcom metanol alebo acetonitril. ODS kolóna v metanolickej eluente delila oligoméry podľa molekulovej hmotnosti. Pri separácii na Zr-CARB v acetonitrile došlo k elúcii veľkého počtu diastereoizomérov, ktoré boli nastrieknuté už ako jednotlivé polystyrénové frakcie získané v systéme ODS-metanol. Rozlíšenie izomérov dosiahnuté na Zr-CARB bolo omnoho lepšie než na ODS, pričom uhlíková fáza dokázala odlíšiť oligoméry na základe koncového reťazca. Vyššiu retenciu ukázala skupina n-butyl oligomérov. Sec-butyl oligoméry však oproti nim tvorili až dvojnásobný počet separovaných izomérov, čo bolo pripísané priestorovému usporiadaniu sec-butyl skupiny. Koncová sec-butyl skupina obsahovala chirálny uhlík, ktorý mal významný vplyv na retenčný proces na uhlíkovom povrchu [123,124].
- V rámci aplikácie, pri ktorej boli testované tri zirkóniové kolóny (Zr-PBD, Zr-PS, DB-C18) bolo poukázané na možnosť straty stacionárnej fázy za vysokých teplôt. Pri použití teplotného gradientu bol pozorovaný výrazný vzostup základnej línie, najvýraznejšie u DB-C18 kolóny. Samotná práca sa venovala separácii ftalátových zmäkčovadiel a antioxidantov. Výsledky izotermických separácií ftalátov vo vodnom acetonitrile potvrdili reverzno-fázový pôvod retencie a pozitívny vplyv teploty na separačnú účinnosť a potrebný čas analýzy. Teplotný gradient umožnil na Zr-PS a DB-C18 fáze elúciu



všetkých ftalátov. Gradient acetonitrilu pri použití vysokej teploty analýzu ďalej skrátil. Podobné závery vyplynuli aj z analýzy antioxidantov. Autori uviedli, že 1 % prírastok ACN v eluente zodpovedá zvýšeniu teploty o 7 °C [125].

- Kolóna DB-C18 poslúžila ako nástroj štúdia kinetiky teplotnej degradácie potenciálneho liečiva pri teplotách 40 - 200 °C ako aj pre objasnenie retenčného mechanizmu s využitím van't Hoffovej analýzy. Značný rozklad analytu bol preukázaný v širšom okolí 140 °C za vzniku degradačných produktov, ktoré bolo snahou pomocou hmotnostnej spektrometrie identifikovať. Z termodynamického hľadiska bola pri teplote 20 °C aproximovaná zmena entalpicky kontrolovaného retenčného chovania na retenciu riadenú entropicky [126].
- Neúspešné použitie  
Ukážkou neočakávanej degradácie testovaného analytu vplyvom vysokej teploty priamo v kolóne je práca zaoberajúca sa hodnotením obsahu talidomidu v tabletách. Kým na polymérnej kolóne bola pozorovaná efektívna analýza liečiva pri 180 °C, na Zr-CARB kolóne dochádzalo vplyvom zvyšujúcej sa teploty k zhoršovaniu tvaru píku a úbytku odozvy. Pri 180 °C bol talidomid pravdepodobne kvôli katalytickému pôsobeniu zirkónia kompletne rozložený [127].

#### Subkritická vodná HPLC

- Jednou z prvých prác ukazujúcich výhody subkritickej vodnej chromatografie je štúdia popisujúca modelovú SWLC separáciu liečivých látok (paracetamol, fenacetín, antipyrín, kofeín). Súčasťou experimentu boli kolóny Zr-PBD a Zr-CARB. Zr-PBD sa ukázala byť pre paracetamol málo retentívna za vysokej aj nízkej teploty a nebolo ju možné použiť v ukážkovej analýze vzorky moču. Chovanie kolóny Zr-CARB bolo diametrálne odlišné. Nadmerná retencia látok nútila mobilnú fázu zahriať až na teploty okolo 200 °C. Ani na Zr-CARB však nebola pozorovaná elúcia všetkých liečiv [128].
- Vzápätí bolo bližšie popísané chromatografické chovanie Zr-PBD kolóny na separácii testosterónu a príbuzných steroidných látok vo vodnej mobilnej fáze pri 160 °C. Autori

názorne ilustrovali potrebu efektívneho ohrevu mobilnej fázy pred kolónou, lebo inak v závislosti na prietoku dochádzalo k rapidnému poklesu účinnosti. Vzhľadom k rozpustnosti analytov iba v diluente obsahujúcom 25 % acetonitrilu, bolo nutné nájsť taký injikovaný objem vzorky, pri ktorom nehrozí ďalšie zhoršenie efektivity ba až štiepenie píku. Experimentálne bol nájdený optimálny prietok s najvyššou separačnou účinnosťou a primárny význam reverzno-fázového retenčného mechanizmu. Retenčné chovanie Zr-PBD pri 160 °C bolo čiastočne rozdielné než v prípade ODS kolóny, ale aj Zr-PBD fázy použitej pri 40 °C [129].

- Jedinou SWLC aplikáciou kolóny DB-C18 bola separácia parabénov subkritickou vodou ako elučným médiom pri teplotách nad 100 °C. Bol študovaný vplyv teploty na retenciu, selektivitu a chvostovanie píkov. Autori ukázali, že k efektívnemu ohrevu mobilnej fázy pred kolónou je nutné použiť dostatočne dlhú kovovú kapiláru. Typ použitého restriktora bol tiež dôležitým faktorom, keďže voda musí počas analýzy zostať pod určitým tlakom. Separčný výkon bol optimálny v eluente s prídavkom 5 % THF (v/v) pri teplote 170 °C a prietoku 1 ml/min. Tlak 85 bar, z čoho 40 bar tvoril odpor restriktora, bol polovičný oproti separácii na ODS pri bežnej teplote. Metóda bola na záver použitá pri hodnotení obsahu parabénov v kozmetickom kréme [130].
- Výsledkom prvej práce od Marsin Sanagiho *et al.* venovanej SWLC na zirkóniových chromatografických nosičoch bola vysoko citlivá metóda stanovenia piatich štruktúrne podobných triazolových antimykotík na Zr-PBD kolóne. Rozlišovacia schopnosť čistej vodnej fázy za vysokej teploty bola vyššia oproti eluentu s nízkym obsahom ACN. Z van't Hoffovej termodynamickej analýzy vyplynulo, že retenčný mechanizmus je exotermický proces (štandardná entalpia prechodu z mobilnej do stacionárnej fázy  $\Delta H^\circ < 0$ ), a tak je pre látky energeticky výhodnejšie zostávať v hydrofóbnej stacionárnej fáze než v eluente. Výber UV detekcie pri 195 nm viedol k citlivosti na úrovni ppb význačne prekonávajúcej bežné HPLC postupy [131].

Následná SWLC aplikácia rovnakého autora je využiteľná pri analýze izomérov vitamínu E ( $\alpha$ -,  $\gamma$ -,  $\delta$ -tokoferol a  $\alpha$ -,  $\gamma$ -,  $\delta$ -tokotrienol) a  $\alpha$ -tokoferol acetátu. Optimálna

separácia na Zr-PBD bola nájdená pri teplotách 80 - 140 °C a koncentráciach acetonitrilu 40 - 50 %. Na hornom okraji teplotného rozsahu bola konštatovaná zmena retenčného mechanizmu [132].

- Neúspešné použitie

Zr-PBD kolóna bola aj kandidátom na subkritickú vysokoteplotnú separáciu zázvorového extraktu v mobilnej fáze tvorenej deuterovanou vodou, avšak v jej podaní bola ihneď zreteľná nízka separačná účinnosť. Analýza sa uskutočnila na odolnej silikagélovej kolóne XTerra C<sub>18</sub> [133].

#### Teplotou ladená tandemová HPLC

- Podľa konceptu teplotou ladenej tandemovej HPLC boli analyzované zmesi rôznych skupín látok, najčastejšie s použitím nezávisle termostatovanej ODS a Zr-CARB kolóny. V prvej práci boli predmetom záujmu karbamátové pesticídy a triazínové herbicídy. Aj keď ani jedna z kolón neposkytla samostatne žiadanú separáciu, už po štyroch pokusoch o optimalizáciu teplôt na oboch kolónach bola separácia úspešná. V prípade triazínových herbicídov bol výsledok lepší než po optimalizácii separácie na ODS [134].  
Na rovnakom princípe spojenia selektivity ODS a Zr-CARB kolóny boli separované barbituráty a fenylothiohydantoinové aminokyseliny s rovnakými pozorovanými uzávermi. Na vyššiu efektivitu teplotou ladeného tandemového HPLC konceptu oproti optimálnej metóde na ODS bolo poukázané na separácii barbiturátov [135].
- Zámenou osvedčenej Zr-CARB fázy za Zr-PBD bola docieľená separácia deviatich variabilne zásaditých antihistaminík, ktoré predtým na jednotlivých fázach neboli kompletne rozdelené. Autori vyzdvihli výhradne reverzno-fázový separačný mód prítomný na retencii protonizovaných antihistaminík v ODS, zatiaľ čo na Zr-PBD potvrdili zmiešaný typ retencie s hlavným príspevkom katiónovej výmeny [136].

### 3.3.3 SPE

- Subramanian *et al.* vo svojej práci zaoberajúcej sa selektívnou izoláciou monoklonálnych protilátok z bunkových kultúr poukázal na možnosť využitia katiónového zirkóniového meniča (EDTPA-modifikovaný  $ZrO_2$ , t.j. analógia ZirChrom-PEZ<sup>®</sup>) v semi-preparatívnej bioanalytickej chromatografii. Krokovým gradientom chloridu sodného boli monoklonálne protilátky eluované v druhej frakcii s dostatočným odstupom od balastných sérových proteínov. Výťažnosť jednokrokovej purifikácie bola viac než 95 %. Čistota frakcie monoklonálnych protilátok rovnako prevyšovala 95 % [137].

V nasledujúcej práci bol EDTPA modifikovaný sorbent využitý k selektívnemu zachyteniu a obohateniu ľudských protilátok triedy IgG, IgA a IgM z biologických tekutín. Väzobná kapacita nezávisela na teplote, ale významne na pH a iónovej sile eluentu. Optimálne pH 5,5 viedlo k selektívnemu vychytávaniu imunoglobulínov, kým negatívne nabitý albumín putoval kolónou bez zádrže [138].

Separácia ľudských imunoglobulínov od balastných proteínov bola opätovne uskutočnená krokovým gradientom chloridu sodného. Čistota imunoglobulínovej frakcie dosiahla okolo 89 % [139].

V nadväzujúcich prácach bolo modelované vychytávanie imunoglobulínov za statických i dynamických podmienok a boli podrobne študované a diskutované mechanizmy prenosu hmoty pri prechode imunoglobulínov cez zirkóniový sorbent [140-142].

- Mikroextračný  $ZrO_2$  sorbent vo forme dutého vlákna bol použitý vo validovanej GC-MS metóde pre stanovenie melamínu. Melamín je hydrofilná dusíkatá látka neslávne známa vďaka afére kontaminovaného mlieka vyrobeného v Číne. Extrakčná i desorpčná časť úpravy vzorky bola optimalizovaná vo viacerých parametroch. Extrakčná schopnosť  $ZrO_2$  bola vysvetlená vodíkovými mostíkmi medzi sorbentom a aminoskupinami melamínu. Metóda bola použitá pri kvantifikácii melamínu v niekoľkých sušených mliekach [143].
- Praktickou aplikáciou polyetylénimínom potiahnutého silného zirkóniového anexu (analógia ZirChrom-SHAX<sup>®</sup>) bol vývoj purifikačného protokolu pre selektívne

vychytávanie bakteriálnych endotoxínov zo vzoriek hovädzieho inzulínu. Protokol spočíval v izolácii endotoxínov na zirkóniovom sorbente po selektívnej elúcii inzulínu pufrom o odlišnom pH. Kolónky s prichyteným endotoxínom bolo možné v jedinom operačnom kroku (preplach roztokom NaOH) regenerovať a depyrogenovať. Hodnota clearance inzulínových frakcií dosiahla až  $1,3 \times 10^8$ , čo ďaleko predčilo efektivitu zaužívaných postupov [144].

#### SPE organofosforylovaných zlúčenín

- Selektívnou SPE extrakciou rôznych organofosfórových látok na  $ZrO_2$  sa zaoberá pomerne veľké množstvo odborných článkov. Úvodný vedecký článok informuje o imobilizácii  $ZrO_2$  na silikagélový SPE materiál a o následnom použití ku selektívnemu zakoncentrovaniu fosforylovaných peptidov [145].
- Vhodnosť čistého  $ZrO_2$  pre selektívne zakoncentrovanie fosforylovaných zlúčenín bola demonštrovaná záchyтом alkylfosfónových kyselín (environmentálne markery organofosfórových bojových látok). Zirkóniová predkolóna bola inštalovaná namiesto dávkovacej slučky. Ukázalo sa, že kovový sorbent zadržoval taktiež síranové anióny. Po vychytení fosfónátov a síranov na sorbent boli tieto Lewisove zásady následne eluované mobilnou fázou s uhličitanom sodným do dvoch sériovo zapojených kolón. Tandemová separácia bola nutná k rozdeleniu síranu od jednotlivých derivátov alkylfosfónových kyselín [146].
- Pri zakoncentrovaní rôznych alkylfosfónátov bol použitý aj komerčne zavedený hybridný SPE materiál HybridSPE-PPT<sup>®</sup>, kde je silikagélový SPE sorbent povrchovo modifikovaný vďaka  $ZrO_2$ . Selektivita tohto zirkóniového sorbentu voči fosfónovým kyselinám je hlavnou výhodou oproti SPE na silikagélovom aniónovom meniči. Extrakčný postup bol vo viacerých krokoch optimalizovaný, pričom počas premývania sorbentu bola selektivita extrakcie zvýšená použitím 2% roztoku kyseliny mravčej, ktorá účinne odstránila vo vzorkách prevažujúce karboxylové kyseliny. Výťažnosť optimalizovanej extrakčnej procedúry bola 80 - 115 %. Vyvinutý extrakčný postup

a následná GC-MS analýza bola aplikovaná na reálnych vzorkách povrchovej vody podozrivých z obsahu alkylfosfonátov [147].

- Rovnaký SPE materiál bol využitý pri selektívnej extrakcii glycerolfosfolipidov s ich následnou HPLC-MS/MS analýzou v zložitých biologických vzorkách. Hydrodynamická procedúra využívajúca práve technológiu HybridSPE-PPT<sup>®</sup> bola optimalizovaná v extrakčnom, premývacom i elučnom kroku. Výťažnosť samotných oxidov kovov bola porovnaná za statických podmienok. Oproti dynamickým podmienkam bola výťažnosť nižšia a klesala v poradí  $ZrO_2 > SnO_2 > TiO_2$  [148].

Rovnaký komerčný produkt poslužil aj v ďalšej štúdií ako efektívny nástroj potlačenia matricových efektov v HPLC-MS vyvolaných prítomnosťou fosfolipidov [149].

- Prospešné použitie hybridného zirkóniového SPE produktu v bioanalytickej praxi je možné objaviť aj v dvoch publikáciách informujúcich o validáciách HPLC-MS/MS metód pre kvantifikáciu clopidogrelu a sitagliptinu v rámci farmakokinetických štúdií. Po deproteinácii biologických vzoriek bol zaradený filtračný krok cez HybridSPE-PPT<sup>®</sup> extrakčné disky, vďaka čomu bolo vo veľmi efektívnej miere potlačené pozadie biologickej matrice počas MS detekcie. Do značnej miery práve aplikácia zirkóniových SPE extrakčných diskov v úprave biologického materiálu pred stanovením sitagliptinu výrazne uľahčila jeho presnú kvantifikáciu [150,151].

- Ucelená správa bola podaná o možnosti selektívnej izolácie fosforylovaných peptidov v mikrošpičkách s oxidom zirkoničitým pred MS detekciou. V porovnaní s  $TiO_2$  boli vychytávané vysoko selektívne najmä monofosforylované peptidy.  $TiO_2$  sa javila omnoho vhodnejšia pre záchyt viacnásobne fosforylovaných peptidov, čo z oboch materiálov činí komplementárny pár [152].

- Poslednou prácou uvedenou v tejto kapitole je ojedinelé využitie silikagélového sorbentu pokrytého  $ZrO_2$ . Za vhodných podmienok ( $H_2O:TFA$ , 95:5, v/v) bol SPE materiál

schopný selektívne eluovať glykopeptidy aj po nanosení zložitých tráviacich zmesí s vysokým zastúpením fosforylovaných makromolekúl [153].

### 3.3.4 HILIC

- Prvá zmienka o použití  $ZrO_2$  v HILIC chromatografii sa zaoberala separáciou hydrofilných látok odvodených od xantínu v kapilárnom chromatografickom merítke. Randon *et al.* testoval silikagelový monolit, silikagelový monolit pokrytý vrstvou  $ZrO_2$  ako aj čistý zirkóniový monolit pri štúdiu vplyvu koncentrácie ACN (resp. vodnej zložky) a pH vodnej zložky na retenciu látok v HILIC oblasti. Výsledky potvrdili špecifickú retenciu xantínov na zirkóniových fázach v mobilných fázach HILIC charakteru, pričom na silikagéle boli látky zadržované veľmi slabo. Retencia dimetylxantínov bola vystupňovaná omnoho viac než retencia kofeínu [154].
- Následne bola kolóna b- $ZrO_2$  súčasťou experimentov porovnávajúcich výkon čistej  $TiO_2$ ,  $ZrO_2$  a  $SiO_2$  analytickej kolóny v HILIC chromatografii. Výsledky ukázali podstatne vyššiu retentivitu oboch kovových kolón pre metylované a dimetylované deriváty xantínu v porovnaní so silikagelovou HILIC kolónou. Významnú rolu počas diskriminácie jednotlivých pík pravdepodobne zohrával dusík heterocyklu v polohe 3. Zvýšenie koncentrácie pufru ďalej viedlo k zníženiu retenčných časov všetkých xantínov. Účinnosť oboch kovových kolón však bola kvôli nízkoefektívnej ligandovej výmene výrazne nižšia než na čistom silikagéle. Najlepšie výsledky z hľadiska selektivity poskytla titánová kolóna [155].
- Jedinou prácou popisujúcou správanie a separáciu modelových analytov na modifikovanej zirkóniovej kolóne v HILIC móde je nedávno publikovaná práca nášho kolektívu [156]. Impulzom prevedenia tejto štúdie bolo niekoľko prác dokumentujúcich HILIC vlastnosti čistej titánovej stacionárnej fázy [155,157-160]. V tejto práci boli na vybraných polárnych analytoch kyslého charakteru testované retenčné schopnosti silikagelovej kolóny určenej pre HILIC chromatografické separácie, ďalej nemodifikovaná zirkóniová kolóna b- $ZrO_2$  a kolóna Zr-PBD. Najprv bol skúmaný vplyv koncentrácie ACN, pH octanového pufru a teploty na dosiahnuté retenčné faktory.

Výsledky ukázali, že retencia na zirkóniových kolónach bola dôsledkom adsorpčných procesov, kým na silikagélovej fáze prevládal rozdeľovací mechanizmus. V prípade karboxylových kyselín bol pozorovaný retenčný profil tvaru písmena U, keďže na ich retencii pozdĺž celého testovaného rozsahu koncentrácie ACN sa podieľala ligandová výmena. Retencia sulfónových kyselín mimo HILIC oblasť bola nulová. Nevýrazný nárast retencie bol pozorovaný až vo vysoko organickom eluente. Na záver bola separovaná modelová zmes troch karboxylových a jednej sulfónovej kyseliny s rovnakými výsledkami na oboch zirkóniových fázach. Polybutadiénová bariéra na Zr-PBD mala dopad iba na zníženie retencie látok oproti b-ZrO<sub>2</sub>. Selektivita kolón zostala podobná. Tvar píkov kyselín na zirkóniových kolónach bol horší než na silikagéle pre HILIC [156].

### 3.3.5 Chirálna HPLC

Rozvoj HPLC nosičov na báze oxidov kovov v chirálnej analýze prekonáva v poslednej dobe značný progres. Počet publikácií popisujúcich prípravu chirálnych stacionárnych fáz na báze ZrO<sub>2</sub> i TiO<sub>2</sub> prudko narástol a ich vlastnosti boli demonštrované na mnohých modelových enantioseparáciách. Vzhľadom k množstvu individuálnych štúdií a viac experimentálnemu než aplikačnému charakteru publikácií však obsah tejto kapitoly nepodáva detailnejší popis výsledkov a záverov.

V úplne prvom článku popisujúcom prípravu zirkóniovej HPLC kolóny pokrytej karbamátom celulózy boli separované niektoré bazické racemáty [161]. Porovnanie enantioseparačných kvalít chirálnych zirkóniových HPLC kolón na báze amylózy a celulózy bolo zámerom niekoľkých prác [162,163]. Chirálna zirkóniové HPLC kolóny boli pripravené modifikáciou čistého ZrO<sub>2</sub> povrchu karbamátom amylózy [164], β-cyklodextrínom [165,166], hovädzím albumínom [167] a boli použité v chirálnej analýze širokého spektra racemických zmesí látok. Kovalentným naviazaním chirálneho selektoru na uhlíkový obal deponovaný na ZrO<sub>2</sub> boli pripravené ďalšie chirálne sorbenty obsahujúce napríklad chinínový motív [168,169] alebo derivát karbamoylcelulózy [170]. ZrO<sub>2</sub> pokrytý karbamátom celulózy bol imobilizovaný do kremičitej kapiláry vo forme zirkóniových mikročastíc [171] a monolitu [172-174] a následne aplikovaný v kapilárnej elektrochromatografii.



O vývoji a pilotných aplikáciách chirálnych zirkóniových stacionárnych fáz obsírne pojednáva Kumar a Park v samostatnom súhrnnom článku [175].

### 3.3.6 Ostatné aplikácie

Superkritická fluidná chromatografia leží na pomedzí HPLC a GC a ako mobilnú fázou využíva superkritickú kvapalinu, najčastejšie CO<sub>2</sub> [1,3]. Jedinou aplikáciou zirkóniových kolón v superkritickej fluidnej chromatografii je separácia skupín uhľovodíkov v dieselových pohonných hmotách. Reverzné fázy Zr-PBD a Zr-CARB sa v úlohe separácie skupín nasýtených, mono-, di-, tri- a polyaromatických uhľovodíkov príliš neosvedčili. Prvá z nich neposkytla spoľahlivú mieru separácie medzi nasýtenými a aromatickými uhľovodíkmi, zatiaľ čo druhá kolóna zdržiavala uhľovodíky príliš silno. Čistý ZrO<sub>2</sub> mal nielen oproti silikagélovým kolónam, ale i voči TiO<sub>2</sub> iba priemerné výsledky. Problémom bola separácia medzi nasýtenými a monoaromatickými uhľovodíkmi a celkovo nižšia separačná efektívnosť. Svetlým bodom ZrO<sub>2</sub> bolo dosiahnutie najlepšieho rozlíšenia medzi di- a triaromatickými uhľovodíkmi. Vo finále sa najlepšie osvedčila kombinácia TiO<sub>2</sub> a silikagélovej kolóny, ktoré boli pri 35 °C a tlaku 150 bar použité k analýze niekoľkých reálnych vzoriek nafty [176].

## 3.4 VALIDÁCIA

Validáciou analytickej metódy sa rozumie séria experimentov, ktorej cieľom je potvrdiť, že vyvinutá metóda poskytuje spoľahlivé a reprodukovateľné výsledky a je teda vhodná pre rutinné účely, napr. stanovenie totožnosti, nečistotného profilu alebo obsahu hlavnej látky. Základné validačné termíny a definície sa medzi liekopisnými autoritami (Ph. Eur., USP apod.) môžu odlišovať, a preto boli harmonizované v smernici ICH Validácia analytických procedúr [177]. Na uvedenú smernicu sa autor v tejto podkapitole odkazuje.

Smernica ICH rozdeľuje analytické metódy určené ku kontrole kvality liečivých látok a liečivých prípravkov do štyroch kategórií. V závislosti na určení analytickej metódy sa požaduje doloženie určitej sady validačných parametrov ako je možné prehľadne vidieť v **Tab. 3**. Pre zjednodušenie sú v tabuľke spomenuté iba metódy kategórie I, II a IV [177]. Popis validačných charakteristík je bližšie uvedený v kapitole 3.4.2.

**Tab. 3** - Prehľad validačných parametrov podľa typu metódy (+ = požaduje sa; - = nepožaduje sa; \* = závisí na type testu)

Parameter	I - Obsah	II - Nečistoty		IV - Totožnosť
		Kvantita	Limitný obsah	
Selektivita	+	+	+	+
Presnosť	+	+	-	-
Správnosť	+	+	*	-
Linearita	+	+	-	-
Rozsah	+	+	-	-
LOD	-	-	+	-
LLOQ	-	+	-	-
Robustnosť	+	+	-	-

### 3.4.1 Test spôsobilosti systému

S validáciou každej HPLC metódy je úzko spätý test spôsobilosti chromatografického systému, ktorý tvorí integrálnu súčasť validácie analytických procedúr. Cieľom overenia spôsobilosti systému je numericky preukázať, že daný analytický koncept je korektný, spoľahlivý a dostatočne účinný. Voľba konkrétneho kritéria testu spôsobilosti závisí na charaktere validovanej metódy. Všeobecne sa vybranými kritériami testuje dostatočná spoľahlivosť, selektivita, retencia i chromatografická účinnosť separácie. Bežné kritéria testu spôsobilosti HPLC systému sú:

- Rozmedzie retenčných časov pre hlavný pík
- Maximálna hodnota RSD pri analýze rovnakého roztoku vzorky
- Minimálny počet teoretických priehradiek hlavného píku
- Rozmedzie faktoru symetrie hlavného píku
- Minimálne rozlíšenie kritického páru pík
- Minimálny pomer signálu k šumu pri analýze látky na úrovni LLOQ

### 3.4.2 Validačné parametre

#### Selektivita

Selektivita vyjadruje schopnosť jednoznačného stanovenia daného analytu v prítomnosti iných zložiek, napr. nečistôt, rozkladných produktov, zbytkových rozpúšťadiel, zložiek matrice atď.

Obyvkle sa prezentuje rozdielom medzi výsledkom HPLC analýzy slepej vzorky (napr. diluentu substancie) a vzorky látky alebo zmesi látok vhodnej k danému testu (napr. identifikačná zmes pri stanovení nečistotného profilu). Požaduje sa priloženie chromatogramov identifikačných roztokov vrátane identifikácie jednotlivých látok. Selektivitu metódy je možno demonštrovať minimálnou hodnotou rozlíšenia kritického páru pík.

#### Presnosť

Pod presnosťou analytickej procedúry sa rozumie miera zhody (event. stupeň rozptylu) jednotlivých meraní opakovaných na homogénnej vzorke za predpísaných podmienok.

Presnosť metódy sa vyjadruje koeficientom variability série meraní (typicky ako RSD). Presnosť môžeme vyjadriť na troch úrovniach:

- Opakovateľnosť
- Intermediárna presnosť
- Reprodukovateľnosť

Opakovateľnosť vyjadruje presnosť metódy za rovnakých operačných podmienok v krátkom časovom intervale. Obyčajne sa stanovuje na uvažovanej koncentračnej hladine na základe šiestich nezávislých analýz vzoriek, ktoré boli spracované kompletným postupom.

Intermediárna presnosť kalkuluje s variabilitou v dôsledku prevedenia metódy rôznymi analytikmi na vybavení odlišných výrobcov v iný deň, pričom rozsah jej prevedenia závisí na okolnostiach budúceho použitia metódy.

Reprodukovateľnosť vyjadruje presnosť medzi laboratóriami, požaduje sa napríklad pred zaradením analytického postupu do liekopisnej monografie.

### Správnosť

Správnosť popisuje tesnosť zhody medzi výsledkami analýzy a skutočným obsahom látky, ktorý je vopred známy alebo zistený inou nezávislou metódou so zaručenou správnosťou.

Doporučuje sa posúdenie správnosti z minimálne deviatich stanovení rozdelených do troch koncentračných hladín (tri replikáty) pokrývajúcich špecifikovaný rozsah metódy. Správnosť stanovenia nečistôt sa prevádza známym prídavkom nečistôt do testovaných vzoriek obvykle formou percentuálnej výťažnosti (recovery). Spôsob vyjadrenia obsahu jednotlivých nečistôt (plošné %, normalizované %, hmotnostné %) vzhľadom k hlavnej látke musí byť racionálne odôvodnený.

### Linearita

Linearita je schopnosť analytickej metódy poskytovať výsledky priamo úmerné koncentrácii (množstvu) stanovovanej látky vo vzorke v danom koncentračnom rozsahu.

V prípade lineárnej závislosti sa výsledky dokladajú spočítaním rovnice regresnej priamky metódou najmenších štvorcov, niekedy až po vhodnej matematickej transformácii, alebo inými vhodnými štatistickými postupmi. Korelačný faktor získaný regresnou analýzou vyjadruje matematickú mieru linearity. Výstupným ukazovateľom miery citlivosti je smernica priamky, zatiaľ čo hodnota y-úseku zodpovedá miere vedľajších vplyvov. Linearita sa hodnotí na minimálne piatich koncentračných hladinách.

### Rozsah

Rozsah metódy tvorí interval medzi hornou a dolnou koncentráciou (množstvom) látky vo vzorke, pre ktorý bola preukázaná dostatočná miera presnosti, správnosti a linearity. Rozsah sa obvykle špecifikuje z výsledkov linearity.

Minimálny rozsah analytickej obsahovej metódy by mal činiť 80 - 120 % testovanej koncentrácie, zatiaľ čo v metóde na nečistoty sa rozsah definuje od LLOQ po 120 % hodnoty uvedenej v špecifikácii.

### Limit detekcie

Detekčným limitom analytickej metódy je najnižšia koncentrácia (množstvo) analytu vo vzorke, ktorú je možné s dostatočnou spoľahlivosťou detegovať.

Existuje niekoľko prístupov ako sa hodnota LOD môže vyjadriť (vizuálne, pomerom signál - šum, extrapoláciou z kalibračnej krivky). Najbežnejší postup u inštrumentálnych techník

(HPLC) je založený na vyjadrení pomeru výšky signálu vzorky obsahujúcej známe stopové množstvo látky k výške šumu blanku v okolí predpokladaného výskytu píku látky. Minimálny pomer LOD je 3:1. Získanú hodnotu LOD je vhodné podložiť ukázkou príslušného chromatogramu. V prípade hodnoty LOD získanej extrapoláciou by mala byť vypočítaná koncentrácia overená analýzou príslušne nariadenej koncentrácie látky.

#### Dolný limit kvantifikácie

Kvantifikačným limitom analytickej metódy sa rozumie najnižšia koncentrácia (množstvo) analytu vo vzorke, ktorú je možné s dostatočnou presnosťou a správnosťou kvantifikovať.

Vyjadruje sa podobne ako LOD s rozdielom, že bežná hodnota pomeru výšky píku a šumu pre LLOQ je 10:1. LLOQ vyjadruje citlivosť danej metódy a je typickým parametrom kvantitatívnej analýzy nečistôt a rozkladných produktov.

#### Robustnosť

Robustnosť analytickej procedúry predstavuje akúsi kapacitu metódy z pohľadu jej schopnosti poskytovať validné výsledky i pri menších zmenách pracovných podmienok (rôzne laboratória, analytici, prístroje, chemikálie atď.). Vyjadruje mieru vplyvu meniacich sa podmienok na dosiahnuté výsledky, čiže indikuje jej spoľahlivosť v rutinej praxi.

Väčšinou sa nepožaduje číselné doloženie robustnosti pomocou reprodukovateľnosti. V popise metódy sa doporučuje uvádzať poznatky nadobudnuté počas vývoja metódy. Tieto poznatky sa týkajú napr. vplyvu pH, teploty alebo prietoku na požadovanú kritickú separáciu, informácií ohľadom stability látok v roztokoch apod. Výsledkom testovania robustnosti by malo byť tolerované rozmedzie hodnôt predpísaných pre každý parameter metódy.

## **4 EXPERIMENTÁLNÁ ČASŤ 1**

## ***INOVATÍVNY PRÍSTUP K ANALÝZE KYSELINY 3-[4-(2-METYLPROPYL)-FENYL]PROPÁNOVEJ AKO LIEKOPISNEJ NEČISTOTY IBUPROFÉNU NA UHLÍKOM POTIAHNUTEJ ZIRKÓNIOVEJ STACIONÁRNEJ FÁZE***

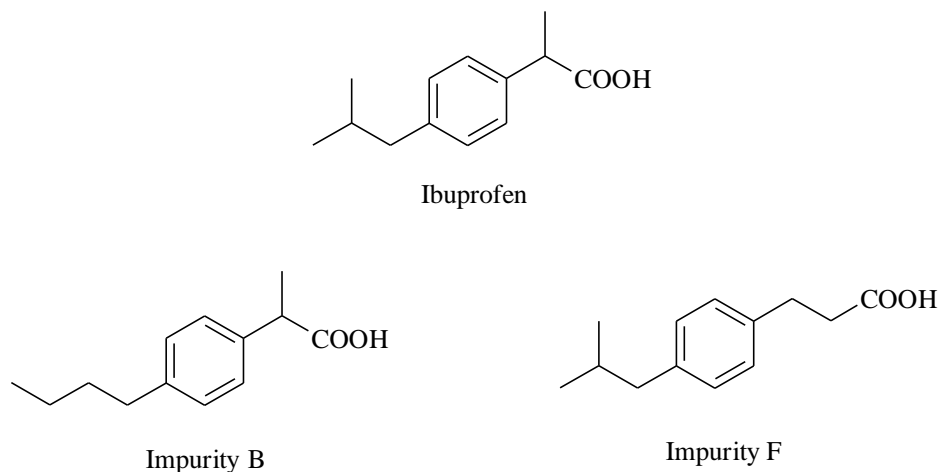
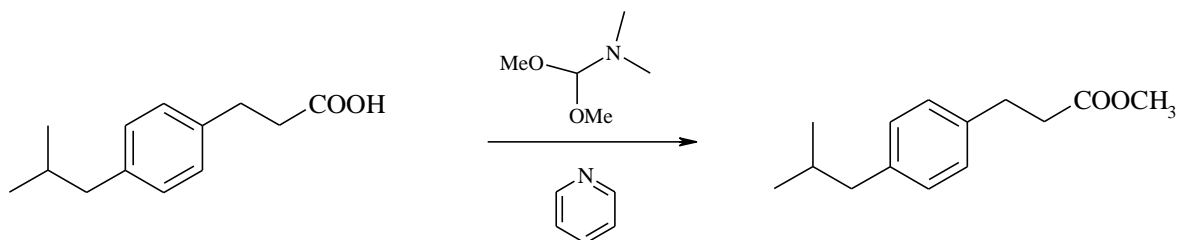
Práca bola publikovaná s originálnym názvom: An innovative approach to the analysis of 3-[4-(2-methylpropyl)phenyl]propanoic acid as an impurity of ibuprofen on a carbon-coated zirconia stationary phase.

P. Kalafut, R. Kučera, J. Klimeš, J. Sochor, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 49 (2009) 1150-1156 [178]

### **4.1 PREDMET ŠTÚDIA**

Ibuprofén, chemicky kyselina (*R,S*)-2-[4-(2-metylpropyl)fenyl]propánová (**Obr. 3**), patrí do širokej a štruktúrne heterogénnej skupiny nesteroidných antiflogistík. Prístupy k hodnoteniu kvality ibuprofenu sa medzi svetovo uznávanými liekopismi odlišujú. USP využíva v skúške na chromatografickú čistotu izokratickú RPLC metódu na ODS fáze s jedinou špecifikovanou príbuznou látkou 4-izobutylaceto fenónom [7]. Skúška na príbuzné látky ibuprofenu v Ph. Eur. je založená na gradientovej reverznej ODS metóde s výnimkou špecifikovanej nečistoty F (**Obr. 3**). Hodnotenie kyseliny 3-[4-(2-metylpropyl)fenyl]propánovej označovanej ako nečistota F bolo do Ph. Eur. zavedené v roku 2002 [179]. Liekopisná metóda stanovenia obsahu tejto látky je založená na princípe GC, pričom pôvodná karboxylová kyselina sa musí najprv derivatizovať na zodpovedajúci metylester (**Obr. 4**). Spôsobilosť HPLC systému je overená dostatočnou separáciou hlavného píku ibuprofenu a nečistoty B (**Obr. 3**). Pomer výšky píku nečistoty B k sedlu musí byť minimálne 1,5 [6].

V odbornej literatúre je HPLC analýza ibuprofenu a jeho niektorých príbuzných látok náplňou väčšieho počtu vedeckých článkov popisujúcich separáciu na silikagélových [118,180-183] ako aj zirkóniových stacionárnych fázach [109,110]. Zmienka o akejkolvek separácii ibuprofenu a nečistoty F však chýba. Keďže sú obe látky polohovými izomérmí, rozdiely v ich fyzikálno-chemických vlastnostiach sú veľmi malé. Na dôvažok disponuje veľmi podobnými vlastnosti aj nečistota B, čo je možné posúdiť v **Tab. 4**.

**Obr. 3** - Chemická štruktúra ibuprofenu, nečistoty B a nečistoty F.**Obr. 4** - Reakčná schéma derivatizácie nečistoty F.

Pokus analyzovať nečistotu F pomerne zložitou liekopisnou metódou založenou na plynovej chromatografii nebol v našom laboratóriu príliš úspešný. Zavedená GC metóda sa javila byť málo citlivá a selektívna. Preto sme sa rozhodli vyšetriť možnosť separácie ibuprofenu a jeho nečistoty F metódou HPLC. Cieľom práce bolo vyvinúť a zvalidovať jednoduchú HPLC metódu pre stanovenie nečistoty F vo vzorkách ibuprofenu s ohľadom na platný Ph. Eur. Významnými faktormi vývoja metódy bolo zvýšenie citlivosti detekcie a naplnenie požiadavku na test spôsobilosti aktuálnej liekopisnej HPLC metódy [6].



**Tab. 4** - Porovnanie vybraných fyzikálno-chemických vlastností ibuprofenu, nečistoty F a B [184].

Vlastnosť		Ibuprofén	Nečistota F	Nečistota B
Molová hmotnosť		206,28	206,28	206,28
Log P		3,72 ± 0,23	3,71 ± 0,21	3,91 ± 0,22
Log D	pH 4	3,58	3,63	3,77
Log D	pH 10	-0,02	-0,03	0,16
pKa		4,41 ± 0,10	4,68 ± 0,10	4,43 ± 0,10
Rozpustnosť	pH 4	mierna	mierna	mierna
Rozpustnosť	pH 10	veľmi ľahká	veľmi ľahká	veľmi ľahká

## 4.2 VYBAVENIE A PRÍPRAVA

### 4.2.1 Inštrumentácia

Chromatografické merania boli uskutočnené na kvapalinovom chromatografe Shimadzu (Tokio, Japonsko) vybavenom čerpadlom LC-10AD<sub>VP</sub>, degasérom DGU-14A, autoinjektorom SIL-10AD<sub>VP</sub>, nízkotlakovým modulom FCV-10AL<sub>VP</sub>, kolónovým termostatom CTO-10AS<sub>VP</sub>, fluorometrickým detektorom RF-10A<sub>XL</sub>, kontrolnou jednotkou SCL-10A<sub>VP</sub> a počítačovým softvérom Class-VP, ver. 6.12. Fluorescenčné spektrá ibuprofenu a jeho nečistôt boli experimentálne získané na fluorometri Aminco-Bowman Series 2 Luminiscence Spectrometer (Madison, USA). UV-VIS spektrofotometer UV2401PC Shimadzu (Tokio, Japonsko) bol využitý pri meraní UV spektier.

### 4.2.2 Chromatografické kolóny

V priebehu experimentálnej časti boli testované tri typy zirkóniových stacionárnych fáz: ZirChrom-CARB<sup>®</sup>, 150 × 4,6 mm (veľkosť častíc 5 μm), DiamondBond-C18<sup>®</sup>, 150 × 4,6 mm (veľkosť častíc 5 μm), obe ZirChrom Separations (Anoka, USA) a Discovery<sup>®</sup> Zr-PS, 150 × 4,6 mm (veľkosť častíc 5 μm), Sigma-Aldrich (Schnelldorf, Nemecko).

### 4.2.3 Chemikálie

Ibuprofén Sigma (St. Louis, USA); kyselina 3-[4-(2-metylpropyl)fényl]propánová (nečistota F) a roztok kyseliny (2*RS*)-2-(4-butylfényl)propánovej (nečistota B) o koncentrácii 0,06 mg/ml boli zakúpené od Európskeho riaditeľstva pre kvalitu liekov a zdravotnú starostlivosť Rady Európy (EDQM, Štrasburg, Francúzsko). Bol použitý acetonitril, metanol i tetrahydrofurán kvality HPLC (Merck, Darmstadt). Deionizovaná voda bola pripravená purifikačným systémom Millipore (Schwalbach, Nemecko). Všetky ostatné chemikálie, prinajmenšom analytickej kvality, boli získané z bežných komerčných zdrojov.

### 4.2.4 Príprava vzoriek

Rozpúšťadlom analytov bola zmes ACN - voda (50:50, v/v).

Štandardný roztok ibuprofenu bol pripravený o koncentrácii 2 mg/ml. Zásobný roztok nečistoty F bol pripravený o koncentrácii 1 mg/ml. Pracovný roztok nečistoty F bol nariadený zo zásobného roztoku na koncentraciu 2 µg/ml.

Modelový roztok ibuprofenu, ktorý bol použitý pri hodnotení testu spôsobilosti HPLC systému, bol pripravený pridaním 20 µl zásobného roztoku nečistoty F a 100 µl roztoku nečistoty B do 10-ml odmernej banky a doplnením po rysku pomocou štandardného roztoku ibuprofenu. Obsah nečistôt v tomto roztoku na úrovni 0,1 % (nečistota F) a 0,03 % (nečistota B) zodpovedá ich liekopisnému limitu voči ibuprofenu.

Nastrekovaný objem vzoriek činil 10 µl.

### 4.2.5 Príprava zložiek mobilných fáz

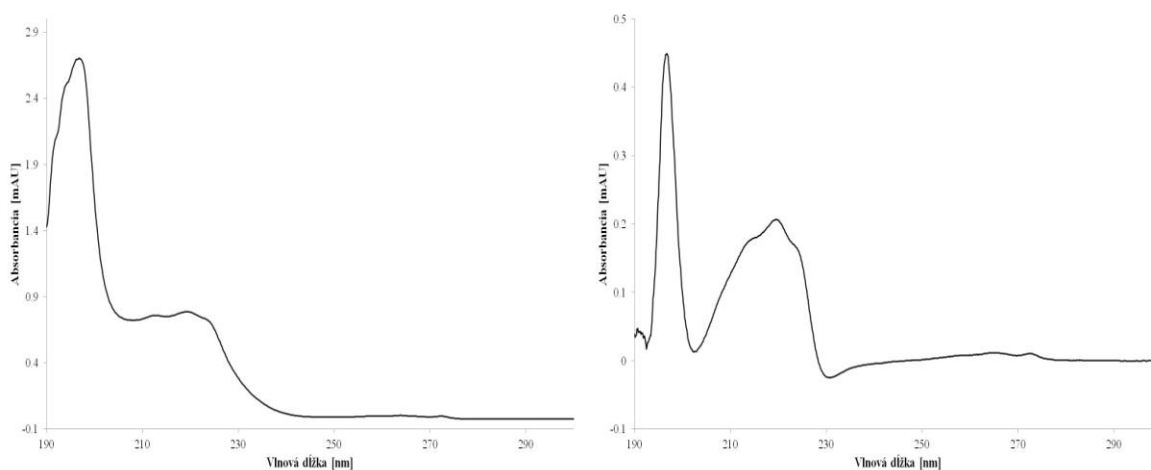
Vodné zložky mobilnej fázy boli pripravené rozpustením patričného množstva soli (dihydrogénfosforečnanu amónneho, prípadne octanu amónneho) vo vode s výslednou koncentraciou 25 mM. Kyslý fosforečnanový pufor použitý v rámci separácie na DB-C18 kolóne bol na koncentraciu 25 mM nariadený priamo z koncentrovanej kyseliny fosforečnej. Aktuálne potrebná hodnota pH bola nastavená pridaním nariadenej kyseliny fosforečnej alebo roztoku hydroxidú amónneho. Pred zmiešaním s daným organickým modifikátorom boli vodné roztoky filtrované cez 0,45 µm filter.

## 4.3 VÝSLEDKY A DISKUSIA

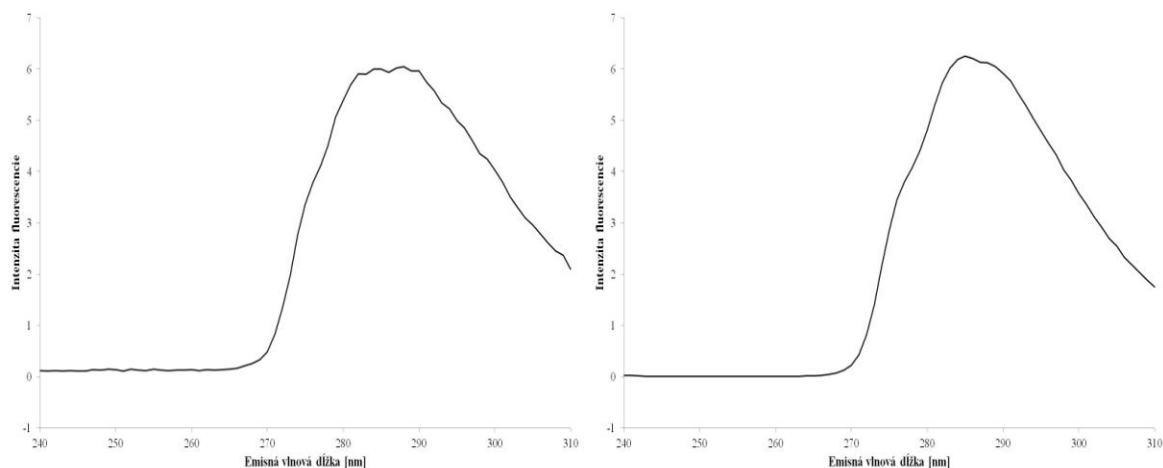
### 4.3.1 Detekcia

I keď je UV spektrum nečistoty F veľmi podobné UV spektru ibuprofenu (**Obr. 5**), odozva UV-VIS detektoru na limitný 0,1 % roztok (t.j. 2 µg/ml) nečistoty F už nie je natoľko intenzívna, aby umožnila potrebnú citlivosť HPLC analýzy. Bolo však zistené, že nízku citlivosť HPLC-UV analýzy je možné obísť zapojením fluorometrickej detekcie.

**Obr. 5** - UV spektrum ibuprofenu (vľavo) a nečistoty F (vpravo).



**Obr. 6** - Emisné fluorescenčné spektrum ibuprofenu (vľavo) a nečistoty F (vpravo).



Po excitácii hodnotených látok žiarením o vlnovej dĺžke 220 nm bolo pozorované emitované žiarenie s pomerne významnou intenzitou v okolí vlnovej dĺžky 285 nm, pozri **Obr. 6**. Citlivosť HPLC analýzy nečistoty F bola teda vystupňovaná fluorescenčnými vlastnosťami analytov za experimentálnych podmienok: excitácia 220 nm, emisia 285 nm.

### 4.3.2 Selektivita

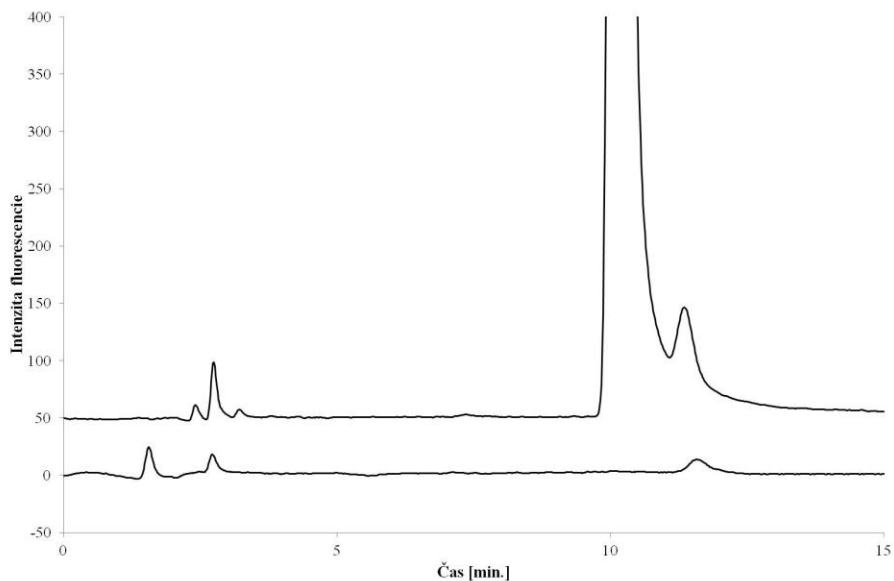
Použitie klasickej silikagélovej ODS fázy, ktoré predchádzalo vzniku tejto práce, nevedlo k žiadnemu náznaku uspokojivého rozdelenia píkov ibuprofenu, nečistoty B a nečistoty F. Nečistota F eluovala tesne pred píkom nečistoty B práve v oblasti výskytu hlavného píku ibuprofenu, čo znemožnilo hodnotenie minoritných píkov oboch nečistôt v modelovej vzorke.

Počas screeningu stacionárnych fáz so selektivitou vystupňovanou k polohovým izomérom boli na základe predchádzajúcich skúseností [109,110] vytypované tri reverzné stacionárne fázy odvodené od  $ZrO_2$ : Zr-PS, Zr-CARB a DB-C18. Vzhľadom k stabilite látok mohli byť všetky kolóny na báze  $ZrO_2$  používané za vyšších teplôt (min. 60 °C). Úprava samotnej teploty nemala na selektivitu metódy príliš významný vplyv.

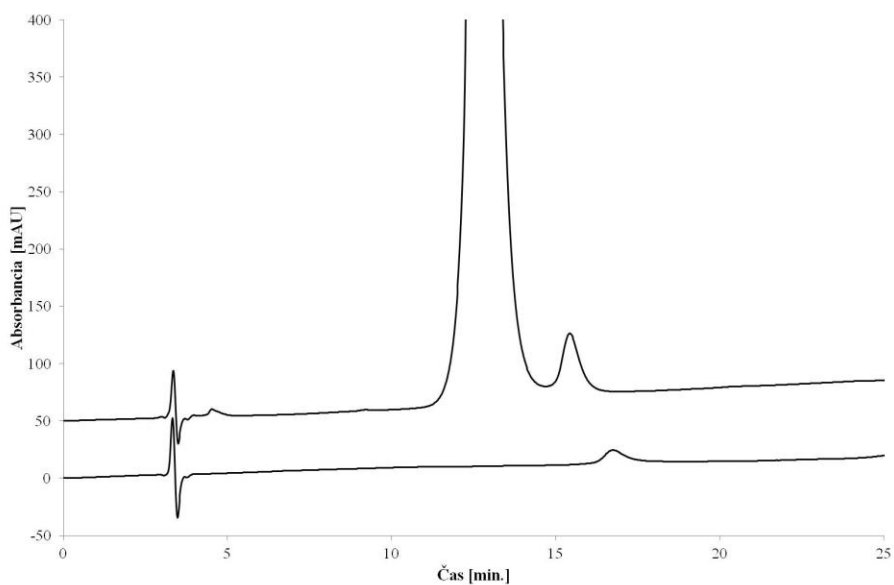
Testovaniu bola ako prvá podrobená zirkóniová kolóna DB-C18, ktorú je možné čiastočne pripodobniť ku ODS kolónam. Separáčne chovanie tejto zirkóniovej stacionárnej fázy bolo veľmi podobné predchádzajúcej ODS fáze a teda nebol badateľný žiaden separačný pokrok. Retencia nečistoty F bola síce oproti nečistote B relatívne zvýšená, avšak nie natoľko výrazne, aby boli obe látky dostatočne oddelené (**Obr. 7**). Prítomnosť  $C_{18}$  reťazcov na povrchu DB-C18 kolóny mala na priebeh medzifázových separačných interakcií veľmi podstatný vplyv. Fázové interakcie sa prednostne odvíjali od hydrofobicity analytov. Zirkóniový povrch ako ani vrstva tenkého uhlíkoveho filmu neboli dostatočne dostupné k účinnejšiemu rozdeleniu izomérov. Obe  $C_{18}$  kolóny preto poskytli takmer identické separačné vlastnosti.

Kolóna Zr-PS bola do práce zahrnutá kvôli špeciálnej selektivitě voči štruktúrnym izomérom s rozdielnou polohou fenylovej skupiny [80]. Táto skutočnosť sa potvrdila aj v predchádzajúcich výsledkoch výskumnej skupiny, keď bola na Zr-PS dosiahnutá lepšia separácia ibuprofenu a nečistoty B než na ODS kolóne [109]. Preto sme sa rovnakým prístupom pokúsili oddeliť nečistotu F. Napriek nízkemu celkovému obsahu uhlíku Zr-PS stacionárnej fázy oproti ODS boli získané pomerne sľubné výsledky. Obe nečistoty boli od ibuprofenu dobre oddelené (**Obr. 8**).

**Obr. 7** - Separácia ibuprofenu a nečistoty B (horný záznam) a chromatogram nečistoty F (dolný záznam) na kolóne DB-C18. Podmienky: mobilná fáza ACN - fosfátový pufor (pH 2,1; 25 mM) (40:60, v/v); excitácia 220 nm, emisia 283 nm ; prietok 1 ml/min; teplota 80 °C.



**Obr. 8** - Separácia ibuprofenu a nečistoty B (horný záznam) a chromatogram nečistoty F (dolný záznam) na kolóne Zr-PS. Podmienky: mobilná fáza MeOH - dihydrogénfosforečnan amónny (pH 4,5; 50 mM) - THF (21:74:5, v/v/v); UV 219 nm; prietok 0,5 ml/min; teplota 60 °C [109].



Najkvalitnejšia separácia nečistoty F od ibuprofenu však bola za vysokej teploty 80 °C dosiahnutá na kolóne Zr-CARB. Vzhľadom k prakticky identickým fyzikálno-chemickým vlastnostiam hodnotených látok boli primárnym dôvodom úspešnej separácie predovšetkým chromatografické vlastnosti uhlíkového povrchu (napr. účasť  $\pi$ - $\pi$  elektrónových interakcií v retenčnom procese) [83,86,185]. Kvôli jedinečnej selektivite Zr-CARB stacionárnej fázy došlo oproti Zr-PS kolóne k markantnému zlepšeniu separácie ibuprofenu a nečistoty F. Separácia na Zr-CARB kolóne za optimálnych podmienok je zobrazená na **Obr. 9**.

### 4.3.3 Optimalizácia metódy

Po nájdení citlivej detekčnej techniky a najvhodnejšej stacionárnej fázy bola perspektívna HPLC metóda optimalizovaná s cieľom čo najlepšie oddeliť nečistotu B od hlavného píku (test spôsobilosti systému), zároveň však dosiahnuť čo najkratší čas celej HPLC analýzy. V ďalších experimentoch bolo optimalizované zloženie mobilnej fázy. Zaujímal nás predovšetkým vplyv organického modifikátoru, pH vodnej zložky mobilnej fázy a vplyv koncentrácie pufru na výslednú separáciu.

Ukázalo sa, že vhodnejšou organickou zložkou mobilnej fázy bol acetonitril. Výmena ACN za MeOH viedla k zhoršeniu separačnej efektivity spojenej s rozširovaním jednotlivých píkov.

Vzhľadom k prítomnosti neionizovaných karboxylových funkčných skupín analytov ( $pK_a$  cca 4,5) bol pozorovaný minimálny dopad na retenciu látok v rozmedzí pH 2 - 4. Retencia analytov bola kontrolovaná reverzno-fázovým mechanizmom (hydrofóbne van der Waalsove interakcie). Pri posune pH mobilnej fázy ponad  $pK_a$  hodnoty látok došlo k dramatickému poklesu retencie. Náboj vytvorený na molekulách karboxylových kyselín vyústil do zmeny retenčného mechanizmu. Do popredia vystúpili odpudivé elektrostatické sily medzi aniónmi kyselín a zirkóniovým povrchom dynamicky modifikovaným fosforečnanovými Lewisovými zásadami [34,44,52,186]. Bohužiaľ poklesla aj selektivita kolóny. Pri pH 6 boli všetky píky prekryté a látky eluovali v mŕtvom objeme kolóny.

Retencia látok na zirkóniových fázach býva výrazne ovplyvnená nielen pH hodnotou, ale tiež samotným typom použitej pufrivacej sústavy (roztoku soli). Koordinačné interakcie silných  $Zr^{IV}$  kyselín spôsobujú málo efektívnu chromatografiu slabých Lewisových zásad (ibuprofen i ďalšie karboxylové kyseliny) prejavujúcu sa širokými a chvostujúcimi píkmami. Kvalitnejšia

analýza takýchto látok sa dá docieľiť dynamickou modifikáciou  $Zr^{IV}$  atómov vhodnými Lewisovými zásadami [52,186]. Octan amónny ako slabá Lewisova zásada neprinesol do separácie žiaden prínos v zmysle vystupňovania rozlíšenia medzi ibuprofénom a nečistotou B. Skutočnosť bola skôr opačná. Octan viedol k nižšiemu počtu teoretických priehradiek a horšiemu tvaru pík. Testovanie fluoridu amónneho, či už samotného alebo v zmesi s fosforečnanom, nebolo vhodné kvôli kyslému pH eluentu. Pri  $pH < 4$  vzniká kyselina fluorovodíková, ktorá koroduje HPLC inštrumentáciu [59]. Počas vývoja metódy sa najvhodnejším eluentom ukázala mobilná fáza obsahujúca silnú Lewisovu zásadu, t.j. fosforečnan.

Optimálne chromatografické podmienky:

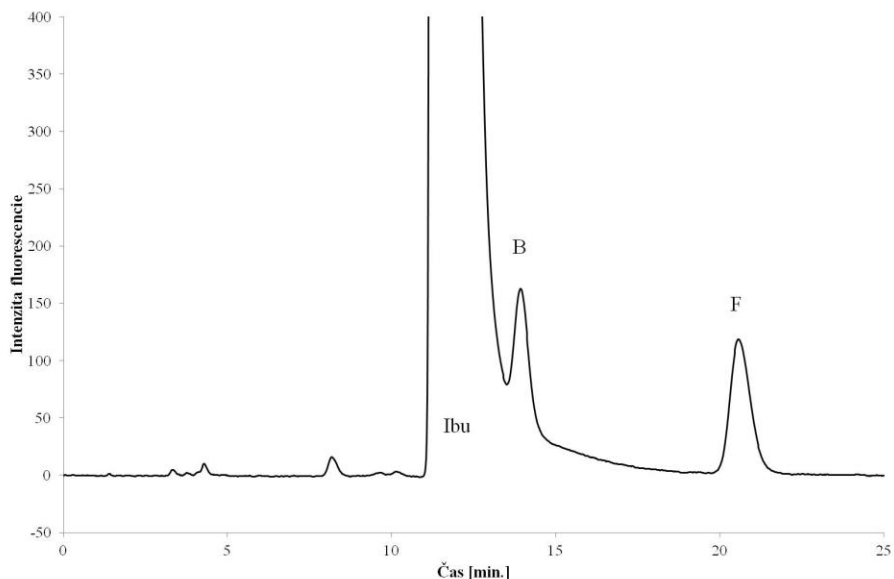
- Stacionárna fáza Zr-CARB  $150 \times 4,6$  mm (veľkosť častíc 5  $\mu$ m)
- Mobilná fáza ACN - dihydrogénfosforečnan amónny (pH 3,5; 25 mM) (38:62, v/v)
- Fluorometrická detekcia 220 nm (excitácia), 285 nm (emisía)
- Prietok 1,2 ml/min
- Teplota 80 °C
- Nástrek 10  $\mu$ l

Za optimálnych HPLC podmienok bola dosiahnutá najlepšia separácia analytov modelového roztoku ibuprofenu (**Obr. 9**). Retenčné časy látok boli: ibuprofén = 12 min., nečistota B = 14 min., nečistota F = 21 min.

V priebehu vývoja a optimalizácie metódy nebolo zistené, že by malé zmeny experimentálnych podmienok mali nežiaduci vplyv na separáciu. Obsah ACN v mobilnej fáze je možné podľa potreby upraviť, aby bol dosiahnutý požadovaný pomer výšky píku nečistoty B k sedlu. Hodnotenú vzorky ibuprofenu boli v autosampleri pri teplote 15 °C stabilné po dobu najmenej 48 hodín.

Zistenie aplikovateľnosti inovatívnej HPLC metódy pre stanovenie nečistoty F v rutinnom kontrolno-analytickom hodnotení ibuprofenu bolo predmetom validácie metódy podľa doporučení ICH [177].

**Obr. 9** - Separácia modelového roztoku ibuprofenu na Zr-CARB kolóne za optimálnych podmienok: mobilná fáza ACN - dihydrogénfosforečnan amónny (pH 3,5; 25 mM) (38:62, v/v); excitácia 220 nm, emisia 285 nm; prietok 1,2 ml/min; teplota 80 °C.



#### 4.3.4 Validácia

##### Selektivita

Chromatogramy dokladajúce selektivitu vyvinutej HPLC metódy stanovenia nečistoty F sú zobrazené na **Obr. 10**. Nameraný pomer výšky píku nečistoty B k sedlu bol 1,6, čím metóda splnila požiadavku na rozlíšenie ibuprofenu od nečistoty B podľa Ph. Eur. Čas celej analýzy potrebný k dosiahnutiu požadovaného rozlíšenia medzi separovanými látkami sa rovnal približne 25 minútam.

##### Presnosť

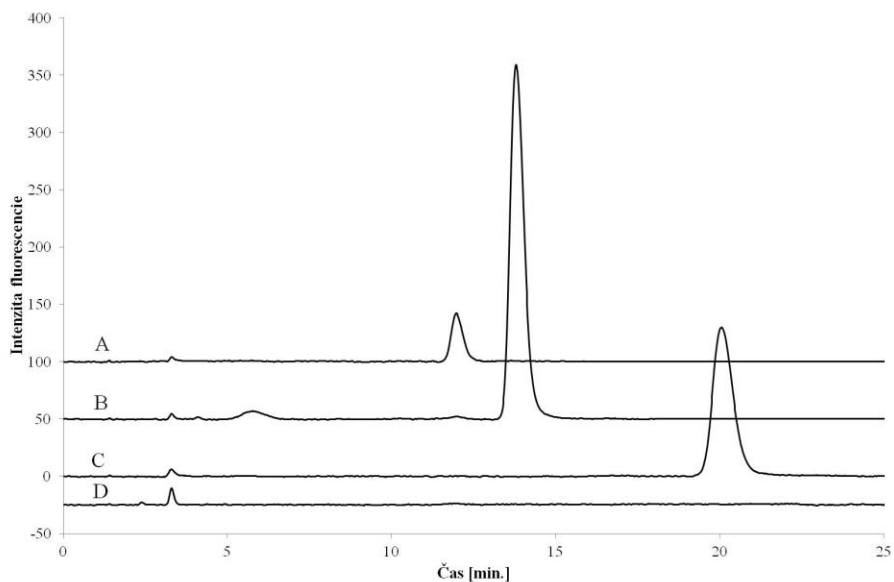
Opakovateľnosť nástreku bola vypočítaná z piatich analýz identickej vialky pracovného roztoku nečistoty F. Dosiahnutá hodnota RSD = 0,58 % poukazuje na spoľahlivú činnosť dávkovacej jednotky chromatografického systému.

Presnosť metódy bola vyjadrená opakovateľnosťou plôch šiestich nezávisle nariadených pracovných roztokov nečistoty F, každý roztok bol analyzovaný štyrikrát. Priemerná plocha píku



nečistoty F jednotlivých roztokov bola použitá do výpočtu RSD. Výsledná hodnota RSD 1,30 % stanovená na nečistotnej koncentračnej úrovni potvrdzuje dostatočnú presnosť metódy.

**Obr. 10** - Selektivita metódy: (A) ibuprofén 2  $\mu\text{g/ml}$ , (B) nečistota B 2  $\mu\text{g/ml}$ , (C) nečistota F 2  $\mu\text{g/ml}$ , (D) ACN - voda (50:50, v/v). Všetky chromatogramy získané za optimálnych podmienok.



### Správnosť

Správnosť metódy bola overená stanovením priemerných výťažností zo vzoriek ibuprofenu s presne známym pridaným množstvom nečistoty F. Kvantifikácia nečistoty F bola prevedená metódou vonkajšieho štandardu.

Okrem výťažnosti na hladine 100 % boli experimentálne validované aj koncentračné hladiny 10 %, 50 % a 120 %, aby boli výsledky správnosti metódy potvrdené v širšom rozsahu a aj v koncentráciách blízko kvantifikačného limitu. Na každej koncentračnej hladine boli pripravené dve navážky a každá navážka bola dávkovaná štyrikrát. Priemerné hodnoty výťažnosti (recovery) sú zobrazené v **Tab. 5** a svedčia o dostatočnej správnosti metódy v testovanom rozmedzí.

**Tab. 5** - Správnosť metódy.

Vzorka	Recovery nečistoty F [%]			
	100 % úroveň	120 % úroveň	50 % úroveň	10 % úroveň
1	102,08	122,33	50,23	9,98
2	101,84	120,19	49,77	9,91
Priemer	101,96	121,26	50,00	9,94

Linearita

Lineárna závislosť plochy píku nečistoty F na koncentrácii bola hodnotená v jednoduchých roztokoch bez obsahu ibuprofenu. Celkovo bolo testovaných 11 koncentračných hladín v rozsahu 2 - 2400 ng/ml (0,1 - 120 % povoleného obsahu). Každá validačná koncentrácia bola nastreknutá štyrikrát a odozva bola priemerovaná. Lineárna závislosť bola nájdená v rozsahu 100 - 2400 ng/ml. Rovnica regresnej priamky bola:  $y = 1,97 \times 10^{-5}x - 1,13$  ( $r = 0,9986$ ). Dosiahnuté výsledky demonštrujú dostatočne širokú lineárnu oblasť s vysokou hodnotou korelačného koeficientu.

Limit detekcie a kvantifikácie

Citlivosť metódy bola deklarovaná na základe výpočtu pomeru výšky signálu ku hodnote šumu základnej línie. Intenzita šumu bola získaná z chromatogramu štandardného roztoku ibuprofenu (2 mg/ml) v oblasti retencie nečistoty F. Výška píku nečistoty F bola odčítaná z chromatogramov vzoriek ibuprofenu (2 mg/ml) obsahujúcich nečistotu F v koncentrácii 200, 100 a 50 ng/ml. Spracovaním týchto dát bola citlivosť metódy stanovená nasledovne: LOD 46 ng/ml (2,3 % povoleného obsahu) a LLOQ 153 ng/ml (7,7 % povoleného obsahu). Z porovnania tejto koncentrácie s dolnou hranicou lineárneho rozsahu 100 ng/ml plynie záver, že skutočný LLOQ limit nečistoty F v prítomnosti majoritného píku ibuprofenu je o niečo vyšší než v roztoku samotnej nečistoty F.

Odozvoový faktor

Priemerné odozvy fluorometrického detektoru na roztoky nečistôt F a B o koncentrácii 2 µg/ml boli vzťahnuté na rovnako koncentrovaný roztok ibuprofenu (**Obr. 10**). Spočítané hodnoty pre nečistotu F a B boli 4,79 a 8,37. Obe nečistoty majú teda za optimálnych podmienok

HPLC analýzy niekoľkokrát vyššiu fluorescenčnú odozvu než ibuprofén, čoho následkom je jednak priaznivý vplyv na rozlíšenie nečistoty B od majoritného píku ibuprofenu ako aj selektívne vyššia citlivosť metódy pre nečistotu F. Tieto skutočnosti vyzdvihujú vhodnosť metódy pre praktické účely.

#### 4.4 ZÁVER

Uhlíkové stacionárne fázy poskytujú analytikovi počas vývoja metódy veľmi široký manipulačný priestor vďaka tomu, že sú v porovnaní so sillikagélovými sorbentami charakteristické vynikajúcou chemickou a teplotnou stabilitou. Kolóny bývajú stabilné v celom možnom rozsahu pH a umožňujú zapájať vysoké separačné teploty ako nástroj vedúci ku skráteniu časov analýz a prípadnej úprave selektivity. Stacionárna fáza Zr-CARB, ktorá je odvodená od oxidu zirkoničitého, je pokrytá uhlíkovou vrstvou a v porovnaní s typickými grafitickými kolónami vykazuje výhodu vysokej mechanickej odolnosti. V uvedenej experimentálnej práci bolo ukázané, že Zr-CARB kolóna je obzvlášť užitočná pri separáciách analytov, ktoré sa navzájom odlišujú iba v nepatrnom usporiadaní atómov.

Platný Ph. Eur. [6] nariaďuje stanovovať obsah kyseliny 3-[4-(2-metylpropyl)-fényl]propánovej ako nečistoty F ibuprofenu pomerne náročnou GC metódou spojenou s derivatizáciou vzorky. V tejto práci bola vyvinutá a validovaná jednoduchá principiálne nová izokratická HPLC metóda k hodnoteniu tejto špecifickej nečistoty v substancii ibuprofenu metódou externého štandardu. Detekčný limit nečistoty F rovnajúci sa 46 ng/ml (t.j. 2,3 % povoleného obsahu) je podstatne nižší než zodpovedá limitnej koncentrácii nečistoty vo výške 2 µg/ml. Ďalšia príbuzná látka, nečistota B, bola do separácie začlenená ako súčasť testu spôsobilosti. Dosiahnutý pomer výšky píku nečistoty B k sedlu bol vyšší než minimálne požadovaná hodnota 1,5. Hoci sú chemické štruktúry ako aj fyzikálno-chemické vlastnosti ibuprofenu, nečistoty B a nečistoty F takmer totožné, touto metódou bola dosiahnutá požadovaná separácia všetkých troch izomérnych analytov v čase 25 minút. Na základe prevedenej validácie sa táto metóda javí byť vhodnou k rutinnej kontrole kvality substancie ibuprofenu. F.

## **5 EXPERIMENTÁLNÁ ČASŤ 2**

## ***VPLYV UHLÍKOVEJ VRSTVY DEPONOVAanej NA ZIRKÓNIOVÝ POVRCH NA RETENCIU POLÁRNYCH ANALYTOV VO VYSOKO ORGANICKEJ MOBILNEJ FÁZE***

Práca bola publikovaná s originálnym názvom: The influence of a carbon layer deposited on a zirconia surface on the retention of polar analytes in an organic rich mobile phase.

P. Kalafut, R. Kučera, J. Klimeš, *J. Chromatogr. A* 1232 (2012) 242-247 [187]

### **5.1 PREDMET ŠTÚDIA**

Táto práca nadväzuje na publikáciu zaoberajúcu sa vplyvom polybutadiénovej vrstvy deponovanej na povrchu  $ZrO_2$  na retenciu polárnych analytov kyslého charakteru za HILIC podmienok [156]. Výsledky v uvedenej práci dokazujú, že nemodifikovaný povrch čistého  $ZrO_2$  bol zodpovedný za retenciu HILIC charakteru. Retenčné faktory získané na Zr-PBD fáze boli v porovnaní s čistým  $ZrO_2$  nižšie. Polymérna bariéra tvorila čiastočnú prekážku k voľnému prístupu analytov na aktívny zirkóniový povrch. Selektivita vybraných látok však nebola výraznejšie ovplyvnená.

V tejto práci sme sa zamerali predovšetkým na hydrofóbnu uhlíkovou vrstvou potiahnutú zirkóniovú stacionárnu fázu Zr-CARB. Do štúdie bol však zaradený väčší počet testovaných analytov rozličných štruktúrnych motívov. Okrem trojice látok z predchádzajúcej štúdie (kyselina 4-hydroxybenzoová, kyselina 4-aminobenzoová, kyselina 4-aminobenzénsulfónová) boli do zoznamu analytov zaradené kyselina 4-toluénsulfónová, rezorcinol, guaifenezín a tri deriváty xantínu (teofylín, teobromín, kofeín). Nová skupina látok si vyžiadala rozšírené testovanie aj na ďalších dvoch kolónach (Zr-PBD, b- $ZrO_2$ ) použitých v minulej práci.

Na všetkých látkach bol študovaný vplyv koncentrácie ACN, vplyv koncentrácie octanového pufru a pH vodnej zložky mobilnej fázy, vplyv typu Lewisovej zásady ako aj separačnej teploty na retenciu. Látky, ktoré neboli zmenami danej premennej ovplyvnené, boli z podrobnejšej diskusie v texte vynechané.

## 5.2 VYBAVENIE A PRÍPRAVA

### 5.2.1 Inštrumentácia

HPLC-DAD merania boli vykonané na chromatografickom systéme Shimadzu LC 20A Prominence (Duisburg, Nemecko) pozostávajúcom z degaséru DGU-20A3, dvoch čerpadiel LC-20AD, autosamplera SIL-20AC, kolónového termostatu CTO-20AC, detektoru diódového poľa SPD-M20A a komunikačným modulom CBM-20AC. Chromatografické dáta boli spracované v softvéri LC Solution, verzia 1.21 SP1 firmy Shimadzu (Duisburg, Nemecko).

### 5.2.2 Chromatografické kolóny

V tejto práci boli celkovo testované tri zirkóniové stacionárne fázy: fáza modifikovaná vrstvou uhlíku ZirChrom-CARB<sup>®</sup>, vrstvou polybutadiénu ZirChrom-PBD<sup>®</sup> a nemodifikovaná fáza ZirChrom-PHASE<sup>®</sup> tvorená čistým ZrO<sub>2</sub>. Všetky kolóny mali identické rozmery 150 × 4,6 mm (priemer častíc 5 µm) a boli zakúpené od výrobcu ZirChrom Separations (Anoka, USA).

### 5.2.3 Chemikálie

Acetonitril HPLC gradientovej kvality bol kúpený od firmy Merck (Darmstadt, Nemecko). Kyselina octová, kyselina mravčia, hydroxid amónny, acetón a všetky skúmané látky (t.j. kyselina 4-aminobenzoová, kyselina 4-hydroxybenzoová, kyselina 4-aminobenzénsulfónová, kyselina 4-toluénsulfónová, teofylín, teobromín, koфеín, guaifenezín a rezorcínol) boli získané od výrobcu Sigma Aldrich (Schnelldorf, Nemecko). Deionizovaná voda bola pripravená purifikačným systémom Millipore (Schwalbach, Nemecko).

### 5.2.4 Príprava vzoriek

Zásobné roztoky analytov o koncentrácii 0,5 mg/ml boli pripravené rozpustením patričného množstva každej substancie v ACN. Výnimku tvoril teobromín, ktorý bol do roztoku prevedený prostredníctvom 1 % (v/v) roztoku kyseliny octovej v ACN.

Pracovné roztoky analytov o koncentrácii 50 µg/ml boli zo zásobných roztokov nariadené dvojakým spôsobom. Vzorky eluované mobilnou fázou s obsahom ACN pod 80 % boli nariadené v zmesi ACN - voda (50:50, v/v), zatiaľ čo vzorky chromatografované vo viac koncentrovanej mobilnej fáze bolo potrebné riediť zmesou ACN - voda (90:10, v/v).

### 5.2.5 Chromatografické podmienky

Vplyv obsahu ACN bol skúmaný v rozmedzí 18 - 90 % (v/v). Mobilné fázy boli pripravené zmiešaním dvoch častí. Prvá časť pozostávala z 50 mM roztoku kyseliny octovej s pH upraveným na 4,5 hydroxidom amónnym. Druhá časť bola namiešaná z deväťdesiatich objemových percent ACN s desiatimi objemovými percentami 0,5 M roztoku kyseliny octovej s pH upraveným na 4,5 hydroxidom amónnym.

Vplyv koncentrácie octanového pufru bol skúmaný na koncentračných hladinách 5, 10, 20, 35 a 50 mM. Mobilná fáza pozostávala z roztoku kyseliny octovej o adekvátnej koncentrácii (pH upravené hydroxidom amónnym na 4,5) a ACN v pomere 14,5:85,5 % (v/v).

Vplyv pH bol skúmaný pri týchto hodnotách pH octanového pufru: 3,8; 4,5; 5,6; 6,7; 8,5 a 9,5. Bola použitá mobilná fáza obsahujúca 35 mM kyselinu octovú (hydroxidom amónnym upravená na požadované pH) a ACN v pomere 14,5:85,5 % (v/v).

Vplyv typu Lewisovej zásady bol vyšetřovaný za použitia octanového a mravenčanového pufru. Obe mobilné fázy boli zložené z príslušnej kyseliny (50 mM, pH 4,5 upravené obvyklým spôsobom) a ACN v pomere 14,5:85,5 % (v/v).

Vplyv teploty kolóny bol študovaný pri teplotách 20, 25, 30, 35, 40, 45, 55, 65, 75 a 83 °C. Mobilná fáza bola zložená z kyseliny octovej (50 mM, pH upravené na 4,5) a ACN v obvyklom pomere.

Konštantnými parametrami počas celej štúdie bola detekcia UV 254 nm, prietok 1 ml/min a nastrekovaný objem roztokov vzoriek činil 20 µl. Mŕtvy objem kolón bol určený pomocou acetónu rozpusteného v zmesi ACN - voda (50:50, v/v). Výpočet počtu teoretických priehradiek, výškového ekvivalentu teoretickej priehradky a tailing faktorov sa pridŕžoval postupov USP [7].

Nastavená hodnota pH uvádzaná v popise prípravy mobilných fáz zodpovedala vždy samotnej vodnej zložke mobilnej fázy. Všetky vodné roztoky boli pred zmiešaním s ACN filtrované cez 0,45 µm filter.

## 5.3 VÝSLEDKY A DISKUSIA

### 5.3.1 Vplyv koncentrácie ACN

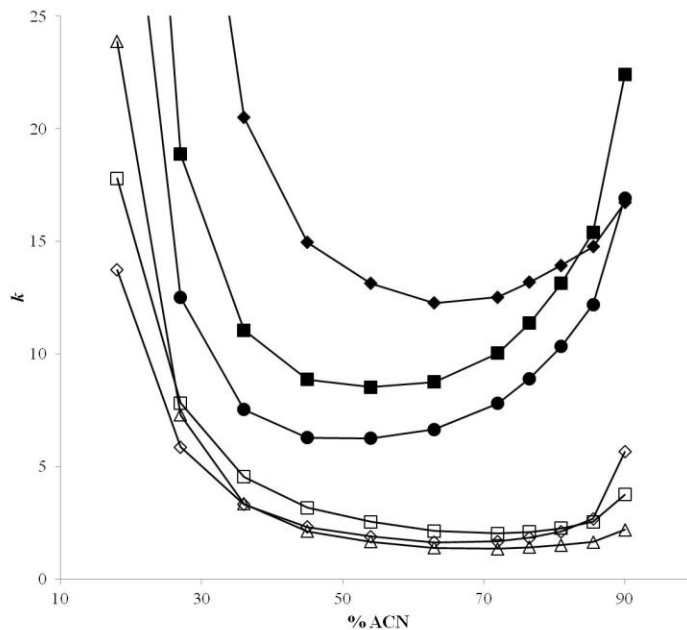
Retenčné chovanie modelových látok na Zr-CARB (**Obr. 11**) bolo hodnotené za rovnakých HPLC podmienok ako predtým na b-ZrO<sub>2</sub> a Zr-PBD. I keď efektivita ukotvenia elementárneho uhlíku na povrch ZrO<sub>2</sub> by mala byť vyššia než v prípade modifikácie polybutadiénom (na Zr-CARB je až 97 % zirkóniového povrchu pokrytých uhlíkom [75]), populácia dostupných Zr<sup>IV</sup> Lewisových kyselín je dostatočná, aby vyvolala interakcie s vhodnými analytmi v HILIC.

Grafická závislosť retenčných faktorov na obsahu ACN bola pre obe karboxylové kyseliny typického vzhľadu podobného písmenu U, čo zodpovedalo pozorovaniam na oboch predchádzajúcich zirkóniových fázach [156]. Na vybranom príklade PHB (**Obr. 12**) je očividné, že retencia Zr-CARB kolóny v eluente obsahujúcom 18 % ACN bola zrovnateľná s b-ZrO<sub>2</sub> a zhruba dvakrát vyššia než v prípade Zr-PBD. Retencia v prostredí 90 % ACN bola vďaka odlišnej modifikácii povrchu významne silnejšia než na Zr-PBD (o 20 %, resp. 30 % pre PHB a PAB), avšak nižšia než na čistom ZrO<sub>2</sub>. Ak si uvedomíme, že retencia karboxylových kyselín bola na b-ZrO<sub>2</sub> ovládaná ligandovou výmenou [55,156] a súčasne, že ich retencia bola v prítomnosti polybutadiénovej vrstvy znížená, vyzerá byť účasť uhlíkovej vrstvy v retenčnom procese veľmi pravdepodobná aj v mobilnej fáze s vysokým podielom organického modifikátoru.

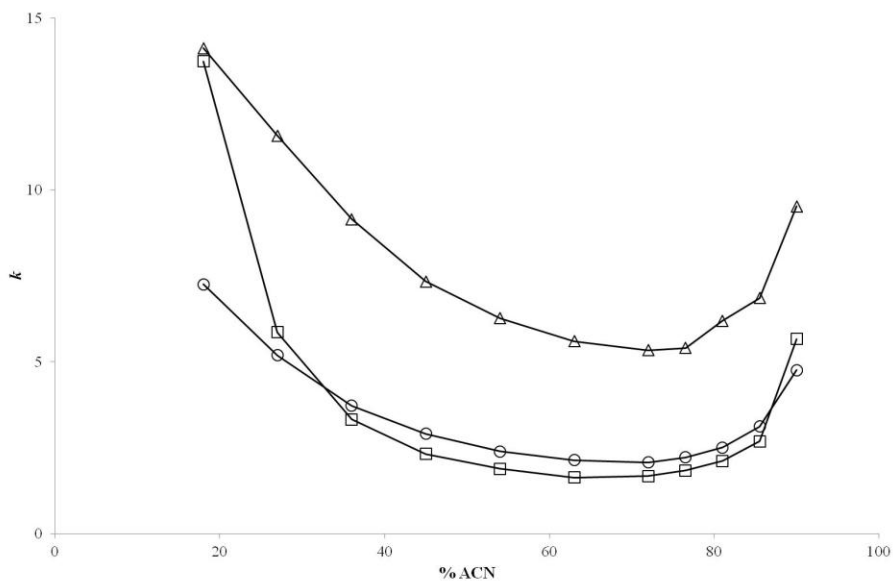
Retenčný profil xantínov mal taktiež podobu písmena U, avšak tvar krivky bol spôsobený odlišnými retenčnými princípmi než v skupine karboxylových kyselín. Extrémne vysoká retencia v oblasti nižšieho obsahu ACN je vyvolaná silnými interakciami heterocyklického skeletu a hydrofóbnej vrstvy grafitického uhlíku (elučné poradie teobromín, teofylín, kofeín). Zásadný význam účasti uhlíkovej vrstvy na vystupňovanej retencii látok na Zr-CARB je v súlade so zanedbateľne nízkou retenciou xantínov na b-ZrO<sub>2</sub> a Zr-PBD. Retencia xantínov v HILIC oblasti dosiahnuté RPLC trendy kopírovala. Na Zr-PBD a ani na b-ZrO<sub>2</sub> nebol pozorovaný žiaden výraznejší nárast dovedy nulovej retencie. Retencia xantínov na Zr-CARB fáze však bola oproti cca 60 % ACN značne zosilená. Sled eluovaných xantínov sa upravil podľa vzrastajúcej polaritu látok v súlade s HILIC princípmi. Takéto chovanie svedčí o zapojení uhlíkovej vrstvy do retenčného procesu xantínov aj v mobilných fázach s vysokým obsahom ACN.



**Obr. 11** - Vplyv koncentrácie ACN na retenciu vybraných látok na Zr-CARB fáze. Látky: kyselina 4-aminobenzoová ( $\square$ ), kyselina 4-hydroxybenzoová ( $\diamond$ ), guaifenezín ( $\Delta$ ), teofylín ( $\blacksquare$ ), kofeín ( $\blacklozenge$ ), teobromín ( $\bullet$ ).



**Obr. 12** - Typické retenčné chovanie karboxylovej kyseliny ako funkcia koncentrácie ACN na testovaných zirkóniových fázach: Zr-CARB ( $\square$ ), Zr-PBD ( $\circ$ ), b-ZrO<sub>2</sub> ( $\Delta$ ). Ako príklad bola použitá kyselina 4-hydroxybenzoová.



Dve testované benzénsulfónové kyseliny nepreukázali odlišné chovanie v porovnaní s predchádzajúcimi výsledkami. Retencia sulfónových kyselín v eluentoch s ACN < 72 % bola nulová, pričom ďalšie zvyšovanie obsahu ACN viedlo k pozvoľnému nárastu retencie (v prípade SUL až na  $k = 1,6$ ).

Aby bolo možné posúdiť prevládajúci retenčný mechanizmus v HILIC oblasti (v našom prípade 72 % - 90 % ACN) bolo potrebné zostrojiť log-log resp. lin-log grafy závislosti retenčných faktorov na obsahu vodnej zložky mobilnej fázy. O prevládajúcej adsorpcii vypovedá vyššia hodnota korelácie v log-log grafe, zatiaľ čo primárna úloha rozdeľovacieho mechanizmu je doložená vyššou koreláciou v lin-log závislosti [26]. Dosiahnutá miera linearity v oboch grafoch bola porovnaná v **Tab. 6**. Okrem benzénsulfónových kyselín, u ktorých sa prevládajúcou retenčnou hybnou silou javí byť rozdeľovanie, boli u všetkých ostatných látok nájdené vyššie korelačné koeficienty v log-log grafe, čo podporuje primárny význam adsorpcie ako hlavného retenčného mechanizmu na Zr-CARB. Testovaná látka rezorcinol nepreukázala nárast retencie vo zvolenej HILIC oblasti, preto nebola hodnota korelačného koeficientu stanovená.

**Tab. 6** - Regresná analýza log-log a lin-log grafov modelových látok na Zr-CARB fáze v HILIC oblasti.

	$R^2$	
	log-log	lin-log
Kyselina 4-aminobenzoová	0,912	0,813
Kyselina 4-hydroxybenzoová	0,922	0,828
Kyselina 4-aminobenzénsulfónová	0,993	0,996
Kyselina 4-toluénsulfónová	0,950	0,982
Teofylín	0,988	0,940
Teobromín	0,996	0,960
Kofeín	0,994	0,960
Guaifenezín	0,937	0,852
Rezorcinol	N/A*	N/A*

\* Nie je aplikovateľné.

### 5.3.2 Vplyv koncentrácie octanu

Celkové výsledky popisujúce vplyv koncentrácie zvoleného pufru na retenciu látok v HILIC oblasti sú prezentované v **Tab. 7**. Vplyvom zvyšujúcej sa koncentrácie octanu amónneho dochádzalo k čiastočnému poklesu retencie karboxylových kyselín. Úbytok retencie sa dá interpretovať vzájomnou kompetíciou Lewisových zásad o kyslé miesta na povrchu sorbentu podliehajúce ligandovej výmene. Čím je v eluente prítomné väčšie množstvo Lewisovej zásady (octanu), tým sa to prejaví vyššou saturáciou  $Zr^{IV}$  Lewisových kyselín, čo má za následok pokles retencie karboxylových kyselín, vyšší počet teoretických priehradiek a lepšiu symetriu píkov. Radikálny význam ligandovej výmeny bol navyše potvrdený odstránením a náhradou octanu z vodnej zložky mobilnej fázy za čistú vodu. Za týchto podmienok (t.j. 85,5 % ACN vo vode) nedošlo na b- $ZrO_2$  k elúcii kyselín, zatiaľ čo na Zr-CARB fáze oba karboxyláty zreteľne eluovali vďaka tieneniu aktívneho zirkóniového povrchu uhlíkom. Pokiaľ porovnáваме retenčné faktory v organicko-vodnom eluente s hodnotami pozorovanými v mobilnej fáze ACN - octan (5 mM, pH 4,5), tak retencia v eluente bez pufru vzrástla viac než dvakrát pre PHB, resp. viac než trikrát pre PAB.

**Tab. 7** - Vplyv koncentrácie octanu amónneho na retenciu, počet teoretických priehradiek [1/m] a tailing faktory modelových látok za HILIC podmienok (85,5 % ACN).

	<i>k</i>		N		$T_f$	
	5 mM	50 mM	5 mM	50 mM	5 mM	50 mM
PAB	5,1	2,9	1000	2300	2,9	2,5
PHB	5,0	3,1	900	2600	3,0	2,5
SUL	0,0	0,5	13300	28200	1,3	1,7
TSA	-0,2	0,2	15100	26100	1,2	1,3
Teofylín	16,6	15,8	17800	19100	4,5	4,3
Teobromín	13,6	12,4	33400	43700	3,5	2,9
Kofeín	16,0	14,8	37300	36700	3,0	3,0
Guaifenezín	1,8	1,7	9400	26900	3,2	2,2
Rezorcínol	0,3	0,3	24800	24900	1,4	1,4

Pomerne nevýrazný pokles retencie s rastúcou koncentráciou pufru bol charakteristický taktiež pre xantíny. Trend bol nájdený pre slabo kyslý teofylín a teobromín, ale aj pre neutrálny kofeín. Preto nie je pravdepodobné, aby za pozorovaný úbytok retencie bola zodpovedná iónová výmena. Vysvetlenie môže spočívať v okrajovom zapojení mechanizmu ligandovej výmeny, keďže tieto heterocyklické štruktúry majú k dispozícii elektrónové páry na atómoch dusíku. Podobné chovanie xantínov v HILIC chromatografii bolo diskutované na nemodifikovanej titánovej stacionárnej fáze [155].

Vzhľadom k tomu, že za nárast retencie benzénsulfónových kyselín v HILIC oblasti bol primárne zodpovedný rozdeľovací retenčný mechanizmus, tak je istý nárast retencie v 50 mM octane značne pravdepodobný. Vyššia koncentrácia soli octanu amónneho rozpusteného v eluente totiž sprostredkuje migráciu hydratovaných octanových aniónov do mikrovrstvy vody asociovanej na povrchu stacionárnej fázy. Pravdepodobne tu dochádza k určitému zväčšeniu objemu vodnej vrstvy [159] s tým, že benzénsulfonáty majú následne tendenciu do vodnej vrstvy účinnejšie prenikať a počas elúcie vo vodnej mikrovrstve zotrvať po dlhšiu dobu.

Zaujímavé chovanie guaifenezínu vplyvom koncentrácie pufru je možné vysvetliť jeho spôsobilosťou koordinačne interagovať so zirkóniovým povrchom vďaka vicinálnym hydroxylovým skupinám [188]. Hypotézu na Zr-CARB podporuje lepšia separačná účinnosť a tvar píku v 50 mM octane oproti 5 mM octanu. Podporným argumentom významu ligandovej výmeny bola tiež chýbajúca elúcia guaifenezínu na kolóne b-ZrO<sub>2</sub> v mobilnej fáze bez prídavku pufru (85,5 % ACN).

### 5.3.3 Vplyv pH octanu

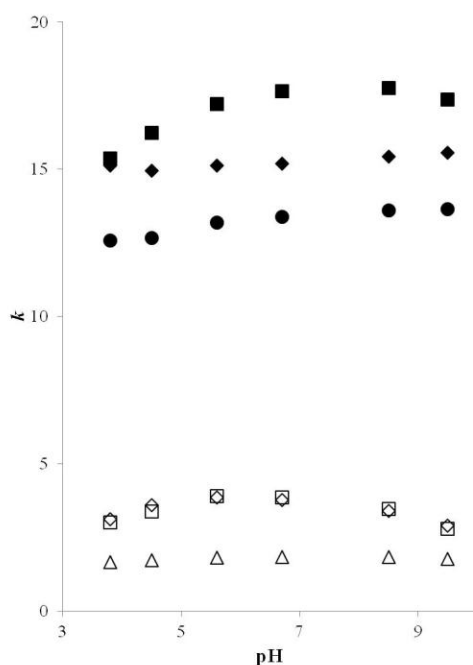
Navzdory podstatne nižšej retencii PAB a PHB v porovnaní s Zr-PBD a b-ZrO<sub>2</sub> [156] výsledky na Zr-CARB kolóne potvrdili primárnu úlohu ligandovej výmeny. Už Blackwell popísal, že najsilnejší príspevok k celkovej retencii karboxylových kyselín vyvolaný ligandovou výmenou je okolo pH 6 s tým, že následne sa prejavuje strmý pokles retencie až k nulovej hodnote kvôli prevládajúcej iónovej repulzii [54]. Porovnateľná retencia u PHB (pKa 4,57) a PAB (pKa 4,86) (hodnoty pKa prevzaté z ref. 184) pri pH 3,8 a pH 9,5 (**Obr. 13**) signalizuje oslabenie odpudivých síl medzi analytom a stacionárnou fázou v alkalickej mobilnej fáze. Podľa Alpertovej ERLIC teórie by mohla byť elektrostatická repulzia stlmená v prítomnosti vysokej koncentrácie organického rozpúšťadla [189]. Pozoruhodná retencia kyselín v alkalickej pH sa

pravdepodobne zachovala v dôsledku ERLIC. Trojnásobne vyšší počet teoretických priehradiek v zásaditom pH potom musí byť odrazom menšieho podielu dynamicky pomalšej ligandovej výmeny na celkovej retencii karboxylových kyselín.

Závislosť retencie derivátov xantínu na pH eluentu je možné vysvetliť podobným spôsobom za predpokladu ich schopnosti podliehať ligandovej výmene. Retencia kofeínu však na rozdiel od dimetylxantínov nebola zmenou pH prakticky vôbec zasiahnutá. Napovedá to zapojeniu sa aj iných bližšie nešpecifikovaných iónových interakcií (napr. možnou ionizáciou kyslej enolickej skupiny v alkalickom pH) do celkovej retencie dimetylxantínov v HILIC eluente.

Pozorované retenčné chovanie guaifenezínu oproti výsledkom xantínov poukazuje na možný meniaci sa podiel ligandovej výmeny závislý na pH. Zatiaľ čo samotná retencia nezdá byť prostredníctvom pH nijak dotknutá, je pík guaifenezínu v alkalickom pH výraznejšie chvostujúci a počet teoretických priehradiek padol z 23500/m v kyslej mobilnej fáze na 12900/m v zásaditom prostredí.

**Obr. 13** - Vplyv pH na retenciu vybraných látok za HILIC podmienok (85,5 % ACN). Látky: kyselina 4-aminobenzoová ( $\square$ ), kyselina 4-hydroxybenzoová ( $\diamond$ ), guaifenezín ( $\Delta$ ), teofylín ( $\blacksquare$ ), kofeín ( $\blacklozenge$ ), teobromín ( $\bullet$ ).



### 5.3.4 Vplyv typu Lewisovej zásady

Substitúcia octanového aniónu za mravenčan viedla k retenčným časom kyselín a xantínov vyšším zhruba o 15 – 25 %, pozri **Tab. 8**. Počas elúcie analytov v mravenčane bola celkovo detegovaná horšia účinnosť separačného procesu spojená s nižším počtom teoretických priehradok a nepriaznivým dopadom na symetriu pík. Objasnenie výsledkov môže tkvieť v slabšom zásaditom charaktere mravenčanu podľa Lewisovej teórie. Analyty podstupujúce konkurenčnú ligandovú výmenu s Lewisovou zásadou slabšou než je octan amónny majú následne príležitosť úspešnejšie interagovať so zirkóniovým povrchom, čo sa prejavuje vyššou retenciou a nižšou chromatografickou účinnosťou.

**Tab. 8** - Vplyv typu Lewisovej zásady na retenciu, počet teoretických priehradiek [1/m] a tailing faktory modelových látok za HILIC podmienok (85,5 % ACN).

	Octan			Mravenčan		
	<i>k</i>	N	T <sub>f</sub>	<i>k</i>	N	T <sub>f</sub>
PAB	2,6	2600	2,5	3,3	2100	2,5
PHB	2,7	2800	2,7	3,5	2100	2,9
SUL	0,5	27400	1,7	0,8	29200	1,7
TSA	0,2	27100	1,3	0,3	25300	1,2
Teofylín	15,5	23100	3,3	18,1	18600	3,6
Teobromín	12,2	42800	2,6	15,8	32900	2,8
Kofeín	14,8	41900	2,5	16,9	31900	2,7
Guaifenezín	1,6	28700	2,0	1,8	15800	2,7
Rezorcinol	0,3	26400	1,4	0,3	21600	1,2

### 5.3.5 Vplyv teploty

Retenčné výsledky dosiahnuté v tomto experimente vrátane počtu teoretických priehradiek, tailing faktorov ako aj hodnôt zmien entalpie retenčného procesu spočítaných z van't Hoffových grafov sú zhrnuté v **Tab. 9**. Manipulácia s teplotným aspektom na Zr-CARB fáze nemala na retenciu kyselín tak silný vplyv ako bolo pozorované na čistom ZrO<sub>2</sub> a Zr-PBD [156]. Najpravdepodobnejšou príčinou je súvislejšie zakrytie povrchu sorbentu uhlíkovou

bariérou. Nárast retencie karboxylových kyselín (PAB, PHB) so stúpajúcou teplotou na kolóne Zr-CARB korešponduje s výsledkami na ostatných dvoch kolónach [156]. Aj na Zr-CARB fáze boli potvrdené dva lineárne segmenty (v oboch  $r^2 > 0,998$ ) ohraničené zreteľným zakrivením okolo teploty 45 °C. Tento jav by mohol byť spätý so zmenou interakčného mechanizmu či zmenou hrúbky vodnej mikrovrstvy v blízkosti aktívneho povrchu [190,191]. Smernice van't Hoffových grafov u benzénsulfónových kyselín boli síce kladné, avšak nelinearita okolo teploty 60 °C bola taktiež zreteľná.

Na opačnej strane bola pre všetky xantíny ako aj guaifenezín konštatovaná vynikajúca linearita ( $r^2 > 0,9999$ ) v celom teplotnom rozsahu van't Hoffových grafov. Ako je v **Tab. 9** vidieť, účinnosť chromatografie xantínov bola za stúpajúcej teploty nepochybne zvýšená, keďže bol dosiahnutý vyšší počet teoretických priehradiek a súčasne nižšie chvostovanie pík. Prekvapujúco však úplne opačné chovanie bolo pozorované v prípade guaifenezínu. Na objasnenie tohto neočakávaného teplotného efektu ako aj súvisu s vplyvom pH na účinnosť retenčného procesu guaifenezínu by nepochybne bolo nevyhnutné ďalšie detailné vyšetrenie.

**Tab. 9** - Vplyv teploty na retenciu, počet teoretických priehradiek [1/m], tailing faktory a  $\Delta H^\circ$  hodnoty [kJ/mol] modelových látok za HILIC podmienok (85,5 % ACN).

	<i>k</i>		N		<i>T<sub>f</sub></i>		$\Delta H^\circ$	<i>R</i> <sup>2</sup>
	20 °C	83 °C	20 °C	83 °C	20 °C	83 °C		
PAB	2,8	3,4	2000	7600	2,8	2,4	2,6	0,973
PHB	3,0	4,0	2000	7800	3,0	2,4	3,7	0,976
SUL	0,5	0,4	28000	28100	1,6	1,5	-2,5	0,927
TSA	0,2	0,1	21700	22900	1,2	1,2	-9,3	0,842
Teofylín	17,9	4,4	16100	44000	4,5	2,5	-19,3	1,000
Teobromín	14,4	3,6	35800	60400	3,1	1,7	-18,9	1,000
Kofeín	17,1	4,3	31700	59400	2,9	1,8	-19,0	1,000
Guaifenezín	1,8	0,7	26300	8200	2,1	3,4	-13,1	1,000
Rezorcinol	0,3	0,2	24200	21200	1,3	1,4	-7,3	0,978

### 5.3.6 Separácia modelových vzoriek

Na základe získaných výsledkov je jasné, že Zr-CARB fáza disponuje niekoľkými možnosťami, pomocou ktorých sa dá ovplyvňovať retencia rôznych typov látok a tým aj výsledná separácia. Popri špecifickom zmiešanom type retencie v nižšom a strednom ACN pásme sa otvára nová aplikačná oblasť aj vo vysokom ACN regióne. Separačná aplikovateľnosť stacionárnej fázy Zr-CARB v mobilnej fáze HILIC charakteru je ilustrovaná na dvoch modelových zmesiach:

- Kyseliny - SUL, PAB, PHB
- Xantíny - teofylín, teobromín, kofeín

#### Kyseliny

Zmes troch organických kyselín bola analyzovaná za presného dodržania HPLC podmienok použitých v predošlej práci [156], t.j. ACN - octan amónny (50 mM, pH 4,5) (90:10, v/v), teplota 60 °C a prietok 1 ml/min. Uľahčilo nám to porovnať dosiahnuté výsledky na testovanej stacionárnej fáze s chovaním zmesi kyselín na fázach Zr-PBD a b-ZrO<sub>2</sub>. Kyselina 3,4-diaminobenzoová nebola v tejto novej zmesi prítomná kvôli príliš silnej retencii na Zr-CARB. Výsledná separácia na Zr-CARB bola uspokojivá, ale bola dosiahnutá podobná selektivita a účinnosť ako v prípade Zr-PBD a b-ZrO<sub>2</sub>. Tailing faktory pre SUL, PAB a PHB boli 1,95; 2,01 a 2,01 a príslušné výškové ekvivalenty teoretickej priehradky sa rovnali 32, 211 a 175  $\mu$ m. Tieto hodnoty svedčia o prevažne nižšej separačnej účinnosti Zr-CARB stacionárnej fázy v porovnaní s hodnotami dosiahnutými na obidvoch referenčných kolónach [156].

#### Xantíny

Za HPLC podmienok využitých pri separácii kyselín bola pozorovaná koelúcia teobromínu a kofeínu. Do úvahy prichádzalo niekoľko opatrení, ktorými by sa problém nedostatku selektivity mohol vyriešiť (napr. redukcia obsahu ACN na cca 75 %). Zistili sme však, že dobré rozlíšenie medzi kofeínom a obidvomi dimetylxantínmi bolo dosiahnuté aj v jednoduchšej mobilnej fáze ACN - voda (95:5, v/v). S ohľadom na extrémne vysokú retenciu xantínov za týchto podmienok ( $k \gg 25$ ) a nízky pracovný tlak bola v metóde s výhodou aplikovaná vyššia teplota a rýchlejší prietok. Teplota nad 60 °C však mala za následok úplné

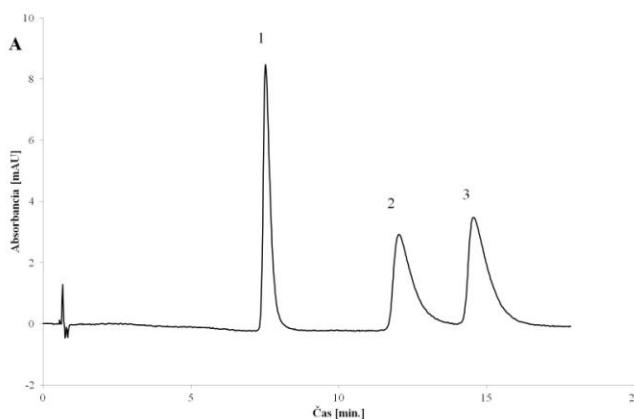


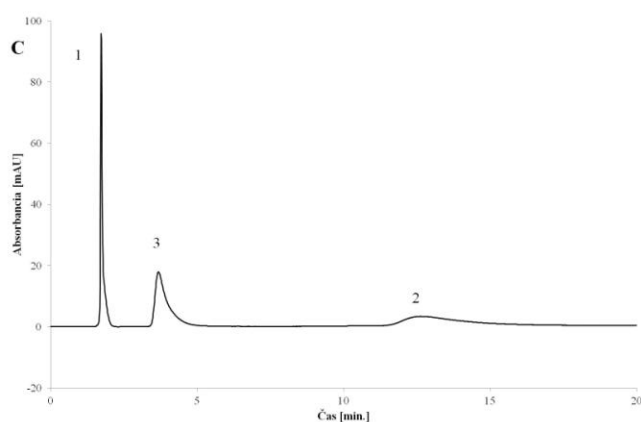
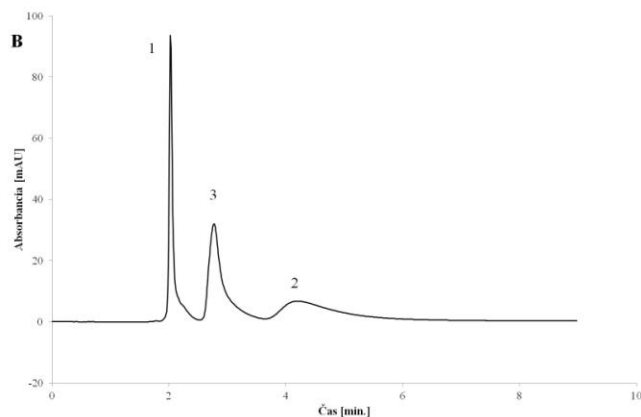
prekrytie píkov teobromínu a teofylínu. Všetky tri látky boli nakoniec od seba rozdelené pri 55 °C a 3 ml/min v čase cca 15 minút (**Obr. 14 A**).

Schopnosť Zr-CARB sorbentu silno zadržiavať xantíny bola v ostrom kontraste s výkonom Zr-PBD a b-ZrO<sub>2</sub> stacionárnych fáz. Na oboch kolónach bola dosiahnutá v podstate nulová retencia kofeínu a iba veľmi slabá retencia dimetylxantínov ( $k < 1,3$ ) dokonca aj v 95 % ACN. Tieto merania znova podčiarkovali dôležitú funkciu uhlíkovej vrstvy počas separácie xantínov.

V priebehu separačných meraní bol nájdený zaujímavý teplotný efekt na fáze b-ZrO<sub>2</sub>. Maximálna retencia kofeínu v 95 % ACN bola dosiahnutá pri zníženej teplote 15 °C ( $k = 0,3$ ; **Obr. 14 B**), pričom stúpajúca teplota viedla k elúcii kofeínu spolu s mŕtvym objemom systému. Opačný trend bol pozorovaný u oboch dimetylxantínov, keď zvyšujúca sa teplota viedla k pomerne prudkému nárastu retencie predovšetkým v prípade teobromínu (**Obr. 14 C**). V porovnaní so Zr-CARB kolónou stojí za zmienku prehodenie poradia dimetylxantínov a súčasne aj signifikantné rozšírenie týchto dvoch píkov na b-ZrO<sub>2</sub>, čo je zhodné s pozorovaním Randona *et al.* [154].

**Obr. 14** - Separácia xantínov na zirkóniových stacionárnych fázach v mobilnej fáze ACN - voda (95:5, v/v), UV 254 nm. (**A**) Zr-CARB, prietok 3 ml/min, teplota 55 °C; (**B**) b-ZrO<sub>2</sub>, prietok 1 ml/min, teplota 15 °C; (**C**) b-ZrO<sub>2</sub>, prietok 1 ml/min, teplota 80 °C; 1 = kofeín; 2 = teobromín; 3 = teofylín.





## 5.4 ZÁVER

Náplňou tejto práce bolo posúdenie významu uhlíkom potiahnutej zirkóniovej stacionárnej fázy pri analýze vybraných polárnych látok za HILIC podmienok. Výsledky jednoznačne poukázali na schopnosť tohto sorbentu zadržiavať polárne látky v HILIC mobilnej fáze napriek prítomnosti silno hydrofóbnej bariéry. Na celkovej retencii látok sa podieľali rôzne retenčné mechanizmy najmä však ligandová výmena, hydrofilné a čo je zaujímavé aj hydrofóbne interakcie. Relatívna dôležitosť jednotlivých interakčných mechanizmov bola silno závislá na chemickej štruktúre a vlastnostiach jednotlivých analytov a na experimentálnych podmienkach.

Na základe porovnania výsledkov s referenčnými zirkóniovými stacionárnymi fázami je zrejmé, že uhlíková vrstva mala oproti polybutadiénu výrazne odlišný vplyv na celkovú retenciu karboxylových kyselín a xantínov. Hlavným rozdielom bola väčšia angažovanosť grafitického uhlíku na retenčnom procese v mobilných fázach bohatých na vodu a aj na ACN. Veľmi

intenzívne interakcie s uhlíkovou bariérou v HILIC typických mobilných fázach boli preukázané hlavne u xantínov, zatiaľ čo na fáze obsahujúcej čistý  $ZrO_2$  mala preferenčné miesto ligandová výmena.

Tieto výsledky naznačujú, že aj modifikované reverzné stacionárne fázy odvodené od  $ZrO_2$  môžu byť úspešne aplikované pri HILIC separáciách. Spôsobilosť k ligandovej výmene je zdá sa veľmi dôležitým faktorom umožňujúcim látkam interagovať s aktívnymi miestami na zirkóniovom povrchu. V niektorých prípadoch môže byť do retencie zapojená aj hydrofóbná vrstva, hoci je použitá HILIC mobilná fáza s vysokým percentom organického modifikátoru. Keďže sa jedná o multimodálny retenčný proces, bolo by žiaduce previesť ďalšie experimenty s inými typmi látok v snahe o hlbšie pochopenie všetkých aspektov ovplyvňujúcich separáciu v oblasti HILIC chromatografie na oxide zirkoničitom.

## **6 EXPERIMENTÁLNÁ ČASŤ 3**

## ***RETENČNÉ CHOVANIE KYSLÝCH, ZÁSADITÝCH A NEUTRÁLNYCH FARMACEUTICKY VÝZNAMNÝCH LÁTOK NA DEAKTIVOVANEJ POLYBUTADIÉNOVEJ ZIRKÓNIOVEJ FÁZE***

Práca bola publikovaná s originálnym názvom: The retention behavior of acidic, basic and neutral pharmaceuticals on the deactivated polybutadiene zirconia phase.

P. Kalafut, R. Kučera, J. Klimeš, *Curr. Anal. Chem.* 8 (2012) 574-582 [192]

### **6.1 PREDMET ŠTÚDIA**

Objektom primárneho záujmu v tejto práci bola pomerne nová zirkóniová stacionárna fáza určená pre HPLC-MS, ktorá bola na trh uvedená pod komerčným názvom ZirChrom-MS<sup>®</sup>. Čistý zirkóniový povrch je v nej chelatovalý molekulami EDTPA zabezpečujúcimi permanentnú deaktiváciu Zr<sup>IV</sup> Lewisových kyselín. Reverzná fáza je získaná pokrytím povrchu špeciálne zosieťovaným polybutadiénom.

Prekvapujúcim zistením však bolo, že podľa ref. [193] Zr-MS patrí do zoznamu desiatich najmenej podobných kolón k Zr-PBD, aj keď je úplne evidentne založená na rovnakom základe. Tento nález ako aj vedomie absencie akejkoľvek adekvátnej štúdie zaoberajúcej sa komplexným zhodnotením chromatografických vlastností Zr-MS kolóny nás primäl k zhodnoteniu rozdielov v retenčnom chovaní a selektivite medzi modifikovanou a nemodifikovanou polybutadiénovou zirkóniovou stacionárnou fázou. Pozornosť sa primárne zameriavala na vplyv pH vodnej komponenty mobilnej fázy, vplyv koncentrácie a typu Lewisovej zásady ako aj teploty na selektivitu.

Farmaceuticky zväčša významné analyty boli vyberané s úmyslom zahrnúť látky kyslej, zásaditej a aj neutrálnej povahy. Zoznam látok je uvedený v **Tab. 10**. Analyty, ktoré neboli zmenami danej premennej signifikantne ovplyvnené boli z podrobnejšej diskusie v danom texte vynechané.

**Tab. 10** - pKa a log P hodnoty testovaných látok [184].

	<b>pKa</b>	<b>Log P</b>
Guaifenezín	13,5	0,57
Benzil	N/A*	3,38
Metylparabén	8,3	1,87
Etylparabén	8,3	2,40
Propylparabén	8,2	2,93
Butylparabén	8,2	3,46
Ibuprofén	4,4	3,74
Diklofenak	4,2	4,06
Kyselina flufenámová	3,7	5,62
Kyselina meklofenámová	3,6	6,67
Prokaín	9,2	2,36
Lidokaín	8,5	2,36
Prilokaín	8,0	1,74
Trimekaín	8,5	2,82

\* Nie je aplikovateľné.

## 6.2 VYBAVENIE A PRÍPRAVA

### 6.2.1 Inštrumentácia

Väčšina chromatografickej časti experimentálnej práce bola prevedená na HPLC systéme Shimadzu LC 20A (Tokio, Japonsko) vybavenom degasérom DGU-20A3, dvomi čerpadlami LC-20AD, autosamplerom SIL-20AC, kolónovým termostatom CTO-20AC, detektorom diódového poľa SPD-M20A, komunikačným modulom CBM-20A a počítačovým programom LC Solution, verzia 1.21 firmy Shimadzu (Tokio, Japonsko). S využitím hmotnostného spektrometra s iónovou pascou LCQ Advantage Max, Thermo Finnigan (San Jose, USA), ktorý umožňuje atmosférické ionizačné techniky ESI a APCI, bol realizovaný prenos metódy na HPLC-MS detekčný systém. Dáta hmotnostného spektrometru boli spracované programom Xcalibur firmy Thermo Finnigan.

## 6.2.2 Chromatografické kolóny

ZirChrom-MS<sup>®</sup> a ZirChrom-PBD<sup>®</sup> s rozmermi 150 × 4,6 mm a priemerom častíc 5 μm boli zakúpené od firmy ZirChrom Separations (Anoka, USA).

## 6.2.3 Chemikálie

Testované substancie boli získané od dodávateľov: ibuprofén a kyselina flufenámová, Sigma (St. Louis, USA); kyselina meklofenámová Sigma-Aldrich (St. Louis, USA); sodná soľ diklofenaku Merck (Darmstadt, Nemecko); metylparabén a etylparabén, Merck (Darmstadt, Nemecko); propylparabén a butylparabén, Lachema (Brno, ČR); benzil Merck (Darmstadt, Nemecko); guaifenezín Sigma-Aldrich (Praha, ČR); hydrochlorid prokaínu, prilokaín, lidokaín, trimekaín, Sigma-Aldrich (St. Louis, USA).

Acetonitril a metanol gradientovej kvality boli od firmy Merck (Darmstadt, Nemecko). Lewisove zásady (dihydrogénfosforečnan amónny, octan amónny, fluorid amónny) pochádzali od firmy Lach-Ner (Neratovice, ČR) a acetón vyrobila Penta (Chrudim, ČR). Hydrochlorid ondansetronu ako aj jeho päť liekopisných nečistôt C - G boli získané darom od firmy Zentiva (Praha, ČR). Deionizovaná voda bola pripravená purifikačným systémom Millipore (Schwalbach, Nemecko).

## 6.2.4 Príprava vzoriek

Zásobné roztoky všetkých testovaných substancií slúžiacich k popisu vlastností deaktivovanej stacionárnej fázy, vrátane acetónu ako indikátoru mŕtveho času chromatografického systému, boli pripravené rozpustením patričného množstva danej substancie v ACN na koncentráciu 1 mg/ml. Výnimku tvoril diklofenak, ktorý musel byť rozpustený v 1 % (v/v) roztoku kyseliny octovej v ACN. Pracovné roztoky testovaných látok o koncentracii 20 μg/ml boli následne pripravené nariadením v zmesi ACN - voda (50:50, v/v).

Zásobné a pracovné roztoky ondansetronu a jeho nečistôt boli rozpúšťané v metanole na finálnu koncentráciu 20 μg/ml.

## 6.2.5 Príprava roztokov Lewisových zásad

Roztoky Lewisových zásad boli pripravené rozpustením ich amónnej soli (dihydrogénfosforečnan, octan, fluorid) vo vode. Konkrétna hodnota pH bola nastavená buď

hydroxidom amónnym alebo príslušnou zriedenou kyselinou (5 % kyselina fosforečná, 1 M kyselina octová, 1 M kyselina chlorovodíková). Vodná časť mobilnej fázy bola filtrovaná cez 0,45 µm filter.

Fosfátový pufoer pH 5,5 bol pripravený postupom uvedeným v Ph. Eur. [6] a následne zriedený vodou na koncentráciu 20 mM.

### 6.2.6 Chromatografické podmienky

Aby analyzované látky vykazovali na oboch stacionárnych fázach primeranú retenciu, bolo nutné nájsť vhodné chromatografické podmienky. Na základe pilotných experimentov bola zvolená mobilná fáza obsahujúca 25 % ACN a 75 % vodného roztoku soli. Podmienky jednotlivých experimentov boli nasledovné:

- pH závislosť bola testovaná v rozsahu 2,5 - 9,5 s gradáciou jednej jednotky pH; mobilná fáza: ACN - dihydrogénfosforečnan amónny (20 mM; pH variabilné) (25:75, v/v); UV detekcia v duálnom móde pri 230 a 265 nm; teplota 35 °C; prietok 1 ml/min.
- Vplyv koncentrácie Lewisovej zásady bol testovaný na hladinách 5, 10, 20 a 40 mM; mobilná fáza: ACN - fosfátový pufoer (koncentrácia variabilná; pH 5,5) (25:75, v/v); UV detekcia v duálnom móde pri 230 a 265 nm; teplota 35 °C; prietok 1 ml/min.
- Závislosť retencie na separačnej teplote bola testovaná pri 20, 25, 30, 35, 40 a 45 °C; mobilná fáza: ACN - fosfátový pufoer (20 mM; pH 5,5) (25:75, v/v); UV detekcia v duálnom móde pri 230 a 265 nm; teplota variabilná; prietok 1 ml/min.
- Vplyv fosfátu, octanu a fluoridu na separáciu študovaných látok bol testovaný za týchto HPLC podmienok: mobilná fáza tvorená zmesou ACN - Lewisova zásada (20 mM; pH 6,5) (25:75, v/v); UV detekcia v duálnom móde pri 230 a 265 nm; teplota 35 °C; prietok 1 ml/min.

Kolóny boli ekvilibrované mobilnou fázou po dobu 90 minút a potom nasledovali HPLC analýzy jednotlivých látok v poradí: acetón, parabény, neutrálne látky, kyseliny a zásady. Nastrekováný objem bol vždy 10 µl. V rovnakom poradí sa celá analýza zopakovala ešte raz. Z priemerného retenčného času jednotlivých látok bol vypočítaný ich retenčný faktor  $k$  podľa definície Ph. Eur. [6].



## 6.3 VÝSLEDKY A DISKUSIA

Na základe nadobudnutých skúseností s chromatografiou na tomto type stacionárnych fáz [111-113,178] bolo zrejmé, že v tejto porovnávej štúdií bude veľmi žiaducim opatrením vyhnutie sa slabej Lewisovej zásade octanu amónnemu v eluente. V opačnom prípade by to viedlo k problematickej analýze organických kyselín na referenčnej Zr-PBD kolóne. Z tohto dôvodu bola väčšina štúdie postavená na použití silnej fosforečnovej Lewisovej zásady, aj keď fosforečnanové soli nie sú vhodnou prísadou v eluentoch podliehajúcich hmotnostnej detekcii.

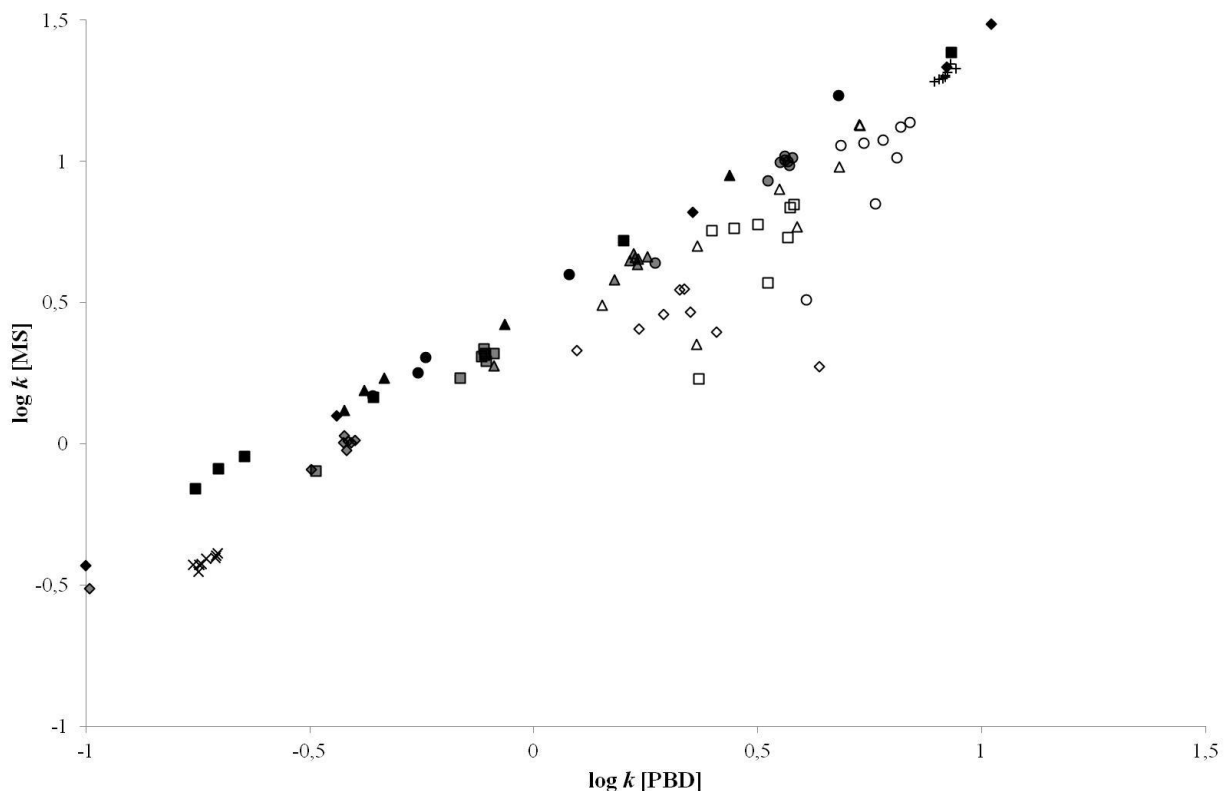
Rozdiely v selektivite medzi dvomi stacionárnymi fázami môžu byť podľa Horvátha vyjadrené graficky v tzv. *k-k* zázname [194]. Číselná miera lineárnej závislosti (korelačný koeficient) nájdená v takomto zázname zodpovedá priamo úmerne podobnosti fáz. V tejto experimentálnej práci boli graficky vynesené logaritmické hodnoty retenčných faktorov ( $\log k$ ) pre všetky analyty na Zr-MS kolóne voči  $\log k$  dosiahnutým na Zr-PBD. Regresné dáta (smernica, úsek, korelačný koeficient) boli najprv spočítané pre každé HPLC podmienky zvlášť, napr. pre jednotlivé pH hodnoty počas pH experimentu. Keďže bola dosiahnutá značná vzájomná zhoda v týchto parciálnych výsledkoch, následne bol vytvorený sumárny *k-k* graf, ktorý obsahoval všetky retenčné dáta (napr. retenčné faktory celého pH experimentu) a dal sa jednoduchšie interpretovať. Rovnice výsledných regresných priamok sú prezentované v jednotlivých odstavcoch.

Zmenami HPLC podmienok nebola významne ovplyvnená chromatografická retencia a ani chromatografická účinnosť píkov oboch zástupcov neutrálnych látok (guaifenezín, benzil), čo bolo v súlade s našimi predpokladmi. Uvedené dva analyty boli preto z ďalšieho rozboru v diskusii vynechané.

### 6.3.1 Vplyv pH

Retencia kyslých ako aj zásaditých látok na Zr-PBD býva zapríčinená zmiešaným retenčným mechanizmom [52]. Podľa informácií od výrobcu si podobnú schopnosť uchováva aj inovatívna Zr-MS kolóna [195]. Nastavenie vhodnej hodnoty pH by teda malo zostať kľúčovým faktorom úspešnej separácie ionizovateľných látok aj na Zr-MS.

**Obr. 15** - Graf  $\log k$  na Zr-MS verzu  $\log k$  na Zr-PBD. Podmienky: ACN - fosfát (25:75, v/v) (pH 2,5 - 9,5; 20 mM); UV 230 a 265 nm; 35 °C; 1 ml/min. Látky: prokaín ( $\diamond$ ), lidokaín ( $\square$ ), prilokaín ( $\Delta$ ), trimekaín ( $\circ$ ), ibuprofén ( $\blacklozenge$ ), diklofenak ( $\blacksquare$ ), kyselina flufenámová ( $\blacktriangle$ ), kyselina meklofenámová ( $\bullet$ ), guaifenezín ( $\times$ ), benzil (+), metylparabén (sivý  $\diamond$ ), etylparabén (sivý  $\square$ ), propylparabén (sivý  $\Delta$ ), butylparabén (sivý  $\circ$ ).



Zostrojený  $k$ - $k$  graf na **Obr. 15** zobrazuje sumár retenčných dát celého pH experimentu. Lineárna regresia je vyjadrená priamkou s rovnicou:  $y = 0,908x + 0,38$  ( $r = 0,9158$ ). Hlavné kvôli špecifickému retenčnému profilu bazických lokálnych anestetík je korelačný koeficient priamky od ideálnej hodnoty čistočne odchylený, ale i napriek tomu je hodnota dosiahnutej korelácie vysoká. Vysoká hodnota korelačného koeficientu svedčí o veľmi podobnej selektivitě testovanej skupiny látok na oboch stacionárnych fázach. Z hodnoty úseku bola na Zr-MS kolóne vyčíslená v priemere 2,4-krát silnejšia retencia oproti klasickej Zr-PBD fáze, čo korešponduje s vyšším plniacim objemom polybutadiénu na Zr-MS stacionárnej fáze.

Rozdiel oboch stacionárnych fáz výhradne z pohľadu hydrofobicity bol kvantifikovaný na základe analýzy homologickej série parabénov (metylparabén až butylparabén) v pH intervale

2,5 - 6,5. Priamky získané regresiou závislosti  $\ln k - n_{\text{CH}_2}$  (počet metylénových skupín) oboch kolón boli navzájom takmer rovnobežné, čo dokladajú priemerné smernice priamok 0,765 a 0,752 pre Zr-MS a Zr-PBD ako aj príslušné úseky -0,77 a -1,72. Korelačné koeficienty prevyšovali 0,999. Z týchto výsledkov je možné vyvodiť záver, že hydrofobicita Zr-MS fázy je 2,6-krát vyššia než bolo pozorované na Zr-PBD.

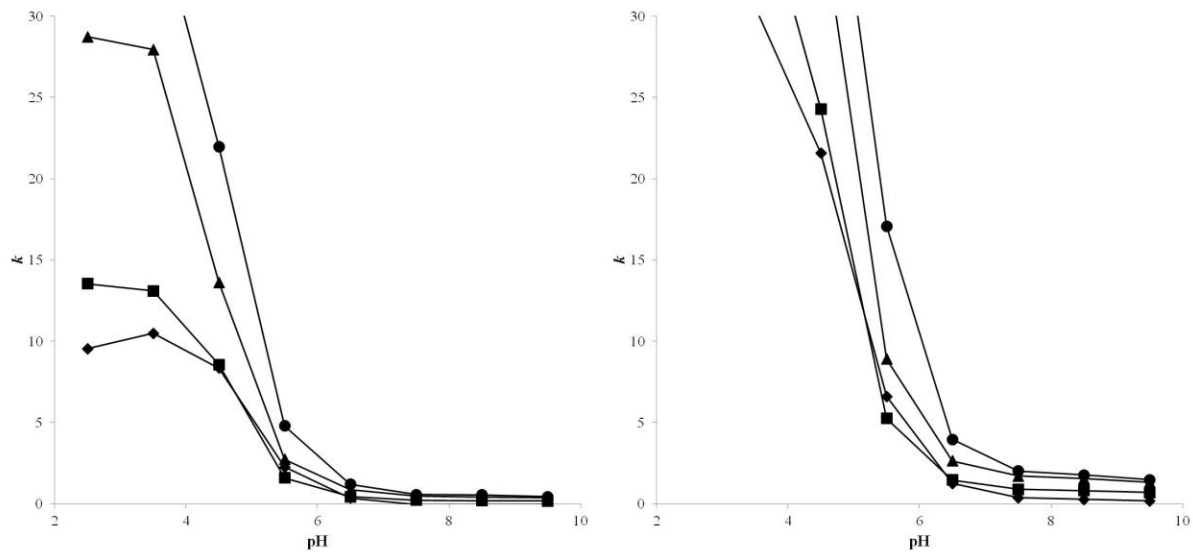
Podobné chromatografické vlastnosti kolón sa odzrkadlili na vzhľade pH závislosti rôznych typov látok. Profil závislosti  $k$  na pH na Zr-MS kolóne si zachoval podobné rysy ako na Zr-PBD pre kyslé aj zásadité liečivá. Prudký úbytok retencie karboxylových kyselín okolo pH hodnôt ekvivalentných ich  $pK_a$  (**Obr. 16**) sa pripisuje prevládajúcim odpudivým silám medzi záporným nábojom karboxylovej skupiny a povrchom fázy. Identická situácia bola pozorovaná u všetkých parabénov okolo pH 8,5.

Akokoľvek bolo retenčné chovanie látok na oboch kolónach analogické, je možné si povšimnúť niekoľko menších odlišností. Napríklad je to prehodenie elučného poradia ibuprofenu a diklofenaku okolo pH 4,5 na Zr-PBD, resp. v okolí pH 5 na Zr-MS. Alebo uspokojivá separácia anestetík na Zr-PBD bola dosiahnutá v pH „okne“ 4,5 - 6,5, kým na Zr-MS bola úplná separácia možná iba pri pH 7 (príčinou bola koelúcia trimekaínu a prilokaínu, vid' **Obr. 17**). Zaujímavým rozdielom bol aj retenčný profil prokaínu na oboch fázach v kyslej oblasti pH. Objasnenie zvyšujúcej sa retencie prokaínu na Zr-PBD vo veľmi kyslej oblasti by asi bolo možné pripísať na vrub špecifickej interakcie prokaínu s  $ZrO_2$  (asi cez primárnu aminoskupinu), keďže obdobný vzhľad retenčného profilu nebol prítomný na  $ZrO_2$  zablokovanom molekulami EDTPA.

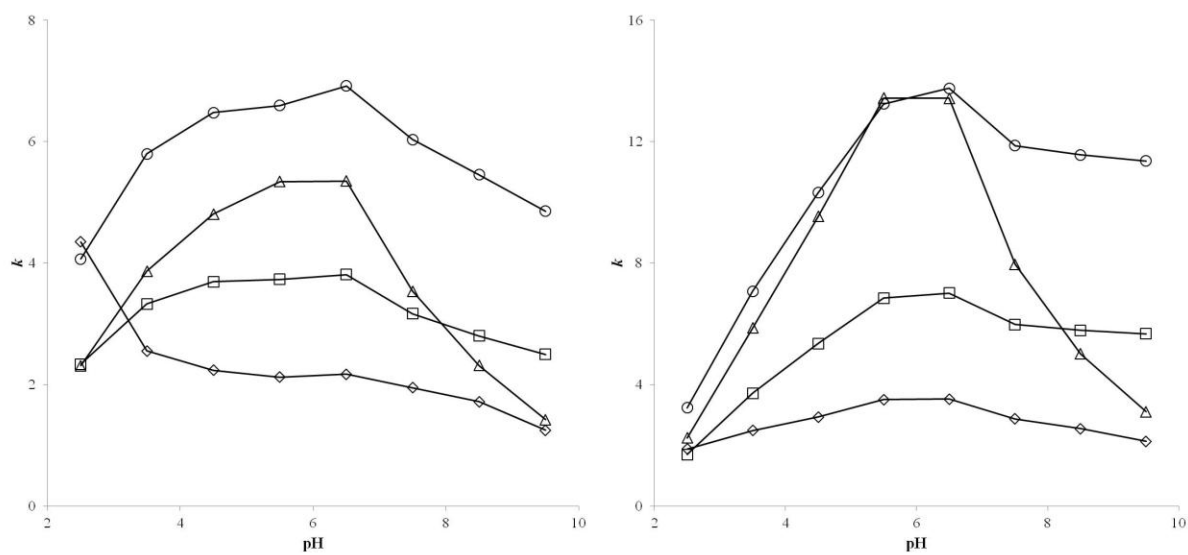
### 6.3.2 Vplyv koncentrácie Lewisovej zásady

Ďalšou alternatívou pri cieľavedomom hľadaní optimálnej retencie ionizovateľných látok (hlavne bazických farmaceutík) je voľba vhodnej koncentrácie Lewisovej zásady. Rovnica regresnej priamky súhrnného  $k-k$  grafu  $y = 1,042x + 0,45$  ( $r = 0,9900$ ) opäť naznačuje veľmi podobné retenčné chovanie a selektivitu oboch fáz. Priemerná retencia na Zr-MS bola v tomto prípade asi 2,8-krát vyššia oproti Zr-PBD, čím tento výsledok celkom dobre koreluje s ostatnými hodnotami v tejto štúdií.

**Obr. 16** - Vplyv pH na retenciu kyselín na Zr-PBD (vľavo) a Zr-MS (vpravo) kolóne. Podmienky rovnaké ako na Obr. 15, UV detekcia 230 nm. Látky: ibuprofén (◆), diklofenak (■), kyselina flufenámová (▲), kyselina meklofenámová (●).



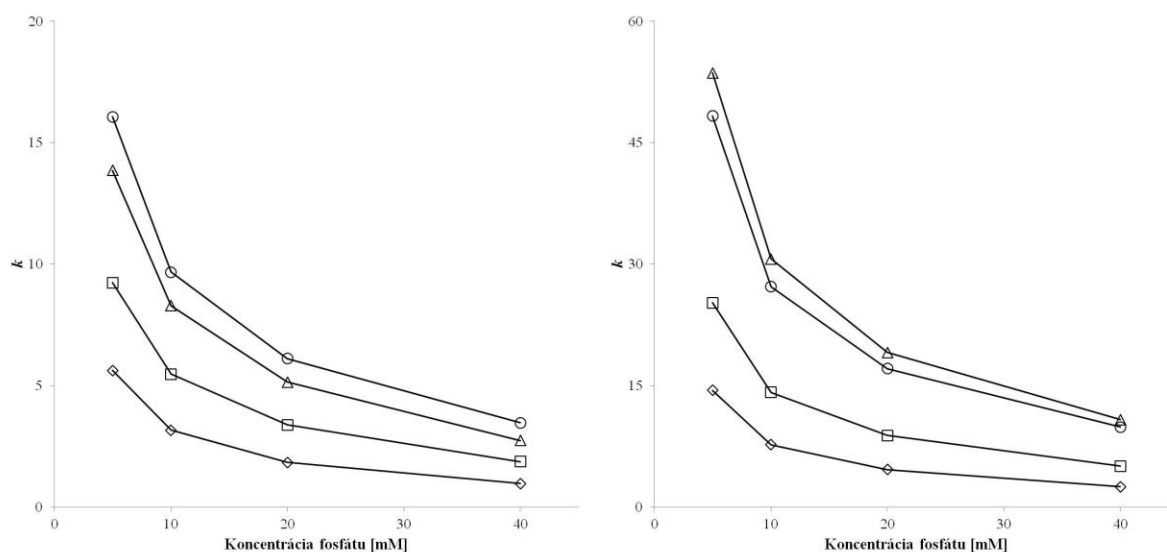
**Obr. 17** - Vplyv pH na retenciu zásad na Zr-PBD (vľavo) a Zr-MS (vpravo) kolóne. Podmienky rovnaké ako na Obr. 15, UV detekcia 265 nm. Látky: prokaín (◇), lidokaín (□), prilokaín (Δ), trimekaín (○).



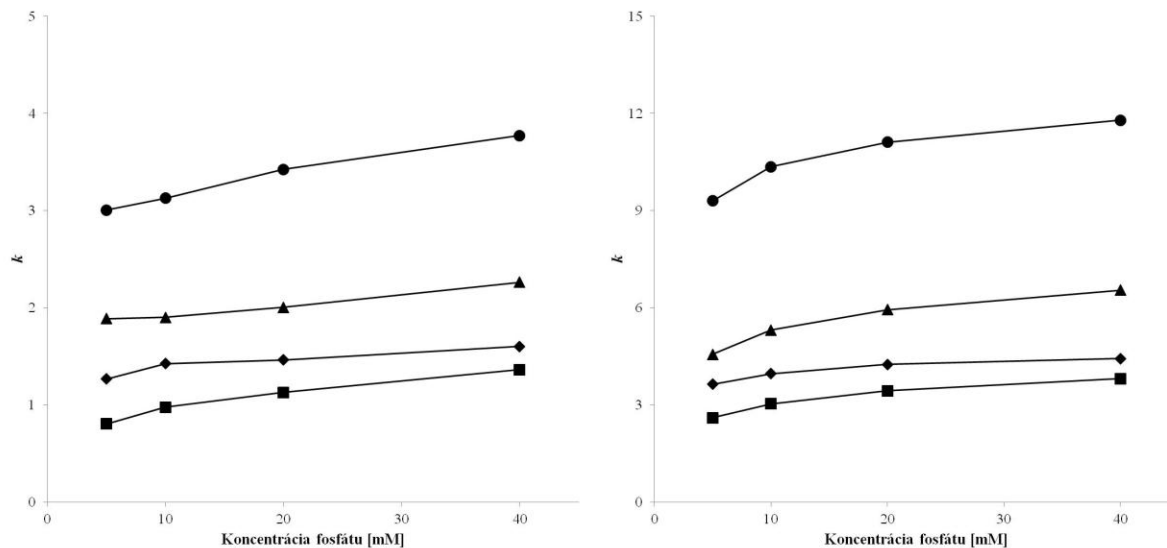
V skupine zásaditých látok bola na oboch kolónach matematickým vyjadrením grafickej závislosti retenčného faktoru a molárnej koncentrácie fosfátu klesajúca exponenciálna funkcia (t.j. lineárny záznam  $\log k - \log[\text{fosfát}]$ ). Korelačný koeficient na Zr-MS bol pre všetky anestetiká v intervale 0,9984 - 0,9987 (**Obr. 18**). Poznatok je zhodný s výsledkami dosiahnutými na Zr-PBD stacionárnej fáze v práci Hua *et al.* [52].

V prípade kyslých liečiv bola síce retencia ovplyvnená menej (**Obr. 19**), avšak vo vyšších koncentráciách fosforečnanu bolo preukázané výrazné zlepšenie tvaru pík. Vysvetlenie spočíva v tom, že príliš nízke množstvo fosforečnanu nie je schopné natoľko účinne zablokovat'  $\text{Zr}^{\text{IV}}$  kyseliny povrchu. Neobsadené atómy zirkónia sú potom atakované relatívne slabšími Lewisovými zásadami (napr. karboxylátmi), čo zhoršuje ich chromatografický proces a znižuje separačnú účinnosť. Na Zr-MS bolo takéto chovanie potlačené, i keď nie v plnej miere. V situáciách, keď je separácia karboxylových kyselín výhodnejšia v mobilnej fáze s nízkym obsahom Lewisovej zásady (fosforečnan, octan a ďalšie), môže byť výber Zr-MS kolóny lepším riešením než automatické použitie základnej reverznej stacionárnej fázy Zr-PBD.

**Obr. 18** - Vplyv koncentrácie fosfátu na retenciu zásad na Zr-PBD (vľavo) a Zr-MS (vpravo) kolóne. Podmienky: ACN - fosfát (25:75, v/v) (pH 5,5; 5 - 40 mM); UV 265 nm; 35 °C; 1 ml/min. Látky: prokaín ( $\diamond$ ), lidokaín ( $\square$ ), prilokaín ( $\Delta$ ), trimekaín ( $\circ$ ).



**Obr. 19** - Vplyv koncentrácie fosfátu na retenciu kyselín na Zr-PBD (vľavo) a Zr-MS (vpravo) kolóne. Podmienky rovnaké ako na Obr. 18, UV detekcia 230 nm. Látky: ibuprofén (◆), diklofenak (■), kyselina flufenámová (▲), kyselina meklofenámová (●).



### 6.3.3 Vplyv teploty

Používanie separačných teplôt nad obvyklé laboratórne štandardy je významnou pridanou hodnotou kolón odvodených od oxidov kovov. Zvýšené teploty zvyčajne vedú ku skráteniu doby analýzy, zlepšeniu separačnej účinnosti a často môžu mať priaznivý efekt aj z hľadiska selektivity. Bohužiaľ najvyššia teplota na kolóne Zr-MS je limitovaná na 50 °C z dôvodu chemickej úpravy zirkóniového povrchu molekulami „blokátora“ EDTPA. Kvôli tomuto citelnému obmedzeniu boli retenčné vlastnosti testovaných kolón skúmané v relatívne úzkom intervale 20 - 45 °C. Rovnako ako u predošlých experimentov bola zvýraznená podobnosť chovania oboch stacionárnych fáz (rovnicu priamky bola  $y = 1,050x + 0,44$ ;  $r = 0,9883$ ).

Výsledky regresnej analýzy získané z van't Hoffovej termodynamickéj rovnice sú predmetom **Tab. 11**. Retenčný proces v prípade karboxylových kyselín bol na oboch kolónach termodynamicky veľmi podobný, ale bazické látky vykazovali pod vplyvom teploty o niečo výraznejšie rozdiely najmarkantnejšie sa prejavujúce u prokaínu. Medzi kolónami boli preto pozorované mierne odchýlky v selektivite. Napríklad píky lidokaínu a flufenámovej kyseliny koeluovali na Zr-MS pri 20 °C, zatiaľ čo na Zr-PBD boli dobre separované. Ďalším príkladom bolo prehodenie elučného poradia lidokaínu a meklofenámovej kyseliny, ktoré na Zr-PBD

nastalo asi pri 35 °C, kým na Zr-MS obe látky nezmenili poradie až do teploty 45 °C. Zohľadňujúc namerané výsledky môžeme skonštatovať, že na selektivitu oboch stacionárnych fáz nemá korekcia teploty identický efekt, a že teda teplota môže byť užitočným nástrojom pri vývoji HPLC metód, predovšetkým v prípade analýzy vzoriek heterogénneho charakteru.

**Tab. 11** - Analýza smerníc [K] a úsekov vo van't Hoffových  $\ln k - 1000/T$  grafoch.

	PBD			MS		
	Smernica	Úsek	R	Smernica	Úsek	R
Guafenezín	1281,3	-5,96	0,9997	1292,6	-5,23	0,9996
Benzil	1963,5	-4,34	0,9998	2149,5	-3,99	0,9997
Metylparabén	1525,0	-6,01	0,9994	1680,4	-5,44	0,9998
Etylparabén	1528,7	-5,31	0,9996	1724,9	-4,88	0,9997
Propylparabén	1664,3	-4,98	0,9998	1894,8	-4,66	0,9997
Butylparabén	1869,3	-4,86	0,9998	2124,7	-4,62	0,9997
Ibuprofén	1980,4	-6,23	0,9992	2109,7	-5,59	0,9994
Diklofenak	2698,2	-8,78	0,9995	2741,1	-7,81	0,9980
Kyselina flufenámová	3189,7	-9,81	0,9997	3334,9	-9,16	0,9984
Kyselina meklofenámová	3157,1	-9,18	0,9998	3346,6	-8,60	0,9998
Prokaín	596,5	-1,43	0,9990	1224,9	-2,85	0,9992
Lidokaín	534,8	-0,63	0,9968	997,4	-1,19	0,9956
Prilokaín	871,8	-1,33	0,9975	1365,9	-1,63	0,9967
Trimekaín	739,4	-0,71	0,9987	1166,2	-1,08	0,9944

### 6.3.4 Vplyv typu Lewisovej zásady

Keďže primárnu úlohu v kontrole retencie karboxylových kyselín na  $ZrO_2$  hrá ligandová výmena, môže ľahko dochádzať k problémom spojeným s ich horšou separačnou efektívnosťou [54]. Výber správnej soli s vlastnosťami Lewisovej zásady býva dostatočne účinnou cestou ako sa dajú oslabiť nevítané interakcie zirkóniových atómov s karboxylovými skupinami analyzovaných molekúl.

Tieto soli sa medzi sebou odlišujú vo veľkosti molekuly ako aj intenzite náboja, ktorým je nabitý ich povrch. Odrazom ich rozličnej koordinačnej schopnosti s povrchom  $ZrO_2$  je následne aj rozličná miera dynamickej modifikácie aktívneho povrchu nedeaktivovanej stacionárnej fázy [34,44,59]. Rozhodli sme sa preto porovnať separačný výkon niekoľkých odlišných mobilných fáz obsahujúcich rôzne Lewisove zásady. Dosiahnuté chromatogramy sú prezentované na **Obr. 20** (kyseliny) a **Obr. 21** (zásady). Vyplyvajúca diskusia je rozdelená do dvoch sekcií podľa typu testovaných analytov.

### Kyseliny

Octan amónny rozpustený v mobilnej fáze nebol schopný dostatočne účinne zablockovať Lewisove kyseliny na Zr-PBD. Výsledkom bola nevydarená elúcia čo len jedného nesteroidného antiflogistika počas celej 40 minútovej analýzy. Použitím fluoridovej soli nebol na Zr-PBD dosiahnutý žiaden náznak rozdelenia ibuprofenu a diklofenaku, resp. kyseliny flufenámovej a meklofenámovej. Najlepší výkon preukázal fosfátový pufor, aj keď diklofenak a ibuprofen boli sčasti prekryté.

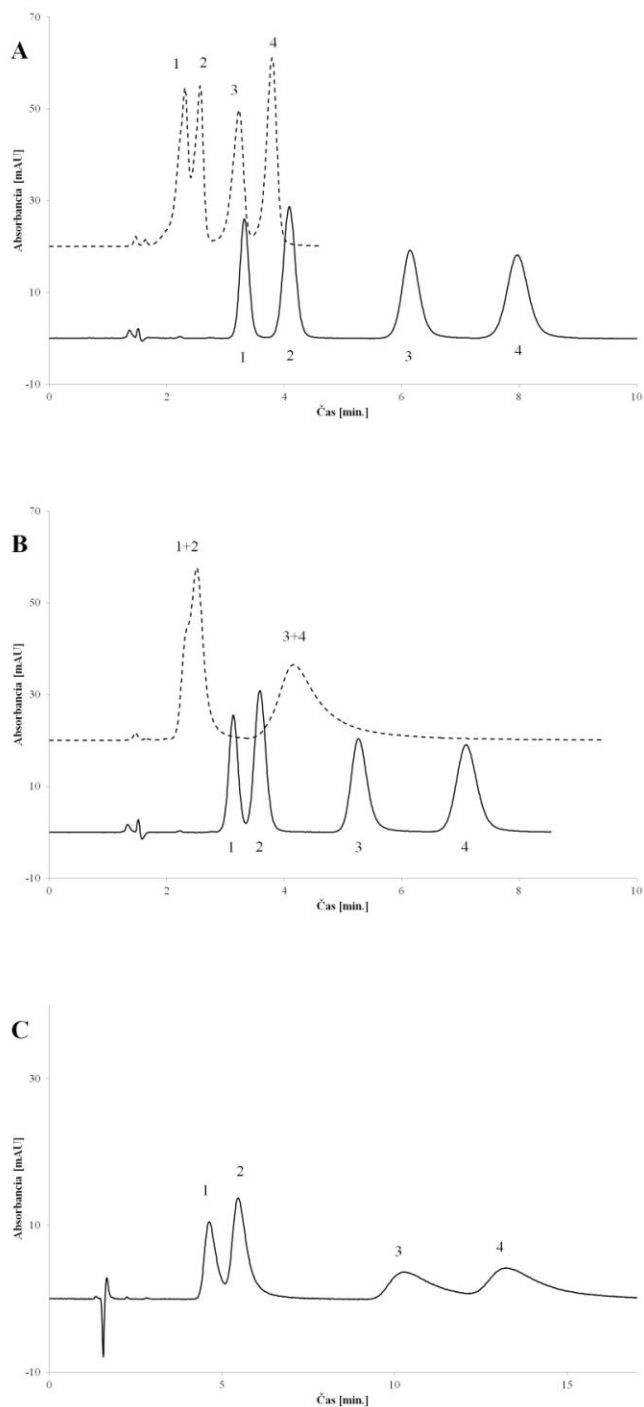
Vyššia hydrofobicita Zr-MS viedla na druhej strane k rozdeleniu diklofenaku a ibuprofenu až na základnú líniu. Nápadné zlepšenie separácie nastalo aj v eluente s fluoridom amónnym. Oba problematické páry píkov boli na Zr-MS natoľko oddelené, že dosiahnutá separácia bola zrovnateľná s chromatogramom fosforečnanu. Najdôležitejším zistením na Zr-MS kolóne bol výsledok analýzy použitím octanového eluentu, kedy bola dosiahnutá celkom prijateľná separácia kyselín. Porovnaním separačnej efektivity chromatografie na octane s fosforečnanom bol zistený výt'azok zhruba 50 % teoretických priehradiek u ibuprofenu a diklofenaku a iba 25 % pre obe kyseliny fénámové. Výsledok výrazne nižší než vo fosforečnane sa dá pripísať reziduálnej aktivite Lewisovych kyselín pretrvávajúcej aj navzdory chemickej úprave povrchu.

### Zásady

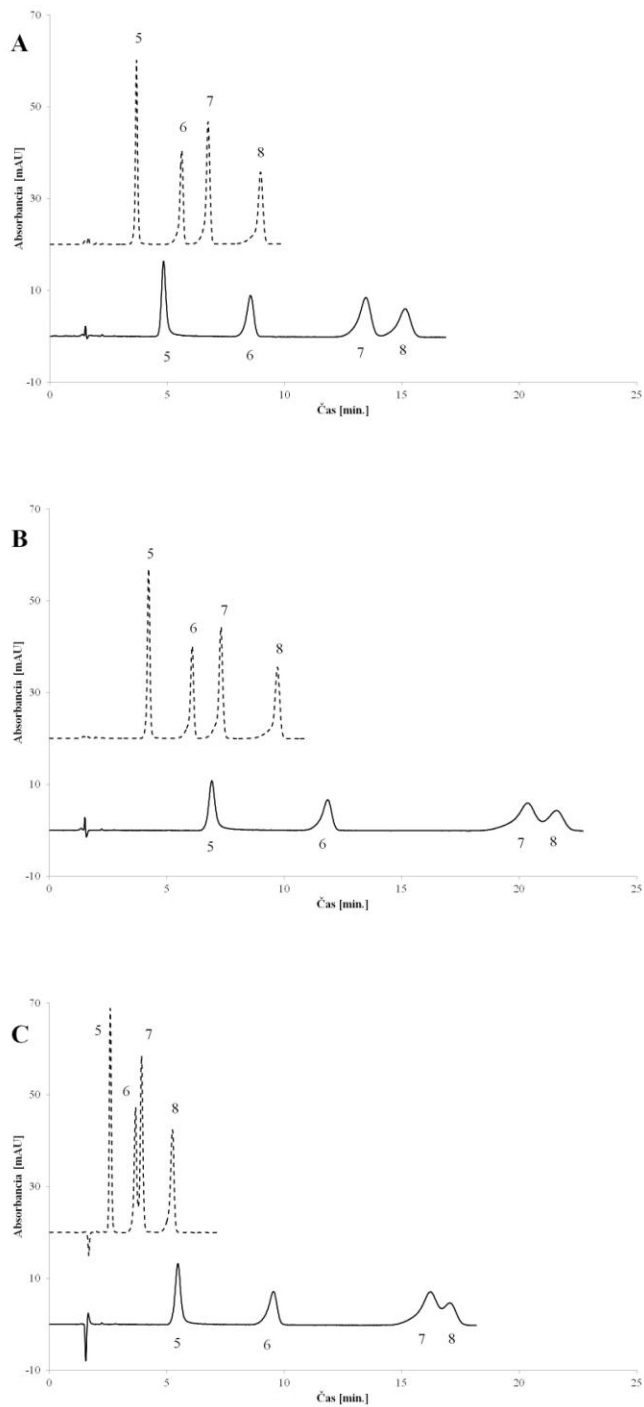
Vo všetkých troch mobilných fázach bola na Zr-PBD kolóne pozorovaná výborná separácia bazických látok. Najrýchlejšia analýza bola dosiahnutá v mobilnej fáze obsahujúcej octan amónny. Takýto výsledok je prejavom relatívne slabšieho záporného náboja na povrchu Zr-PBD dynamicky modifikovaného octanovými aniónmi.



**Obr. 20** - Chromatogramy kyselín na Zr-PBD (čiarkovaná linka) a Zr-MS kolóne za použitia fosfátu (A), fluoridu (B) a octanu (C). Podmienky: ACN - Lewisova zásada (20 mM; pH 6,5) (25:75, v/v); UV 230 nm; 35 °C, 1 ml/min. Látky: ibuprofén (1), diklofenak (2), kyselina flufenámová (3), kyselina meklofenámová (4).



**Obr. 21** - Chromatogramy zásad na Zr-PBD (čiarkovaná linka) a Zr-MS kolóne za použitia fosfátu (A), fluoridu (B) a octanu (C). Podmienky rovnaké ako na Obr. 20. Látky: prokaín (5), lidokaín (6), prilokaín (7), trimekaín (8).



Celkové trvanie analýz zásaditých látok vo fosforečnane aj octane na Zr-MS bolo viacej podobné, čo by mohlo dokazovať zablokovanie väčšiny Lewisových kyselín pomocou EDTPA. I napriek tomu sú v chromatogramoch viditeľné čiastočné rozdiely signalizujúce nie úplne efektívnu elimináciu populácie kyslých atómov  $Zr^{IV}$ , čo prispieva k určitému vplyvu typu Lewisovej zásady na separáciu na Zr-MS. Približne o 25 % vyššia retencia vo fluoride by mohla byť adresovaná malým rozmerom fluoridového aniónu. Vďaka lepšej priestupnosti k povrchu by fluorid mohol dodatočne zosilovať negatívny náboj stacionárnej fázy a vystupňovanými iónovými interakciami prispievať k vyššej retencii protonizovaných molekúl [59].

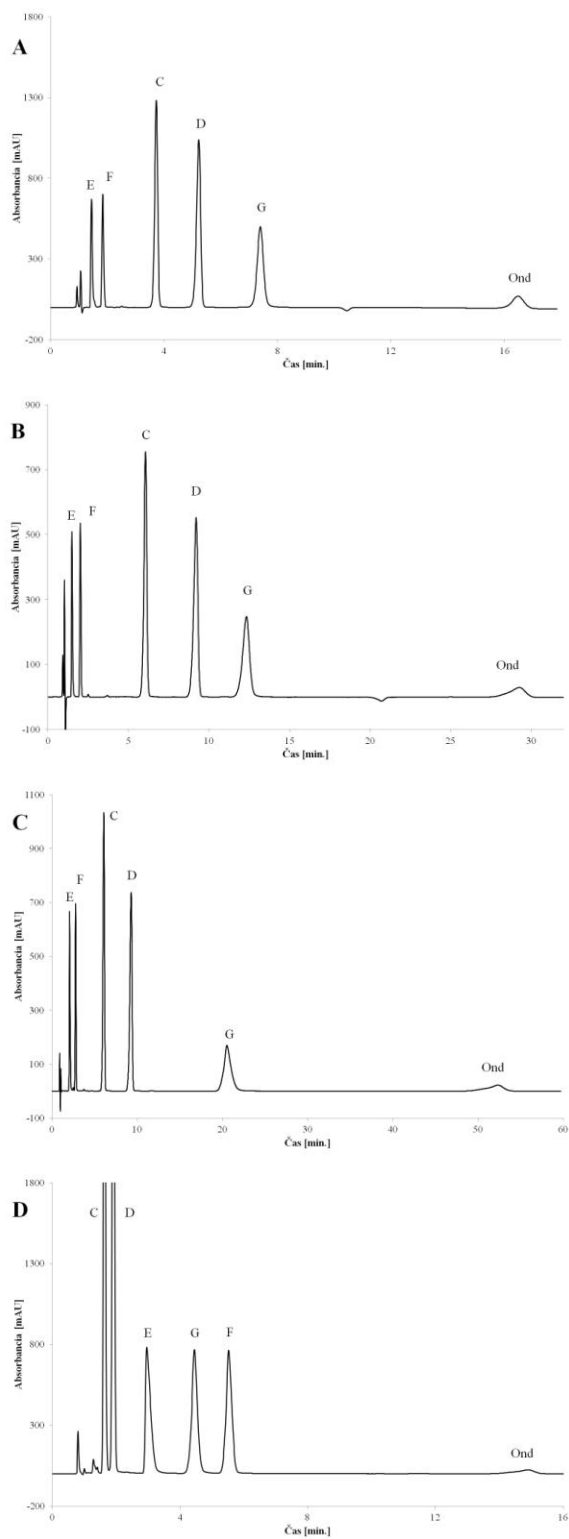
### 6.3.5 Separácia ondansetronu

Na základe predchádzajúcej skúsenosti so separáciou ondansetronu [111] a jeho piatich príbuzných látok (liekopisné nečistoty C, D, E, F a G [6]) bol demonštrovaný modelový transfer metódy z kolóny Zr-PBD na kolónu Zr-MS (**Obr. 22**), ktorý bol zacielený na zvýšenie citlivosti detekcie hodnotených nečistôt zapojením hmotnostného detektoru.

Optimálna separácia na Zr-PBD kolóne na **Obr. 22 A** bola nájdená v mobilnej fáze ACN - fosforečnan amónny (25 mM; pH 7) (18:82, v/v) [111]. Prejavom prevedenia metódy na deaktivovanú Zr-MS kolónu bolo pozorovanie dlhších retenčných časov, avšak za zachovania zhodnej selektivity (**Obr. 22 B**). Náhrada fosfátového aniónu octanom vyústila do ešte vyššej retencie ( $T_R$  ondansetronu 50 minút, **Obr. 22 C**). Sľubná izokratická separácia bola nájdená v mobilnej fáze ACN - octan amónny (5 mM; pH 7) (40:60, v/v) ako je vidieť na **Obr. 22 D**. Pokles iónovej sily a súčasne vyššie percento organickej zložky v eluente prospievajú účinnejšej ionizácii molekúl v iónovom zdroji hmotnostného spektrometru. Je možné si ďalej všimnúť okrem iného aj zmenu poradia eluovaných nečistôt.

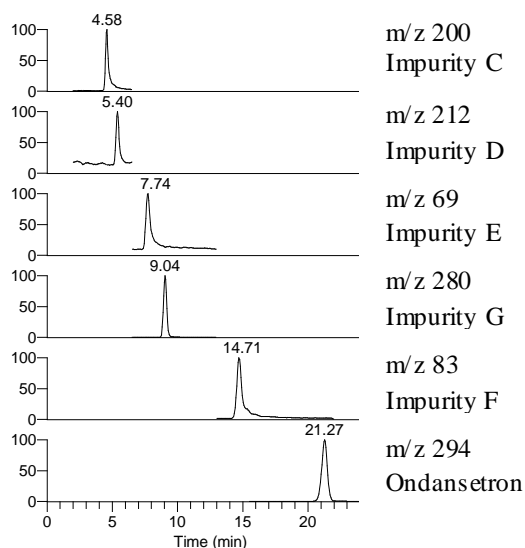
V ďalšej fáze prevodu metódy bolo nutné prietok mobilnej fázy zredukovať (v našom prípade na 0,5 ml/min), aby sa na rozhraní LC-MS zabezpečilo kompletne splnenie kvapalného eluentu. Na záver bola analýza urýchlená využitím nasledujúceho ACN gradientu: 0 - 4 min, 40 % ACN; 4 - 5 min; 40 → 50 % ACN; 5 - 21 min, 50 % ACN; 21 - 25 min, 50 → 40 % ACN; 25 - 27 min, 40 % ACN.

**Obr. 22** - Separácia ondansetronu a piatich liekopisných nečistôt za chromatografických podmienok: UV 216 nm, 40 °C, 1,5 ml/min. Stacionárne a mobilné fázy sú uvedené v texte.



V rámci HPLC-MS analýzy boli preverené obe dostupné ionizačné techniky (ESI, APCI) a mobilné fázy obsahujúce ACN i MeOH, tak aby bola vybraná tá najcitlivejšia LC-MS metóda. Boli optimalizované všetky bežné MS nastavenia. Metanolová mobilná fáza poskytla oproti ACN nepatrne nižšiu citlivosť detekcie pre všetky hodnotené látky. Ionizácia ESI viedla k nárastu citlivosti detekcie oproti APCI, hlavne pre nečistotu D. Najlepšie sa teda javila kombinácia HPLC-ESI-MS, ktorou bola vykonaná analýza modelového roztoku ondansetronu (**Obr. 23**). Detekčná citlivosť narástla minimálne 12-krát (nečistota D) a pre nečistotu G dokonca až 100-krát. Detekčné limity všetkých nečistôt klesli pod 10 ng/ml (**Tab. 12**).

**Obr. 23** - Gradientová HPLC-ESI-MS analýza ondansetronu a piatich liekopisných nečistôt na Zr-MS kolóne za optimálnych HPLC podmienok. Iniciálne podmienky: ACN - octan (5 mM; pH 7) (40:60, v/v); 40 °C; 0,5 ml/min. Gradient ACN: 0 - 4 min, 40 %; 4 - 5 min; 40 → 50 %; 5 - 21 min, 50 %; 21 - 25 min, 50 → 40 %; 25 - 27 min, 40 %. Parametre ESI: napätie +2 kV; teplota kapiláry 300 °C.



**Tab. 12** - Porovnanie detekčných limitov [ng/ml] liekopisných nečistôt ondansetronu.

Nečistota	Zr-PBD	Zr-MS	Zr-MS
	UV 216 nm	UV 216 nm	MS detekcia
	Fosfát 25 mM	Octan 5 mM	Octan 5 mM
C	70	50	2

D	85	60	5
E	105	190	9
F	105	150	5
G	115	110	1

## 6.4 ZÁVER

V tejto práci bolo porovnané retenčné chovanie rôznych typov farmaceuticky významných látok na deaktivovanej polybutadiénovej zirkóniovej fáze s obvyklou stacionárnou fázou Zr-PBD. Toto porovnanie zirkóniových kolón by mohlo byť nápomocné počas vývoja metód na Zr-MS alebo pri transfere metód zo Zr-PBD na Zr-MS. Vykonané experimenty poukázali len na menšie rozdiely v selektivite oboch študovaných fáz dôsledkom zmien chromatografických podmienok.

Hlavným rozdielom bola v priemere 2,5-krát vyššia hydrofobicita Zr-MS kolóny než bolo pozorované na Zr-PBD. Vyššia retenčná schopnosť Zr-MS fázy by mohla byť s výhodou využitá v praxi napr. v prípade analýzy polárnych látok, ktorým menej hydrofóbny povrch Zr-PBD fázy nedokáže poskytnúť dostatočnú retenciu. Táto vlastnosť taktiež dovoľuje do mobilnej fázy použiť vyšší obsah organického rozpúšťadla, čím sa zlepšuje citlivosť prípadnej MS detekcie.

Úlohou EDTPA je blokovat' nežiaduce silné interakcie Lewisova kyselina - Lewisova zásada a tak umožniť analýzu Lewisových zásad, hoci je v eluente použité aditívum s vlastnosťami slabej Lewisovej zásady. Pri použití rôznych typov Lewisových zásad boli pre kyslé aj zásadité látky pozorované určité variácie v retencii a selektivite (**Obr. 20, Obr. 21**). Retenčná príbuznosť oboch stacionárnych fáz bola v celej štúdií veľmi blízka iba s niekoľkými rozdielmi - časť z nich bola reprezentovaná prokaínom. Za rovnakých podmienok sú vlastnosti Zr-MS a Zr-PBD podobné, nie však identické, a to robí novú stacionárnou fázou zaujímavou aj v klasickej HPLC-UV chromatografii. Tienistou stránkou poklesu aktivity  $Zr^{IV}$  kyselín na Zr-MS oproti parentnej Zr-PBD fáze je negatívny vplyv na pH stabilitu (1 - 10) a teplotnú odolnosť (max. 50 °C) materiálu.

## **7 ZÁVER**

---

Hlavnou náplňou tejto dizertačnej práce s názvom „Vyžitie alternatívnych stacionárnych fáz vo farmaceutickej analýze“ bolo štúdium retenčných a separačných vlastností vybraných stacionárnych fáz odvođených od oxidu zirkoničitého. Chromatografické chovanie zirkóniových fáz bolo skúmané systematicky z hľadiska charakteru stacionárnej fázy a vplyvu zmien zloženia mobilnej fázy (typ a obsah organickej zložky, typ, pH a koncentrácia pufru) ako aj teploty na výslednú separáciu. Na základe jednotlivých výsledkov bol posúdený význam a aplikovateľnosť v rutinej analyticko-farmaceutickej praxi.

Výsledky dosiahnuté v dizertačnej práci je možné zhrnúť podľa jednotlivých experimentálnych oddielov do nasledujúcich záverov:

1. V práci č.1 bola vyvinutá principiálne nová izokratická HPLC metóda k hodnoteniu liekopisnej nečistoty F v substancii ibuprofenu s limitom detekcie na úrovni 2,3 % prípustného obsahu. Nová metóda splnila test spôsobilosti (podľa Ph. Eur.) spočívajúci v dostatočnej separácii hlavného píku a nečistoty B. Bolo demonštrované, že Zr-CARB kolóna je obzvlášť užitočná pri separáciách analytov, ktoré sa navzájom odlišujú iba v nepatrnom usporiadaní atómov. Metóda sa na základe validácie javí byť vhodnou k rutinnému hodnoteniu obsahu liekopisnej nečistoty F v substancii ibuprofenu.
2. V práci č.2 bola demonštrovaná schopnosť hydrofóbnej Zr-CARB kolóny zadržiavať polárne látky v HILIC podmienkach. Výsledná retencia mala multimodálny charakter s rôznym zastúpením jednotlivých interakčných mechanizmov (ligandová výmena, hydrofilné a hydrofóbne interakcie) v závislosti na type analytu. Zr-CARB kolóna preukázala oproti obom porovnávacím fázam Zr-PBD a čistému ZrO<sub>2</sub> odlišné retenčné chovanie pre karboxylové kyseliny a xantíny. Za HILIC podmienok boli u xantínov pozorované dominantné interakcie s uhlíkovou vrstvou Zr-CARB fázy, zatiaľ čo na fáze obsahujúcej čistý ZrO<sub>2</sub> mala preferenčné miesto ligandová výmena. Spôsobilosť k ligandovej výmene je pravdepodobne veľmi dôležitým faktorom umožňujúcim látkam interagovať v zmysle HILIC princípov. Výsledky naznačujú, že aj modifikované reverzné stacionárne fázy na báze ZrO<sub>2</sub> môžu byť výhodne použité v HILIC chromatografii farmaceuticky významných látok.



- 
3. V práci č. 3 bolo porovnané retenčné chovanie chemicky heterogénneho spektra látok na Zr-MS fáze vyznačujúcej sa deaktiváciou zirkóniových Lewisových kyselín na povrchu s nedeaktivovanou stacionárnou fázou Zr-PBD. Hydrofobicita Zr-MS kolóny bola 2,5-krát vyššia než v prípade Zr-PBD, čo umožňuje použiť eluent s vyšším obsahom organickej zložky, a tým dosiahnuť lepšiu citlivosť MS detekcie. Retenčná príbuznosť a selektivita oboch stacionárnych fáz bola v celej štúdii veľmi blízka, ale i tak boli pozorované drobné odchýlky. Uvedené detailné porovnanie dvoch zirkóniových kolón by mohlo byť nápomocné počas vývoja metód na Zr-MS kolóne alebo pri transfere metód zo Zr-PBD na Zr-MS za účelom MS detekcie. Do úvahy je však potrebné vziať horšiu teplotnú (max. 50 °C) a chemickú odolnosť (pH 1 - 10) Zr-MS stacionárnej fázy.

## 8 ABSTRAKT

Vysoká škola	Univerzita Karlova v Praze
Fakulta	Farmaceutická fakulta v Hradci Králové
Katedra	Katedra farmaceutické chemie a kontroly léčiv
Kandidát	Mgr. Peter Kalafut
Školiteľ	Prof. RNDr. Jiří Klimeš, CSc.
Názov dizertačnej práce	Možnosti využitia alternatívnych stacionárnych fáz vo farmaceutickej analýze

---

Významne postavenie v oblasti HPLC si popri silikagélových stacionárnych fázach vydobyli chromatografické nosiče na báze oxidu zirkoničitého. Do povedomia odbornej verejnosti sa dostali hlavne vďaka výhodným vlastnostiam (všestranná odolnosť voči pôsobeniu mobilných fáz a vysokej teploty) a odlišnej selektivity oproti konkurenčným materiálom.

Teoretická časť dizertačnej práce podáva stručný prehľad základov kvapalinovej chromatografie a popisuje modernú inštrumentáciu. Dôležitou časťou je literárna rešerš zaoberajúca sa detailne vlastnosťami zirkóniových stacionárnych fáz a následnými aplikáciami v analytickej praxi.

Jadrom práce je experimentálna časť, ktorá sa zaoberá štúdiom chromatografického chovania vybraných typov zirkóniových stacionárnych fáz a potenciálnym využitím v HPLC analýze s dôrazom na farmaceuticko-analytickú prax. Chromatografické chovanie je popísané z hľadiska vplyvu zmien zloženia mobilnej fázy (typ a obsah organickej zložky, typ, pH a koncentrácia pufru) a teploty na výslednú separáciu.

Experimentálna časť dizertačnej práce je rozdelená do troch samostatných oddielov. Náplňou prvej práce je inovatívny prístup k analýze kyseliny 3-[4-(2-metylpropyl)fenyl]propánovej ako liekopisnej nečistoty F ibuprofenu na uhlíkom potiahnutej zirkóniovej stacionárnej fáze. V tejto časti bola vyvinutá a zvalidovaná HPLC metóda k hodnoteniu liekopisnej nečistoty F v substancii ibuprofenu s limitom detekcie na úrovni 2,3 % prípustného obsahu. Druhá práca skúma vplyv uhlíkovej vrstvy deponovanej na zirkóniový

povrch na retenciu polárnych analytov vo vysoko organickej mobilnej fáze. V tejto časti bola demonštrovaná schopnosť hydrofóbnej Zr-CARB kolóny prostredníctvom multimodálneho retenčného mechanizmu zadržiavať polárne látky v HILIC podmienkach. V poslednej práci je predmetom štúdia retenčné chovanie kyslých, zásaditých a neutrálnych farmaceuticky významných látok na deaktivovanej polybutadiénovej zirkóniovej fáze. Na základe porovnania s obdobnou polybutadiénovou kolónou, ktorej povrch nebol nijak chemicky upravený, bola zistená asi 2,5-krát vyššia hydrofobicita deaktivovanej stacionárnej fázy a mierny vplyv na selektivitu separácie.

## 9 ABSTRACT

University	Charles University in Prague
Faculty	Faculty of Pharmacy in Hradec Králové
Department	Department of Pharmaceutical Chemistry and Drug Control
Candidate	Mgr. Peter Kalafut
Supervisor	Prof. RNDr. Jiří Klimeš, CSc.
Title of Doctoral Thesis	The possibilities of utilization of alternative stationary phases in pharmaceutical analysis.

---

The significance of metal-based HPLC stationary phases, mainly the zirconia, has arisen, recently. Zirconia-based phases came in the awareness of professional community mainly thanks to the versatile stability in different mobile phases and high temperatures as well as to the ability to provide very different selectivity as compared to common silica concurents.

The theoretical part of this doctoral thesis provides general overview of liquid chromatography and also describes the recent instrumentation. The main part is devoted to a bibliographic search dealing in detail with the properties of zirconia-based stationary phases and consequent applications in the analytical practice.

The fundamental of this thesis is represented by the experimental part, which studies the chromatographic behaviour of some chosen types of zirconia-based stationary phases and their potential use in HPLC analysis emphasizing especially on the pharmaceutical-analytical practice. The chromatographic behaviour is described from the viewpoint of the influence of changes in the mobile phase composition (the type and amount of organic solvent, the type, pH and concentration of a buffer) as well as the temperature on the resulting separation.

The experimental part of this doctoral thesis is divided into three individual sections. The title of the first experimental work is „An innovative approach to the analysis of 3-[4-(2-methylpropyl)phenyl]propanoic acid as an impurity of ibuprofen on a carbon-coated zirconia stationary phase“. Herein, a new HPLC method for the determination of the pharmacopoeial impurity F of ibuprofen was developed and validated showing the limit of detection at 2.3 % of

the admissible amount. The second paper is entitled „The influence of a carbon layer deposited on a zirconia surface on the retention of polar analytes in an organic rich mobile phase“. In this work the ability of hydrophobic Zr-CARB column to retain through multimodal retention mechanism some polar compounds under HILIC conditions was demonstrated. The title of the last experimental chapter is „The retention behavior of acidic, basic and neutral pharmaceuticals on the deactivated polybutadiene zirconia phase“. Based on the comparison with undeactivated polybutadiene zirconia phase, approx. 2.5-fold higher hydrophobicity of deactivated stationary phase was established and also small impact on the selectivity of a separation was observed.

# 10 ZOZNAM ODBORNÝCH PUBLIKÁCIÍ

## 10.1 Publikácie v impaktovaných časopisoch

- P. Kalafut, R. Kučera, J. Klimeš, J. Sochor. An innovative approach to the analysis of 3-[4-(2-methylpropyl)-phenyl]propanoic acid as an impurity of ibuprofen on a carbon-coated zirconia stationary phase.
  - *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 49 (2009) 1150-1156  
(Príloha I, str. 141)  
**IF = 2,453**
- P. Kalafut, R. Kučera, J. Klimeš. The influence of a carbon layer deposited on a zirconia surface on the retention of polar analytes in an organic rich mobile phase.
  - *Journal of Chromatography A*, 1232 (2012) 242-247  
(Príloha II, str. 149)  
**IF = 4,194**
- P. Kalafut, R. Kučera, J. Klimeš. The retention behavior of acidic, basic and neutral pharmaceuticals on the deactivated polybutadiene zirconia phase.
  - *Current Analytical Chemistry*, 8 (2012) 574-582  
(Príloha III, str. 156)  
**IF = 1,000**

## 10.2 Abstrakty uvedené v zborníkoch

- P. Kalafut, R. Kučera, J. Klimeš. Inovativní přístup k analýze ibuprofenu. 37. konferencia *Syntéza a analýza léčiv*, 8. - 10. 9. 2008, Brno (Česká republika).
- P. Kalafut, R. Kučera, J. Klimeš. Stanovenie kurkuminoïdov s využitím HPLC. 38. konferencia *Syntéza a analýza léčiv*, 14. - 16. 9. 2009, Hradec Králové (Česká republika).

- P. Kalafut, R. Kučera, J. Klimeš, B. Bíba. Possibilities of employment of zirconia-based stationary phases in drug analysis. *Advances in Chromatography and Electrophoresis & Chiranal*, 8. - 11. 2. 2010, Olomouc (Česká republika).
- P. Kalafut, R. Kučera, J. Klimeš. Retenčné chovanie zirkóniovej stacionárnej fázy s deaktivovaným povrchom. *39. konferencia Syntéza a analýza liečiv*, 2. - 4. 9. 2010, Modra-Harmónia (Slovensko).
- P. Kalafut, R. Kučera, J. Klimeš. Description of HILIC properties of hydrophobic carbon-coated zirconia reversed-phase stationary phase. *HPLC 2011*, 19. - 23. 6. 2011, Budapešť (Maďarsko).
- P. Kalafut, R. Kučera, J. Klimeš, B. Bíba. The use of sub-2 $\mu$ m zirconia-based stationary phase in the drug analysis. *40. konferencia Syntéza a analýza liečiv*, 12. - 14. 9. 2011, Brno (Česká republika).

### **10.3 Prednášky**

- P. Kalafut, R. Kučera, J. Klimeš. Možnosti využítí stacionárních fází na bázi oxidu zirkoničitého ve farmaceutické analýze. *Zjazd chemických spoločností*, 7. - 11. 9. 2009, Vysoké Tatry (Slovensko).

# 11 ZOZNAM POUŽITEJ LITERATURY

- [1] Y. Kazakevich, R. LoBrutto; HPLC for pharmaceutical scientists; John Wiley & Sons, Hoboken (2007).
- [2] HPLC - High performance liquid chromatography; What is HPLC? [On-line] (cit. 2. 10. 2012) Dostupné z: [http://www.waters.com/waters/nav.htm?cid=10048919&locale=en\\_CZ](http://www.waters.com/waters/nav.htm?cid=10048919&locale=en_CZ)
- [3] L.R. Snyder, J.J. Kirkland, J.W. Dolan; Introduction to modern liquid chromatography, 3<sup>rd</sup> ed.; John Wiley & Sons, Hoboken (2009).
- [4] HPLC 2011. 36<sup>th</sup> International Symposium on high-performance liquid phase separations and related techniques - Csaba Horváth Award; Budapest 19. - 23. 6. 2011.
- [5] J. Klimeš a kol.; Kontrolně-analytické hodnocení léčiv lékopisnými metodami; Nucleus HK, Hradec Králové (2011).
- [6] The European Pharmacopoeia, 7<sup>th</sup> ed.; Council of Europe, Directorate for the Quality of Medicines, Strasbourg (2011).
- [7] Proceedings of the United States Pharmacopoeia XXXV; The United States Pharmacopoeial Convention, Rockville (2012).
- [8] Teorie HPLC; Základní charakteristiky chromatografického procesu [On-line] (cit. 2. 10. 2012) Dostupné z: <http://www.hplc.cz/Teorie/uvod.html>
- [9] D. Sýkora, E. Tesařová, M. Vosmanská, M. Zvolánková; Moderní stacionární fáze pro RP-HPLC, *Chem. Listy* 101 (2007) 190-199.
- [10] Sigma-Aldrich; Fused core columns technology [On-line] (cit. 28. 10. 2012) Dostupné z: <http://www.sigmaaldrich.com/analytical-chromatography/hplc/columns/ascentis-express/fused-core-advantage.html>
- [11] H. Kobayashi, T. Ikegami, H. Kimura, T. Hara, D. Tokuda, N. Tanaka; Properties of monolithic silica columns for HPLC, *Anal. Sci.* 22 (2006) 491-501.
- [12] G. Guiochon; Monolithic columns in high-performance liquid chromatography, *J. Chromatogr. A* 1168 (2007) 101-168.
- [13] K.K. Unger, R. Skudas, M.M. Schulte; Particle packed columns and monolithic columns in high-performance liquid chromatography - comparison and critical appraisal, *J. Chromatogr. A* 1184 (2008) 393-415.
- [14] Y.F. Cheng, T.H. Walter, Z.L. Lu, P. Iraneta, B.A. Alden, C. Gendreau, U.D. Neue, J.M. Grassi, J.L. Carmody, J.E. O'Gara, R.P. Fisk; Hybrid organic-inorganic particle technology: breaking through traditional barriers of HPLC separations, *LCGC North America* 18 (2000) 1162-1172.
- [15] K.D. Wyndham, J.E. O'Gara, T.H. Walter, K.H. Glöse, N.L. Lawrence, B.A. Alden, G.S. Izzo, C.J. Hudalla, P.C. Iraneta; Characterization and evaluation of C<sub>18</sub> HPLC stationary phases based on ethyl-bridged hybrid organic/inorganic particles, *Anal. Chem.* 75 (2003) 6781-6788.
- [16] P. Ross; The role of porous graphitic carbon in HPLC, *LCGC Europe* 13 (2000) 310-319.



- [17] S. Ahuja; Chiral separation methods for pharmaceutical and biotechnological products; John Wiley & Sons, Hoboken (2011).
- [18] Thermo Scientific; How electrochemical detection for HPLC works? [On-line] (cit. 3. 10. 2012) Dostupné z: [http://www.esainc.com/resources/Detector\\_tech/How\\_EC\\_works](http://www.esainc.com/resources/Detector_tech/How_EC_works)
- [19] Waters; Waters 432 conductivity detector; operator's guide [On-line] (cit. 3. 10. 2012) Dostupné z: <http://www.waters.com/webassets/cms/support/docs/71500043202rb.pdf>
- [20] Teorie HPLC; ELSD - detektor [On-line] (cit. 3. 10. 2012) Dostupné z: <http://www.hplc.cz/Teorie/ELSD.html>
- [21] Development of a new universal HPLC: the corona CAD [On-line] (cit. 3. 10. 2012) Dostupné z: <http://www.cyberlipid.org/carona.pdf>
- [22] R.E. Ardrey; Liquid chromatography - Mass spectrometry: An introduction; Wiley & Sons, New York (2003).
- [23] J.S. Fritz, D.T. Gjerde; Ion Chromatography, 4<sup>th</sup> ed; Wiley-VCH, Weinheim (2009).
- [24] J. Pesek, M.T. Matyska; A comparison of two separation modes: HILIC and aqueous normal phase chromatography, *LCGC North America* 25 (2007) 480-490.
- [25] A.J. Alpert; Hydrophilic-interaction chromatography for separation of peptides, nucleic acids and other polar compounds, *J. Chromatogr.* 499 (1990) 177-196.
- [26] P. Hemström, K. Irgum; Hydrophilic interaction chromatography, *J. Sep. Sci.* 29 (2006) 1784-1821.
- [27] P. Jandera; Stationary and mobile phases in hydrophilic interaction chromatography, *Anal. Chim. Acta* 692 (2011) 1-25.
- [28] Shimadzu; Nexera - Ultra high performance liquid chromatograph [On-line] (cit. 28. 10. 2012) Dostupné z: <http://www.shimadzu.com/nexera/performance.html>
- [29] S. Fekete, E. Oláh, J. Fekete; Fast liquid chromatography: the domination of core-shell and very fine particles, *J. Chromatogr. A* 1228 (2012) 57-71.
- [30] S.A.C Wren, P. Tchelitcheff; Use of ultra-performance liquid chromatography in pharmaceutical development, *J. Chromatogr. A* 1119 (2006) 140-146.
- [31] Y. Wang, F. Ai, S.C. Ng, T.T.Y. Tan; Sub-2  $\mu\text{m}$  porous silica materials for enhanced separation performance in liquid chromatography, *J. Chromatogr. A* 1228 (2012) 99-109.
- [32] F. Gritti, G. Guiochon; Measurement of the axial and radial temperature profiles of a chromatographic columns: influence of thermal insulation on column efficiency, *J. Chromatogr. A* 1138 (2007) 141-157.
- [33] F. Ai, L. Li, S.C. Ng, T.T. Tan; Sub-1-micron mesoporous silica particles functionalized with cyclodextrin derivative for rapid enantioseparations on ultra-high pressure liquid chromatography, *J. Chromatogr. A* 1217 (2010) 7502-7506.
- [34] J. Nawrocki, C. Dunlap, A. McCormick, P.W. Carr; Part I. Chromatography using ultra-stable metal oxide-based stationary phases for HPLC, *J. Chromatogr. A* 1028 (2004) 1-30.
- [35] G. Schomburg; Polymer coating of surfaces in column liquid chromatography and capillary electrophoresis, *Trends Anal. Chem.* 10 (1991) 163-169.

- [36] D.V. McCalley; Effect of temperature and flow-rate on analysis of basic compounds in high-performance liquid chromatography using a reversed-phase column, *J. Chromatogr. A* 902 (2000) 311-320.
- [37] J.J. Pesek, M.T. Matyska; Modified aluminas as chromatographic supports for high-performance liquid chromatography, *J. Chromatogr. A* 952 (2002) 1-11.
- [38] Y. Akama, H. Kanno; Liquid chromatographic separation of polycyclic aromatic hydrocarbons with cerium (IV) oxide as packing material, *Anal. Chim. Acta* 309 (1995) 153-156.
- [39] Y. Akama; Use of cerium oxide (CeO<sub>2</sub>) as a packing material for the chromatographic separation of C<sub>60</sub> and C<sub>70</sub> fullerenes, *Talanta* 42 (1995) 1943-1946.
- [40] D.C. Hoth, J.G. Rivera, L.A. Colón; Metal oxide monolithic columns, *J. Chromatogr. A* 1079 (2005) 392-396.
- [41] M. Grün, A.A. Kurganov, S. Schacht, F. Schüth, K.K. Unger; Comparison of an ordered mesoporous aluminosilicate, silica, alumina, titania and zirconia in normal-phase high-performance liquid chromatography, *J. Chromatogr. A* 740 (1996) 1-9.
- [42] ZirChrom Separations; E-Newsletter Vol. 10 [On-line] (cit. 17. 10. 2012) Dostupné z: <http://www.zirchrom.com/pdf/news10.pdf>
- [43] ZirChrom Separations; Why should I use a zirconia-based HPLC column? [On-line] (cit. 9. 10. 2012) Dostupné z: <http://www.zirchrom.com/Compare.asp>
- [44] J. Nawrocki, M.P. Rigney, A. McCormick, P.W. Carr; Chemistry of zirconia and its use in chromatography, *J. Chromatogr. A* 657 (1993) 229-282.
- [45] ZirChrom Separations; Packed columns [On-line] (cit. 9. 10. 2012) Dostupné z: <http://zirchrom.com/columns.asp>
- [46] Sigma-Aldrich; Discovery HPLC columns [On-line] (cit. 9. 10. 2012) Dostupné z: <http://www.sigmaaldrich.com/analytical-chromatography/hplc/columns/discovery-hplc.html>
- [47] ZirChrom Separations; Sachtopore® HPLC columns [On-line] (cit. 9. 10. 2012) Dostupné z: <http://zirchrom.com/Sachtopore.asp>
- [48] J. Nawrocki, C. Dunlap, J. Li, J. Zhao, C.V. McNeff, A. McCormick, P.W. Carr; Part II. Chromatography using ultra-stable metal oxide-based stationary phases for HPLC, *J. Chromatogr. A* 1028 (2004) 31-62.
- [49] J. Li, P.W. Carr; Retention characteristics of polybutadiene-coated zirconia and comparison to conventional bonded phases, *Anal. Chem.* 68 (1996) 2857-2868.
- [50] J. Dai, X. Yang, P.W. Carr; Comparison of the chromatography of octadecyl silane bonded silica and polybutadiene-coated zirconia phases based on a diverse set of cationic drugs, *J. Chromatogr. A* 1005 (2003) 63-82.
- [51] M.P. Rigney, E.F. Funkenbusch, P.W. Carr; Physical and chemical characterization of microporous zirconia, *J. Chromatogr.* 499 (1990) 291-304.
- [52] Y. Hu, X. Yang, P.W. Carr; Mixed-mode reversed-phase and ion-exchange separations of cationic compounds on polybutadiene-coated zirconia, *J. Chromatogr. A* 968 (2002) 17-29.
- [53] M.P. Rigney, T.P. Weber, P.W. Carr; Preparation and evaluation of a polymer-coated zirconia reversed-phase chromatographic support, *J. Chromatogr.* 484 (1989) 273-291.

- [54] J.A. Blackwell, P.W. Carr; The role of Lewis acid-base processes in ligand-exchange chromatography of benzoic acid derivatives on zirconium oxide, *Anal. Chem.* 64 (1992) 853-863.
- [55] J.A. Blackwell, P.W. Carr; Development of an eluotropic series for the chromatography of Lewis bases on zirconium oxide, *Anal. Chem.* 64 (1992) 863-873.
- [56] J.A. Blackwell, P.W. Carr; Ion- and ligand-exchange chromatography of proteins using porous zirconium supports in organic and inorganic Lewis base eluents, *J. Chromatogr.* 596 (1992) 27-41
- [57] L. Sun, P.W. Carr; Mixed-mode retention of peptides on phosphate-modified polybutadiene-coated zirconia, *Anal. Chem.* 67 (1995) 2517-2523.
- [58] J.A. Blackwell, P.W. Carr; Fluoride-modified zirconium oxide as a biocompatible stationary phase for high-performance liquid chromatography, *J. Chromatogr.* 549 (1991) 59-75.
- [59] Y. Hu, P.W. Carr; The special effect of fluoride on the chromatography of acidic analytes on polybutadiene-coated zirconia, *Chromatographia* 56 (2002) 439-444.
- [60] C. Ovens, D. Sievwright, A.J. Silcock; Unusual retention behaviour of 4-substituted piperidines on polybutadiene and polystyrene coated zirconia by comparison to reverse phase silica, *J. Chromatogr. A* 1137 (2006) 56-62.
- [61] C. McNeff, L. Zigan, K. Johnson, P.W. Carr, A. Wang, A.M. Weber-Main; Analytical advantages of highly stable stationary phases for reversed-phase LC, *LC-GC* 18 (2000) 515-529.
- [62] U. Trüdinger, G. Müller, K.K. Unger; Porous zirconia and titania as packing materials for high-performance liquid chromatography, *J. Chromatogr.* 535 (1990) 111-125.
- [63] L. Sun, M.J. Annen, F. Lorenzano-Porras, P.W. Carr, A.V. McCormick; Synthesis of porous zirconia spheres for HPLC by polymerization-induced colloid aggregation (PICA), *J. Colloid Interface Sci.* 163 (1994) 464-473
- [64] Y. Xiang, B. Yan, C.V. McNeff, P.W. Carr, M.L. Lee; Synthesis of micron diameter polybutadiene-encapsulated non-porous zirconia particles for ultrahigh pressure liquid chromatography, *J. Chromatogr. A* 1002 (2003) 71-78.
- [65] M.J. Xie, Y.Q. Feng, S.L. Da; Capillary electrophoresis using zirconia-coated fused silica capillaries, *J. Sep. Sci.* 24 (2001) 62-66.
- [66] M. Crosnier de Bellaistre, O. Mathieu, J. Randon, J.L. Rocca; Control of electroosmotic flow in zirconia-coated capillaries, *J. Chromatogr. A* 971 (2002) 199-205.
- [67] Z.G. Shi, Y.Q. Feng, L. Xu, M. Zhang, S.L. Da; Preparation and evaluation of zirconia-coated monolith for capillary electrochromatography, *Talanta* 63 (2004) 593-598.
- [68] J. Randon, S. Huguet, A. Piram, G. Puy, C. Demesmay, J.L. Rocca; Synthesis of zirconia monoliths for chromatographic separations, *J. Chromatogr. A* 1109 (2006) 19-25.
- [69] S.D. Chambers, M.T. McDermott, C.A. Lucy; Covalently modified graphitic carbon-based stationary phases for anion chromatography, *Analyst* 134 (2009) 2273-2280.
- [70] M.F. Wahab, C.A. Pohl, C.A. Lucy; Ion chromatography on carbon clad zirconia modified by diazonium chemistry and functionalized latex nanoparticles, *Analyst* 136 (2011) 3113-3120.

- [71] B.C. Trammell, M.A. Hillmeyer, P.W. Carr; A study of the Lewis acid-base interactions of vinylphosphonic acid-modified polybutadiene-coated zirconia, *Anal. Chem.* 73 (2001) 3323-3331.
- [72] ZirChrom Separations; ZirChrom-Chiral HPLC columns [On-line] (cit. 14. 10. 2012)  
Dostupné z: <http://zirchrom.com/chiral.asp>
- [73] L.F. Yao, H.B. He, Y.Q. Feng, S.L. Da; HPLC separation of positional isomers on dodecylamine-N,N-dimethylenephosphonic acid modified zirconia stationary phase, *Talanta* 64 (2004) 244-251.
- [74] D. Xiang, L. Tang, J.A. Blackwell; Evaluation of the stability and selectivity of various adjustable stationary phases using zirconium oxide supports in high-performance liquid chromatography, *J. Chromatogr. A* 953 (2002) 67-77.
- [75] T.P. Weber, P.T. Jackson, P.W. Carr; Chromatographic evaluation of porous carbon-clad zirconia microparticles, *Anal. Chem.* 67 (1995) 3042-3050.
- [76] C. McNeff, Q. Zhao, P.W. Carr; High-performance anion exchange of small anions with polyethyleneimine-coated porous zirconia, *J. Chromatogr. A* 684 (1994) 201-211.
- [77] C. McNeff, P.W. Carr; Synthesis and use of quaternized polyethyleneimine-coated zirconia for high-performance anion-exchange chromatography, *Anal. Chem.* 67 (1995) 3886-3892.
- [78] Y. He, P.W. Carr; Synthesis and characterization of new zirconia-based polymeric cation-exchange stationary phases for high-performance liquid chromatography of proteins, *Anal. Chem.* 70 (1998) 1934-1942.
- [79] C.B. Castells, P.W. Carr; Cellulose tris(3,5-dimethylphenylcarbamate)-coated zirconia as a chiral stationary phase for HPLC, *Anal. Chem.* 71 (1999) 3013-3021.
- [80] J. Zhao, P.W. Carr; A comparative study of the chromatographic selectivity of polystyrene-coated zirconia and related reversed-phase materials, *Anal. Chem.* 72 (2000) 302-309.
- [81] X. Yang, J. Dai, P.W. Carr; Effect of amine counterion type on the retention of basic compounds on octadecyl silane bonded silica-based and polybutadiene-coated zirconia phases, *Anal. Chem.* 75 (2003) 3153-3160.
- [82] J. Zhao, P.W. Carr; Synthesis and evaluation of an aromatic polymer-coated zirconia for reversed-phase liquid chromatography, *Anal. Chem.* 71 (1999) 5217-5224.
- [83] P.T. Jackson, M.R. Schure, T.P. Weber, P.W. Carr; Intermolecular interactions involved in solute retention on carbon media in reversed-phase high performance liquid chromatography, *Anal. Chem.* 69 (1997) 416-425.
- [84] J. Janečková, K. Kalíková, Z. Bosáková, E. Tesařová; Study of interaction mechanisms on zirconia-based polystyrene HPLC column, *J. Sep. Sci.* 33 (2010) 3043-3051.
- [85] P.T. Jackson, P.W. Carr; Study of polar and nonpolar substituted benzenes and aromatic isomers on carbon-coated zirconia and alkyl bonded phases, *J. Chromatogr. A* 958 (2002) 121-129.
- [86] P.T. Jackson, T.Y. Kim, P.W. Carr; Diastereomeric selectivity of carbon-coated zirconia reversed-phase liquid chromatographic media, *Anal. Chem.* 69 (1997) 5011-5017.

- [87] M. Gray, G.R. Dennis, P. Wormell, R.A. Shalliker, P. Slonecker; Two dimensional reversed-phase - reversed-phase separations. Isomeric separations incorporating C<sub>18</sub> and carbon clad zirconia stationary phases, *J. Chromatogr. A* 975 (2002) 285-297.
- [88] F. Cacciola, P. Jandera, L. Mondello; Temperature effects on separation on zirconia columns: applications to one- and two-dimensional LC separations of phenolic compounds, *J. Sep. Sci.* 30 (2007) 462-474.
- [89] ZirChrom Separations; DiamondBond-C18 column care guide [On-line] (cit. 11. 10. 2012) Dostupné z: <http://zirchrom.com/pdf/DBCare.pdf>
- [90] ZirChrom Separations; Synthesis of a new thermally and chemically stable Lewis acid-deactivated reversed-phase zirconia stationary phase for HPLC [On-line] (cit. 12. 10. 2012) Dostupné z: <http://zirchrom.com/pdf/p2004ms.pdf>
- [91] ZirChrom Separations; The analysis of basic compounds using neutral pH conditions: A column comparison study [On-line] (cit. 12. 10. 2012) Dostupné z: <http://zirchrom.com/pdf/303.pdf>
- [92] F.D. Antia, C.J. Horváth; High-performance liquid chromatography at elevated temperatures: examination of conditions for rapid separation of large molecules, *J. Chromatogr.* 435 (1988) 1-15.
- [93] J. Li, P.W. Carr; Effect of temperature on the thermodynamic properties, kinetic performance and stability of polybutadiene-coated zirconia, *Anal. Chem.* 69 (1997) 837-843.
- [94] B.W. Wenclawiak, S. Giegold, T. Teutenberg; High-temperature liquid chromatography, *Anal. Lett.* 41 (2008) 1097-1105.
- [95] T. Greibrokk, T. Andersen; High-temperature liquid chromatography, *J. Chromatogr. A* 1000 (2003) 743-755.
- [96] J. Li, P.W. Carr; Evaluation of temperature effects on selectivity in RPLC separations using polybutadiene-coated zirconia, *Anal. Chem.* 69 (1997) 2202-2206.
- [97] J. Li, P.W. Carr; Fast separations at elevated temperatures on polybutadiene-coated zirconia reversed-phase material, *Anal. Chem.* 69 (1997) 3884-3888.
- [98] R.E. Paproski, C. Liang, C.A. Lucy; High temperature normal phase liquid chromatography of aromatic hydrocarbons on bare zirconia, *J. Chromatogr. A* 1218 (2011) 7948-7955.
- [99] D.J. Miller, S.B. Hawthorne; Subcritical water chromatography with flame ionization detector, *Anal. Chem.* 73 (1997) 623-627.
- [100] Dielectric constant reference guide; [On-line] (cit. 15. 10. 2012) Dostupné z: <http://www.asiinstr.com/technical/Dielectric%20Constants.htm>
- [101] Y. Yang, C.D. Jones, A.D. Eaton; Retention behavior of phenyls, anilines and alkylbenzenes in liquid chromatographic separations using subcritical water as the mobile phase, *Anal. Chem.* 71 (1999) 3808-3813.
- [102] T.S. Kephart, P.K. Dasgupta; Superheated water eluent capillary liquid chromatography, *Talanta* 56 (2002) 977-987.
- [103] B. Yan, J. Zhao, J.S. Brown, J. Blackwell, P.W. Carr; High-temperature ultrafast liquid chromatography, *Anal. Chem.* 72 (2000) 1253-1262.

- [104] Y. Mao, P.W. Carr; Adjusting selectivity in liquid chromatography by use of the thermally tuned tandem column concept, *Anal. Chem.* 72 (2000) 110-118.
- [105] R.P. Hunter, D.E. Koch, A. Mutlow, R. Isaza; Extraction and quantitation of carfentanil and naltrexone in goat plasma with liquid chromatography - mass spectrometry, *J. Chromatogr. B* 793 (2003) 351-355.
- [106] D.E. Koch, R. Isaza, J.W. Carpenter, R.P. Hunter; Simultaneous extraction and quantitation of fentanyl and norfentanyl from primate plasma with LC/MS detection, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 34 (2004) 577-584.
- [107] E. Schleyer, S. Pursche, C.H. Köhne, U. Schuler, U. Renner, H. Gscheidmeier, J. Freiberg-Richter, T. Leopold, A. Jenke, M. Bonin, T. Bergemann, P. le Coutre, M. Gruner, M. Bornhäuser, O.G. Ottmann, G. Ehniger; Liquid chromatographic method for detection and quantitation of STI-571 and its main metabolite N-desmethyl-STI in plasma, urine, cerebrospinal fluid, culture medium and cell preparations, *J. Chromatogr. B* 799 (2004) 23-36.
- [108] S. Pursche, O.G. Ottmann, G. Ehniger, E. Schleyer; High-performance liquid chromatography method with ultraviolet detection for the quantification of the BCR-ABL inhibitor nilotinib (AMN107) in plasma, urine, culture medium and cell preparations, *J. Chromatogr. B* 852 (2007) 208-216.
- [109] R. Kučera, J. Sochor, J. Klimeš, J. Dohnal; Use of the zirconia-based stationary phase for separation of ibuprofen and its impurities, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 38 (2005) 609-618.
- [110] R. Kučera, V. Žižkovský, J. Sochor, J. Klimeš, J. Dohnal; Utilization of zirconia stationary phase as a tool in drug control, *J. Sep. Sci.* 28 (2005) 1307-1314.
- [111] V. Žižkovský, R. Kučera, J. Klimeš; Potential employment of non-silica-based stationary phases in pharmaceutical analysis, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 44 (2007) 1048-1055.
- [112] V. Žižkovský, R. Kučera, J. Klimeš, J. Dohnal; Titania-based stationary phase in separation of ondansetron and its related compounds, *J. Chromatogr. A* 1189 (2008) 83-91.
- [113] V. Žižkovský, R. Kučera, J. Klimeš, P. Holásková, J. Dohnal; RP-ZrO<sub>2</sub> stationary phase as an alternative to separate of doxazosine impurities, *Chromatographia* 70 (2009) 185-189.
- [114] M.S. Beldean-Galea, P. Jandera, S. Hodisan; Retention and separation selectivity of natural phenolic antioxidants on zirconia based stationary phases, *J. Liq. Chrom. Relat. Tech.* 31 (2008) 807-818.
- [115] T. Welerowicz, P. Jandera, K. Novotná, B. Buszewski; Solvent and temperature gradients in separation of synthetic oxyethylene-oxypropylene block (co)polymer using high-temperature liquid chromatography, *J. Sep. Sci.* 29 (2006) 1155-1165.
- [116] K. Soukupová, E. Krafková, J. Suchánková, E. Tesařová; Comparison of zirconia- and silica-based reversed stationary phases for separation of enkephalins, *J. Chromatogr. A* 1087 (2005) 104-111.
- [117] J.C. Reepmeyer, J.F. Brower, H. Ye; Separation and detection of the isomeric conjugated estrogens, equilin sulfate and  $\Delta^{8,9}$ -dehydroestrone sulfate by liquid chromatography-electrospray-mass spectrometry using carbon-coated zirconia and porous graphitic carbon stationary phases, *J. Chromatogr. A* 1083 (2005) 42-51.

- [118] A.L. Huidobro, F.J. Rupérez, C. Barbas; Tandem column for the simultaneous determination of arginine, ibuprofen and related impurities by liquid chromatography, *J. Chromatogr. A* 1119 (2006) 238-245.
- [119] L. Havlíková, L. Nováková, L. Matysová, J. Šícha, P. Solich; Determination of estradiol and its degradation products by liquid chromatography, *J. Chromatogr. A* 1119 (2006) 116-123.
- [120] L.A. Riddle, G. Guiochon; Separation of free sterols by high temperature liquid chromatography, *J. Chromatogr. A* 1137 (2006) 173-179.
- [121] Y. Hsieh, K. Merkle, G. Wang; Zirconia-based column high-performance liquid chromatography/atmospheric pressure photoionization tandem mass spectrometric analyses of drug molecules in rat plasma, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 17 (2003) 1775-1780.
- [122] R. Berta, M. Babják, M. Gazdag; A study of some practical aspects of high temperature liquid chromatography in pharmaceutical applications, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 54 (2011) 458-462.
- [123] A.P. Sweeney, P. Wormell, R.A. Shalliker; End-group selectivity of low-molecular-weight polystyrenes on a carbon-clad zirconia stationary phase in reversed-phase HPLC, *Macromol. Chem. Phys.* 203 (2002) 375-380.
- [124] A.P. Sweeney, V. Wong, R.A. Shalliker; The separation of diastereoisomers of polystyrene oligomers in reversed phase HPLC, *Chromatographia* 54 (2001) 24-30.
- [125] B.H. Kim, D.K. Yang, J.H. Ok; Analysis of polymer additives in high-temperature liquid chromatography, *J. Chrom. Sci.* 45 (2007) 16-21.
- [126] P.J. Skrdla, A. Bopra, T. Chasse, T. Wang; A high-temperature liquid chromatographic reactor approach for investigating the solvolytic stability of a pharmaceutical compound and an investigation of its retention behavior on a C18-modified zirconia stationary phase, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 47 (2008) 312-319.
- [127] S. Giegold, M. Holzhauser, T. Kiffmeyer, J. Tuerk, T. Teutenberg, M. Rosenhagen, D. Hennies, T. Hoppe-Tichy, B. Wenclawiak; Influence of the stationary phase on the stability of thalidomide and comparison of different methods for the quantification of thalidomide in tablets using high-temperature liquid chromatography, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 46 (2008) 625-630.
- [128] I.D. Wilson; Investigation of a range of stationary phases for the separation of model drugs by HPLC using superheated water as the mobile phase, *Chromatographia* 52 (2000) S28-S33.
- [129] S.M. Fields, C.Q. Ye, D.D. Zhang, B.R. Branch, X.J. Zhang, N. Okafo; Superheated water as eluent in high-temperature high-performance liquid chromatographic separations of steroids on a polymer-coated zirconia column, *J. Chromatogr. A* 913 (2001) 197-204.
- [130] P. Dugo, K. Buonasera, M.L. Crupi, F. Cacciola, G. Dugo, L. Mondello; Superheated water as chromatographic eluent for parabens separation on octadecyl coated zirconia stationary phase, *J. Sep. Sci.* 30 (2007) 1125-1130.
- [131] M. Marsin Sanagi, H.H. See, W.A. Wan Ibrahim, A. Abu Naim; High temperature liquid chromatography of triazole fungicides on polybutadiene-coated zirconia stationary phase, *J. Chromatogr. A* 1059 (2004) 95-101.

- [132] M. Marsin Sanagi, H.H. See, W.A. Wan Ibrahim, A. Abu Naim; High temperature liquid chromatography of tocol-derivatives on polybutadiene-coated zirconia stationary phases, *Chromatographia* 61 (2005) 567-571.
- [133] S. Saha, R.M. Smith, E. Lenz, I.D. Wilson; Analysis of a ginger extract by high-performance liquid chromatography coupled to nuclear magnetic resonance spectroscopy using superheated deuterium oxide as the mobile phase, *J. Chromatogr. A* 991 (2003) 143-150.
- [134] Y. Mao, P.W. Carr; Application of the thermally tuned tandem column concept to the separation of several families of environmental toxicants, *Anal. Chem.* 72 (2000) 2788-2796.
- [135] Y. Mao, P.W. Carr; Separation of barbiturates and phenylhydantoin amino acids using the thermally tuned tandem column concept, *Anal. Chem.* 73 (2001) 1821-1830.
- [136] Y. Mao, P.W. Carr; Separation of selected basic pharmaceuticals by reversed-phase and ion-exchange chromatography using thermally tuned tandem columns, *Anal. Chem.* 73 (2001) 4478-4485.
- [137] A. Subramanian, P.W. Carr, C.V. McNeff; Use of spray-dried zirconia microspheres in the separation of immunoglobulins from cell culture supernatant, *J. Chromatogr. A* 890 (2000) 15-23.
- [138] S. Sarkar, P.W. Carr, C.V. McNeff, A. Subramanian; Characterization and optimization of a chromatographic process based on ethylenediamine-N,N,N',N'-tetra(methylphosphonic) acid-modified zirconia particles, *J. Chromatogr. B* 790 (2003) 143-152.
- [139] A. Subramanian, S. Sarkar; Use of a modified zirconia support in the separation of immunoproteins, *J. Chromatogr. A* 944 (2002) 179-187.
- [140] A. Subramanian, S. Sarkar; Interaction of immunoglobulin G with N,N,N',N'-ethylenediaminetetramethylenephosphonic acid-modified zirconia, *J. Chromatogr. A* 989 (2003) 131-138.
- [141] S. Sarkar, P.W. Carr, A. Subramanian; Identification of the mass transfer mechanisms involved in the transport of human immunoglobulin-G in N,N,N',N'-ethylenediaminetetramethylenephosphonic acid-modified zirconia, *J. Chromatogr. B* 821 (2005) 124-131.
- [142] S. Sarkar, A. Subramanian; Modeling of immunoglobuline uptake by N,N,N',N'-ethylenediaminetetramethylenephosphonic acid-modified zirconia under static and dynamic conditions, *J. Chromatogr. B* 821 (2005) 81-87.
- [143] J. Li, H.Y. Qi, Y.P. Shi; Determination of melamine residues in milk products by zirconia hollow fiber sorptive microextraction and gas chromatography-mass spectrometry, *J. Chromatogr. A* 1216 (2009) 5467-5471.
- [144] C. McNeff, Q. Zhao, E. Almlöf, M. Flickinger, P.W. Carr; The efficient removal of endotoxins from insulin using quaternized polyethyleneimine-coated porous zirconia, *Anal. Biochem.* 274 (1999) 181-187.
- [145] H. Wan, J. Yan, L. Yu, X. Zhang, X. Xue, X. Li, X. Liang; Zirconia layer coated mesoporous silica microspheres used for highly specific phosphopeptide enrichment, *Talanta* 82 (2010) 1701-1707.



- [146] T. Zhou, C.A. Lucy; Selective preconcentration of chemical warfare agent degradation products using a zirconia preconcentration column, *J. Chromatogr. A* 1213 (2008) 8-13.
- [147] P.K. Kanaujia, D. Pardasani, V. Tak, A.K. Purohit, D.K. Dubey; Selective enrichment of the degradation products of organophosphorous nerve agents by zirconia based solid-phase extraction, *J. Chromatogr. A* 1218 (2011) 6612-6620.
- [148] A. González, B. Preinerstorfer, W. Lindner; Selective enrichment of phosphatidylcholines from food and biological matrices using metal oxides as solid-phase extraction materials prior to analysis by HPLC-ESI-MS/MS, *Anal. Bioanal. Chem.* 396 (2010) 2965-2975.
- [149] V. Pucci, S. Di Palma, A. Alfieri, F. Bonelli, E. Monteagudo; A novel strategy for reducing phospholipids-based matrix effect in LC-ESI-MS bioanalysis by means of hybrid SPE, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 50 (2009) 867-871.
- [150] L. Silvestro, M.C. Gheorghe, I. Tarcomnicu, S. Savu, S.R. Savu, A. Iordachescu, K. Dulea; Development and validation of an HPLC-MS/MS method to determine clopidogrel in human plasma - use of incurred samples to test back-conversion, *J. Chromatogr. B* 878 (2010) 3134-3142.
- [151] W. Zeng, Y. Xu, M. Constanzer, E.J. Woolf; Determination of sitagliptin in human plasma using protein precipitation and tandem mass spectrometry, *J. Chromatogr. B* 878 (2010) 1817-1823.
- [152] H.K. Kweon, K. Hakansson; Selective zirconium oxide-based enrichment of phosphorylated peptides for mass spectrometric analysis, *Anal. Chem.* 78 (2006) 1743-1749.
- [153] M. Wan, J. Yan, L. Yu, Q. Sheng, X. Zhang, X. Xue, X. Li, X. Liang; Zirconia layer coated mesoporous silica microspheres as HILIC SPE materials for selective glycopeptide enrichment, *Analyst* 136 (2011) 4422-4430.
- [154] J. Randon, S. Huguet, C. Demesmay, A. Berthod; Zirconia based monoliths used in hydrophilic-interaction chromatography for original selectivity of xanthenes, *J. Chromatogr. A* 1217 (2010) 1496-1500.
- [155] M. Abi Jaoudé, J. Randon; Chromatography behavior of xanthenes in aqueous normal phase chromatography using titania stationary phase, *J. Chromatogr. A* 1218 (2011) 721-725.
- [156] R. Kučera, P. Kovaříková, M. Klivický, J. Klimeš; The retention behavior of polar compounds on zirconia based stationary phases under hydrophilic interaction liquid chromatography conditions, *J. Chromatogr. A* 1218 (2011) 6981-6986.
- [157] J. Randon, J.F. Guerin, J.L. Rocca; Synthesis of titania monoliths for chromatographic separations, *J. Chromatogr. A* 1214 (2008) 183-186.
- [158] T. Zhou, C.A. Lucy; Hydrophilic interaction chromatography of nucleotides and their pathway intermediates on titania, *J. Chromatogr. A* 1187 (2008) 87-93.
- [159] T. Zhou, C.A. Lucy; Separation of carboxylates by hydrophilic interaction liquid chromatography, *J. Chromatogr. A* 1217 (2010) 82-88.
- [160] R. El Debs, M. Abi Jaoudé, N. Morin, C. Miede, J. Randon; Retention of  $\beta$  blockers on native titania stationary phase, *J. Sep. Sci.* 34 (2011) 1805-1810.

- [161] C.B. Castells, P.W. Carr; Fast enantioseparations of basic analytes by high-performance liquid chromatography using cellulose *tris*(3,5-dimethylphenylcarbamate)-coated zirconia stationary phases, *J. Chromatogr. A* 904 (2000) 17-33.
- [162] J.H. Park, Y.C. Whang, Y.J. Jung, Y. Okamoto, C. Yamamoto, P.W. Carr, C.V. McNeff; Separation of racemic compounds on amylose and cellulose dimethylphenylcarbamate-coated zirconia in HPLC, *J. Sep. Sci.* 26 (2003) 1331-1336.
- [163] B. Chankvetadze, C. Yamamoto, B. Okamoto; Enantioseparation of selected chiral sulfoxides using polysaccharide-type chiral stationary phases and polar organic, polar aqueous-organic and normal-phase eluents, *J. Chromatogr. A* 922 (2001) 127-137.
- [164] I.W. Kim, Y. Okamoto, P.W. Carr, J.K. Ryu, J.H. Park; Amylose *tris*(3,5-dimethylphenylcarbamate)-coated zirconia as a chiral stationary phase for micro HPLC, *Bull. Korean Chem. Soc.* 23 (2002) 1014-1016.
- [165] S.Y. Park, J.K. Park, J.H. Park, C.V. McNeff, P.W. Carr; Separation of racemic 2,4-dinitrophenyl amino acids on carboxymethyl- $\beta$ -cyclodextrin coated zirconia in RPLC, *Microchem. J.* 70 (2001) 179-185.
- [166] I.W. Kim, H.M. Choi, H.J. Yoon, J.H. Park;  $\beta$ -Cyclodextrin-hexamethylene diisocyanate copolymer-coated zirconia for separation of racemic 2,4-dinitrophenyl amino acids in reversed-phase liquid chromatography, *Anal. Chim. Acta* 569 (2006) 151-156.
- [167] J.H. Park, J.K. Ryu, J.K. Park, C.V. McNeff, P.W. Carr; Separation of enantiomers on bovine serum albumin coated zirconia on reversed phase liquid chromatography, *Chromatographia* 53 (2001) 405-408.
- [168] J.H. Park, J.W. Lee, S.H. Kwon, J.S. Cha, P.W. Carr, C.V. McNeff; Separation of racemic 2,4-dinitrophenyl amino acids on 9-O-(phenyloxycarbonyl)quinine-bonded carbon-clad zirconia in reversed-phase liquid chromatography, *J. Chromatogr. A* 1050 (2004) 151-157.
- [169] M. Lee, J. Gwon, J.H. Park; Enantioseparation of neutral compounds on a quinine carbamate-immobilized zirconia in reversed-phase capillary electrochromatography, *Bull. Korean Chem. Soc.* 31 (2010) 81-86.
- [170] S.H. Kwon, Y. Okamoto, C. Yamamoto, W. Cheong, M. Moon, J.H. Park; Cellulose dimethylphenylcarbamate-bonded carbon-clad zirconia for chiral separation in high performance liquid chromatography, *Anal. Sci.* 22 (2006) 1525-1529.
- [171] J. Gwon, J. Jin, C.V. McNeff, J.H. Park; Cellulose dimethylphenylcarbamate-immobilized zirconia for chiral separation in reversed-phase CEC, *Electrophoresis* 30 (2009) 3846-3854.
- [172] A.P. Kumar, J.H. Park; Enantioseparation on cellulose dimethylphenylcarbamate-modified zirconia monolithic columns by reversed-phase capillary electrochromatography, *J. Chromatogr. A* 1217 (2010) 4494-4500.
- [173] A.P. Kumar, J.H. Park; Fast separations of chiral  $\beta$ -blockers on a cellulose *tris*(3,5-dimethylphenylcarbamate)-coated zirconia monolithic column by capillary electrochromatography, *J. Chromatogr. A* 1218 (2011) 5369-5373.

- [174] A.P. Kumar, J.H. Park; Chiral separation of basic compounds on a cellulose 3,5-dimethylphenylcarbamate-coated zirconia monolith in basic eluents by capillary electrochromatography, *J. Chromatogr. A* 1218 (2011) 6548-6553.
- [175] A.P. Kumar, J.H. Park; Zirconia-based stationary phases for chiral separation: a mini-review, *Anal. Lett.* 45 (2012) 15-42.
- [176] R.E. Paproski, J. Cooley, C.A. Lucy; Comparison of titania, zirconia and silica stationary phases for separating diesel fuels according to hydrocarbon group-type by supercritical fluid chromatography, *J. Chromatogr. A* 1095 (2005) 156-163.
- [177] International Conference on Harmonisation; Validation of analytical procedures: Text and methodology Q2(R1) [On-line] (cit. 21. 10. 2012) Dostupné z: [http://www.ich.org/fileadmin/Public\\_Web\\_Site/ICH\\_Products/Guidelines/Quality/Q2\\_R1/Step4/Q2\\_R1\\_Guideline.pdf](http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q2_R1/Step4/Q2_R1_Guideline.pdf)
- [178] P. Kalafut, R. Kučera, J. Klimeš; An innovative approach to the analysis of 3-[4-(2-methylpropyl)-phenyl]propanoic acid as an impurity of ibuprofen on a carbon-coated zirconia stationary phase, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 49 (2009) 1150-1156.
- [179] The European Pharmacopoeia, Supplement 4.2, 4<sup>th</sup> ed.; Council of Europe, Directorate for the Quality of Medicines, Strasbourg (2002).
- [180] M.G. Quaglia, E. Donati, S. Fanali, P. Catarcini; Ibuprofen quality control by electrochromatography, *Farmaco* 58 (2003) 699-705.
- [181] P.A. Asmus; Determination of 2-(4-isobutylphenyl)propionic acid in bulk drug and compressed tablets by reversed-phase high-performance liquid chromatography, *J. Chromatogr.* 331 (1985) 169-176.
- [182] V.E. Haikala, I.K. Heimonen, H.J. Vuorela; Determination of ibuprofen in ointments by reversed-phase liquid chromatography, *J. Pharm. Sci.* 80 (1991) 456-458.
- [183] A.I. Gasco-Lopez, R. Izquiedo-Hornillos, A. Jimenez; LC method development for ibuprofen and validation in different pharmaceuticals, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 21 (1999) 143-149.
- [184] Advanced Chemistry Development (ACD/Labs) Software V11.02 (1994-2011 ACD/Labs).
- [185] ZirChrom Separations; ZirChrom Reversed-Phase Method Development Guide [On-line] (cit. 11. 10. 2012) Dostupné z: <http://zirchrom.com/pdf/RPMDG.pdf>
- [186] X. Yang, J. Dai, P.W. Carr; Analysis and critical comparison of the reversed-phase and ion-exchange contributions to retention on polybutadiene coated zirconia and octadecyl silane bonded silica phases, *J. Chromatogr. A* 996 (2003) 13-31.
- [187] P. Kalafut, R. Kučera, J. Klimeš; The influence of a carbon layer deposited on a zirconia surface on the retention of polar analytes in an organic rich mobile phase, *J. Chromatogr. A* 1232 (2012) 242-247.
- [188] L. Xu, H. Shi, T. Liang, J. Feng, Y. Jin, Y. Ke, X. Liang; Selective separation of flavonoid glycosides in *Dalbergia odorifera* by matrix solid-phase dispersion using titania, *J. Sep. Sci.* 34 (2011) 1347-1354.

- [189] A.J. Alpert; Electrostatic repulsion hydrophilic interaction chromatography for isocratic separation of charged solutes and selective isolation of phosphopeptides, *Anal. Chem.* 80 (2008) 62-76.
- [190] B.A. Bidlingmeyer, J. Henderson; Investigation of retention on bare silica using reversed-phase mobile phases at elevated temperatures, *J. Chromatogr. A* 1060 (2004) 187-193.
- [191] T.L. Chester, J.W. Coym; Effect of phase ratio on van't Hoff analysis in reversed-phase liquid chromatography and phase-ratio-independent estimation of transfer enthalpy, *J. Chromatogr. A* 1003 (2003) 101-111.
- [192] P. Kalafut, R. Kučera, J. Klimeš; The retention behavior of acidic, basic and neutral pharmaceuticals on the deactivated polybutadiene zirconia phase, *Curr. Anal. Chem* 8 (2012) 574-582.
- [193] The United States Pharmacopeial Convention; U.S. Pharmacopeia: Column Compare, PQRI Database [On-line] (cit. 22. 8. 2012) Dostupné z: <http://www.usp.org/USPNF/columnsDB.html>
- [194] W. Melander, J. Stoveken, Cs. Horváth; Stationary phase effects in reversed-phase chromatography I., *J. Chromatogr.* 199 (1980) 35-56.
- [195] ZirChrom Separations; ZirChrom-MS: A next generation HPLC column for LC/MS applications [On-line] (cit. 20. 8. 2012) Dostupné z: <http://www.zirchrom.com/MS.asp>