

**UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE**

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

KATEDRA FARMACEUTICKÉ CHEMIE A KONTROLY LÉČIV



# Hodnocení Quetiapinu pomocí HPLC

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: PharmDr. Pavla Pilařová, Ph.D.

Konzultant: Doc. PharmDr. Radim Kučera, Ph.D.

*„Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány. Práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.“*

V Hradci Králové, 5. května 2015

.....  
Vendula Koldová

Na tomto místě bych ráda poděkovala mé školitelce PharmDr. Pavle Pilařové, Ph.D. za odborné vedení, cenné rady a věnovaný čas. Dále bych poděkovala PharmDr. Petru Kastnerovi, Ph.D., Doc. PharmDr. Radimu Kučerovi, Ph.D. a všem pracovníkům katedry farmaceutické chemie a kontroly léčiv za vstřícné jednání a pomoc.

Experimentální část diplomové práce byla podpořena Univerzitou Karlovou v Praze v rámci projektu GAUK 631612.

# Obsah

<b>1. Úvod</b> .....	6
<b>2. Cíl práce</b> .....	8
<b>3. Teoretická část</b> .....	10
3.1 Kvetiapin a jeho vlastnosti .....	11
3.1.1 Vzorec a chemické vlastnosti .....	11
3.1.2 Indikace .....	13
3.1.3 Mechanismus účinku .....	13
3.1.4 Farmakokinetické vlastnosti .....	13
3.1.5 Kontraindikace .....	14
3.1.6 Nežádoucí účinky .....	15
3.1.7 Interakce .....	15
3.1.8 Některé přípravky s obsahem kvetiapinu na trhu: .....	15
3.2 Vysokúčinná kapalinová chromatografie (HPLC) .....	16
3.2.1 Princip HPLC .....	16
3.2.2 Instrumentace kapalinového chromatografu .....	19
3.2.3 Kvalitativní a kvantitativní analýza .....	21
3.3 Stacionární fáze v HPLC .....	23
3.3.1 Popis zirkoniových HPLC fází .....	23
3.3.2 Chemismus chromatografického děje na zirkoniových kolonách .....	24
3.3.3 Srovnání reverzních zirkoniových fází s reverzními silikagelovými fázemi .....	27
3.3.4 Možnosti modifikace povrchu ZrO <sub>2</sub> .....	27
3.3.5 Popis ZirChrom <sup>®</sup> - PBD kolony .....	28
3.3.6 HPLC kolony na bázi ZrO <sub>2</sub> dostupné na trhu .....	29
3.4 Chromatografické podmínky pro stanovení kvetiapinu kapalinovou chromatografií uvedené v literatuře .....	33
<b>4. Experimentální část</b> .....	34
4.1 Chemikálie a pomůcky .....	35
4.1.1 Chemikálie .....	35
4.1.2 Sestava pro HPLC .....	35
4.1.3 Přístroje .....	35
4.1.4 Pomůcky .....	35

4.2	Obecné postupy.....	37
4.2.1	Příprava standardů .....	37
4.2.2	Příprava mobilní fáze s octanovým pufrem.....	37
4.2.3	Výchozí nastavení chromatografických podmínek .....	37
4.2.4	Příprava kapalinového chromatografu před samotným měřením.....	38
4.2.5	Optimalizace podmínek separace .....	38
4.2.6	Vývoj gradientové eluce .....	39
<b>5.</b>	<b>Výsledky a diskuze .....</b>	<b>45</b>
5.1	Retenční chování kvetiapinu.....	46
5.1.1	Vliv koncentrace octanového pufru.....	46
5.1.2	Vliv pH octanového pufru .....	47
5.1.3	Zastoupení organické složky (ACN) v mobilní fázi.....	48
5.2	Retenční chování 7-hydroxykvetiapinu .....	49
5.2.1	Vliv koncentrace octanového pufru.....	49
5.2.2	Vliv pH octanového pufru .....	50
5.2.3	Vliv zastoupení organické složky (ACN) v mobilní fázi .....	51
5.3	Sledování retenčního chování norkvetiapinu:.....	52
5.3.1	Vliv koncentrace octanového pufru.....	52
5.3.2	Vliv pH octanového pufru .....	53
5.3.3	Vliv zastoupení organické složky (ACN) v mobilní fázi .....	54
5.4	Gradientová eluce .....	55
<b>6.</b>	<b>Závěr .....</b>	<b>61</b>
<b>7.</b>	<b>Seznam použitých zkratk .....</b>	<b>63</b>
<b>8.</b>	<b>Literatura .....</b>	<b>65</b>
	<b>Abstrakt .....</b>	<b>70</b>

# **1. Úvod**

Kvetiapin je léčivo patřící ke skupině atypických antipsychotik. Používá se v psychiatrických indikacích, a to k léčbě schizofrenie a středně těžkých až manických epizod. Lékové formy s postupným uvolňováním také k léčbě depresivních epizod.<sup>1,5</sup>

Kvetiapin je významně metabolizován játry za vzniku několika metabolitů, z nichž norkvetiapin a 7-hydroxykvetiapin vykazují farmakodynamickou aktivitu. Vzhledem k různé farmakokinetické variabilitě mezi jedinci a různé klinické odpovědi, je kvetiapin vhodným kandidátem pro terapeutické monitorování.

Nezbytným prostředkem k hodnocení bezpečnosti a účinnosti podávání léčiv je metoda HPLC. V minulosti již byla popsána celá řada metod stanovující koncentrace kvetiapinu a jeho metabolitů v plasmě s využitím různých chromatografických podmínek a stacionárních fází.

Stále častěji se čerpá z četných výhod, které nabízí stacionární fáze na bázi oxidů přechodných kovů – zejména z oxidu zirkonia. Mezi hlavní přednosti těchto fází patří vyšší chemická a fyzikální stabilita – během analýzy lze tedy zvolit širší rozsah pH a vyšší teplotu bez snížení životnosti kolony. Stacionární fáze na bázi oxidu zirkoničitého lze, stejně jako silikagel, různým způsobem modifikovat, čímž jsou umožněny analýzy ve více separačních módech. Příkladem může být depozice polymeru na povrchu zirkonia umožňující chromatografickou separaci na systému reverzních fází u kolony ZirChrom<sup>®</sup>-PBD.

## **2. Cíl práce**



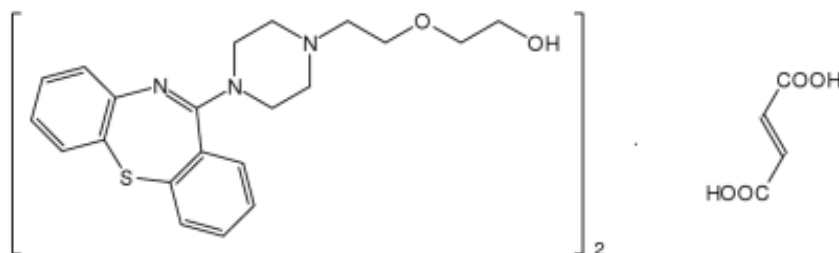
Teoretická část práce se zaměřuje na popis vlastností mateřské látky kvetiapinu z pohledu platného Českého lékopisu a její farmakodynamické a farmakokinetické chování v organismu. Práce se také zmiňuje o dvou dalších aktivních metabolitech kvetiapinu, a to 7-hydroxykvetiapinu a norkvetiapinu. Součástí je i popis principu a instrumentace HPLC, charakterizace moderních stacionárních fází na bázi oxidu zirkoničitého a jejich srovnání s tradičními silikagelovými fázemi.

Cílem této diplomové práce bude nalezení vhodných analytických podmínek pro separaci směsi kvetiapinu a jeho dvou metabolitů 7-hydroxykvetiapinu a norkvetiapinu za pomoci vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC) s využitím ZirChrom<sup>®</sup>-PBD kolony. Bude sledován vliv změn pH mobilní fáze, molarity použitého pufru a zastoupení organické složky v eluentu na retenční chování analytů. Na základě získaných znalostí bude vyvinuta metoda pro separaci směsi těchto tří analytů z plasmy.

# **3. Teoretická část**

## 3.1 Kvetiapin a jeho vlastnosti

### 3.1.1 Vzorec a chemické vlastnosti



Sumární vzorec: (C<sub>46</sub>H<sub>54</sub>N<sub>6</sub>O<sub>8</sub>S<sub>2</sub>)

Molekulová hmotnost (M<sub>r</sub>): 883,10

Systematický název: bis(2 - {2-[4-(dibenzo[*b,f*][1,4]thiazepin-11-yl)piperazin-1yl]ethoxy}ethan-1-ol-(2*E*)-but-2-endionát

Obsahuje 99,0% až 101,0% kvetiapinu-fumarátu (C<sub>46</sub>H<sub>54</sub>N<sub>6</sub>O<sub>8</sub>S<sub>2</sub>) a 12,5% až 13,8% kyseliny fumarové (C<sub>4</sub>H<sub>4</sub>O<sub>4</sub>; M<sub>r</sub> 116,08), počítáno na vysušenou látku.<sup>3</sup>

#### ***Vlastnosti***

Kvetiapin je bílý nebo téměř bílý prášek, těžce rozpustný ve vodě, v ethanolu bezvodém a v methanolu. Je polymorfní.<sup>3</sup>

#### ***Zkoušky totožnosti***

Infračervená absorbní spektrofotometrie – spektra zkoušené látky v pevném stavu, anebo spektra zkoušené látky rozpuštěné v *methanolu R* a následně odpařené do sucha se porovnávají se spektrem *kvetiapin fumarátu CRL*.<sup>3</sup>

#### ***Zkoušky na čistotu***

- Kapalinová chromatografie
- Těžké kovy
- Ztráta sušením
- Síranový popel<sup>3</sup>

### **Stanovení obsahu**

- Kvetiapin-fumarát – titrace *kyselinou chloristou 0,1 mol/l VS* s potenciometrickou indikací ekvivalenčního bodu
- Kyselina fumarová – titrace *hydroxidem sodným 0,1 mol/l VS* s potenciometrickou indikací ekvivalenčního bodu<sup>3</sup>

### **Nečistoty:**

- 2-{2-[4-(dibenzo[*b,f*][1,4]thiazepin-11-yl)piperazin-1-yl]ethoxy}ethyl-acetát
- 11-(piperazin-1-yl)dibenzo[*b,f*][1,4]thiazepin
- 2-{2-[4-(dibenzo[*b,f*][1,4]thiazepin-11-yl)piperazin-1-yl]ethoxy}ethyl-2-[4-(dibenzo[*b,f*][1,4]thiazepin-11-yl)piperazin-1-yl]acetát
- 11,11'-(piperazin-1,4-diyl)bis(dibenzo[*b,f*][1,4]thiazepin
- 11,11'-[ethylenbis(oxyethylenpiperazin-4,1-diyl)]bis(dibenzo[*b,f*][1,4]thiazepin)
- {2-[(2-aminofenyl)sulfanyl]fenyl} {4-[2-(2-hydroxyethoxy)ethyl]piperazin-1-yl}methanon
- dibenzo[*b,f*][1,4]thiazepin-11(10*H*)-on
- 4-(dibenzo[*b,f*][1,4]thiazepin-11-yl)-1-[2-(2-hydroxyethoxy)ethyl]piperazin-1-oxid
- 2-[4-(dibenzo[*b,f*][1,4]thiazepin-11-yl)piperazin-1-yl]ethan-1-ol
- 2-[2-(2-{2-[4-dibenzo[*b,f*][1,4]thiazepin-11-yl]piperazin-1-yl]ethoxy}ethoxy)ethan-1-ol
- *N*-{2-[(2-{4-[2-(2-hydroxyethoxy)ethyl]piperazin-1-karbonyl}fenyl)sulfanyl]fenyl}acetamid
- 2-{2-[4-(9-chlordibenzo[*b,f*][1,4]thiazepin-11-yl)piperazin-1-yl]ethoxy}ethan-1-ol
- 2-{2-[4-(2-{2-[4-(dibenzo[*b,f*][1,4]thiazepin-11-yl]ethoxy{ethyl}piperazin-1-yl]ethoxy}ethan-1-ol
- 11-(4-ethylpiperazin-1-yl)dibenzo[*b,f*][1,4]thiazepin
- 4-(dibenzo[*b,f*][1,4]thiazepin-11-yl)-1,1-bis[2-(2-hydroxyethoxy)ethyl]piperazin-1-ium
- 2-{2-[4-(5-oxo-5λ<sup>4</sup>-dibenzo[*b,f*][1,4]thiazepin-11-yl-piperazin-1-yl]ethoxy}ethan-1-ol
- 11-morfolindibenzo[*b,f*][1,4]thiazepin
- dibenzo[*b,f*][1,4]thiazepin-11-amin
- 2-{2-[4-(fenanthridin-6-yl)piperazin-1-yl]ethoxy}ethan-1-ol
- 11-[4-(2-{2-[(dibenzo[*b,f*][1,4]thiazepin-11-yl)oxy]-ethoxy}ethyl)piperazin-1-yl]dibenzo[*b,f*][1,4]thiazepin<sup>3</sup>

### 3.1.2 Indikace

Kvetiapin je antipsychotikum II. generace (tzv. atypické) ze skupiny MARTA (*multiacting receptor-targeted antagonists*).<sup>4</sup> Perorální lékové formy s okamžitým uvolňováním se používají k léčbě schizofrenie a středně těžkých až těžkých manických epizod, lékové formy s postupným uvolňováním rozšiřují indikaci kvetiapinu o přídatnou léčbu středně těžkých depresivních epizod u pacientů s depresivní nemocí.<sup>1,5</sup>

### 3.1.3 Mechanismus účinku

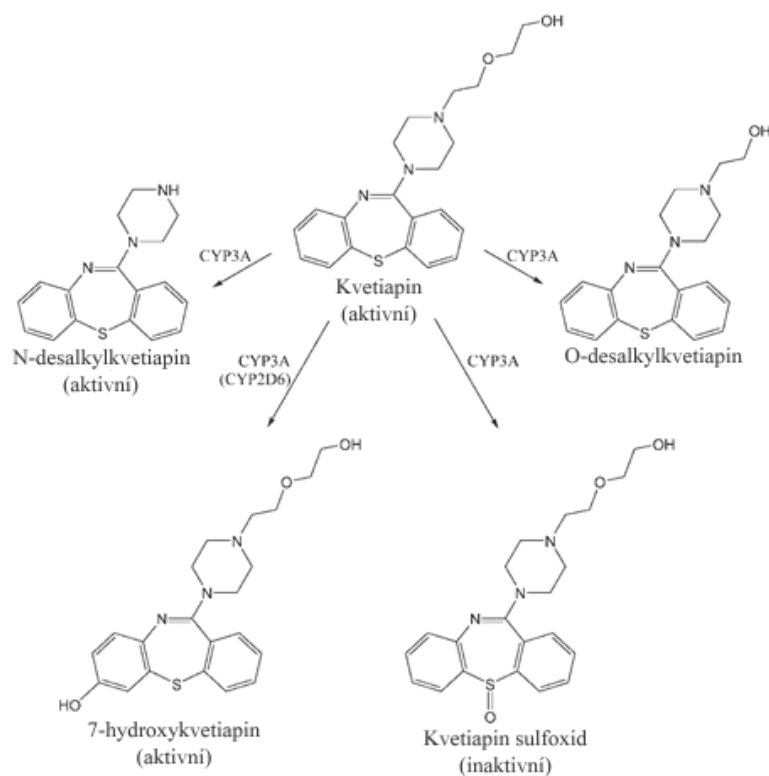
Kvetiapin a jeho aktivní metabolit norkvetiapin interagují se širokým spektrem neurotransmiterových receptorů, přičemž jejich afinita k jednotlivým receptorům je různá. Antagonizují serotoninové (5HT<sub>2</sub>) receptory a dopaminové (D<sub>1</sub>,D<sub>2</sub>) receptory. Kvetiapin má antipsychotické vlastnosti, způsobuje ovšem jen slabé extrapyramidové (EPS) účinky oproti typickým antipsychotikům. Je to vysvětlováno vyšší selektivitou kvetiapinu k 5HT<sub>2</sub> receptorům než k dopaminovým receptorům. Jeho aktivní metabolit norkvetiapin vykazuje vysokou afinitu k noradrenalinovému přenašeči („norepinephrine transporter“ – NET), což vysvětluje antidepresivní efekt po podání kvetiapinu. Mateřské léčivo i jeho metabolit mají také vysokou afinitu k histaminovým a adrenergním  $\alpha_1$  receptorům a nízkou afinitu k adrenergním  $\alpha_2$  a serotoninovým 5HT<sub>1A</sub> receptorům. Kvetiapin nemá afinitu k muskarinovým a benzodiazepinovým receptorům.<sup>5</sup>

### 3.1.4 Farmakokinetické vlastnosti

Po perorálním podání se dobře vstřebává a jeho absorpce není ovlivněna podáním spolu s jídlem. Vaznost na bílkoviny je 83%. Intenzivně se metabolizuje v játrech na aktivní metabolit norkvetiapin.

*In vitro* studie ukázaly, že hlavním izoenzymem cytochromu P450 účastnícím se biotransformace kvetiapinu, je CYP3A4.

Cesty biotransformace kvetiapinu zahrnují sulfoxidaci, *N*- a *O*-dealkylaci postranního alkylového řetězce (viz obr. 1). V malé míře se také uplatňuje hydroxylace dibenzothiazepinového kruhu v poloze sedm zprostředkováná cytochromem CYP2C9 za vzniku aktivního 7-hydroxykvetiapinu. V největší míře vzniká kvetiapinsulfoxid, ten ovšem není farmakologicky aktivní. Nejvýznamnější farmakologicky aktivní metabolit *N*-desalkylkvetiapin (= norkvetiapin) je tvořen i eliminován cestou CYP3A4.<sup>5,6,7</sup>



Obr. 1: Metabolismus kvetiapiinu *in vitro*<sup>8</sup>

Další výzkumy *in vitro* prokázaly, že kvetiapin a několik jeho dalších metabolitů (včetně norkvetiapinu) jsou slabými inhibitory lidského cytochromu P450 1A2, 2C9, 2C19, 2D6 a 3A. Avšak pouze v koncentracích 5-50krát vyšších než jsou koncentrace dosahované u člověka při dávkování 300 až 800 mg/den. Klinicky významná léková inhibice druhého léku taktéž metabolizovaného cytochromem P450 je tedy nepravděpodobná. Ze studií na zvířatech vyplývá, že kvetiapin může indukovat enzymy cytochromu P450, ale specifické interakční studie na psychotických pacientech zvýšenou aktivitu cytochromu P450 nepotvrdily. Biologický poločas kvetiapiinu je asi 7 hodin, norkvetiapinu asi 14 hodin.<sup>5</sup>

### 3.1.5 Kontraindikace

Pacient nesmí kvetiapin užívat při známé přecitlivělosti na účinnou látku, dále při současném podávání inhibitorů cytochromu-P450-3A4 (inhibitory HIV proteázy, azolová antimykotika, erythromycin, klarithromycin, nefazodon). Kvůli vyšší četnosti výskytu několika nežádoucích účinků u dětí a dospívajících do 18 let, se podávání kvetiapiinu u těchto pacientů nedoporučuje.

Vzhledem ke klinickému zlepšení stavu v rozmezí několika týdnů by měli být pacienti rizikováni z hlediska možné sebevraždy, zejména v počátcích léčby, ale i později, pečlivě sledováni.<sup>5</sup>

### **3.1.6 Nežádoucí účinky**

Při užívání kvetiapinu se mohou velmi často objevit závratě, somnolence, bolesti hlavy, sucho v ústech, zvýšení triglyceridů v séru, celkového cholesterolu (zejména LDL), snížení HDL cholesterolu a zvýšení hmotnosti. Dále může často docházet hyperprolaktinémii, zvýšení chuti k jídlu, leukopenii, extrapyramidovým symptomům, dysartrií, rozmazanému vidění, tachykardií, ortostatické hypotenzi, zácpě, dyspepsii, mírné astenii, periferním edémům, podrážděnosti, zvýšení hladiny transamináz v séru, sníženému počtu neutrofilů a zvýšené glykémii.<sup>5</sup>

### **3.1.7 Interakce**

- Silné induktory jaterních enzymů (např. fenytoin, karbamazepin) – přínos léčby kvetiapinem a těmito induktory současně, musí převážet případná rizika; dále je nezbytné, aby jakákoli změna léčby induktory byla postupná
- Léky prodlužující QT-interval (např. hladinu draslíku snižující thiazidová diuretika) – je třeba opatrnosti vzhledem k možnému vzniku maligních arytmií
- Inhibitory CYP3A4 – vzhledem k zvýšení AUC kvetiapinu je jejich podávání kontraindikováno<sup>5</sup>

### **3.1.8 Některé přípravky s obsahem kvetiapinu na trhu**

- Apo-Quetiapin 200 mg, Apotex Europe B.V., Leiden, Německo
- Derin 200 mg potahované tablety, Viapharm SA., Ożarów Mazowiecki, Polsko
- Hedonin 100 mg, G. L. Pharma GmbH, Lannach, Rakousko
- Kétilept 100 mg, EGIS Pharmaceuticals PLC, Budapešť, Maďarsko
- Quetiapin Actavis 200 mg, Actavis Group PTC ehf., Hafnarfjörður, Island
- Quetiapin Mylan 300 mg, Generics (UK) Ltd., Hertfordshire, Velká Británie
- Quetiapin Teva 400 mg retard, Teva Pharmaceuticals CR s.r.o., Praha, Česká republika
- Seroquel PROLONG 200 mg tablety s prodlouženým uvolňováním, AstraZeneca, Londýn, Velká Británie<sup>9</sup>

## 3.2 Vysokúčinná kapalinová chromatografie (HPLC)

Vysokúčinná kapalinová chromatografie (anglický akronym HPLC, *High Performance Liquid Chromatography*) představuje jednu z nejrychleji se vyvíjejících a nejpoužívanějších metod v separaci, analýze a preparativní přípravě takřka jakékoli směsi látek rozpustných v kapalině.

Mezi hlavní výhody HPLC lze zařadit:

- možnost separace a následné kvantitativní a kvalitativní hodnocení složek směsi
- rychlost analýzy, citlivost stanovení
- minimální spotřeba vzorku pro analýzu
- není nutná přítomnost operátora – automatizace procesu

Součet těchto kladů tedy směřuje k širokému využití metody v různých oblastech analýzy léčiv, například:

- identifikace léčiv, určení obsahu, čistoty, eventuálně nečistoty léčiva
- stabilitní studie – kvalitativní a kvantitativní sledování poklesu výchozího léčiva a naopak přírůstu rozkladných produktů v průběhu skladování léčivého přípravku
- analýza účinných látek v přírodním materiálu
- „Drug monitoring“ - monitorování vlastních účinných látek či metabolitů léčiv v tělních tekutinách pacienta<sup>10</sup>

### 3.2.1 Princip HPLC

Separace látek je umožněna rozdílnou afinitou látek k nepohyblivé (stacionární) a pohyblivé (mobilní) fází. Stacionární fáze (SF, *Stationary phase*) je umístěna v koloně ve formě sorbentu a má schopnost analyzované látky ve směsi zadržovat. Mobilní fáze (MF, *Mobil Phase*) naopak zadržování analytu snižuje, unáší ho s sebou – hovoříme tedy o vymývání (eluci). Mobilní fáze, je do systému přiváděna pomocí vysokotlakého čerpadla a po průchodu kolonou je následně společně s vymytou složkou (exfluentem) zaznamenána vhodným detektorem.<sup>11</sup> Výsledkem procesu jsou záznamy intenzity signálu na čase – chromatogramy.



Podle polaritý stacionární a mobilní fáze rozlišujeme v kapalinové chromatografii dva základní módy:

- Chromatografii na normálních fázích (*Normal Phase Liquid Chromatography; NP-LC*) – stacionární fáze je polární, mobilní fáze nepolární. Stacionární fáze je nejčastěji tvořena porézním oxidem křemičitým ( $\text{SiO}_2$ ) nebo oxidem hlinitým ( $\text{Al}_2\text{O}_3$ ). Povrch těchto polárních sorbentů je bohatý na hydroxylové skupiny, které mu udělují vysokou polaritu a může být dále chemicky modifikován různě polárními funkčními skupinami (např. diol,  $-\text{NH}_2$ ,  $-\text{CN}$ ). Nepolární mobilní fáze je organické rozpouštědlo (např. hexan, heptan) eventuálně s malým přídatkem polárnějšího rozpouštědla (např. methanolu, ethanolu). Tento mód je vhodný pro vysoce hydrofobní sloučeniny nerozpustné v polárních rozpouštědlech – typicky pro separaci lipidů.
- Chromatografii na reverzních fázích (*Reversed Phase Liquid Chromatography; RP-LC*) – stacionární fáze je nepolární a mobilní fáze polární. Adsorbentem je nejčastěji chemicky modifikovaný silikagel. Modifikace spočívá v kovalentním navázání různě dlouhých hydrofobních uhlíkatých řetězců (např. oktadecyl –  $\text{C}_{18}$ , oktyl –  $\text{C}_8$ ). Mobilní fáze je tvořena směsí vody a organického rozpouštědla mísitelného s vodou (methanol, acetonitril, tetrahydrofuran, dimethylsulfoxid), často také s příměsí vhodného pufru. Jedná se o více užívanou metodu vhodnou pro neutrální až mírně ionizovatelné látky – až 90% všech HPLC analýz nízkomolekulárních látek je zprostředkováno pomocí tohoto módu.<sup>10,12</sup>

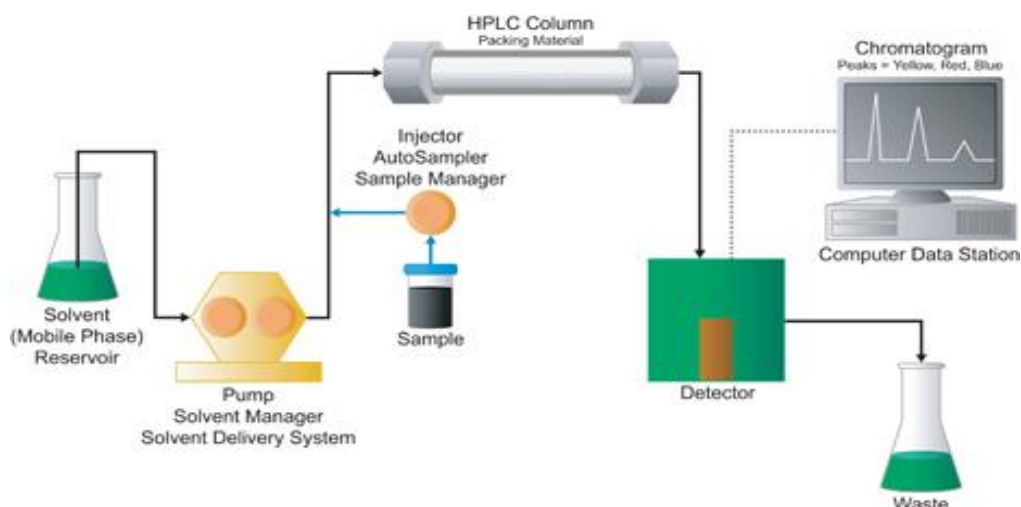
V průběhu chromatografické separace látek se uplatňují různé mechanismy, podle nichž můžeme chromatografii rozdělit na adsorbční, rozdělovací, iontově výměnou, gelovou a afinitní.

- Adsorbční chromatografie (*Adsorption chromatography*) využívá různé afinity molekul analyzované směsi k aktivnímu povrchu stacionární fáze. V tomto případě se uplatňují interakce dipól-dipól, vodíkové a slabé kovalentní vazby, celková polarita analytu, stacionární i mobilní fáze. Obecně platí, že polární sloučeniny mají vyšší afinitu k polárním sorbentům, jsou tedy déle zadržovány a naopak. Tento princip se uplatňuje zejména u chromatografii na normálních fázích.<sup>11</sup>
- V kapalinové rozdělovací chromatografii (*Liquid Liquid Chromatography; LLC*) dochází k dělení látek na základě rozdílné rozpustnosti analytu v mobilní a stacionární fázi. V tomto případě je stacionární fází kapalina, která je zakotvena na vhodném nosiči.<sup>11</sup>

- Podstatou iontově výměnné chromatografie (*Ion Exchange Chromatography; IEC*) je rozdílná afinita iontů dělených látek k iontovýměnným skupinám stacionární fáze. Pokud stacionární fáze na svém povrchu obsahuje záporný náboj, pak bude zadržovat kationty a chovat se jako katex, v případě kladně nabitého povrchu bude situace opačná a stacionární fáze bude vystupovat jako anex. Retence analyzovaných látek unášených mobilní fází je závislá nejen na hodnotách disociačních konstant ionogenních skupin, na různé velikosti iontů a různém mocenství iontů, ale i na pH a iontová síle mobilní fáze.<sup>11</sup>
- Gelová chromatografie (*Gel Permeation Chromatography = GPC; Size Exclusion Chromatography = SEC*) je založena na rozdělování molekul analytu na gelem naplněné koloně podle jejich velikosti. Mechanismus spočívá v rozdílném propouštění nebo pronikání molekul rozpuštěné látky do pórů částic gelu – hovoříme o sítovém efektu nebo o mechanismu sférické exkluze.<sup>11</sup>
- Principem afinitní chromatografie (*Affinity Chromatography*) je reverzibilní interakce mezi ligandem navázaným na nerozpustné inertní matici a analytem (biomolekulou) s určitou afinitou k tomuto ligandu. Příkladem takovéto interakce může být například interakce protilátka – antigen, enzym – substrát, hormon – receptor.<sup>11</sup>

Separace a eluce jednotlivých složek směsi je ovlivněna jak povahou stacionární fáze, tak povahou fáze mobilní. Mají-li látky podobné fyzikálně-chemické vlastnosti, pak je pro jejich separaci vhodná metoda izokratické eluce, kdy se složení mobilní fáze v průběhu analýzy nemění, mobilní fáze má po celou dobu stejnou eluční sílu. Ovšem v případě odlišných fyzikálně-chemických vlastností analytů by byla izokratická eluce velmi časově náročná. Vhodnější je tedy metoda gradientové eluce, která umožňuje složení mobilní fáze v průběhu eluce programově měnit ve prospěch silnější eluční složky.<sup>11</sup>

### 3.2.2 Instrumentace kapalinového chromatografu



Obr. 2: Schématické znázornění kapalinového chromatografu<sup>13</sup>

Kapalinový chromatograf tvoří následující části (viz obr.2):

- Zásobník mobilní fáze (*Mobil Phase Reservoir*) - je to jednotka tvořená většinou ze skla zajišťující dostatečné množství mobilní fáze pro analýzu. Vstupu mechanických nečistot do chromatografického systému zamezuje přítomnost filtru, jehož volba závisí na typu a použití mobilní fáze. Dalším důležitým krokem před vstupem mobilní fáze do chromatografického systému je odplynění pomocí odplyňovače (*degasser*). Přítomnost plynu v eluentu by mohla vést ke kolísání pracovního tlaku v systému s následkem kolísání retenčních časů, k rušivým píkům a k celkově nižší reprodukovatelnosti analýz, anebo k reakci plynu se sorbentem v průběhu kolony. Při izokratické eluci je dostačující jeden zásobník, v případě gradientové eluce je zásobníků více a k procesu mísení mobilních fází pak dochází v zadaném poměru ve směšovači.<sup>11,14</sup>
- Pumpa (*Pump*) – zajišťuje stabilní a bezpulsní průtok (*flow rate*) mobilní fáze na kolonu typicky v řádu mililitrů za minutu.
- Dávkovač vzorku (*Injector*) – Nachází se před vstupem do kolony a umožňuje nástřik (*Inject volume*) naprogramovaného objemu analyzovaného vzorku do mobilní fáze, která ho unáší na kolonu. V současnosti se nejvíce používají velice přesné automatické dávkovače – tzv. autosamplery. Ty jsou spojené se zásobníkem vzorků, kde jsou uloženy vialky uzavřené pryžovým septem nebo perforovanou zátkou, která je jehlou dávkovače

perforována. Prostor zásobníku pro vzorky je většinou temperován a chráněn před světlem.<sup>15</sup>

- Kolona (*HPLC column*) – trubice o délce nejčastěji 5 – 25 cm a vnitřním průměru 3 – 5 mm vyplněná sorbentem a zhotovená z nerezové oceli nebo ze skla. Jedná se místo separace požadované analytické směsi.<sup>10</sup>
- Detector (*Detector*) - detektory zaznamenávají rozdíl mezi průchodem čisté mobilní fáze a mobilní fáze obsahující eluovanou složku. Tento rozdíl převádí na elektrický signál.<sup>15</sup>
- V praxi se nejvíce používají typy detektorů uvedené v tabulce č. 1.<sup>16,17,18</sup>

Tab. 1: Nejčastěji používané detektory v HPLC analýze<sup>16,17,18</sup>

<b>Detektor:</b>	<b>Měřená veličina:</b>	<b>Využití:</b>
<i>Spektrofotometrický</i> Typická citlivost (hmotnost/ml): ng	Absorbce záření v oblasti vlnových délek od 180 do 800 nm.	Citlivý detektor se širokou linearitou odezvy vhodný pro látky absorbující v UV oblasti. Použitá rozpouštědla nesmí absorbovat v UV oblasti.
<i>Fluorescenční</i> Typická citlivost (hmotnost/ml): pg	Fluorescence emitovaná jako sekundární zdroj energie po absorpci elektromagnetického záření látkou.	Detekce látek obsahujících tzv. fluorofor (např. konjugované dvojné vazby aromatických sloučenin).
<i>Elektrochemický</i> Typická citlivost (hmotnost/ml): pg	Elektrický proud generovaný vložením konstantního napětí mezi pracovní a referenční elektrodu.	Detektor látek schopných oxidace a redukce, vysoce citlivý, s rychlou odezvou. Pro požadavek vodivé MF omezení jen na RP-LC.
<i>Konduktometrický</i> Typická citlivost (hmotnost/ml): ng	Změna vodivosti mobilní fáze mezi dvěma elektrodami, na které je vloženo střídavé napětí.	Iontově výměnná chromatografie, MF musí být nevodivá, tj. bez přídavku pufru. Univerzální, nepřilíš citlivý detektor
<i>Refraktometrický</i> Typická citlivost (hmotnost/ml): µg	Změna indexu lomu eluátu.	Univerzální detektor používaný v SEC, vhodný pro detekci nefluoreskujících a neabsorbujících analytů (cukry, lipidy, polymery). Nevýhodou je závislost indexu lomu na teplotě a použití jen pro izokratickou eluci.
<i>Hmotnostní</i> Typická citlivost (hmotnost/ml): pg	Poměr hmotnosti k náboji iontů (m/z) vznikajících převodem analytů rozpuštěných v MF na ionty v plynné fázi.	Identifikace analytů na základě jejich hmotnostních spekter. Univerzální, vysoce citlivý a selektivní detektor.

- Počítač (*Computer Data Station*) - zpracovává a sbírá signál generovaný detektorem a interpretuje výsledky analýzy. Dále umožňuje nastavení a kontrolu chromatografických podmínek, jako jsou průtoková rychlost, složení gradientu, maximální tlak pump, pořadí a objem nástřiků jednotlivých vzorků, teploty v zásobníku vialek i na koloně a parametry detektoru.<sup>19</sup>
- Odpadní láhev (*Waste*) – sbírá mobilní fázi s eluovanými analyty po průchodu chromatografickým systémem.

### 3.2.3 Kvalitativní a kvantitativní analýza

Výsledkem eluce analytu, jeho následné detekce a interpretace počítačem je pík (*peak*) na chromatogramu, který umožňuje jeho kvalitativní a kvantitativní hodnocení.

#### *Kvalitativní analýza*

- Retenční čas ( $t_R$ ) je definován jako doba, která uplyne od nástřiku látky do mobilní fáze po maximum píku látky na chromatogramu. Nemění-li se podmínky mezi jednotlivými analýzami, pak retenční čas představuje identifikační (kvalitativní) charakteristiku látek. Přiřazením retenčních časů látek v separované směsi k retenčním časům standardů (*CRL, chemická referenční látka*) při zachování stejných chromatografických podmínek tedy umožňuje určit, jaké látky jsou ve směsi zastoupeny.<sup>14</sup>

Velikost retenčního času je dána rozdílnou atrakcí analytu k stacionární a mobilní fázi, což popisuje distribuční (rozdělovací) konstanta  $K_D$ :

$$K_D = c_S / c_M$$

kde  $c_S$  = koncentrace analytu ve stacionární fázi

$c_M$  = koncentrace analytu v mobilní fázi

Čím je hodnota rozdělovací konstanty pro danou látku vyšší, tím delší dobu setrvávají její molekuly ve stacionární fázi – lze tedy očekávat pomalejší eluci analytu a delší retenční čas.<sup>11</sup>

**Kvantitativní analýza** – vychází z výšky či plochy píku, které jsou přímo úměrné koncentraci analytu. Nejčastěji používanými metodami jsou metoda vnějšího standardu, vnitřního standardu, metoda normalizace a kalibrační postup.<sup>20</sup>

- Metoda vnějšího standardu – spočívá ve dvou krocích. V prvním kroku se na kolonu nastříkne roztok analyzovaného vzorku a po registraci chromatografického záznamu se v druhém kroku nastříkne roztok vnějšího standardu a opět se registruje jako chromatogram. Koncentrace stanovovaných složek směsi se pak vypočítá z poměru ploch (výšek) píků jednotlivých stanovovaných látek a plochy píku vnějšího standardu.<sup>21</sup>
- Metoda vnitřního standardu – ke známému objemu roztoku vzorku se přidá definovaný objem roztoku vhodného vnitřního standardu a po promíchání se nastříkuje na kolonu. Koncentrace stanovovaných složek se opět vypočítá z poměru ploch (výšek) píků jednotlivých separovaných složek a plochy píku standardu. Metoda vnitřního standardu je méně časově náročná a přesnější, protože není zatížena chybou dvojího nástřiku. Požadavky na vhodný vnitřní standard jsou následující: eluce standardu v blízkosti píků stanovovaných látek, podobná koncentrace standardu jako látky, jejichž obsah je zjišťován, chemická inertnost.<sup>21</sup>
- Metoda normalizace – jejím předpokladem je stejná citlivost detektoru ke všem složkám směsi. Koncentrace analytu se vypočítá jako procentuální část plochy píku stanovované látky k celkovému součtu všech ploch píků chromatogramu, který představuje 100%. Do celkové plochy všech píků chromatogramu se nezapočítávají píky rozpouštědel, přidaných činidel nebo píky, které mají plochu pod limitem zanedbatelnosti.<sup>20,22</sup>
- Kalibrační postup – provede se několik nástřiků standardů o různém obsahu koncentrované složky. Sestrojí se kalibrační křivka závislosti plochy (výšky) píku na koncentraci látky a z tohoto grafu se určí koncentrace složky ve vzorku.<sup>22</sup>

### 3.3 Stacionární fáze v HPLC

Všeobecně nejrozšířenějším materiálem pro výrobu stacionárních fází v HPLC je polární, nejčastěji amorfni anorganický  $\text{SiO}_2$  – silikagel. Nemodifikovaný umožňuje separaci za normálního uspořádání fází a v módu HILIC, po chemickém navázání ligandů zase separaci na reverzních fázích. Jeho výhodami jsou mechanická odolnost (umožňuje použití při vysokých tlacích) a inertnost vůči změnám koncentrace organické složky mobilní fáze (nedochází ke smršťování ani bobtnání). Mezi další přednosti patří i dobře známé chemické vlastnosti povrchu, četné možnosti modifikace povrchu, široké spektrum volby parametrů kolony (velikost částic, průměr pórů, ploch pórů) a v neposlední řadě také množství výrobců na trhu.<sup>11,23</sup>

Navzdory těmto vlastnostem, existují i některá omezení pro použití silikagelu:<sup>24,25</sup>

- pH vyšší než 7,5 vede k rozpouštění silikagelu, při nízkých hodnotách pH dochází k hydrolyze siloxanové vazby („krvácení kolony“ vedoucí k nereprodukovatelnosti retenčních časů a projevující se jako šum na pozadí během analýz)
- nestabilita při teplotě vyšší jak 40 °C
- použití běžných pufrů (fosforečnan, uhličitan) rovněž vede k rozpouštění silikagelu

Tyto nestabilní vlastnosti silikagelu vedly k použití oxidů přechodných kovů ( $\text{ZrO}_2$ ,  $\text{TiO}_2$ ,  $\text{Al}_2\text{O}_3$ ). Oxid zirkoničitý je nejpoužívanějším a nejprostudovanějším z těchto sorbentů a v HPLC analýze jasně převažuje použití zirkoniových kolon nad kolonami na bázi  $\text{TiO}_2$  a  $\text{Al}_2\text{O}_3$ . Firma ZirChrom Separations, Inc. má ve svém portfoliu pouze dvě stacionární fáze na bázi  $\text{TiO}_2$ , a to kolonu Sachtopore<sup>®</sup> - pro NPLC (nemodifikovaný  $\text{TiO}_2$ ) a pro RPLC (modifikace  $\text{TiO}_2$  polyethylenem).<sup>26</sup> Oxid hlinitý se v současnosti jako stacionární fáze v HPLC téměř nepoužívá, protože na jeho povrchu dochází ke katalytickému štěpení a k rozkladu nebo k ireverzibilní adsorpci chromatografovaných látek.<sup>11</sup>

#### 3.3.1 Popis zirkoniových HPLC fází

Hlavní výhody stacionárních fází na bázi oxidu zirkonia jsou:<sup>11</sup>

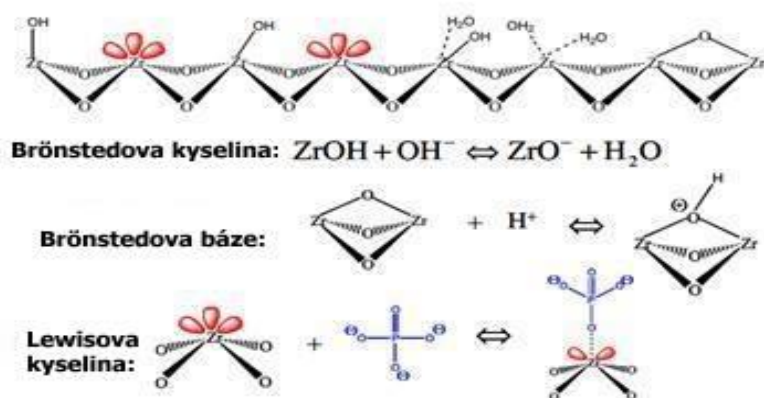
- vysoká chemická a termální stabilita (rozmezí pH 1 – 14, teplota až 200 °C) rozšiřující možnosti volby chromatografických podmínek, prodlužující životnost kolon a snižující cenu analýzy

- menší vymývání ligandu (ztrácení ligandu, *column bleeding*), což je vhodné pro MS a ELSD detektory, ale i čištění kolon za daleko agresivnějších podmínek.

Nevýhodou může být odlišná povrchová chemie, která je daleko složitější než povrchová chemie silikagelu a může značně komplikovat vývoj metody pro složité směsi látek.<sup>11</sup>

### 3.3.2 Chemismus chromatografického děje na zirkoniových kolonách

Na rozdíl od silikagelu má oxid zirkoničitý vyšší isoelektrický bod, díky čemuž nedochází v takové míře k interakcím s bazickými látkami. Dále je amfoterní, což znamená, že se v závislosti na pH prostředí může chovat jako anex nebo katex. Stejně jako silikagel má na svém povrchu hydroxylové skupiny, ale navíc jsou zde přítomna i adsorbční centra charakteru Lewisových kyselin (viz obrázky níže). Jejich přítomnost vyžaduje obohacení mobilní fáze o Lewisovu bázi v podobě pufru, která minimalizuje interakce těchto center s fosfátovými či karboxylovými skupinami v molekulách analyzovaných látek. O typu interakce pak rozhodují vlastnosti analytu, pH a typ pufru, celková iontová síla, a také koncentrace organického modifikátoru.<sup>11,24</sup>



Obr. 3: Znázornění povrchu oxidu zirkoničitého a chemických interakcí na jeho povrchu (obrázek byl převzat a upraven ze zdroje č. 26)

Díky těmto interakcím lze oxid zirkoničitý používat v několika chromatografických módech – nejčastěji v HILIC systému nebo s reverzními fázemi. Jeho povrch také umožňuje četné modifikace – potažení tenkou vrstvou polymeru (např. polybutadienu, polystyrenu), pyrolytickým uhlíkem, který lze případně dále modifikovat ligandem C<sub>18</sub>.<sup>11</sup>

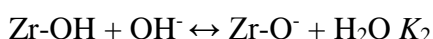
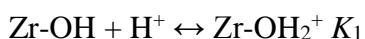
Tyto modifikace pak částečně blokují adsorbční centra ZrO<sub>2</sub>. U neutrálních látek dochází k interakcím klasickým mechanismem reverzních fází (tzn. sorpce a desorpce na základě interakcí s hydrofobní vrstvou). U látek charakteru organických bází či Lewisových bází se mimo interakce



mechanismem reverzních fází, uplatňuje také „mixed mode“ retence umožněná výměnou iontů a výměnou ligandů.<sup>24</sup>

### ***Výměna iontů***

Iontová výměna je umožněna schopností hydroxylů na povrchu ZrO<sub>2</sub> disociovat, nebo se protonizovat v závislosti na pH eluentu:



Z rovnic vyplývá, že když je pH prostředí kyselé, hydroxylové skupiny se protonizují, povrch ZrO<sub>2</sub> nese kladný náboj a stává se tedy anexem – zadržuje anionty. Naopak v zásaditém prostředí hydroxylové skupiny disociují, povrch ZrO<sub>2</sub> je záporný a má vlastnosti katexu (zadržuje kationty).

H<sup>+</sup> a OH<sup>-</sup> jsou potenciál určující ionty. Je-li množství kladně nabitých Zr-OH<sub>2</sub><sup>+</sup> částic a záporně nabitých Zr-O<sup>-</sup> částic stejné, pak celkový povrch fáze nese nulový náboj. pH, při němž dochází k tomuto jevu (pH<sub>pzc</sub>; akronym *pzc* = *point of zero charge*) je rovno isoelektrickému bodu (pI) a jeho hodnota závisí na ionizačních konstantách:

$$\text{pH}_{\text{pzc}} = 0,5 (\text{p}K_1 + \text{p}K_2)$$

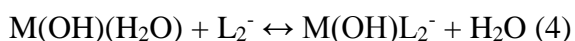
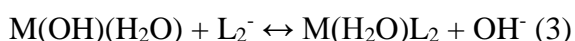
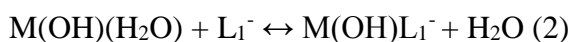
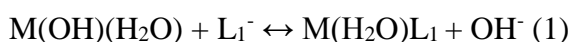
Je-li pH eluentu < pK<sub>1</sub>, pak ZrO<sub>2</sub> vystupuje jako anex. Pokud je pH eluentu < pK<sub>2</sub> tak ZrO<sub>2</sub> vystupuje jako katex.

Hodnota pH<sub>pzc</sub> ZrO<sub>2</sub> je oproti silikagelu (pH<sub>pzc</sub>=3) vyšší a udává se v hodnotách 6,4-8. Tato skutečnost vysvětluje problematickou separaci alifatických aminů na silikagelovém sorbentu. Silanolové skupiny silikagelu totiž disociují již při neutrálním pH, jeho povrch tak nese negativní náboj a aminy, které jsou při neutrálním pH protonizovány, jsou na povrchu silně zadržovány. Naproti tomu u ZrO<sub>2</sub> je při neutrálním pH počet kladně a záporně nabitých iontů stejný, celkový náboj povrchu je roven nule, a proto k tak silným elektrostatickým interakcím nedochází. Kromě toho stabilita ZrO<sub>2</sub> i při vysokých hodnotách pH umožňuje deprotonaci kationické báze ještě před začátkem analýzy.<sup>24</sup>

### **Výměna ligandů**

Schopnost  $ZrO_2$  zadržovat analyty vychází i z přítomnosti koordinačně vázaných molekul vody na povrchu oxidu zirkoničitého. Ty pak mohou být vyměněny za jiný ligand charakteru Lewisovy báze. Výměna je tím snazší, čím je báze silnější.

Následující rovnice popisují fenomén výměny ligandů na povrchu  $ZrO_2$ :



Kde M představuje zirkonium,  $L_1$  je pufr charakteru Lewisovy báze přítomný v eluentu (např. fosforečnan, octan),  $L_2$  je analyt s vlastnostmi Lewisovy báze.

Rovnice (1) a (2) charakterizují proces odehrávající se na povrchu stacionární fáze, je-li složkou eluentu Lewisova báze. Rovnice (3) – (5) popisují děje, ke kterým dochází za přítomnosti analytu charakteru Lewisovy báze ( $L_2^-$ ). Příspěvek molekul vody a hydroxylových iontů na celkové výměně ligandů silně závisí na pH mobilní fáze. Při nízkých hodnotách se na povrchu sorbentu s vyšší pravděpodobností uplatňují procesy popsané rovnicemi (2) – (5). Při vysokém pH mají reakce popsané rovnicemi (1) a (5) jen minimální podíl na celkové výměně ligandů. Toto je vysvětleno skutečností, že hydroxylový iont ( $OH^-$ ) je nejsilnější známá monovalentní Lewisova báze schopná vytěsnit jakoukoli jinou monovalentní bázi

Ochota Lewisových bází interagovat s místy charakteru Lewisových kyselin na povrchu  $ZrO_2$  závisí na elektronové hustotě a schopnosti Lewisovy báze se polarizovat. Čím je elektronová hustota a polarizovatelnost báze nižší, tím je síla interakce s povrchem vyšší. Síla těchto interakcí je následovná:

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

K popsaným dějům nedochází pouze u nativního  $ZrO_2$  bez chemické úpravy, ale i u  $ZrO_2$ , jehož povrch je upraven polymerem či grafitizovaným uhlíkem. Důvodem je fakt, že chemická modifikace povrchu není celistvá, nepropustná, a proto blokáce přístupu k povrchu není kompletní.<sup>24</sup>

### 3.3.3 Srovnání reverzních zirkoniových fází s reverzními silikagelovými fázemi

#### *Podobnosti reverzních zirkoniových fází s reverzními silikagelovými fázemi:*<sup>25</sup>

- retenční čas vzrůstá se zvyšující se hydrofobicitou analytu
- podobné eluční pořadí u neelektrolytů
- 10%ním zvýšením organické složky mobilní fáze klesá retenční čas zhruba dvojnásobně
- s každým zvýšením teploty o 50 °C retenční čas klesá trojnásobně
- eluční síla rozpouštědel klesá v pořadí tetrahydrofuran > acetonitril > methanol

#### *Odlišnosti reverzních zirkoniových fází od reverzních silikagelových fází:*<sup>25</sup>

- kationty jsou v přítomnosti fosfátového pufru na reverzních zirkoniových stacionárních fázích déle zadržovány
- eluční pořadí aniontů a kationtů se při neutrálním pH může značně lišit na obou fázích
- pro analyty s karboxylovou skupinou je u zirkoniových kolon nezbytné použití Lewisovy báze (výrobce doporučuje < 5mM fosforečnan nebo tetramethylamoniumhydroxid)
- přidavek Lewisovy báze v neutrálním rozsahu pH do MF umožňuje iontově výměnnou a reverzně fázovou retenci
- možné použít o 10 – 30% méně organické složky v závislosti na zvolené stacionární fázi a analytu
- retenční čas bazických sloučenin klesá, pokud je pH mobilní fáze > pKa

### 3.3.4 Možnosti modifikace povrchu ZrO<sub>2</sub>

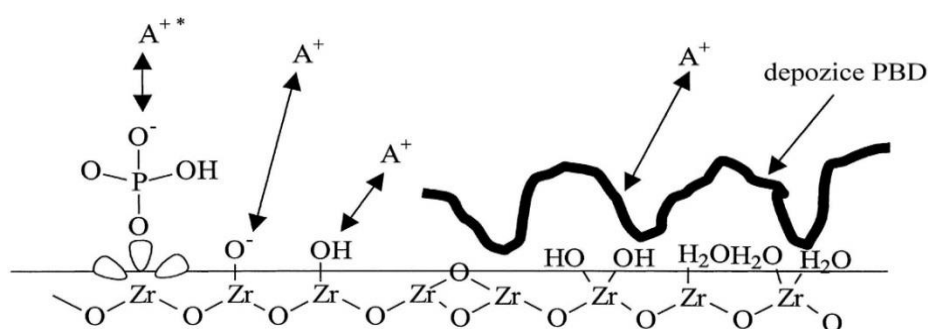
***Dynamická modifikace*** – reverzibilní zablokování silně interagujících míst charakteru Lewisovy kyseliny přidáním pufru charakteru Lewisovy báze do eluentu (např. fosforečnanu, fluoridu, EDTA).<sup>23</sup>

***Permanentní modifikace*** - kvůli nízké stabilitě vazby Zr-O-Si-R a obtížné silanizaci zirkoniových hydroxylů, není ZrO<sub>2</sub> vhodný pro kovalentní navázání uhlovodíkových řetězců. Jinou možností permanentní modifikace je koordinačně-kovalentní vazba silné Lewisovy zásady na místa charakteru Lewisových kyselin (např. fosfát, fluorid, EDTPA). Dalším zajímavým typem

permanentní modifikace je kovalentní navázání oktadecylového ligandu k povrchu  $ZrO_2$  potaženém vrstvou uhlíku.<sup>23,26</sup>

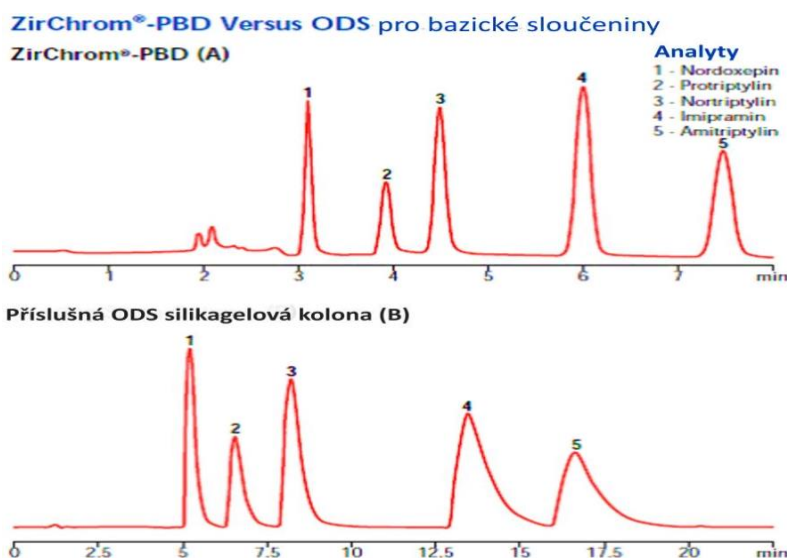
**Fyzikální pokrytí** – pro použití polárního  $ZrO_2$  také v reverzním módu, je nezbytné na jeho povrch zavést hydrofobní materiál. V praxi se setkáme s navázanými zesíťovanými polymery (polybutadien, polystyren) nebo s nanesením tenké vrstvy uhlíku na povrch  $ZrO_2$ . Depozicí zesíťovaného polyethyleniminu na  $ZrO_2$  se použití zirkonia rozšiřuje i na iontově-výměnnou chromatografii.<sup>23,26</sup>

### 3.3.5 Popis ZirChrom<sup>®</sup> - PBD kolony



Obr. 4: Znázornění povrchu částice zirkonia a interakcí povrchu s analytem a Lewisovou bází v podobě fosforečnanu přítomnou v eluentu. \*  $A^+$ : kationt analytu. (obrázek byl převzat a upraven ze zdroje č. 27)

Jedná se o reverzní stacionární fázi připravenou pokrytím polárního  $ZrO_2$  hydrofobním zesíťovaným polybutadienem (viz obrázek výše). Tato stacionární fáze vykazuje podobnost s tradiční ODS, navíc je stabilní až do teploty 150 °C, lze ji použít v celém rozsahu pH a vykazuje vysokou separační účinnost (> 120 tis. teoretických pater / m). Kromě toho poskytuje vynikající tvar píků pro bazické sloučeniny při vysokém pH (viz obr. 5).<sup>27</sup> To lze vysvětlit nižší protonizací bazického analytu při zvýšeném pH a tedy nižším podílem kation-výměnného mechanismu na retenci.<sup>28</sup>



Obr. 5: Chromatografické podmínky: MF (A) – 45:55 ACN:20mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , pH 12,0; MF (B) – 50:50 ACN:20mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , pH 7,0; průtok 1,0 ml/min, teplota 30 °C, nástřik 5 $\mu\text{L}$ , detekce při 254 nm. Obrázek byl převzat a upraven ze zdroje č. 27.

Jak bylo uvedeno dříve, úpravou povrchu  $\text{ZrO}_2$  nedošlo ke kompletní deaktivaci míst charakteru Lewisových kyselin. U neutrálních analytů se neuplatňují interakce s povrchem  $\text{ZrO}_2$ , ale výhradně reverzně-fázový mechanismus a lze očekávat podobné retenční chování jako na silikagelových reverzních fázích ( $\text{C}_8$ ,  $\text{C}_{18}$ ). Ovšem organické báze a látky charakteru Lewisových bází vykazují navíc smíšený retenční mechanismus reprezentovaný výměnou iontů a výměnou ligandů v závislosti na pH mobilní fáze.<sup>24</sup>

### 3.3.6 HPLC kolony na bázi $\text{ZrO}_2$ dostupné na trhu

Majoritními dodavateli zirkoniových kolon jsou společnosti Sigma-Aldrich s.r.o. a ZirChrom Separations, Inc. Společnost Sigma-Aldrich nabízí pod označením Discovery® reverzní zirkoniové stacionární fáze potažené polymery (polystyrenem, polybutadienem), grafitizovaným uhlíkem nebo s navázaným oktadecylovým ligandem na grafitizovaným uhlíkem potažený povrch. Nabídka firmy ZirChrom Separations, Inc. je širší, proto se kapitola zaměřuje na popis náplní kolon této firmy.

- *kolony s reverzním systémem fází*

Tab. 2: Zirkoniové kolony se systémem reverzních fází uvedené v portfoliu firmy ZirChrom Separations, Inc.:<sup>26</sup>

Název + stabilitní rozmezí:	Modifikace povrchu ZrO <sub>2</sub> :	Využití:
ZirChrom <sup>®</sup> -PS pH 1-13 teplota do 150 °C	Pokrytí tenkou vrstvou polystyrenu.	Ideální pro hydrofobní analyty s použitím MF o nižším obsahu organického rozpouštědla. Zvýšená selektivita pro polyaromáty.
ZirChrom <sup>®</sup> -CARB pH 1–14 teplota do 200 °C	Potažení velmi tenkou vrstvou grafitizovaného uhlíku.	Vhodná pro separaci geometrických izomerů a diastereomerů.
DiamondBond <sup>®</sup> -C18 pH 1-14 teplota až 200 °C	Kovalentní navázání C18 ligandu na grafitizovaným uhlíkem pokrytý povrch.	Použití pro analýzu steroidů a jejich analogů, výborná selektivita pro kyselé sloučeniny.
ZirChrom <sup>®</sup> -MS pH 1-10 teplota do 50 °C	Depozice zesíťovaného PBD + deaktivace míst charakteru Lewisových kyselin kovalentně navázanou EDTPA (do MF tedy není nutné přidání Lewisovy báze).	Díky nižší „krvácivosti“ kolony použití v chromatografii s MS detekcí – separace bazických, kyselých, neutrálních látek i jejich směsí.
ZirChrom <sup>®</sup> -EZ pH 1-10 teplota do 50 °C	Depozice zesíťovaného PBD + povrchová deaktivace míst charakteru Lewisových kyselin na principu chelatace (do MF tedy není nutné přidání Lewisovy báze).	Vhodná pro separaci kyselin a bází.

- **kolony s normálním systémem fází**

Tab. 3: Zirkoniové kolony se systémem normálních fází v portfoliu firmy ZirChromSeparations, Inc.:<sup>30</sup>

Název + stabilitní rozmezí:	Využití:
ZirChrom <sup>®</sup> -PHASE pH 1-14 teplota do 150°C	Jako extrémně stabilní SEC fáze, která při analýze aminů nechvostuje. Stabilnější alternativa křehkého a drahého hydroxyapatitu v chromatografii proteinů.

- **kolony s iontově-výměnným systémem fází**

Tab. 4: Zirkoniové kolony s iontově výměnným systémem fází v portfoliu firmy ZirChrom Separations, Inc.:<sup>26</sup>

Název + stabilitní rozmezí:	Modifikace povrchu ZrO <sub>2</sub> :	Využití:
ZirChrom <sup>®</sup> -SHAX pH 1-12 teplota do 80°C	Potažení povrchu kvarterním polyethyleniminem – působí jako silný anex a je hydrofilnější než níže uvedené kolona ZirChrom <sup>®</sup> -SAX.	Vhodná pro analýzu proteinů.
ZirChrom <sup>®</sup> -SAX pH 1-12 teplota do 80 °C	Potažení kvarterním polyethylendiaminem – silný anex, který je méně hydrofilní než kolona ZirChrom <sup>®</sup> -SHAX.	Separace anorganických a anorganických aniontů (aminokyselin, peptidů, proteinů, ve vodě rozpustných vitaminů atd.).
ZirChrom <sup>®</sup> -WAX pH 3-9 teplota do 200 °C	Potažení kvarterním polyethylendiiminem – slabě iontově výměnná fáze, která na svém povrchu zadržuje velmi slabé anionty.	Separace biomolekul (nukleotidů, sacharidů, peptidů, proteinů).
ZirChrom <sup>®</sup> -WCX pH 1-10 teplota do 150 °C	Vazba fosfátu jakožto Lewisovy báze k povrchu – slabý katex.	Analýza proteinů v kation-výměnném módu.
ZirChrom <sup>®</sup> -PEZ pH 1-10 teplota do 50 °C	Vazba EDTPA (Lewisovy báze) k povrchu.	Chromatografie proteinů v kation-výměnném módu (např. monoklonální protilátky)

- *kolony s chirální stacionární fází*

Tab. 5: Zirkoniové kolony s chirálním systémem fází v portfoliu firmy ZirChrom Separations, Inc.:<sup>26</sup>

Název + stabilitní rozmezí:	Modifikace povrchu ZrO <sub>2</sub> :	Využití:
ZirChrom®-Chiral(S)LEU ZirChrom®-Chiral(R)NESA ZirChrom®-Chiral(S)NESA ZirChrom®-Chiral(S)PG ZirChrom®-Chiral(R)PG ZirChrom®-CelluloZe pH 1-8 teplota do 50 °C	Reakce mezi povrchem ZrO <sub>2</sub> (Lewisova kyselina) a příslušnou vázající skupinou (Lewisovou bází), následné kovalentní navázání vhodného chirálního selektoru.	Separace enantiomerů na normálním systému fází.



### 3.4 Chromatografické podmínky pro stanovení kvetiapinu kapalinovou chromatografií uvedené v literatuře

V literatuře jsou popsány způsoby HPLC stanovení jak kvetiapinu samotného, tak současně s jeho dalšími metabolity (viz tabulka č. 6).

Tab. 6: Analytické podmínky pro stanovení kvetiapinu a jeho metabolitů kapalinovou chromatografií popsané v literatuře:

<b>Metoda č. 1</b>	
Mobilní fáze	mravenčnan amonný (10 mM, pH 3,0) : ACN (55:45)
Stacionární fáze	Sunifire C <sub>18</sub> (50 mm x 2,2 mm, 5µm)
Detekce	ESI-MS/MS
Úprava vzorku před analýzou	LLE z plasmy pomocí MTBE
Zdroj literatury	31
<b>Metoda č. 2</b>	
Mobilní fáze	octan amonný (2 mM, pH 5,0) : MeOH (1:99)
Stacionární fáze	Spherisorb S5W (150 mm × 4,6 mm, 5µm)
Detekce	UV při 267 nm
Úprava vzorku před analýzou	SPE
Zdroj literatury	32
<b>Metoda č. 3</b>	
Mobilní fáze	mravenčnan amonný (10 mM, pH 3,0) : MeOH - gradientová eluce
Stacionární fáze	Luna C <sub>18</sub> (50 mm x 2,0 mm, 5µm)
Detekce	MS/MS
Úprava vzorku před analýzou	LLE z plasmy pomocí MTBE
Zdroj literatury	33
<b>Metoda č. 4</b>	
Mobilní fáze	kyselina mravenčí 1,7mM, octan amonný 5,8mM : ACN (65:35)
Stacionární fáze	Kromasil C <sub>18</sub> (150 mm x 4,6 mm, 5 µm)
Detekce	ESI-MS
Úprava vzorku před analýzou	SPE
Zdroj literatury	33
<b>Metoda č. 5</b>	
Mobilní fáze	50mM methanolický roztok octanu amonného, pH 6,0
Stacionární fáze	Spherisorb S5SCX (100 mm x 2,1 mm, 5 µm)
Detekce	MS/MS
Úprava vzorku před analýzou	LLE z plasmy pomocí směsi butylacetátu a butanolu
Zdroj literatury	34

## **4. Experimentální část**

## 4.1 Chemikálie a pomůcky

### 4.1.1 Chemikálie

- pracovní standard: kvetiapin fumarát, Sigma Aldrich, Německo
- pracovní standard: 7-hydroxykvetiapin (1mg v 1 ml), Sigma Aldrich, Německo
- pracovní standard: norkvetiapin (1mg v ml), Sigma Aldrich, Německo
- acetonitril (ACN), Chromasolv gradient grade for HPLC, Sigma Aldrich, Německo
- methanol (MeOH), Chromasolv gradient grade for HPLC, Sigma Aldrich, Německo
- octan amonný ( $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ ), Penta, Česká republika
- kyselina octová (99,8 - 100,5%), Sigma Aldrich, Německo
- voda čištěná

### 4.1.2 Sestava pro HPLC

- kontrolní jednotka: CTO-20AC VP Shimadzu
- čerpadlo: LC-20AD XR VP Shimadzu
- degasér: DGU-20A3 VP Shimadzu
- termostat kolony: CTO-20AS VP Shimadzu
- PC program: Shimadzu-CLASS-VP 5
- UV-VIS detektor: SPD-20A VP Shimadzu
- autosampler: SIL-20AC XR VP Shimadzu
- řídicí jednotka: CBM-20A VP Shimadzu
- chromatografická kolona: ZirChrom<sup>®</sup> - PBD, 150 x 4,6 mm s částicemi velikosti 5  $\mu\text{m}$ , ZirChrom Separations, Inc., USA

### 4.1.3 Přístroje

- digitální váhy: Sartorius AG typ A200S, Německo
- pH-metr: SCHOTT CG 843, Schott Instruments GmbH, Německo
- magnetické míchadlo s míchadélky, IKA Color Squid, Německo

### 4.1.4 Pomůcky

- kádinky, odměrné baňky, odměrné válce, dělené pipety, balónek k pipetě, skleněná tyčinka

zábrusové lahve k uchovávání kapalin, vialky a inserty, laboratorní lžičky, lodičky, stříčka, mikropipety, membránový filtr 0,45  $\mu\text{m}$ , alobal.

## 4.2 Obecné postupy

### 4.2.1 Příprava standardů

Pro izokratickou eluci byl připraven zásobní roztok standardu kvetiapinu o koncentraci 0,1 mg/ml navážením 1 mg kvetiapinu do 10 ml odměrné baňky. Baňka byla doplněna 50% ACN a poté uchovávána v lednici. Odebráním 20 $\mu$ l pracovních standardů 7-hydroxykvetiapinu a norkvetiapinu o koncentraci 1 mg/ml mikropipetou do insertů a zředěním 120  $\mu$ l methanolu byly připraveny zásobní roztoky standardů o koncentraci 0,1 mg v 1 ml.

Vzorek pro analýzu směsi mateřské látky kvetiapinu a jeho dvou metabolitů metodou gradientové eluce byl připraven odebráním 40 $\mu$ l z jednotlivých zásobních roztoků standardů o koncentraci 0,1 mg/ml do insertu a doplněním na 200 $\mu$ l methanolem – koncentrace jednotlivých standardů ve směsi činila 0,02 mg/ml.

### 4.2.2 Příprava mobilní fáze s octanovým pufrem

Mobilní fáze se skládala ze dvou složek:

- Anorganická složka – CH<sub>3</sub>COONH<sub>4</sub>
- Organická složka – ACN – již bez další úpravy.

Pufř byl připraven navážením pevné látky ( $M_{\text{CH}_3\text{COONH}_4} = 77,0825 \text{ g/mol}$ ) do kádinky a rozpouštěním v potřebném množství čištěné vody. Pomocí kyseliny octové (1 mol/l) bylo pH upraveno na požadovanou hodnotu (pH 5,0; pH 6,0 nebo pH 7,0). Takto upravený roztok byl kvantitativně převeden do odměrné baňky, doplněn čištěnou vodou po rysku, přefiltrován přes mikrofiltr 0,45  $\mu$ m a následně v požadovaném poměru smísen s acetonitrilem. Pro účely práce byly připraveny tyto koncentrace octanu: 3 mM, 6 mM a 12 mM. Použité poměry octanového pufřu CH<sub>3</sub>COONH<sub>4</sub> : ACN – 50 : 50; 60 : 40; 70 : 30; 75 : 25; 80 : 20; 90 : 10 (v/v).

### 4.2.3 Výchozí nastavení chromatografických podmínek

Všechna měření na koloně ZirChrom-PBD<sup>®</sup> probíhala s tímto nastavením chromatografu:

- Mobilní fáze: CH<sub>3</sub>COONH<sub>4</sub> (3 mM, 6 mM, 12 mM; pH 5,0; 6,0;7,0) : ACN (v/v)
- Teplota: 30 °C
- Průtok: 1,0 ml/min
- Detekce: 254 nm
- Injikovaný objem: 10  $\mu$ l

#### 4.2.4 Příprava kapalinového chromatografu před samotným měřením

Před každým prvním měřením nebo při jakékoli změně mobilní fáze byl chromatograf řádně propláchnut mobilní fází. Pro dostatečnou ekvilibraci přístroje se poté systémem nechala alespoň 90 minut volně protékat mobilní fází – nižší čas se pro ustálení základní linie jevil jako nedostatečný.

#### 4.2.5 Optimalizace podmínek separace

Mobilní fázi tvořila směs acetonitrilu a octanu amonného jako pufru. Nejprve se pracovalo s jednotlivými analyty samostatně – jejich koncentrace byla 0,1 mg/ml. Výchozí poměr  $\text{CH}_3\text{COONH}_4$  : ACN byl 70 : 30 (v/v). Byl sledován vliv změny koncentrace a pH pufru (3 mM, 6 mM, 12 mM; pH 5,0; 6,0; 7,0) na retenční chování kvetiapinu, 7-hydroxykvetiapinu a norkvetiapinu v izokratickém režimu. Hodnota pH byla upravována pomocí kyseliny octové (1 mol/l).

Později se přistoupilo také ke změně poměru octanového pufru vůči acetonitrilu v mobilní fázi – na 80 : 20 a 75 : 25 (v/v) u kvetiapinu a 7-hydroxykvetiapinu a na 60 : 40 a 50 : 50 (v/v) u norkvetiapinu. V tomto případě měl octanový pufr koncentraci 6 mM a pH 6,0.

Pro separaci směsi zkoumaných standardů o koncentraci 0,02 mg/ml byla zvolena metoda gradientové eluce. Na základě zjištěných poznatků o retenčním chování kvetiapinu, 7-hydroxykvetiapinu a norkvetiapinu byl použit octanový pufr o koncentraci 6 mM a pH 6,0 a acetonitril. V zásobníku A byla směs  $\text{CH}_3\text{COONH}_4$  : ACN, a to v poměru nejprve 50 : 50 (v/v), později 90 : 10 (v/v). V zásobníku B byl vždy čistý octanový pufr.

#### 4.2.6 Vývoj gradientové eluce

Pro separaci směsi standardů bylo testováno celkem třináct gradientových profilů. Nastříkována byla směs standardů kvetiapinu, 7-hydroxykvetiapinu a norkvetiapinu o koncentraci 0,02 mg/ml. Vyhodnocení nejvýznamnějších výsledků je předmětem kapitoly 5.4.

##### **Gradient č. 1:**

V zásobníku B byl čistý octanový pufr (6 mM, pH 6,0), v zásobníku B směs acetonitrilu a octanového pufru (6 mM, pH 6,0) v poměru 50 : 50 (v/v). Doba analýzy byla nastavena na 35 minut a časové schéma gradientu bylo následující:

Čas (min)	Mobilní fáze A v % (v/v)	Mobilní fáze B v % (v/v)
0-4	50	50
4-6	50→60	50→40
6-10	60	40
10-12	60→80	40→20
12-25	80	20
25-27	80→50	20→50
27-35	50	50

##### **Gradient č. 2:**

V zásobníku B byl čistý octanový pufr (6 mM, pH 6,0), v zásobníku B směs acetonitrilu a octanového pufru (6 mM, pH 6,0) v poměru 50 : 50 (v/v). Ve snaze zvýšit retenci 7-hydroxykvetiapinu byl oproti gradientu č. 1 zvýšen poměr pufru na počátku analýzy. Doba analýzy byla zkrácena na 25 minut a gradient byl zvolen následující:

Čas (min)	Mobilní fáze A v % (v/v)	Mobilní fáze B v % (v/v)
0-4	40	60
4-10	40→80	60→20
10-20	80	20
20-22	80→40	20→60
22-25	40	60

**Gradient č. 3:**

V zásobníku B byl čistý octanový pufr (6 mM, pH 6,0), v zásobníku B směs acetonitrilu a octanového pufru (6mM, pH 6,0) v poměru 50 : 50 (v/v). Doba analýzy byla zkrácena na 22 minut a gradient byl nastaven takto:

Čas (min)	Mobilní fáze A v % (v/v)	Mobilní fáze B v % (v/v)
0-2	40	60
2-8	40→80	60→20
8-16	80	20
16-18	80→40	20→60
18-22	40	60

**Gradient č. 4:**

V zásobníku B byl čistý octanový pufr (6 mM, pH 6,0), v zásobníku B směs acetonitrilu a octanového pufru (6 mM, pH 6,0) v poměru 50 : 50 (v/v). Pro zkrácení retenčního času norkvetiapinu a celkové doby analýzy byl v 6. minutě zvýšen poměr acetonitrilu k octanovému pufru. Doba analýzy zůstala 22 minut a gradient byl změněn následovně:

Čas (min)	Mobilní fáze A v % (v/v)	Mobilní fáze B v % (v/v)
0-2	40	60
2-6	40→100	60→0
6-12	100	0
12-17	100→40	0→60
17-22	40	60



**Gradient č. 5:**

Bylo zvýšeno zastoupení acetonitrilu v zásobníku A z dosavadního poměru 50:50 na poměr 90:10 (ACN : pufr, v/v). Obsah zásobníku B zůstal totožný – čistý octanový pufr (6 mM, pH 6,0). Toto uspořádání zůstalo stejné i pro všechny následující gradienty. Gradient byl nastaven tak, aby byla koncentrace pufru v mobilní fázi do 2. minuty vysoká a došlo tím k delšímu zadržení 7-hydroxykvetiapinu na koloně. Pro snížení retenčního času norkvetiapinu bylo od 6. minuty naopak zastoupení pufru v eluentu sníženo ve prospěch acetonitrilu.

Čas (min)	Mobilní fáze A v % (v/v)	Mobilní fáze B v % (v/v)
0-2	22,2	77,8
2-6	22,2→66,6	77,8→33,4
6-12	66,6	33,4
12-18	66,6→22,2	33,4→77,8
18-22	22,2	77,8

**Gradient č. 6:**

Ke snižování výchozího zastoupení pufru ve prospěch acetonitrilu došlo oproti gradientu č. 5 již od 1. minuty. Další podmínky gradientu se od předchozí metody nijak nelišily.

Čas (min)	Mobilní fáze A v % (v/v)	Mobilní fáze B v % (v/v)
0-1	22,2	77,8
1-6	22,2→66,6	77,8→33,4
6-12	66,6	33,4
12-18	66,6→22,2	33,4→77,8
18-22	22,2	77,8

**Gradient č. 7:**

Gradientový profil byl obdobný jako v gradientu č. 6 vyjma ještě vyšší koncentrace pufru v mobilní fázi na počátku analýzy. Schéma gradientové eluce bylo následující:

Čas (min)	Mobilní fáze A v % (v/v)	Mobilní fáze B v % (v/v)
0-1	11,1	88,9
1-6	11,1→66,6	88,9→33,4
6-12	66,6	33,4
12-18	66,6→11,1	33,4→88,9
18-22	11,1	88,9

**Gradient č. 8:**

Oproti všem předchozím gradientům byl výchozí poměr pufru vůči acetonitrilu v mobilní fázi snižován již velmi brzy. Během 5. a 11. minuty byl poměr konstantní a ustalování na počáteční poměr bylo nastaveno od 11. minuty. Čas analýzy byl zkrácen na 17 minut.

Čas (min)	Mobilní fáze A v % (v/v)	Mobilní fáze B v % (v/v)
0-0,2	11,1	88,9
0,2-5,0	11,1→66,6	88,9→33,4
5-11	66,6	33,4
11-15	66,6→11,1	33,4→88,9
15 -17	11,1	88,9

**Gradient č. 9:**

Gradient byl stejný jako gradient č. 7 kromě ještě většího poklesu výchozí koncentrace pufru ve prospěch acetonitrilu v 1. minutě. Celkové schéma bylo následující:

Čas (min)	Mobilní fáze A v % (v/v)	Mobilní fáze B v % (v/v)
0-1	11,1	88,9
1-6	11,1→72,2	88,9→27,8
6-12	72,2	27,8
12-18	72,2→11,1	27,8→88,9
18-22	11,1	88,9

**Gradient č. 10:**

Ustalování na výchozí koncentraci pufru v eluentu bylo nastaveno již od 11. minuty a celková doba analýzy byla zkrácena na 15 minut.

Čas (min)	Mobilní fáze A v % (v/v)	Mobilní fáze B v % (v/v)
0-1	11,1	88,9
1-6	11,1→72,2	88,9→27,8
6-11	72,2	27,8
11-13	72,2→11,1	27,8→88,9
13-15	11,1	88,9

**Gradient č. 11:**

Ve srovnání s gradientem č. 10 bylo od 6. minuty zastoupení acetonitrilu na úkor pufru v mobilní fázi zvýšeno ještě výrazněji.

Čas (min)	Mobilní fáze A v % (v/v)	Mobilní fáze B v % (v/v)
0-1	11,1	88,9
1-6	11,1→83,3	88,9→16,7
6-11	83,3	16,7
11-13	83,3→11,1	16,7→88,9
13-15	11,1	88,9

**Gradient č. 12:**

V tomto gradientu bylo zvyšování koncentrace acetonitrilu (respektive snižování koncentrace pufru) z výchozích hodnot ještě strmější.

Čas (min)	Mobilní fáze A v % (v/v)	Mobilní fáze B v % (v/v)
0-1	11,1	88,9
1-6	11,1→88,9	88,9→11,1
6-11	88,9	11,1
11-13	88,9→11,1	11,1→88,9
13-15	11,1	88,9

**Gradient č. 13:**

Do první minuty byl výchozí poměr pufru k acetonitrilu ještě vyšší než v gradientech č. 7 – 12. Snižování počáteční koncentrace pufru bylo nastaveno od 1. minuty na stejnou koncentraci jako v gradientu č. 5. Mezi 5. a 11. minutou byla koncentrace mobilní fáze konstantní a ustalování na původní koncentraci bylo nastaveno od 11. minuty.

Čas (min)	Mobilní fáze A v % (v/v)	Mobilní fáze B v % (v/v)
0-1	5,6	94,4
1-5	5,6→72,2	94,4→27,8
5-11	72,2	27,8
11-13	72,2→5,6	27,8→94,4
13-15	5,6	94,4

## **5. Výsledky a diskuze**

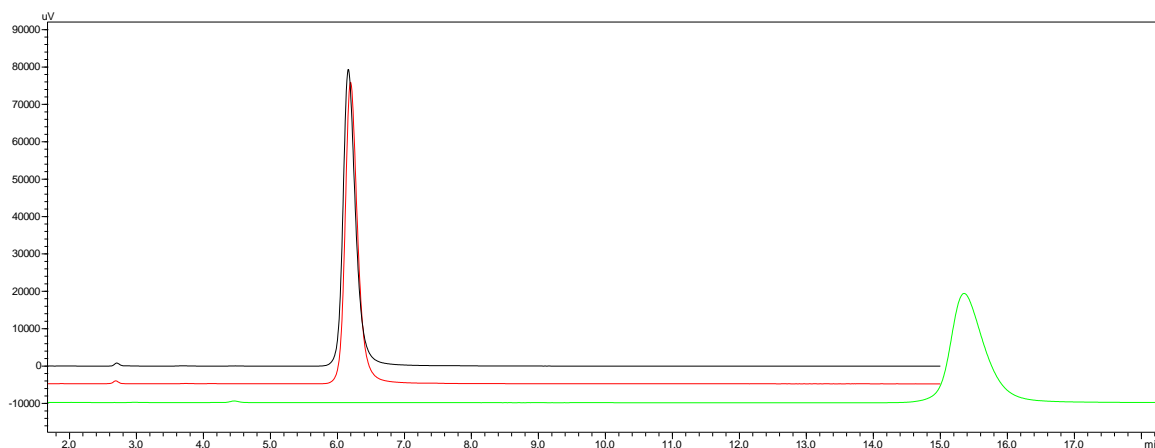
## 5.1 Retenční chování kvetiapinu

### 5.1.1 Vliv koncentrace octanového pufru

Složení MF:  $\text{CH}_3\text{COONH}_4$  : ACN – 70 : 30 (v/v)

pH  $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ : 6,0

koncentrace  $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ : 3 mM, 6 mM, 12 mM



*Obr. 6: Záznam retenčního chování kvetiapinu v závislosti na koncentraci octanového pufru.*

*černá – 6mM octanový pufr*

*červená – 12mM octanový pufr*

*zelená – 3mM octanový pufr*

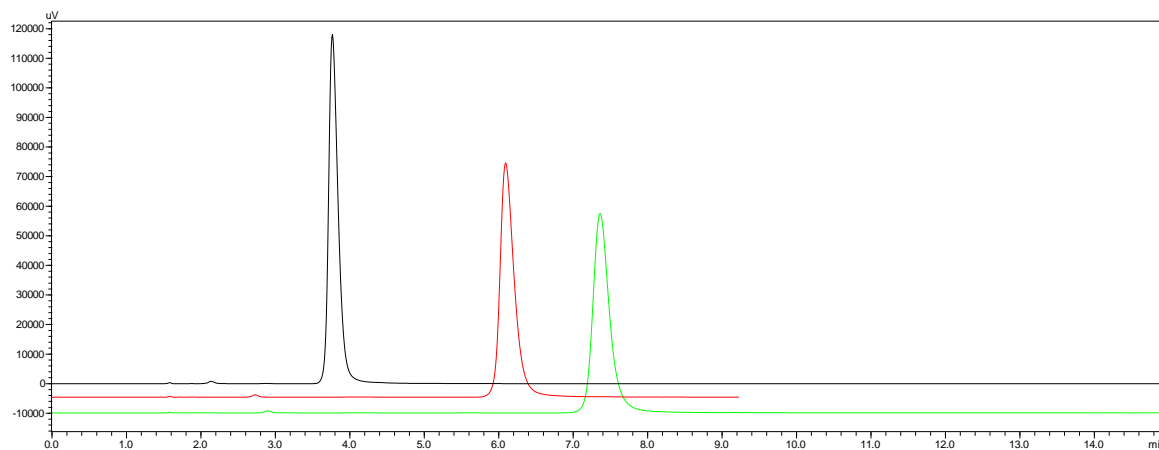
**Komentář:** Z chromatogramu vyplývá, že pouze nízká koncentrace pufru (3 mM) vedla k výraznému prodloužení retenčního času, rozšířila se také eluční zóna kvetiapinu. Toto lze vysvětlit interakcí octanu jakožto Lewisovy báze s kyselými místy charakteru Lewisovy kyseliny na povrchu zirkonia, která nesou záporný náboj. Čím je v MF vyšší koncentrace Lewisovy báze (octanu), tím jsou tato místa více blokována, interakce analytu s negativně nabitým povrchem zirkonia je nižší, což se projeví úbytkem retence látky. Jen nepatrná změna retenčních časů při koncentraci octanu 6 mM a 12 mM svědčí o tom, že další zvyšování koncentrace Lewisovy báze v eluentu nevede k vyšší saturaci míst charakteru Lewisových kyselin a k dalšímu snížení retenčního času.

### 5.1.2 Vliv pH octanového pufru

Složení MF:  $\text{CH}_3\text{COONH}_4$  : ACN – 70 : 30 (v/v)

koncentrace  $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ : 6 mM

pH  $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ : 5,0; 6,0; 7,0



Obr. 7: Záznam retenčního chování kvetiapinu v závislosti na pH octanového pufru.

černá – pH 5,0

červená – pH 6,0

zelená – pH 7,0

**Komentář:** Se zvyšujícím pH octanového pufru se zvyšuje retence kvetiapinu na koloně. Nejnižšího retenčního času bylo dosaženo při pH 5,0, neboť při této hodnotě je kvetiapin nejvíce disociován (jeho pKa je 6,9), tím je hydrofilnější, na retenci se více uplatňuje kation-výměnný mechanismus a hydrofobní interakce jsou oslabeny. Při pH 7,0 je kvetiapin méně disociován, je hydrofobnější a na retenci má vyšší vliv reverzně-fázový mechanismus.

### 5.1.3 Zastoupení organické složky (ACN) v mobilní fázi

Složení MF: CH<sub>3</sub>COONH<sub>4</sub> : ACN – 80 : 20, 75 : 25, 70 : 30 (v/v)

pH CH<sub>3</sub>COONH<sub>4</sub>: 6,0

koncentrace CH<sub>3</sub>COONH<sub>4</sub>: 6 mM

*Tab. 7: Retenční časy kvetiapinu v závislosti na koncentraci acetonitrilu v eluentu*

Koncentrace ACN v %:	Retenční čas (min)
20	25,9
25	11,9
30	6,1

**Komentář:** Se vzrůstajícím zastoupením organické složky v eluentu, retenční čas klesal, což svědčí o výrazném podílu reverzně-fázového mechanismu na retenci.



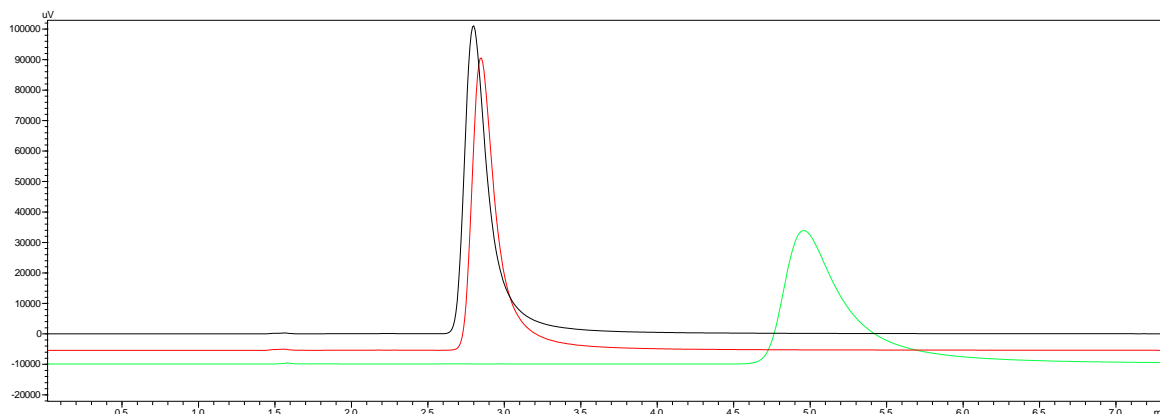
## 5.2 Retenční chování 7-hydroxykvetiapinu

### 5.2.1 Vliv koncentrace octanového pufru

Složení MF:  $\text{CH}_3\text{COONH}_4$  : ACN – 70 : 30 (v/v)

pH  $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ : 6,0

koncentrace  $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ : 3 mM, 6 mM, 12 mM



Obr. 8: Retenční chování 7-hydroxykvetiapinu v závislosti na koncentraci octanového pufru

černá – 12mM octanový pufr

červená – 6mM octanový pufr

zelená – 3mM octanový pufr

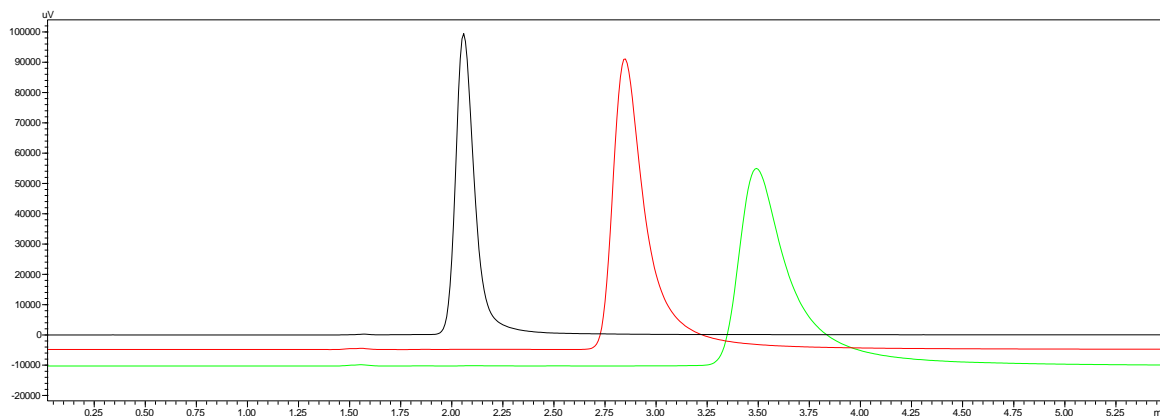
**Komentář:** 7-hydroxykvetiapin vykazoval obdobné vlastnosti jako mateřská látka. Retenční čas byl nejnižší při 12mM koncentraci octanu a příliš se nelišil od retenčního času analytu při 6mM koncentraci octanu. Ke zvýšení retenčního času došlo pouze při koncentraci 3 mM, i když ne k tak výraznému jako u kvetiapinu. Celkově kratší retenční časy 7-hydroxykvetiapinu lze přičíst nižšímu uplatnění hydrofobních interakcí na retenci. V porovnání s kvetiapinem obsahuje v poloze 7 dibenzothiazepinového seskupení hydroxylovou skupinu – jedná se tedy o hydrofilnější sloučeninu.

## 5.2.2 Vliv pH octanového pufru

Složení MF:  $\text{CH}_3\text{COONH}_4$  : ACN – 70 : 30 (v/v)

koncentrace  $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ : 6 mM

pH  $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ : 5,0; 6,0; 7,0



Obr. 10: Retenční chování 7-hydroxykvetiapinu v závislosti na pH octanového pufru

Černá – pH 5,0

Červená – pH 6,0

Zelená – pH 7,0

**Komentář:** S rostoucím pH pufru dle předpokladu došlo ke zvýšení retenčního času a k rozšíření eluční zóny látky. Při pH 5,0 byl 7-hydroxykvetiapin více disociován a tedy hydrofilnější, což vedlo ke snížení podílu reverzně-fázového mechanismu na retenci.

### 5.2.3 Vliv zastoupení organické složky (ACN) v mobilní fázi

Složení MF: CH<sub>3</sub>COONH<sub>4</sub> : ACN – 80 : 20, 75 : 25, 70 : 30 (v/v)

pH CH<sub>3</sub>COONH<sub>4</sub>: 6,0

koncentrace CH<sub>3</sub>COONH<sub>4</sub>: 6 mM

Tab. 8: Retenční časy 7-hydroxykvetiapinu v závislosti na koncentraci acetonitrilu v eluentu.

Koncentrace ACN v %:	Retenční čas (min)
20	7,0
25	4,3
30	2,0

**Komentář:** Potvrdilo se, že se zvyšujícím se zastoupením organické složky (ACN) v mobilní fázi na úkor pufru, klesá retenční čas.

### 5.3 Sledování retenčního chování norkvetiapinu:

Norkvetiapin je bazická látka charakteru sekundárního aminu – bazičtější a lipofilnější než předchozí zkoumané sloučeniny. Vykazoval značně odlišné retenční časy i tvar píku od předchozích dvou analytů. Při všech níže uvedených podmínkách vykazoval tzv. „chvostování píků“. Pro nesymetrické píky a dlouhý retenční čas norkvetiapinu jsou uvedeny pouze retenční časy norkvetiapinu při různých podmínkách.

#### 5.3.1 Vliv koncentrace octanového pufru

Složení MF:  $\text{CH}_3\text{COONH}_4$  : ACN – 70 : 30 (v/v)

koncentrace  $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ : 3 mM, 6 mM, 12 mM

pH  $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ : 5,0

Tab. 9: Retenční časy norkvetiapinu v závislosti na koncentraci octanového pufru při pH 5,0

Koncentrace $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ :	Retenční čas (min):
3 mM	12,4
6 mM	11,4
12 mM	10,9

Složení MF:  $\text{CH}_3\text{COONH}_4$  : ACN – 70 : 30 (v/v)

koncentrace  $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ : 3 mM, 6 mM, 12 mM

pH  $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ : 6,0

Tab. 10: Retenční časy norkvetiapinu v závislosti na koncentraci octanového pufru při pH 6,0

Koncentrace $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ :	Retenční čas (min):
3 mM	53,7
6 mM	23,5
12 mM	21,1

Složení MF: CH<sub>3</sub>COONH<sub>4</sub> : ACN – 70 : 30 (v/v)  
 koncentrace CH<sub>3</sub>COONH<sub>4</sub>: 3 mM, 6 mM, 12 mM  
 pH CH<sub>3</sub>COONH<sub>4</sub>: 7,0

Tab. 11: Retenční časy norkvetiapinu v závislosti na koncentraci octanového pufru při pH 7,0

Koncentrace CH <sub>3</sub> COONH <sub>4</sub> :	Retenční čas (min):
3 mM	52,4
6 mM	45,1
12 mM	35,5

**Komentář:** Retenční časy norkvetiapinu jasně ukazují, že zvýšení koncentrace octanového pufru v mobilní fázi vede k rychlejší eluci metabolitu. Octan totiž působí jako Lewisova báze, která blokuje záporně nabitá místa charakteru Lewisových kyselin na povrchu ZrO<sub>2</sub> a nedochází proto v takové míře k zadržování na koloně. Zvýšení iontové síly mobilní fáze oslabí interakce mezi bazickou sloučeninou a povrchem zirkonia – výsledkem je nižší retence. Vyšší retenci norkvetiapinu než u předchozích dvou látek lze přičíst vyšší bazicitě a lipofilitě sloučeniny.

### 5.3.2 Vliv pH octanového pufru

Složení MF: CH<sub>3</sub>COONH<sub>4</sub> : ACN – 70 : 30 (v/v)  
 koncentrace CH<sub>3</sub>COONH<sub>4</sub>: 6 mM  
 pH CH<sub>3</sub>COONH<sub>4</sub>: 5,0; 6,0; 7,0

Tab. 12: Retenční časy norkvetiapinu v závislosti na pH octanového pufru

pH CH <sub>3</sub> COONH <sub>4</sub> :	Retenční čas (min):
5,0	11,4
6,0	23,5
7,0	45,1

**Komentář:** S klesajícím pH byla retence norkvetiapinu kratší. Při nižších hodnotách pH je norkvetiapin více disociován a jsou pravděpodobně dominantní kation-výměnné interakce. Při pH 7,0 byl podíl disociované formy nižší a na retenci se začaly také uplatňovat hydrofobní interakce. Pokud bychom zvýšili pH pufru nad pKa norkvetiapinu (pKa nejbazičtějšího centra je 8,8), potlačila by se jeho ionizace a na retenci by se podílel pouze reverzně-fázový retenční mechanismus.

### 5.3.3 Vliv zastoupení organické složky (ACN) v mobilní fázi

Složení MF: CH<sub>3</sub>COONH<sub>4</sub> : ACN – 70 : 30; 60 : 40; 50 : 50 (v/v)

pH CH<sub>3</sub>COONH<sub>4</sub>: 6,0

koncentrace CH<sub>3</sub>COONH<sub>4</sub>: 6 mM

*Tab. 13: Retenční časy norkvetiapinu v závislosti na koncentraci acetonitrilu v eluentu*

Koncentrace ACN v %:	Retenční čas (min)
30	23,5
40	15,0
50	9,5

**Komentář:** Se zvyšující eluční silou mobilní fáze retenční čas norkvetiapinu klesal.

## 5.4 Gradientová eluce

Vzhledem k odlišnému retenčnímu chování norkvetiapinu od ostatních derivátů, byla pro analýzu směsi látek navržena metoda gradientové eluce s cílem:

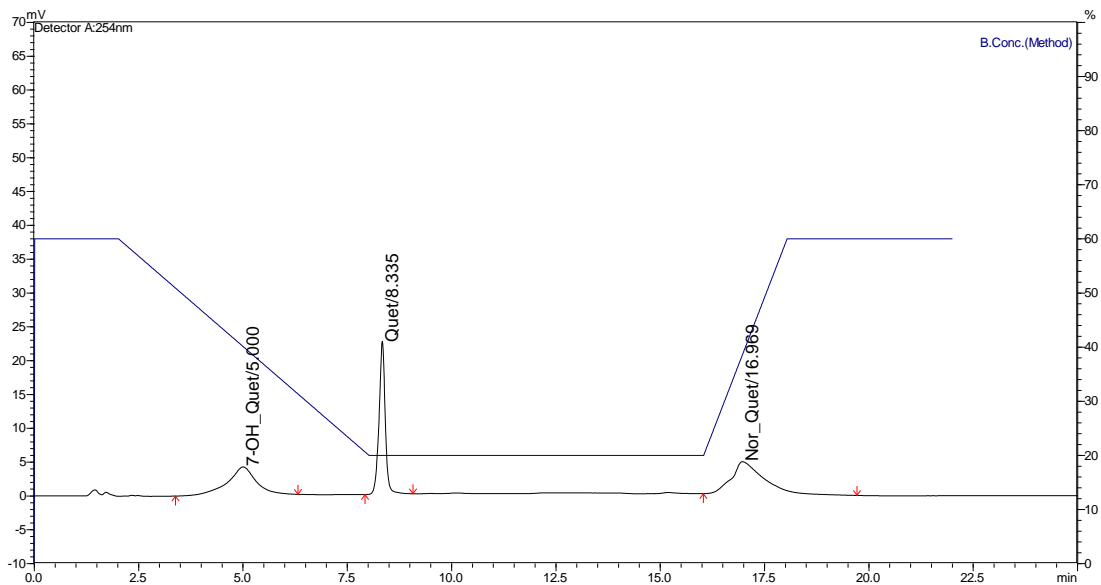
- Snížit retenční čas norkvetiapinu a zkrátit tak celkovou dobu analýzy
- Zlepšit tvar píku norkvetiapinu
- Dosáhnout takového retenčního času 7-hydroxykvetiapinu, aby nedošlo při případné analýze směsi látek z plasmy k zastínění jeho píku balastními látkami
- Dosáhnout dostatečného rozlišení všech píků ve směsi (nejméně 1,5).

Na základě předchozích poznatků byla pro účely gradientu zvolena koncentrace pufru 6 mM a jeho úprava na pH 6,0. Výše uvedených požadavků jsme se pokoušeli dosáhnout optimálními změnami zastoupení organické složky (ACN) v eluentu – zejména jejím snížením na počátku analýzy, aby došlo k optimální eluci 7-hydroxykvetiapinu. Poté jejím zvýšením, aby bylo dosaženo poklesu retence norkvetiapinu a celkového zkrácení doby analýzy.

V gradientech 1 - 3 byly získány chromatogramy buď s nízkým retenčním časem, neostrým píkem 7-hydroxykvetiapinu, nebo s kombinací obou faktorů. Norkvetiapin se oproti kvetiapinu a 7-hydroxykvetiapinu eluoval mnohem později a chvostoval.

Tab. 14: Gradientový profil metody č. 3 - zásobník A = acetonitril : pufr v poměru 50:50 (v/v); zásobník B = 6mM octanový pufr, pH 6,0

Čas (min)	Mobilní fáze A v % (v/v)	Mobilní fáze B v % (v/v)
0-2	40	60
2-8	40→80	60→20
8-16	80	20
16-18	80→40	20→60
18-22	40	60



Obr. 11: Záznam separace směsi kvetiapinu a jeho dvou metabolitů pomocí gradientu č. 3  
 7-OH\_Quet = 7-hydroxykvetiapin; Quet = kvetiapin; Nor\_Quet = norkvetiapin

**Komentář:** Z chromatogramu vyplývá, že rozlišení mezi jednotlivými píky je sice dostatečné, ovšem píky 7-hydroxykvetiapinu a norkvetiapinu jsou neostré, norkvetiapin se eluuje až kolem 17. minuty a celková doba analýzy je 22 minut.

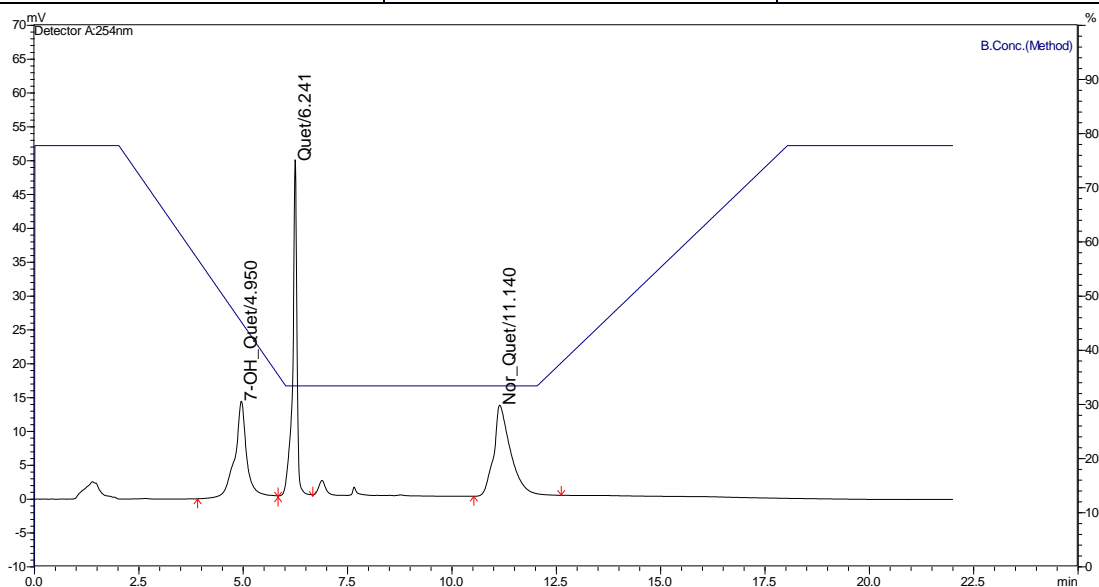
V gradientu č. 4 byl pokles počáteční koncentrace pufru strmější, mezi 6. a 12. minutou bylo zastoupení acetonitrilu v mobilní fázi 50 % - došlo ke zlepšení symetrie píku 7-hydroxykvetiapinu, norkvetiapin se eluoval před 14. minutou. Schéma gradientu je uvedeno na str. 40.



Gradientem č. 5 bylo dosaženo nižší retence norkvetiapinu a lepší symetrie všech analytů díky zvýšení zastoupení acetonitrilu v 6. minutě a jeho konstantní koncentraci do 12. minuty.

Tab. 15: Gradientový profil metody č. 5 - zásobník A = ACN : pufr v poměru 90:10 (v/v); zásobník B = 6mM octanový pufr, pH 6,0

Čas (min)	Mobilní fáze A v % (v/v)	Mobilní fáze B v % (v/v)
0-2	22,2	77,8
2-6	22,2→66,6	77,8→33,4
6-12	66,6	33,4
12-18	66,6→22,2	33,4→77,8
18-22	22,2	77,8



Obr. 12: Záznam separace směsi kvetiapinu a jeho dvou metabolitů pomocí gradientu č. 5  
7-OH\_Quet = 7-hydroxykvetiapin; Quet = kvetiapin; Nor\_Quet = norkvetiapin

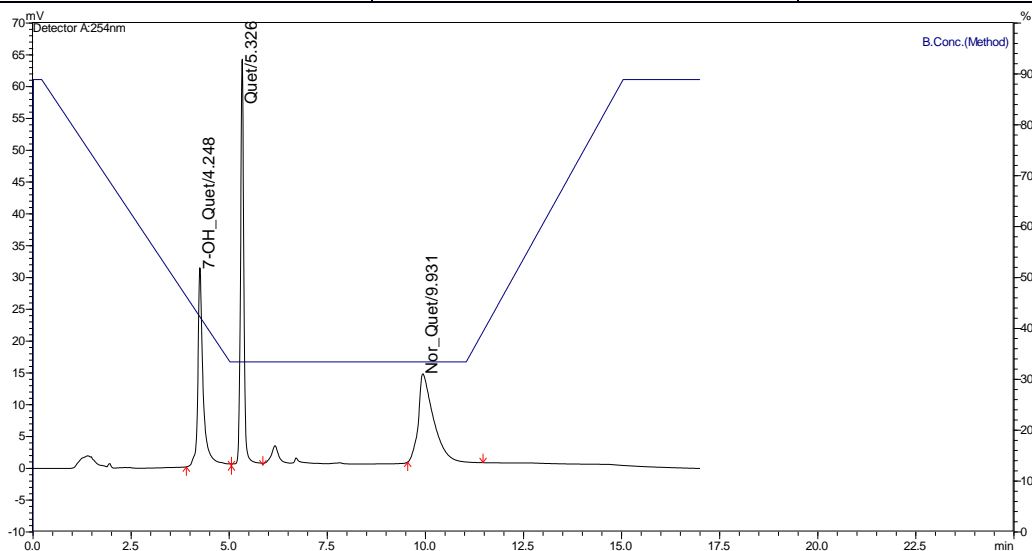
**Komentář:** Tímto gradientem bylo dosaženo výrazného zkrácení retenčního času norkvetiapinu a zlepšení symetrie píku zejména kvetiapinu.

V gradientech č. 6 a 7 byla počáteční koncentrace pufru snižována ve prospěch acetonitrilu již od 1. minuty – tím se nepatrně urychlila eluce všech tří analytů. Lepší symetrie píku 7-hydroxykvetiapinu bylo dosaženo v gradientu č. 7, kde byla výchozí koncentrace pufru zvýšena. Schéma těchto gradientů je popsáno na str. 41 - 42.

V gradientu č. 8 dalším snižováním zastoupení acetonitrilu na úkor pufru na počátku analýzy, jeho zvýšením v 5. minutě a konstantním poměrem až do 11. minuty, došlo ke zkrácení retenčních časů všech analytů i celkové doby analýzy na 17 minut.

Tab. 16: Gradientový profil metody č. 8 - zásobník A = ACN : pufr – 90:10 (v/v); zásobník B = 6mM octanový pufr, pH 6,0

Čas (min)	Mobilní fáze A v %(v/v)	Mobilní fáze B v % (v/v)
0,0-0,2	11,1	88,9
0,2-5,0	11,1→66,6	88,9→33,4
5-11	66,6	33,4
11-15	66,6→11,1	33,4→88,9
15 -17	11,1	88,9



Obr. 12: Záznam separace směsi kvetiapinu a jeho metabolitů pomocí gradientu č. 8

7-OH\_Quet = 7-hydroxykvetiapin; Quet = kvetiapin; Nor\_Quet = norkvetiapin

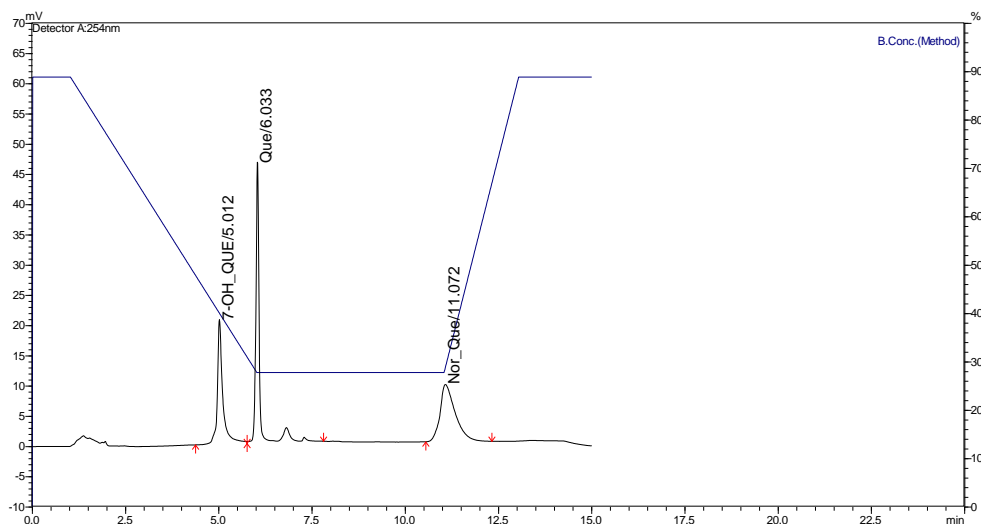
**Komentář:** Píky 7-hydroxykvetiapinu a kvetiapinu jsou symetrické a dostatečně rozlišené, norkvetiapin se eluuje v 10. minutě.

Gradient č. 9 vznikl obměnou gradientu č. 7 – od 6. minuty začala klesat koncentrace pufru ve prospěch acetonitrilu v mobilní fázi ještě výrazněji. Tímto bylo dosaženo nižších retenčních časů všech tří analytů a lepší symetrie píku 7-hydroxykvetiapinu. Schéma gradientu je popsáno na str. 42.

V gradientu č. 10 bylo ustalování na výchozí koncentraci pufru vůči acetonitrilu nastaveno již od 11. minuty. Doba analýzy byla zkrácena na 15 minut.

Tab. 17: Gradientový profil metody č. 10: zásobník A = ACN : pufr – 90:10 (v/v); zásobník B = octanový pufr (pH 6,0, 6 mM)

Čas (min)	Mobilní fáze A v % (v/v)	Mobilní fáze B v % (v/v)
0-1	11,1	88,9
1-6	11,1→72,2	88,9→27,8
6-11	72,2	27,8
11-13	72,2→11,1	27,8→88,9
15	11,1	88,9



Obr. 13: Záznam separace směsi kvetiapinu a jeho metabolitů pomocí gradientu č. 10  
7-OH\_Quet = 7-hydroxykvetiapin; Quet = kvetiapin; Nor\_Quet = norkvetiapin

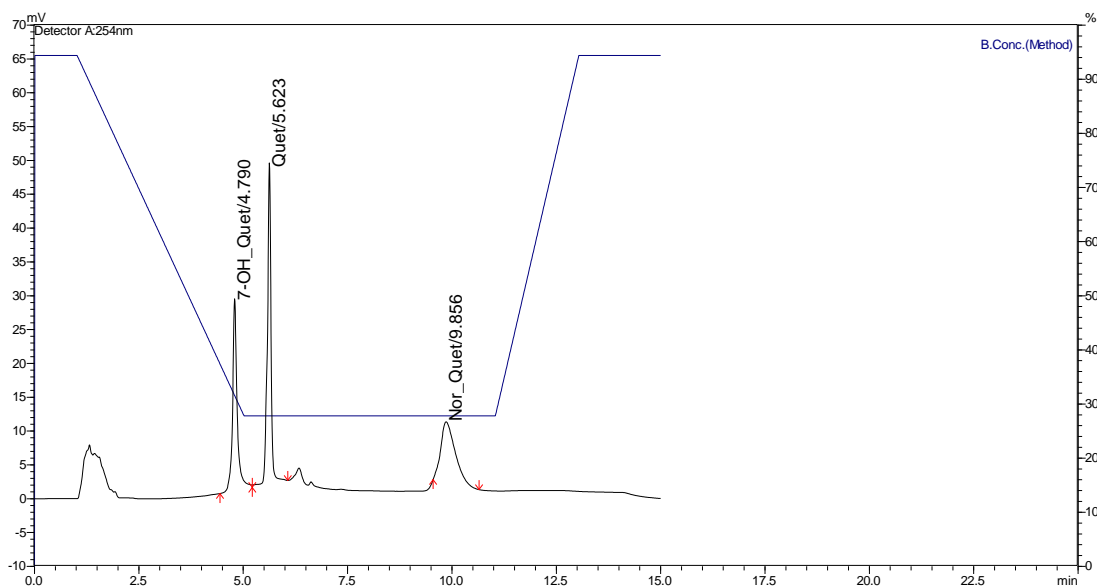
**Komentář:** V tomto gradientu byla retence všech látek nepatrně vyšší. Gradient byl zkrácen na 15 minut. Rozlišení mezi píky 7-hydroxykvetiapinu a kvetiapinu bylo 5,4. Rozlišení mezi píkem kvetiapinu a norkvetiapinu bylo 11,6. Metoda je vhodná pro budoucí analýzu kvetiapinu a jeho metabolitů z plasmu.

Ve snaze ještě více snížit retenci norkvetiapinu byla v metodách č. 11 a 12 zvyšována eluční síla mobilní fáze od 1. minuty ještě výrazněji (nárůstem koncentrace ACN ve směsi). Tyto zásahy ovšem nepřinesly očekávaný výsledek. Gradientové profily jsou uvedeny na str. 43.

V metodě č. 13 byla zvýšena počáteční koncentrace pufru, ta se snižovala od 1. minuty na koncentraci jako v gradientu č. 10. Mezi 5. a 11. minutou se koncentrace neměnila a ustalování na výchozí gradientové podmínky bylo nastaveno mezi 11. a 13. minutou. Ekvilibrace systému probíhala mezi 13. a 15. minutou.

Tab. 18: Gradientový profil metody č. 13 - zásobník A = ACN : pufr – 90:10 (v/v); zásobník B = octanový pufr (pH 6,0; 6 mM)

Čas (min)	Mobilní fáze A v % (v/v)	Mobilní fáze B v % (v/v)
0-1	11,1	88,9
1-6	11,1→88,9	88,9→11,1
6-11	88,9	11,1
11-13	88,9→11,1	11,1→88,9
13-15	11,1	88,9



Obr. 14: Záznam separace směsi kvetiapinu a jeho metabolitů pomocí gradientu č. 13  
7-OH\_Quet = 7-hydroxykvetiapin; Quet = kvetiapin; Nor\_Quet = norkvetiapin

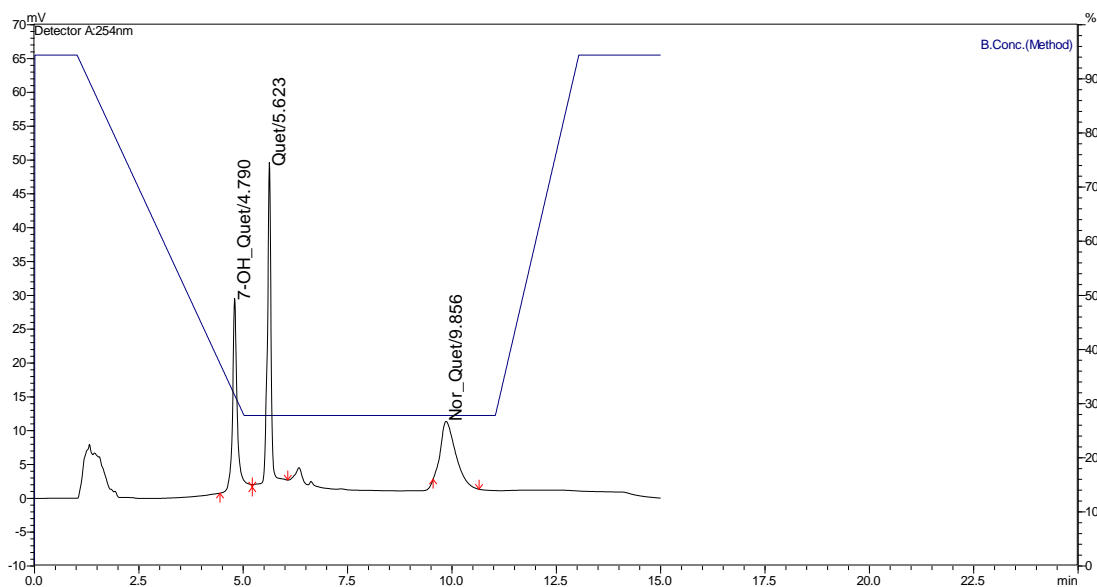
**Komentář:** Byly separovány píky všech tří solutů. Rozlišení mezi píkem 7-hydroxykvetiapinu a kvetiapinu bylo 4,9, a tedy vyhovující. Rozlišení mezi píkem kvetiapinu a norkvetiapinu bylo 10,6 – o celou jednotku nižší než u gradientu č. 10. Norkvetiapin se eluoval před 10. minutou a celková doba analýzy byla 15 minut, a tedy optimální pro případné měření většího množství vzorků. Metoda je vhodná pro analytické stanovení kvetiapinu a jeho metabolitů z plasmy.

## **6. Závěr**

1. V teoretické části diplomové práce byly charakterizovány vlastnosti kvetiapinu z pohledu platného Českého lékopisu, jeho farmakodynamické a farmakokinetické chování. Dále byl popsán princip a instrumentace HPLC, charakterizace stacionárních fází na bázi  $ZrO_2$  a jejich srovnání s tradičními silikagelovými fázemi.

2. V experimentální části byl sledován vliv změny koncentrace, pH použitého pufru a zastoupení organické složky v mobilní fázi na retenční chování kvetiapinu, 7-hydroxykvetiapinu a norkvetiapinu. Stacionární fází byla kolona ZirChrom<sup>®</sup>-PBD (150 x 4,6 mm, s částicemi velikosti 5  $\mu$ m), jako Lewisova báze v mobilní fázi byl použit octanový pufr. Organickou složkou eluentu byl acetonitril.

3. Na základě údajů o retenčním chování kvetiapinu, 7-hydroxykvetiapinu a norkvetiapinu byla optimalizována metoda pro stanovení jejich směsi na koloně ZirChrom<sup>®</sup>-PBD (150 x 4,6 mm, 5  $\mu$ m). Použitá mobilní fáze byla složena z octanového pufru (6 mM, pH 6,0) a acetonitrilu. Stanovení probíhalo za použití gradientu č. 13 se schématem uvedeným v tab. 18 na straně 60. V zásobníku A byla směs ACN : octanový pufr - 90 : 10 (v/v), v zásobníku B čistý octanový pufr (6 mM, pH 6,0). Průtoková rychlost byla 1,0 ml/min, teplota na koloně 30 °C. Injikovaný objem směsi standardů o koncentraci 0,02 mg/ml činil 10  $\mu$ l. Pro detekci látek byl použit UV spektrofotometrický detektor při vlnové délce 254 nm.



Obr. 15: Záznam separace směsi kvetiapinu a jeho metabolitů pomocí gradientu č. 13

4. Validace vyvinuté metody pro stanovení kvetiapinu, 7-hydroxykvetiapinu a norkvetiapinu bude předmětem další práce.

## 7. Seznam použitých zkratek

7-OH\_Quet – 7-hydroxykvetiapin

ACN - acetonitril

AUC – *Area Under Curve*, plocha pod křivkou

CARB – stacionární fáze pokrytá grafitizovaným uhlíkem

CRL – chemická referenční látka

EDTPA - z angl. *ethylenediamine-N,N,N',N'-tetra(methylenephosphonic) acid* (ethylendiamin N, N, N', N' - tetramethylenfosfonová kyselina)

ELSD - z angl. *Evaporative Light Scattering Detector*, odpařovací detektor rozptylu světla

ESI-MS – z angl. *Electrospray Ionization- Mass Spectrometry*, hmotnostní spektrometrie s ionizací elektrosprejem

ESI-MS/MS - tandemová hmotnostní spektrometrie spojená s ionizací elektrosprejem

EZ – reverzní stacionární fáze s deaktivovanými místy charakteru Lewisovy kyseliny na povrchu ZrO<sub>2</sub>

GPC – *Gel Permeation Chromatography*, gelová permeační chromatografie

HDL – *High Density Lipoprotein*, vysokodenzitní lipoprotein

HILIC – *Hydrophilic Interaction Chromatography*, hydrofilní interakční chromatografie

HPLC – *High Performance Liquid Chromatography*, vysokoúčinná kapalinová chromatografie

i.d. – *Internal Diameter*, vnitřní průměr

IEC – *Ion Exclusion Chromatography*, iontově výměnná chromatografie

LC-MS – *Liquid Chromatography-Mass Spectrometry*

LC-MS/MS – spojení kapalinové chromatografie s tandemovou hmotnostní spektrometrií

LDL – *Low Density Lipoprotein*, nízkodenzitní lipoprotein

LLC – *Liquid-Liquid Chromatography*, rozdělovací kapalinová chromatografie

LLE – *Liquid-Liquid Extraction*, extrakce z kapaliny do kapaliny

MARTA – z angl. *Multiacting Receptor-Targeted Antagonists*, multireceptoroví antagonisté

m/z – poměr molární hmotnosti k náboji iontu

MeOH - methanol

MF – mobilní fáze

M<sub>r</sub> – relativní molekulová hmotnost

MS – hmotnostní spektrometr

MS/MS – tandemová hmotnostní spektrometrie

MTBE – methyl tert-butyl ether

NET – *norepinephrine transporter*

Nor\_Quet - norkvetiapin

NP-LC – *Normal Phase Liquid Chromatography*, kapalinová chromatografie na normálních fázích

ODS – *Oktadecylsilica* – oktadecylsilikagel

PBD – polybutadien

PEZ – kationtově výměnná stacionární fáze s deaktivovanými místy charakteru Lewisovy kyseliny pomocí EDTPA na povrchu ZrO<sub>2</sub>

PS – polystyren

PZC – *point of zero charge*

Quet – kvetiapin

RP-LC – *Reversed Phase Liquid Chromatography*, kapalinová chromatografie na reverzních fázích

SAX – z angl. *Strong Anion Exchanger*, silný měnič aniontů

SCX – z angl. *Strong Cation Exchanger*, silný měnič kationtů

SEC – *Size Exclusion Chromatography*, vylučovací chromatografie

SF – stacionární fáze

SHAX – z angl. *Strong Hydrophilic Anion Exchanger*, silný hydrofilní měnič aniontů

SPE – *Solid Phase Extraction*, extrakce tuhou fází

UV-VIS - *Ultra – Violet/Visible* – ultrafialová-viditelná oblast světla

WAX – z angl. *Weak Anion Exchanger*, slabý měnič aniontů

WCX – z angl. *Weak Cation Exchanger*, slabý měnič kationtů



# **8. Literatura**

1. Výpis z databáze SPC přípravku Seroquel PROLONG 200 mg: tablety s prodlouženým uvolňováním. aktualizováno 14.7.2014.
2. ZIRCHROM SEPARATIONS, Inc. *ZirChrom Newsletter Vol. #14* [online]. 2015 [cit. 2015-01-28]. Dostupné z: <http://www.zirchrom.com/newsletter.asp>
3. *Český lékopis 2009: Doplněk 2014*. 2014. vyd. Praha: Grada Publishing a.s., 2014. ISBN 978-80-247-5193-1.
4. HERINK, J. Interakce antipsychotik. *Klinická farmakologie a farmacie* [online]. 2014, č. 18, s. 207-211 [cit. 2015-02-02]. Dostupné z: <http://www.klinickafarmakologie.cz/pdfs/far/2004/04/05.pdf>
5. Výpis z databáze SPC přípravku Quetsax 200 mg: potahované tablety. aktualizováno 23.1.2013.
6. DEVANE, C. Lindsay a Charles B. NEMEROFF. Clinical Pharmacokinetics of Quetiapine. *Clinical Pharmacokinetics*. 2001, vol. 40, issue 7, s. 509-522. DOI: 10.2165/00003088-200140070-00003. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.2165/00003088-200140070-00003>
7. BAKKEN, G. V., E. MOLDEN, K. KNUTSEN, N. LUNDER a M. HERMANN. Metabolism of the Active Metabolite of Quetiapine, N-Desalkylquetiapine In Vitro. *Drug Metabolism and Disposition* [online]. 2012, vol. 40, issue 9, s. 1778-1784 [cit. 2015-02-02]. DOI: 10.1124/dmd.112.045237. Dostupné z: <http://dmd.aspetjournals.org/content/40/9/1778.full>
8. Obrázek převzat a upraven z: BAKKEN, G. V., I. RUDBERG, H. CHRISTENSEN, E. MOLDEN, H. REFSUM a M. HERMANN. Metabolism of Quetiapine by CYP3A4 and CYP3A5 in Presence or Absence of Cytochrome B5. *Drug Metabolism and Disposition*. 2008, vol. 37, issue 2, s. 254-258. DOI: 10.1124/dmd.108.023291.
9. *Databáze léků* [online]. 31.1.2015 [cit. 2015-02-02]. Dostupné z: [www.sukl.cz](http://www.sukl.cz)
10. KLIMEŠ, J. *Kontrolně-analytické hodnocení léčiv lékopisnými metodami*. Hradec Králové: Nucleus, 2011. ISBN 978-80-87009-29-1.

- 11.** NOVÁKOVÁ, L., M. DOUŠA *Moderní HPLC separace v teorii a praxi*. 1. vyd. Hradec Králové: Lucie Nováková, 2013, 235 s. ISBN 978-80-260-4243-3.
- 12.** KAZAKEVICH, Y. a R. LOBRUTTO. *HPLC for pharmaceutical scientists* [online]. Hoboken, N.J.: Wiley-Interscience, c2007, xxvi, 1104 p. [cit. 2015-01-31]. ISBN 04-716-8162-8. Dostupné z:  
<http://faculty.ksu.edu.sa/hisham/Documents/eBooks/HPLC%20for%20Pharmaceutical%20Scientists%20%282007%29.pdf>
- 13.** How Does High Performance Liquid Chromatography Work?. *Www.waters.com* [online]. 2015 [cit. 2015-02-02]. Dostupné z: [http://www.waters.com/waters/en\\_CZ/How-Does-High-Performance-Liquid-Chromatography-Work%3F/nav.htm?cid=10049055&locale=en\\_CZ](http://www.waters.com/waters/en_CZ/How-Does-High-Performance-Liquid-Chromatography-Work%3F/nav.htm?cid=10049055&locale=en_CZ)
- 14.** SNYDER, Lloyd R, J KIRKLAND a John W DOLAN. *Introduction to modern liquid chromatography*. 3rd ed. Hoboken, N.J.: Wiley, c2010, xli, 912 p. ISBN 978-047-0167-540.
- 15.** DOUŠA, M. *Teorie HPLC / Základy HPLC* [online]. 2013 [cit. 2015-02-02]. Dostupné z: [www.hplc.cz](http://www.hplc.cz)
- 16.** CVAČKA, J. *Detekce ve vysokoúčinné kapalinové chromatografii*. Praha, 2010. Dostupné z: <http://web.natur.cuni.cz/~analchem/bosakova/hplc3.pdf>. Přednáška. Přírodovědecká fakulta UK v Praze.
- 17.** CORRADINI, D. a E. KATZ. *Handbook of HPLC*. New York: M. Dekker, c1998, xi, 989 p. Chromatographic science, v. 78. ISBN 08-247-9444-3
- 18.** HPLC II: HPLC - High Performance Liquid Chromatography. In: *Farmaceutická fakulta Univerzity Karlovy v Praze: Studijní materiály Katedry analytické chemie, předmět Speciální metody instrumentální analýzy* [online]. 2012 [cit. 2015-02-16]. Dostupné z:  
<https://intranet.faf.cuni.cz/Studijnimaterialy/KACH/?page=3&path=farmacie%5cspeciální+metody+instrumentální+analýzy%5cteorie+úloh+a+návody+k+přístrojům>
- 19.** MOLDOVEANU, Ș. a V. DAVID. *Essentials in modern HPLC separations*. Waltham, MA: Elsevier, c2013, xv, 532 p. ISBN 978-012-3850-133..

20. *Český lékopis 2009*. 1. vyd. Praha: Grada Publishing, 2009, 1176 s. ISBN 978-802-4729-947.
21. KLIMEŠ, J. *Kontrola léčiv II*. 1. vyd. Praha: Karolinum, 2004. ISBN 80-246-0818-9.
22. KLOUDA, P. *Moderní analytické metody*. 2., upr. a dopl. vyd. Ostrava: Pavel Klouda, 2003, 132 s. ISBN 80-863-6907-2.
23. NAWROCKI, J, C DUNLAP, J LI, J ZHAO, C.V MCNEFF, A MCCORMICK a P.W CARR. Part II. Chromatography using ultra-stable metal oxide-based stationary phases for HPLC. *Journal of Chromatography A* [online]. 2004, vol. 1028, issue 1, s. 31-62 [cit. 2015-03-02]. DOI: 10.1016/j.chroma.2003.11.050. Dostupné z:[http://www.researchgate.net/publication/8690402\\_Part\\_II\\_Chromatography\\_using\\_ultra-stable\\_metal\\_oxide-based\\_stationary\\_phases\\_for\\_HPLC](http://www.researchgate.net/publication/8690402_Part_II_Chromatography_using_ultra-stable_metal_oxide-based_stationary_phases_for_HPLC)
24. NAWROCKI, J., C. DUNLAP, A. MCCORMICK a P.W. CARR. Part I. Chromatography using ultra-stable metal oxide-based stationary phases for HPLC. *Journal of Chromatography A* [online]. 2004, vol. 1028, issue 1, s. 1-30 [cit. 2015-02-03]. DOI: 10.1016/j.chroma.2003.11.052. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14969280>
25. ZIRCHROM SEPARATIONS, Inc. *ZirChrom®: Reversed-Phase Method Development Guide* [online]. 2002 [cit. 2015-02-20]. Dostupné : <http://www.zirchrom.com/pdf/DRPMDG.pdf>
26. ZIRCHROM SEPARATIONS, Inc. *HPLC Catalog Column Guide: 2013 - 2014* [online]. 2013 [cit. 2015-02-17]. Dostupné z: <http://www.zirchrom.com/pdf/Catalog2013to2014.pdf>
27. YANG, X.; DAI, J.; CARR, P. W. Analysis and critical comparison of the reversed-phase and ion-exchange contributions to retention on polybutadiene coated zirconia and octadecyl silane bonded silica phases. *Journal of Chromatography A*, 2003, 996.1: 13-31.)
28. HU, Y.; YANG, X.; CARR, P. W. Mixed-mode reversed-phase and ion-exchange separations of cationic analytes on polybutadiene-coated zirconia. *Journal of Chromatography A*, 2002, 968.1: 17-29.
29. Discovery® Zirconia. *Sigma-Aldrich Co. LLC*. [online]. 2015 [cit. 2015-04-14]. Dostupné z: <http://www.sigmaaldrich.com/analytical-chromatography/analytical-products.html?TablePage=9659234>

**30.** ZirChrom Separations, Inc. [online]. 2015 [cit. 2015-02-20]. Dostupné z: <https://www.zirchrom.com/Phase.asp>

**31.** XIONG, X., L. YANG a J. DUAN. Development and validation of a sensitive and robust LC–MS/MS with electrospray ionization method for simultaneous quantitation of quetiapine and its active metabolite norquetiapine in human plasma. *Clinica Chimica Acta*. 2013, vol. 423, s. 69-74. DOI: 10.1016/j.cca.2013.04.016.

**32.** HASSELSTROM, J a K LINNET. Fully automated on-line quantification of quetiapine in human serum by solid phase extraction and liquid chromatography. *Journal of Chromatography B*. 2003, vol. 798, issue 1, s. 9-16. DOI: 10.1016/s1570-0232(03)00592-0.

**33.** DAVIS, P. C., O. BRAVO, M. GEHRKE a C. T. AZUMAYA. Development and validation of an LC–MS/MS method for the determination of quetiapine and four related metabolites in human plasma. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2010, vol. 51, issue 5, s. 1113-1119. DOI: 10.1016/j.jpba.2009.11.018.

**34.** LI, Kun-Yan, et al. Simultaneous determination of quetiapine and three metabolites in human plasma by high-performance liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry. *Acta Pharmacol Sin*, 2004, 25.1: 110-114.

**35.** FISHER, D. S., S. A. HANDLEY, D. TAYLOR a R. J. FLANAGAN. Measurement of quetiapine and four quetiapine metabolites in human plasma by LC-MS/MS. *Biomedical Chromatography* [online]. 2012, vol. 26, issue 9, s. 1125-1132 [cit. 2015-02-21]. DOI: 10.1002/bmc.2672. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/bmc.2672>

## **Abstrakt**

**Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové**

**Katedra:** Farmaceutické chemie a kontroly léčiv

**Kandidát:** Vendula Koldová

**Školitel:** PharmDr. Pavla Pilařová, Ph.D.

**Název diplomové práce:** Hodnocení Quetiapinu pomocí HPLC

V této diplomové práci byla vyvinuta metoda pro separaci kvetiapinu a jeho dvou biologicky aktivních metabolitů 7-hydroxykvetiapinu a norkvetiapinu na zirkoniové koloně ZirChrom<sup>®</sup>-PBD (150 x 4,6 mm i.d., 5 μm). Byl testován vliv změny síly a pH octanového pufru a zastoupení organické složky (ACN) v mobilní fázi na retenční chování těchto tří analytů. Optimální podmínky separace směsi kvetiapinu a jeho dvou metabolitů byly s využitím gradientové eluce. Mobilní fáze byla tvořena směsí octanového pufru (CH<sub>3</sub>COONH<sub>4</sub> 6mM, pH 6,0) a acetonitrilu. Průtok byl nastaven na 1,0 ml/min při teplotě kolony 30 °C. Detekce probíhala v UV oblasti při vlnové délce 254 nm. Vyvinutá metoda může být v budoucnu aplikována ke stanovení kvetiapinu, 7-hydroxykvetiapinu a norkvetiapinu z plasmy.

## **Abstrakt**

**Charles University in Prague, Faculty of Pharmacy in Hradci Králové**

**Department:** Pharmaceutical Chemistry and Drug Control

**Candidate:** Vendula Koldová

**Tutor:** PharmDr. Pavla Pilařová, Ph.D.

**Name of Degree Paper:** Evaluation of Quetiapine using HPLC

In this study was developed a method for separation of quetiapine and its two biologically active metabolites 7-hydroxyquetiapine and norquetiapine. Separation was performed on zirconia reversed-phased column ZirChrom<sup>®</sup>-PBD (150 x 4.6 mm i.d., 5 μm). The retention behaviour of those three analytes was examined at changing strength and pH of acetate buffer and changing levels of organic compound (ACN) in eluent. The separation of the mixture of quetiapine and its two metabolites was performed by gradient elution. Mobile phase was composed of acetate buffer (CH<sub>3</sub>COONH<sub>4</sub> 6mM , pH 6.0) and acetonitrile. The flow rate of the mobile phase was 1.0 ml/min and temperature in the column was set at 30 °C. Detection was carried out at a wavelength of 254 nm. The method is supposed to be used for determination of quetiapine, 7-hydroxyquetiapine and norquetiapine in plasma.