

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Fakulta přírodovědecká

Katedra analytické chemie

**Vývoj HPLC metody na stanovení meziproductů
Silodosinu a její optimalizace, identifikace nečistot
metodou LC/MS**

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Autor práce: Bc. Lucie Hanková

Studijní obor: Analytická chemie

Vedoucí diplomové práce: RNDr. Přemysl Indrák, CSc.

Olomouc 2014

Souhrn

Analytická chemie lékových substancí (API) je dosti diskutované odvětví podléhající kontrolám národních autorit např. SÚKL, FDA a zákaznickým auditům. Stěžejní metoda na stanovení čistoty resp. na stanovení příbuzných látek „related substances“ a obsahu API je HPLC. Přísná kritéria lékopisných metod nutí farmaceutické firmy vyrábět API ve vysoké kvalitě. Dosažení vyhovující čistoty či obsahu dané substance souvisí s použitými surovinami, rozpouštědly, technologií výroby a nezanedbatelným faktorem je analytická kontrola výše uvedených látek včetně meziproduktů. Stanovení čistoty pokročilých meziproduktů bývá důležité pro čistotu konečné substance. Zabývala jsem se vývojem HPLC metody na stanovení čistoty resp. příbuzných látek pokročilých intermediátů (R)-5-(2-Aminopropyl)-1-(3-benzoyl-oxopropyl)inuline-7-carbonitriletartarate a (R)-5-(2-Amino propyl)-1-(benzoyl-oxopropyl)inuline-7-carbonitriletartarate 1-[3-(benzoyloxy) propyl] -2,3-di hydro-5-[(2R)-2-[[2-[2-(2,2,2-trifluoroethoxy)phenoxy]ethylamino]propyl]-1H-indole-7-carbonitrile oxalate substance Silodosinu a identifikací nečistot metodou LC/MS. Silodosin se prozatím nenachází v lékopisech a není na něj a jeho meziprodukty vyvinuta oficiální HPLC metoda na stanovení čistoty resp. příbuzných látek či obsahu

Summary

Analytical chemistry of Active Pharmaceutical Ingredients (API) is a frequently discussed branch which is under supervision of national authorities, for instance the Czech State Institute for Drug Control (SÚKL) and audited by customers. The principal method for determination of purity, resp. related substances and assay determinations is the High Performance Liquid Chromatography (HPLC). Strict criteria of pharmacopoeial methods force API manufacturers to produce their products in the highest quality. This objective can be achieved by using verified and approved starting materials, solvents and reagents, validated technological procedures and a not negligible factor is the analytical control of all materials including intermediates. The purity determinations of advanced intermediates are crucial for the final product quality. I have occupied myself in a development of the HPLC method for the purity determination, resp. related substances analysis of advanced intermediates (R)-5-(2-Aminopropyl)-1-(3-benzoyl-oxopropyl)inuline-7-carbonitrile tartarate and (R)-5-(2-Aminopropyl)-1-(benzoyl-oxypopyl)inuline-7-carbonitrile tartarate.-1-[3-(benzoyloxy)propyl]-2,3-dihydro-5-[(2R)-2-[[2-[2-(2,2,2-trifluoroethoxy)phenoxy]ethyl]amino]propyl]-1H-indole-7-carbonitrile oxalate of the active ingredient Silodosine. Then related substances were identified by the liquid chromatography equipped with a mass detector (LC/MS) method. Silodosine is an API which monograph has not been issued in any pharmacopoeia, yet. An official analytical method for determination of purity and assay both of Silodosine and its intermediated was not available.

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto práci vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou v seznamu použité literatury.

Souhlasím s tím, že práce je prezenčně zpřístupněna v knihovně Katedry analytické chemie, Přírodovědecké Fakulty, Univerzity Palackého v Olomouci.

V Olomouci dne:

.....

Podpis

Poděkování

Děkuji svému vedoucímu RNDr. Přemyslu Indrákovi, CSc. za umožnění měření diplomové práce na oddělení odboru kvality v laboratoři vysokoúčinné kapalinové chromatografie ve firmě Farmak a.s. Dále mu děkuji za odborné vedení, pomoc a rady při vypracovávání, vyhodnocování a sepisování diplomové práce.

Bibliografické údaje:

Jméno a příjmení autora: Bc. Lucie Hanková

Název práce: Vývoj HPLC metody na stanovení meziproductů Silodosinu a její optimalizace, identifikace nečistot metodou LC/MS

Typ práce: Diplomová práce

Pracoviště: Katedra analytické chemie

Vedoucí práce: RNDr. Přemysl Indrák, CSc.

Rok obhajoby práce: 2014

Abstrakt: Cílem práce bylo vyvinout HPLC metody na stanovení čistoty resp. příbuzných látek pokročilých intermediátů lékové substance Silodosinu a identifikace nečistot metodou LC/MS

Klíčová slova: HPLC, vývoj metody, lékové substance

Počet stran: 85

Počet příloh: 22

Jazyk: čeština

Bibliographical identification:

Author's first name and surname: Bc. Lucie Hanková

Title: Development of the HPLC method for determination of Silodosin intermediates and its optimization, identification of impurities by the LC/MS method

Type of thesis: Diploma

Department: Department of Analytical chemistry

Supervisor: RNDr. Přemysl Indrák, CSc.

The year of presentation: 2014

Abstract: The aim of the work was to develop HPLC methods for determining the purity or related substances of advanced intermediates of drug substances Silodosine and identification of impurities by LC/MS

Keywords: HPLC, method development, drug substances

Number of pages: 85

Number of appendices: 22

Language: Czech

OBSAH

1	ÚVOD	12
2	TEORETICKÁ ČÁST	13
2.1	Vysokoučinná kapalinová chromatografie	13
2.1.1	Retenční charakteristiky	14
2.1.1.1	Retenční čas t_R	14
2.1.1.2	Retenční objem $V_{R,i}$	14
2.1.1.3	Lineární rychlost mobilní fáze u	15
2.1.1.4	Retenční poměr k (míra retence separovaných látek).....	15
2.1.2	Účinnost chromatografického děje.....	15
2.1.2.1	Počet teoretických pater n	15
2.1.2.2	Výškový ekvivalent teoretického patra H	15
2.1.3	Rozmývání elučních zón	16
2.1.3.1	Van Deemterova rovnice	16
2.1.3.2	Zkrácený zápis Van Deemterovy rovnice	17
2.1.3.3	Mimokolonové příspěvky	18
2.1.4	Symetrie píku	19
2.1.5	Rozlišení.....	20
2.1.6	Separační faktor (selektivita) α	20
2.1.7	Statistické parametry	21
2.1.7.1	Směrodatná odchylka	21
2.1.7.2	Relativní směrodatná odchylka	21
2.1.8	Základní typy chromatografických systémů	21
2.1.8.1	Normální fáze	21
2.1.8.2	Reverzní fáze	23
2.1.9	Isokratická a gradientová eluce v HPLC.....	24
2.1.10	Instrumentace pro HPLC.....	24

2.1.10.1	Čerpací systémy.....	24
2.1.10.2	Dávkovací zařízení	24
2.1.10.3	Kolony	25
2.1.10.4	Detektory	26
2.2	Hmotnostní spektrometrie	27
2.2.1	Schema LC/MS sestavy Scientific Exactive	28
2.2.2	Zavádění vzorku	29
2.2.3	Ionizace vzorku	29
2.2.3.1	APCI (chemická ionizace za atmosférického tlaku).....	30
2.2.3.2	Elektrosprej.....	31
2.2.3.3	HESI (termosprej).....	33
2.2.4	Hmotnostní analyzátory	33
2.2.4.1	Iontová past.....	33
2.2.4.2	Průletový analyzátor (analyzátor doby letu).....	34
2.2.4.3	Kvadrupolový analyzátor	35
2.2.4.4	Orbitrap (orbitální past)	36
3	Experimentální část	37
3.1	Silodosin.....	37
3.1.1	Strukturní vzorec, sumární vzorec, molekulová hmotnost, fyzikálně chemické vlastnosti (vzhled, rozpustnost) a syntéza Silodosinu.....	37
3.2	Zkoumané látky	38
3.2.1	Strukturní vzorce, sumární vzorce, molekulové hmotnosti, fyzikálně chemické vlastnosti (vzhled, rozpustnost)	38
3.2.1.1	Rozpustnost zkoumaných látek	39
3.2.2	Syntéza	40
3.3	Vývoj HPLC metody na stanovení čistoty pokročilého intermediátu Oxalátu .	41
3.3.1	Přístroje:	41
3.3.2	Kolony:.....	42

3.3.3	Chemikálie:	43
3.3.4	Přehled použitých metod	44
3.3.5	Finální HPLC metoda na stanovení čistoty pokročilého intermediátu Oxalátu	57
3.3.6	Optimalizace finální HPLC metody na stanovení čistoty pokročilého intermediátu Oxalátu.....	60
3.4	Vývoj HPLC/MS metody pro pokročilý intermediát Oxalát	64
3.4.1	Přístroje:	64
3.4.2	Kolony:.....	64
3.4.3	Chemikálie:	65
3.4.4	Průběh vývoje:.....	65
3.5	Vývoj HPLC metody na stanovení čistoty intermediátu Tartarátu	68
3.5.1	Přehled dalších použitých metod.....	68
4	Výsledky a diskuze.....	74
4.1	Optimální parametry vyvinutých HPLC metod.....	74
4.2	HPLC metoda na stanovení čistoty resp. příbuzných látek pokročilého intermediátu Oxalátu lékové substance Silodosinu	75
4.3	HPLC metoda na stanovení čistoty resp. příbuzných látek intermediátu Tartarátu lékové substance Silodosinu.....	76
4.4	LC/MS metoda na identifikaci nečistot pokročilého intermediátu Oxalátu	77
5	Závěr	78
	Seznam použité literatury.....	80
	SEZNAM PŘÍLOH	83
1	SILODO16:Blank	83
2	SILODO16: Blank	84
3	SILODO16: Limitní roztok Oxalátu.....	85
4	SILODO16: Limitní roztok Tartarátu	86
5	SILODO16: Oxalát.....	87
6	SILODO16: Oxalát.....	88

7	SILODO16: Tartarát	89
8	SILODO16: Statistika 0,5 % roztoku Oxalátu	90
9	SILODO16: Statistika 0,5 % roztoku Tartarátu.....	91
10	SILODO16: Statistika	92
11	SILODO16: Statistika	93
12	SILODO16: Statistika	94
13	SILODO16: Statistika	95
14	LC/ MS metoda: Nečistota RRT 0,91	96
15	LC/ MS metoda: Oxalát	97
16	SILODO28: Blank	98
17	SILODO28: 0,5 % roztok Tartarátu	99
18	SILODO28:Tartarát	100
19	SILODO28: Statistika 0,5 % roztoku Tartarátu.....	101
20	SILODO28: Statistika	102
21	SILODO28: Statistika	103
22	SILODO28: Statistika	104

1 ÚVOD

Silodosin je léková substance (API) používaná jako antagonist α_1 -adrenoreceptorů při léčbě dolních močových cest u mužů s benigní hyperplazií prostaty (BHP). Snižuje vnitřní tlak v močovodu bez velkého vlivu na krevní tlak a působí jak selektivní inhibitor konstrikcí hladkých svalů v močovodu. Se Silodosinem se začalo obchodovat v r. 2006 v Japonsku. Pod názvem Urief ho uvedly na trh firmy Kissei Pharmaceutical Co.,Ltd a Daiichi Sankyo Pharmaceutical Co., Ltd. Firma Kissei Pharmaceutical Co.,Ltd žádala v 2004 Watson Pharmaceuticals, Inc. o licenci a práva na prodej Silodosinu na území Ameriky, Kanady a Mexika. V r. 2008 Watson Pharmaceuticals, Inc. přijala podanou žádost. FDA schválila tento lék 9. 10. 2008. Silodosin se prodává v Americe pod obchodním názvem Rapaflo, Evropa (Silodyx), Indie (Ipca Urosciences). Dva nezávislí autoři posoudily kvalitu účinku Silodosinu na léčbu a vyhodnotily výsledky z randomizovaných kontrolovaných studií (RST). Mezi hlavní nežádoucí příznaky při léčbě jsou porucha ejakulace a nezhoubné zvětšení prostaty.^{1,2}

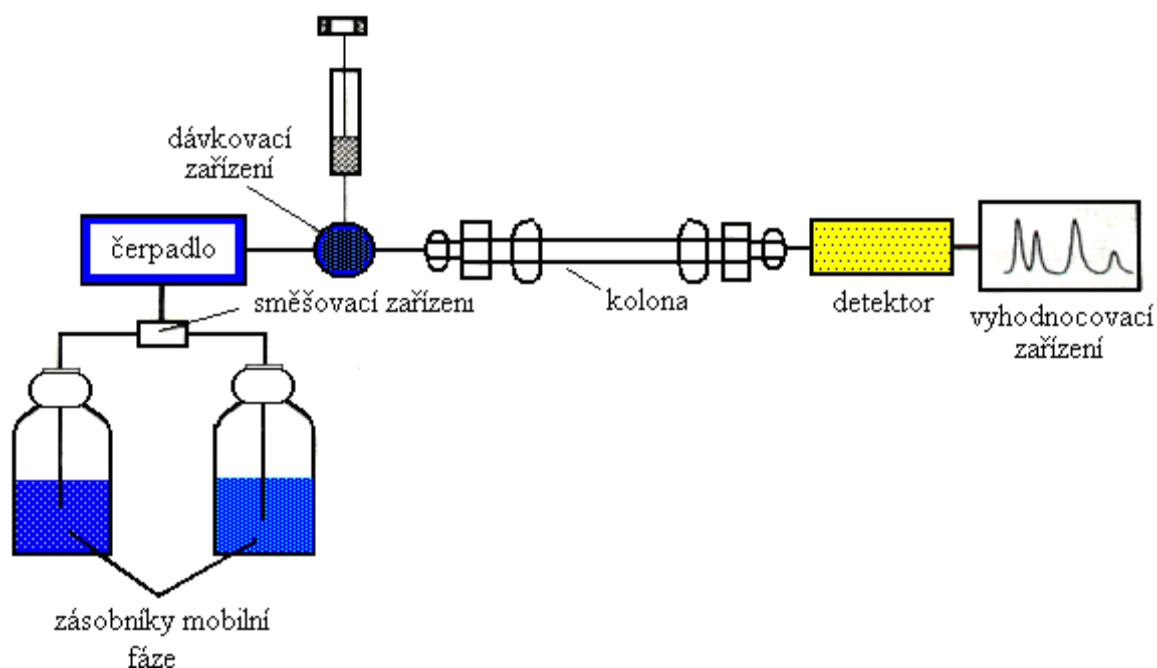
Silodosin je registrován v bibliografické databázi Národní lékařské knihovny USA a jeho výroba je popsána v patentu.^{3,4,5}

Cílem této práce je vyvinout HPLC metodu na stanovení čistoty, resp. stanovení příbuzných látek meziproduktů Silodosinu před a po kritickém kroku a identifikace nečistot metodou LC/MS.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie

Vysokoúčinná kapalinová chromatografie, dále jen HPLC je řazena mezi separační metody. Její princip je založen na rozdílné distribuci látek mezi dvěma nemísitelnými fázemi, z nichž první fází je kapalina tzv. mobilní fáze, dále jen MF, která prochází druhou, pevnou tzv. stacionární fází naplněnou v koloně. HPLC je zpravidla založena na mechanismech adsorpce, rozdělování a výměny iontu tzv. ion-párová chromatografie.⁶ HPLC je využívána na stanovení netěkavých, nebo málo těkavých, termicky stabilních látek, popř. směsí látek.⁷ Schema kapalinového chromatografu obrázek 1



Obrázek 1: Schema HPLC. ⁸

HPLC sestava se skládá z čerpacího systému, dávkovacího zařízení, chromatografické kolony, detektoru a zařízení na zpracování dat. MF je do systému přiváděna přes odplyňovač tzv. degasser pomocí vysokotlakého čerpadla z jedné či více zásobních lahví. Postupuje přes tlumič pulsů a protéká většinou konstantní rychlostí kolonou a následně detectorem. Detektor

je spojen se zařízením pro registraci průběhu analýzy (PC s hardwarovou úpravou a vyhodnocovacím software). Zásobní lahve jsou naplněny rozpouštědly, která jsou používána na proplach systému a jako MF. S použitím směšovacího zařízení lze poměr rozpouštědel v průběhu analýzy kombinovat tzv. gradientová eluce. Při isokratické eluci zůstává zachován stálý poměr rozpouštědel po celý čas analýzy.^{8, 9, 10}

2.1.1 Retenční charakteristiky

2.1.1.1 Retenční čas t_R

Doba od nástřiku vzorku do zaznamenání maxima eluční křivky (vrcholu píku) detektorem. t_R patří mezi kvalitativní charakteristiky látky

$$t_R = t_M + t'_{R,i} \text{ [min]}$$

t_M - mrtvý retenční čas → analyt se pohybuje stejnou rychlostí jako MF a není v koloně zadržován

t'_{R} - redukovaný retenční čas → doba pobytu analytu ve stacionární fázi

2.1.1.2 Retenční objem $V_{R,i}$

Objem MF, která proteče systémem od nástřiku do t_R vzorku.

$$V_{R,i} = V_M + V'_{R,i} \text{ [ml]}$$

V_M – mrtvý objem, objem analytu pohybující se stejnou rychlostí jako MF a není v koloně zadržován (objem kolonové trubice minus objem náplně)

V'_{R} – redukovaný retenční objem → rozdíl retenčního a mrtvého objemu

$$V_R = F_m \cdot t_R$$

F_m – objemový průtok [ml/min]

2.1.1.3 Lineární rychlost mobilní fáze u

$$u = \frac{L}{t_m} \text{ [cm/min]}$$

L = délka kolony

2.1.1.4 Retenční poměr k (míra retence separovaných látek)

Udává, kolikrát více času stráví analyt ve stacionární fázi než ve fázi mobilní, tj. v kolikanásobku mrtvého času (objemu) analyt eluuje. Dále to je i poměr látkových množství analytu ve stacionární a mobilní fázi za rovnovážných podmínek.

$$k = \frac{t'_{R,i}}{t_M} = \frac{t_{R,i} - t_M}{t_M}$$

$$k = \frac{(n_i)_s}{(n_i)_m} = K_{D,i} \cdot \frac{V_S}{V_m}$$

K_D – distribuční konstanta (poměr rovnovážné koncentrace látky ve stacionární a mobilní fázi)

2.1.2 Účinnost chromatografického děje

2.1.2.1 Počet teoretických pater n

Bezrozměrná veličina vyjadřující účinnost chromatografické kolony. Výpočet se provádí z šířky píku v chromatogramu.

$$n = 16 \cdot \left(\frac{t_{R,i}}{w_b} \right)^2 = 5,54 \cdot \left(\frac{t_{R,i}}{w_{0,5}} \right)^2$$

Vysoká hodnota n → úzká eluční zóna analytu → účinná separace

2.1.2.2 Výškový ekvivalent teoretického patra H

Délka kolony připadající na jedno teoretické patro. Souvisí se šířkou elučních zón analytu při průchodu kolonou. Parametr používající se pro srovnání kolon o různých délkách.

$$H = \frac{L}{n}$$

2.1.3 Rozmývání elučních zón

2.1.3.1 Van Deemterova rovnice

$$H = H_F + H_L + H_M + H_S$$

K celkovému výškovému ekvivalentu teoretického patra přispívá:

H_F – vířivá (turbulentní) difúze v mobilní fázi

H_L – axiální difúze v mobilní fázi

H_S – odpor proti převodu hmoty ve stacionární fázi

H_M – odpor proti převodu hmoty v mobilní fázi

Vířivá difúze – souvisí s nepravidelnostmi stacionární fáze. Molekuly MF a analytu jsou unášeny stejnou rychlostí, ale za totožný čas urazí různé dráhy.

$$H_F = 2\lambda d_p$$

λ – geometrický faktor, koeficient nerovnoměrného plnění chromatografické kolony

d_p – velikost částic (průměr)

Axiální difúze – koncentrační gradienty po stranách zóny způsobují pohyb analytu do oblastí s nižší koncentrací.

$$H_L = \frac{2D_m}{u}$$

D_m – difúzní koeficient analytu v mobilní fázi

u – lineární rychlost mobilní fáze

Odpor proti přenosu hmoty ve stacionární fázi H_S

Některé molekuly analytu proniknou hlouběji do stacionární fáze jak jiné.

$$H_s = \frac{d_p^2 \cdot u}{3_0 D_m} \cdot \frac{k}{(k + 1)^2}$$

Odpor proti přenosu hmoty v mobilní fázi H_M

Při průchodu mobilní fáze kanálkem mají částice uprostřed mnohem větší rychlost než u stěny.

$$H_m = \frac{\omega \cdot d_p^2 \cdot u}{D_m}$$

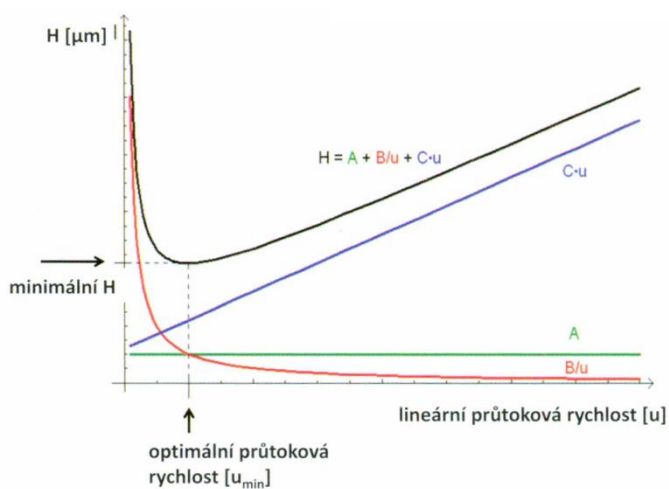
ω = faktor závislý na typu náplně

2.1.3.2 Zkrácený zápis Van Deemterovy rovnice

Závislost výškového ekvivalentu teoretického patra na lineární rychlosti mobilní fáze. Nachází využití v praxi.

$$H = A + \frac{B}{u} + C \cdot u$$

A, B, C – konstanty pro daný chromatografický systém ¹¹



Obrázek 2: Závislost výšky teoretického patra na průtokové rychlosti¹²

Minimum křivky odpovídá **optimální průtokové rychlosti**. Daná kolona tehdy vykazuje **největší účinnost** a minimálně rozšiřuje zóny analytů.

Účinnost separace roste se snižující se velikostí částic náplně. Minimum křivky udává rozsah průtokových rychlostí, při kterých kolona pracuje bez ztráty účinnosti.

2.1.3.3 Mimokolonové příspěvky

Napomáhají k rozšíření eluční zóny. K celkové šířce píku přispívá jak kolona, tak i ostatní části HPLC systému jako nástřikové a spojovací zařízení s detektorem.

$$\sigma_{celk}^2 = \sigma_{inj}^2 + \sigma_{kolona}^2 + \sigma_{spoj}^2 + \sigma_{det}^2 + \sigma_{el}^2$$

σ_{inj}^2 – příspěvek injektoru

Objem vzorku by měl být co nejmenší (<1. teor. patro). Nastříknutá zóna by měla být pravoúhlá.

$$\sigma_{inj}^2 = \frac{V_{inj}^2}{K^2}$$

K – faktor závislý na konstrukci injektoru

σ_{spoj}^2 – příspěvek spojovacích trubice

Spojovací trubice by měla mít malý vnitřní průměr a musí být co nejkratší.

$$\sigma_{spoj}^2 = \frac{\pi \cdot R^4 \cdot l \cdot F_m}{24D_m}$$

R – vnitřní poloměr

l – délka (trubice)

D_m – difúzní koeficient analytu v mobilní fázi

Při běžných rychlostech mobilní fáze vzniká v trubici **laminární proudění**, při kterém lze kapalinu považovat za soubor vrstev, mezi nimiž působí viskózní síly.

Turbulentní proudění – vzniká při velmi vysokých rychlostech, pohyb mobilní fáze je chaotický, dochází k intenzivnímu promíchávání.

σ^2_{det} – příspěvek detektoru

Závisí na objemu a geometrii detekční cely.

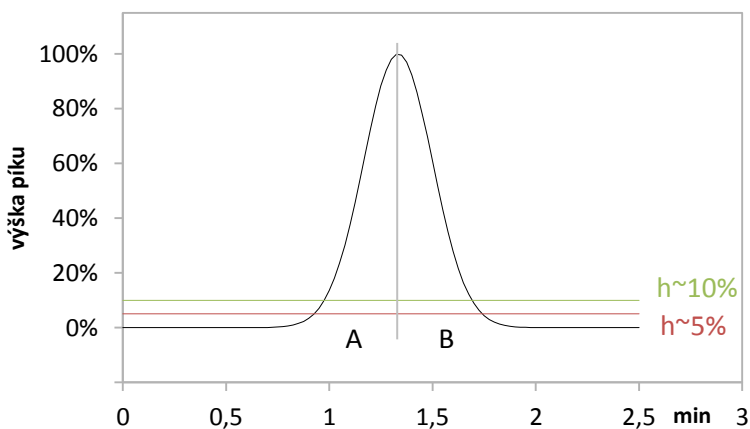
$$\sigma^2_{det} \approx \frac{V_{det}^2}{K^2}$$

σ^2_{el} – příspěvek elektroniky

Závisí na časových konstantách elektronických obvodů (zesilovačů).

$$\sigma^2_{el} = konst \cdot F_m^2$$

2.1.4 Symetrie píku



Obrázek 3: Symetrie píku

$$A_s = \frac{B}{A} \qquad T_f = \frac{W_{0,5}}{2f}$$

A_s – faktor asymetrie – určuje se v 10% výšky píku, míra souměrnosti chromatografického píku

T_f – tailing faktor – obdobná veličina jako faktor asymetrie, určuje se v 5 % výšky píku

T_f > 1 – píky asymetrické v sestupné části (chvostující píky)

T_f < 1 – píky asymetrické ve vzestupné části (frontující píky)

2.1.5 Rozlišení

Veličina udávající schopnost chromatografického systému vzájemně oddělit dva analyty. Cílem chromatografických metod je dosáhnout dobrého rozdělení analyzovaných látek v přijatelném čase. Nejde o dosažení co největšího rozlišení, ale o dosažení právě potřebného rozlišení v přijatelné době. S rostoucím rozlišením stoupají požadavky na trvání analýzy a na pracovní tlak, což je obecně nežádoucí. Dokonalého rozdělení píků až na základní linii se dosáhne při rozlišení R_{1,2} = 1,5, kdy dochází k 0,1% překryvu dvou sousedních píků.

$$R_{1,2} = \frac{t_{R,2} - t_{R,1}}{0,5 \cdot (W_{b,2} + W_{b,1})}$$

$$R_{1,2} = \frac{\sqrt{n}}{4} \cdot (\alpha_{1,2} - 1) \cdot \left(\frac{k_1}{1 + k_1} \right)$$

n – počet pater (rozlišení roste s jeho druhou odmocninou)

První člen vzorce → selektivita; druhý člen vzorce → účinnost; třetí člen vzorce → retence

Ovlivnění selektivity a retence – volbou mobilní fáze, stacionární fáze, teploty

Ovlivnění účinnosti – délkou kolony, velikostí částic, průtokem

2.1.6 Separační faktor (selektivita) α

Parametr charakterizující vzájemnou retenci dvou analytů vyjádřený poměrem jejich redukovaných časů. Separační faktor má vysoký vliv na parametr rozlišení. Ovlivňuje se optimalizací stacionární a MF.¹¹

$$a = \frac{k_2}{K_1} = \frac{K_{D2}}{K_{D1}}$$

2.1.7 Statistické parametry

2.1.7.1 Směrodatná odchylka

$$S = \sqrt{\frac{1}{n-1} \sum_{i=1}^n (X_i - \bar{X})^2}$$

n – počet členů, X_i – naměřená hodnota, \bar{X} – průměrná hodnota

2.1.7.2 Relativní směrodatná odchylka

$$S_r = \frac{S}{\bar{X}} \quad \text{resp.} \quad (S_r)\% = 100 \cdot S_r$$

S – směrodatná odchylka, \bar{X} – průměrná hodnota¹³

2.1.8 Základní typy chromatografických systémů

2.1.8.1 Normální fáze

Chromatografie na normálních fázích (NPC), nazývána jako adsorpční chromatografie (z angl. liquid-solid chrom.), je separační technika založená na adsorpci desorpcí analytů na polárnějších stacionárních fázích v kombinaci s nepolární MF. Nejčastější stacionární fází je silikagel chemicky modifikovaný polárními skupinami např. kyanpropylovými či diolovými resp. hydroxylovými resp. silanolovými (Si-OH), které se účastní interakce s analytem. Dále chromatografie s normálními fázemi využívá jako stacionární fáze nemodifikovaný oxid křemičitý a porézní grafit.^{14,15} NPC je využívána zejména k separaci polárních látek, částečně k separaci izomerů a látek nepolárních. MF komplementární k NCP jsou směsi organických rozpouštědel jako je např. hexan, propanol, ethyleter ap. NCP jsou citlivé na obsah vody v mobilní fázi, která se silně váže na hydrofilní povrch silikagelu a tím mění jeho vlastnosti (problémy s opakovatelností výsledků). Voda v MF zlepšuje symetrii píku snížením aktivity silikagelového povrchu.¹⁶

2.1.8.1.1 Silikagel

Povrch silikagelu je slabě kyselý.¹⁷ Spíše zadržuje látky bazičtější povahy, než látky neutrální a kyselé. Chemicky vázaná stacionární fáze obsahuje zbytkové silanolové skupiny (aktivní centra). Příčina stoupajícího retenčního času a chvostování polárních, zejména bazických

skupin látek je reakce analytu s MF a silanolovými skupinami (vodíkové vazby, dipól-dipólové interakce, reakce iontově-výměnné). Se zvyšujícím se pH roste vliv zbytkových silanolových skupin. To se stává nevýhodou pro separaci bazických látek, které upřednostňují zásaditou oblast pH. Je potřeba minimalizovat interakce mezi bazickými látkami a silanolovými skupinami, tím zabráníme jejich chvostování. K potlačení chvostování bazického analytu na silikagelu se používají slabé organické báze amoniového typu (např. triethylamin, nebo silnější trioctylamin) jejich přidavkem do MF. Báze amoniového typu soutěží s analytem o aktivní centra zbytkových silanolových skupin a tím dochází k eliminaci chvostování. Při pH= 8 a výše dochází k rozpouštění silikagelu.¹⁸

2.1.8.1.2 Oxid hlinitý (alumina)

Povrch CO_2 obsahuje kromě hydroxylových skupin i centra s elektron-akceptorovými vlastnostmi schopných interakce s analyty bohatými na elektrony (Lewisovy báze). Tyto interakce vedou k odlišné selektivitě mezi CO_2 a silikagelem při separaci látek s odlišným elektronovým rozložením, kde je výhodnější použít silikagel. Alumina se uplatňuje výhradně u separací nenasycených, nasycených a polyaromatických uhlovodíků. Pro separace mechanismem adsorpční chromatografie je nejvhodnější typ neutální aluminy. Kyselé a zásadité CO_2 vykazuje vlastnosti iontoměniče.^{19, 20}

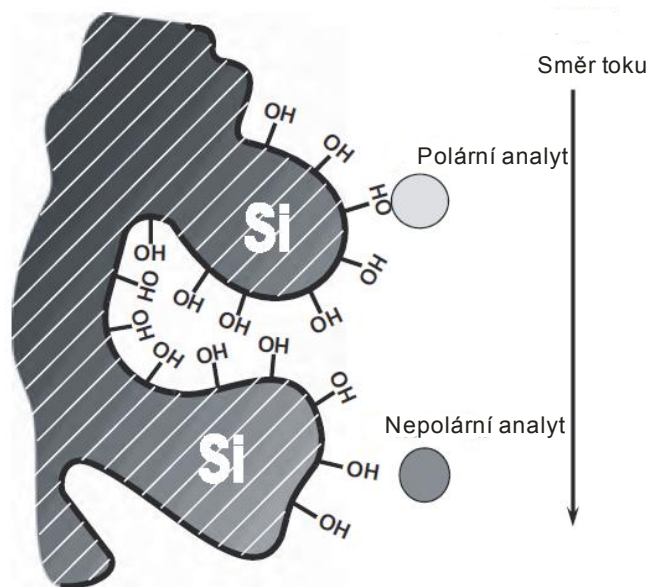
Typy stacionárních fází pro NC:

silikagel (silanolová skupina) = Si-OH

propylamin = Si-(CH₂)₃-NH₂

kyanpropyl = Si-(CH₂)₃-CN

diol = Si-(CH₂)₃-OCH(OH)-CH₂-OH



Obrázek 4: Schéma interakce mezi polární stacionární fází (silikagelem) a polárním a nepolárním analytem.²¹

2.1.8.2 Reverzní fáze

Chromatografie na reverzních (tzv. obrácených fázích) je založená hlaně na rozdělování molekul mezi MF a stacionární fází. MF jsou polárnější jako stacionární fáze. Stacionární fáze jsou tvořeny různými druhy chemicky modifikovaných nosičů vyrobených z oxidu křemičitého, nebo porézního grafitu.^{8, 15} Výhradně se však používá chemicky modifikovaný silikagel na němž jsou navázány nejčastěji hydrofobní oktadecylové tzv. (C18) a oktanová (C8) řetězce. MF se skládají z vody a organického rozpouštědla (ACN, MeOH, THF). Vodu může nahrazovat pufr (často upravený na určité pH) tvořený z kyselin, anorganických komponent např. KH_2PO_4 , nebo organických látek podporujících ion-párovou výměnu např. hexansulfonát sodný atd. HPLC na reverzních fázích je více používaná (cca ze 70%) jako chromatografie na fázích normálních. HPLC na obrácených fázích umožňuje separovat silně nepolární, středně polární a polární analyty i látky iotové povahy, u kterých je potřeba dbát na vhodně zvolené pH.²²

Některé typy RP stacionárních fází používaných v HPLC kolonách

C18 $\text{Si}-(\text{CH}_2)_{17}-\text{CH}_3$

C8 $\text{Si}-(\text{CH}_2)_7-\text{CH}_3$

2.1.9 Isokratická a gradientová eluce v HPLC

V klasickém isokratickém uspořádání se složení MF (její eluční síla) v průběhu analýzy nemění. Pokud během analýzy roste síla MF, tak se jedná o eluci gradientovou. Gradientová eluce se používá u analýz komplexních vzorků s velkým počtem analytů lišících se v retenci (retenčním čase). Mezi výhody gradientové eluce patří lepší rozlišení pro píky na začátku chromatogramu a lepší rozlišení a citlivost pro píky na konci chromatogramu. Jako nevýhodu gradientové eluce lze zmínit náročnější vývoj metody a delší dobu analýzy vyplývající z nutnosti ekvilibrace kolon.²³

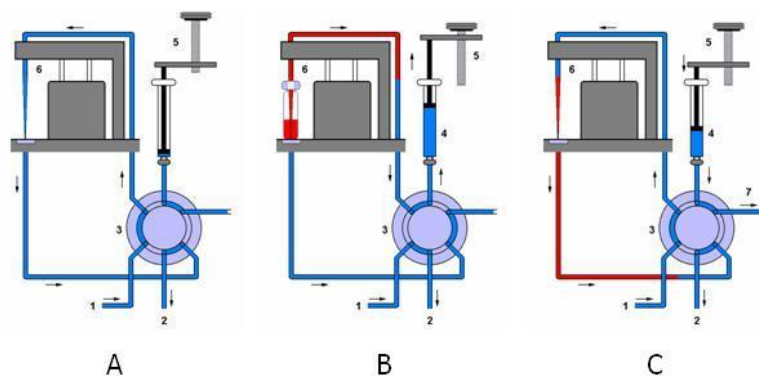
2.1.10 Instrumentace pro HPLC

2.1.10.1 Čerpací systémy

Nejčastěji používaná čerpadla v HPLC jsou čerpadla pístová. U malých průtoků MF je vhodné použít pístové čerpadlo s bezpulsním chodem. Bezpulsní chod snižuje šum chromatografického systému a je zajišťován např. použitím dvou a více pulsujících pístových čerpadel současně, jejichž činnost je fázově posunuta, nebo zařazení tlumiče pulsů do sestavy. V HPLC se pracuje s tlaky 1-60 Mpa při průtoku MF v rozsahu od 0,1 do 10 ml. min⁻¹.²⁴

2.1.10.2 Dávkovací zařízení

Účinnost chromatografického děje a opakovatelnost separace je závislá na dokonalém nadávkování vzorku. V současné době, kdy jsou kladeny vysoké požadavky na správné nadávkování vzorku, obzvláště v laboratořích zpracovávajících větší množství vzorků se stávají nejvíce používané vysokotlaké automatické dávkovače tzv. autosamplery umožňující nadávkování vzorku až do tlaku 80 MPa. Kapalný vzorek je nadávkován do tzv. vialky (skleněná či plastová nádobka o objemu nejčastěji 2 ml), poté se uzavře víkem se septem, umístí do prostoru dávkovacího zařízení a následně je nastříknut pomocí jehly (injekční stříkačky) do proudu MF.



Obrázek 5: Schéma automatického dávkovače firmy Agilent

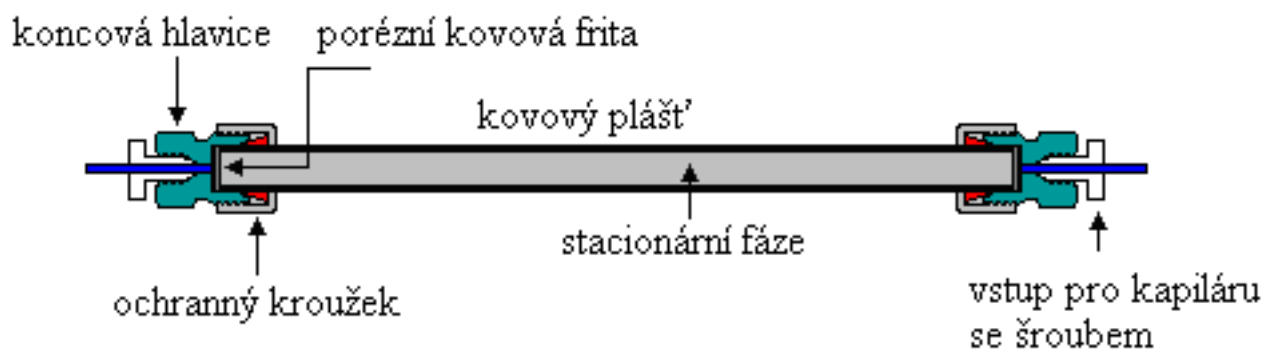
A – separace; B – plnění jehly; C – dávkování vzorku,

1 – vysokotlaké čerpadlo přivádějící MF do systému; 2 – kolona; 3 – šesticečný ventil; 4 – píst jehly (injekční stříkačky); 5- krokový motor; 6 – dávkovací jednotka; 7 – odpad

A – MF je vedena čerpadlem (1) přes šesticečný ventil (3) a dávkovací jednotku na kolonu
 B – přepnutí ventilu, dochází k naplnění jehly (smyčky) vzorkem na softwearově zadaný objem pomocí krokového motoru (5) ovládajícího píst injekční stříkačky (4)
 C – následným přepnutím ventilu je vzorek vytlačen proudem MF na kolonu (2); dávkovací systém se dostává do bodu A, dochází k vyprázdnění injekční stříkačky dávkovače do odpadu (7)

2.1.10.3 Kolony

Kolony jsou dostupné v mnoha variantách (rozměry, náplně), aby vyhovovaly různým aplikacím HPLC. Jsou vyrobeny z válců z nerezové oceli či polymerů nebo zřídka kdy ze skla. Nejběžnější velikosti stacionární fáze se pohybují v rozmezí 1,0 μm až 5 μm , obvyklý vnitřní průměr kolon měří 2,1 mm – 5,0 mm a standardní délka kolony nepřesahuje 25 cm. Pro separaci API se používají kolony vyrobené z nerezové oceli, pokud není v příslušném článku jednotlivé lékové substance uvedeno jinak. Rychlost průtoku MF kolonou u separace API pomocí HPLC je v rozmezí (0,8 ml/min – 2 ml/min). Spojení kapalinové chromatografie (LC) s hmotnostní spektrometrií (MS) neumožňuje tak vysoké průtoky MF systémem LC/MS (0,1 $\mu\text{L}/\text{min}$ – 1 ml/min). Kolony používané při LC/MS separaci musí být kompatibilní s typickými těkavými přísadami přidávanými do MF jako je kyselina mravenčí a octová.^{12, 15}



Obrázek 6: Typ kolony využívané v HPLC ¹²

2.1.10.4 Detektory

Detektory monitorují změny složení MF měřením chemických či fyzikálních veličin. Mezi nejčastěji používané detektory v analýze léčivých látek pomocí HPLC patří UV/VIS detektory a DAD detektor (UV/VIS detektor diodového pole). Dále se využívá spojení (LC) s (MS) detekcí. ⁸ UV/VIS detektory se řadí mezi nedestruktivní detektory tzn. nedochází k chemické změně detekovaného analytu. Při detekci analytu pomocí (MS) dochází k nevratné změně analyzované látky, tudíž patří mezi destruktivní detektory. Detektory se dále dělí na koncentrační a hmotnostní. Koncentrační detektory měří změny koncentrace složky v eluentu nezávisle na rychlosti průtoku MF (UV/VIS). Hmotnostní detektory měří změny hmotnostního toku složky v eluentu. Při změně rychlosti průtoku MF zůstává plocha píku stejná, mění se jeho výška. Detektory můžeme také třídit podle možností jejich využití na detektory univerzální, selektivní a specifické.

2.1.10.4.1 UV/ VIS detektory

Měří absorbanci analytu v rozmezí vlnových délek od 190 do 800 nm. Velikost odezvy se řídí Lambert-Beerovým zákonem, který popisuje vzájemný vztah mezi tloušťkou absorbující vrstvy (l), koncentrací absorbující složky (c) a velikostí absorpce vyjádřenou absorbancí (A). Citlivost těchto detektorů závisí na délce optické dráhy.

$$A = \varepsilon \cdot c \cdot l$$

ε = molární absorpční koeficient [l/mol/cm]

Podle konstrukce UV/VIS detektorů se dělí na:

Detektory s fixní vlnovou délkou (často 253,7 nm), měnitelnou vlnovou délkou, programovatelnou vlnovou délkou a DAD (PDA) detektory

2.1.10.4.1.1 DAD (PDA) detektory

Snímají celé spektrum v reálném čase bez přerušení separace. Záření prochází ze zdroje (1) štěrbinou (2), dále postupuje čočkou (3), clonou (4) a celou detektoru (5). Záření se rozkládá na holarografické mřížce (6), která je součástí detektoru a zářivý tok o určité vlnové délce zeslabený absorpcí v cele detektoru dopadá na systém fotodiod (7). Každá fotodiody je napojena na kondenzátor nabitý na danou hodnotu. Fotoelektrický proud vzniklý dopadem záření na fotodiody vybíjí kondenzátory. Vybití jednotlivých kondenzátorů je úměrné dopadajícímu záření na diody a vzniku fotoelektrického proudu. Při opětovném nabití kondenzátorů se mění proud potřebný na jejich dobítí na původní hodnotu a zaznamenává se do paměti řídicí jednotky. Proces vybíjení a nabíjení kondenzátorů se velice rychle opakuje. Tím se zaznamenávají údaje o absorpenci u každé vlnové délky v daném okamžiku. Používá se 512 – 1024 diod. Počet diod ovlivňuje spektrální rozlišení.¹²

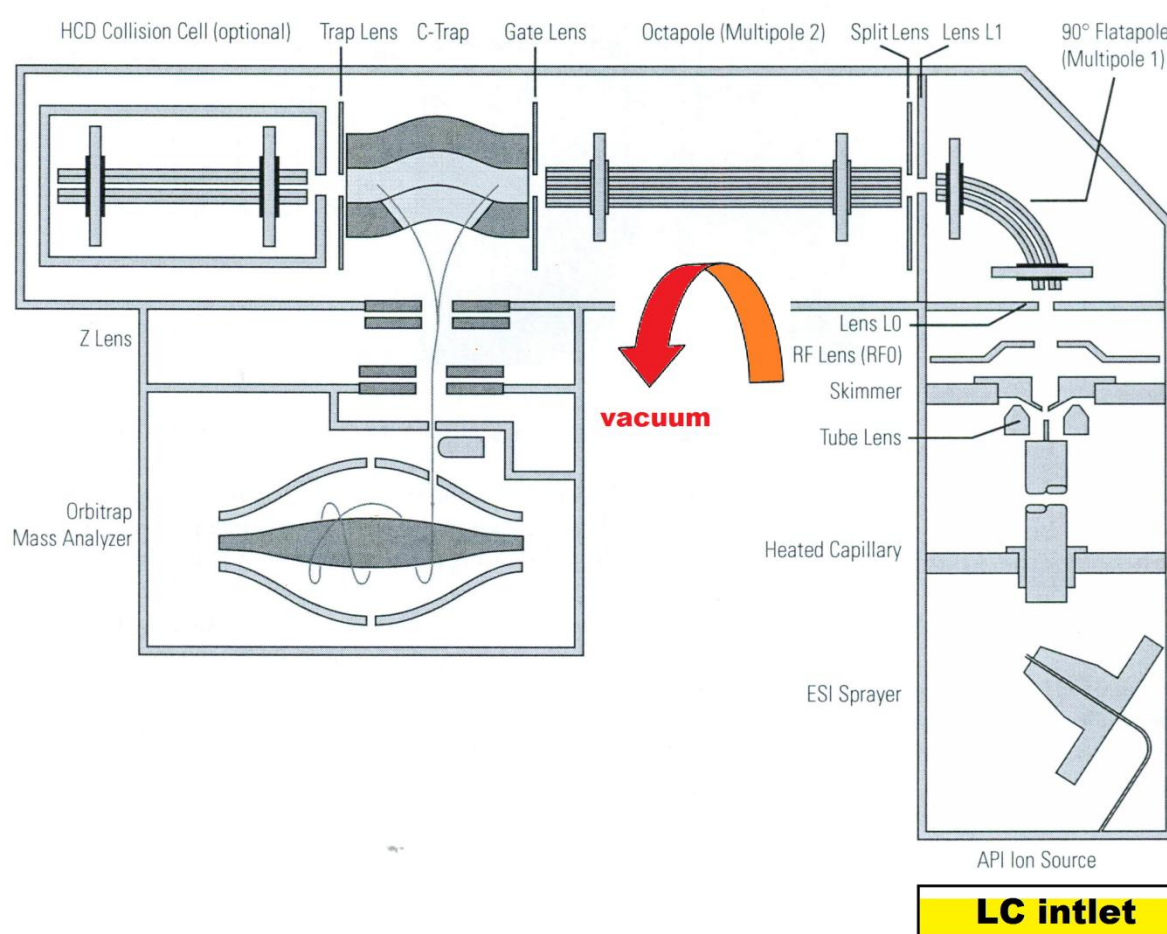
2.2 Hmotnostní spektrometrie

Hmotnostní spektrometrie (MS), je založena na vytváření plyných iontů z neutrálních molekul analytů, následné separace těchto iontů podle (m/z) a jejich detekce. Výsledné hmotnostní spektrum je graf relativní četnosti iontů produkovaných v závislosti na poměru (m/z). Většina iontů má jednoduchý náboj, proto se jejich poměr rovná hmotnosti iontu. Hodnota (m/z) je bezjednotkový poměr hmotnostního čísla k množství základních nábojů iontů. Je třeba zdůraznit, že hmotnostní spektrometrie se zabývá přesnou hmotností konkrétních izotopů prvku nebo přesnou hmotností sloučenin, které obsahují specifickou škálu izotopů.²⁵ Dnes je hmotnostní spektrometr vysoce sofistikovaný elektronický nástroj. Skládá se z pěti důležitých částí. Z přívodu vzorku, ionizace analytu, hmotnostní analýzy, detekce iontů a zpracování dat. MS je kombinace separační a detekční techniky. MS je velice rozsáhlá metoda, důležitá pro stanovení molekulové hmotnosti, molekulárního vzorce či elementárního složení. Iontová chemie může být studována např. s cílem zjistit reakční

mechanismy v organické chemii a konečně MS může být použita i při analýze sekundárních iontů ve studích povrchů.²⁶

2.2.1 Schema LC/MS sestavy Scientific Exactive

LC/MS sestava Scientific Exactive byla použita v praktické části na identifikaci nečistot pokročilého intermediátu Oxalátu. V teoretické části hmotnostní spektrometrie jsou dále popsány mechanismy ionizace a detekce (MS spektrometr), které umožňuje, či byly použity na této sestavě.



Obrázek 7: sestava Scientific Exactive²⁸

Iontová optika fokusuje a transmittuje ionty ze zdroje do hmotnostního analyzátoru.

heated capillary – asistuje při desolvataci iontů, běžná temperance 270°C ESI, 250°C APCI, ionty z vyhřívané kapiláry vstupují do tube lens

tube lens – je na nich aplikované napětí, které fokusuje ionty směrem k otvoru Skimmeru

Skimmer – působí jako vakuová přepážka, ionty prošlé Skimmerem postupují do RF lens

RF lens – tvořeny z kovových prvků, zařízení na zaměřování iontů

LO lens – působí jako kovová clona a vakuová přepážka, aplikované napětí $\pm 50V$

Multipol 1 – zařízení na transmisi iontů, tyče zahnuté do 90° snižují stopu, zabraňují vstupu neutrálních objektů do detektoru a tím snižuje šum v datech

Lens L1 – aplikované napětí $\pm 25V$

Split lens – používají se na vpuštění nebo zastavení iontů do hmotnostního analyzátoru, umožňují vysokou výchylku napětí po většinu času, vybrané ionty vpustí do c trap a zbytek iontů vychýlí, pro rychlé přepínání iontového paprsku je třeba určení přesného času nástřiku iontů, jen nutná automatická kontrola

c- trap – ionty procházející pastí jsou elektrodou vráceny zpět do této pasti, ztrácejí svoji kinetickou energii

orbitrap – axiálně symetrický hmotnostní analyzátor složený ze středové elektrody (vřetena) obklopené dvojicí vypuklých elektrod, používá elektrické pole k zachycení a omezení iontů ²⁷

2.2.2 Zavádění vzorku

Vzorky jsou buď zavedeny do vysoce vakuované oblasti, kde je umístěn zdroj iontů, hmotnostní analyzátor a detektor iontů (GC/MS), nebo do atmosférického tlaku iontového zdroje, kde dochází k ionizaci vzorku a ionty jsou následně transportovány do vysoce vakuovaného prostoru obsahujícího hmotnostní analyzátor a detektor iontů (LC/MS).²⁶

2.2.3 Ionizace vzorku

V dnešní době existuje řada ionizačních technik. Nejdůležitější dělení spočívá v rozlišení tvrdé a měkké ionizace. Ve tvrdé variantě je velké množství energie předáno iontu analytu během ionizace, což nejčastěji způsobí unimolekulární disociační reakce. Elektronová ionizace je archetypální technikou tvrdé ionizace. Většina ostatních technik je však založena na jemné (měkké) ionizaci, jejichž výstupem je malá fragmentace a tedy i informace

o molekulové hmotnosti. Jemné techniky lze dále dělit např. podle způsobu zavádění vzorku. Různé metody jemné ionizace vytvářejí totožné typy iontů, tj. kationizované molekuly, kvůli přilnutí kationtu např. H^+ nebo Na^+ v režimu pozitivních iontů a anionizované molekuly v režimu negativních iontů. Nejdůležitějšími vytvořenými molekulami jsou protonované molekuly $(M + H)^+$ v režimu pozitivních a deprotonované molekuly $(M - H)^-$ v režimu negativních iontů.²⁶

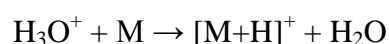
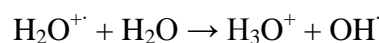
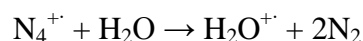
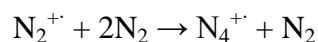
2.2.3.1 APCI (chemická ionizace za atmosférického tlaku)

Nejrozšířenější aplikace pro LC/MS zahrnují chemickou ionizaci za atmosférického tlaku a ionizaci elektrosprejem (ESI). APCI zdroj/interface se skládá z vyhřívaného pneumatického rozprašovače, který převádí průtok kapaliny na jemné kapky. Kapičky migrují za pomoci plynu prostřednictvím desolvatační komory do oblasti tvorby iontu, kde coronový výboj iniciuje APCI za odpaření rozpouštědla jako reakčního plynu. Coronový výboj probíhá na jehle o pozitivním potenciálu 2 – 5KV pro pozitivní ionty (negativní potenciál pro negativní ionty) a je zodpovědný za ionizaci rozpouštědla. Kombinace kolizí a nábojové výměny mezi rozpouštědlem a forem molekul plynu se tvoří činidla plazmového plynu lokalizované v oblasti coronového výboje jehly. Tyto činidla odpovídají za ionizaci molekul vzorků převodem protonu, vznikají především adukty MH^+ nebo MH^- . Sloučeniny s vysokou elektronovou afinitou mohou tvořit negativní ionty elektronového záchytu. Složení reakčního plynu je řízeno (kontrolováno) složením MF. Přídavek octanu amonného do MF způsobí rychlé odpaření rozpuštěných protonovaných iontů za vzniku amonných iontů, které se stávají dominantními ionty reakčního plynu. Stejně tak i přidání alkylaminů nebo kyseliny do MF vede ke tvorbě protonovaných aminů nebo aniontů dominantních v plynu plazmy. APCI má za následek tvorbu především aduktů molekulárních iontů, které jsou vhodné pro indikaci molekulové hmotnosti. Malá fragmentace omezuje možnost objasnění struktury. Fragmentace může být vyvolána kolizí indukovanou disociací (CID) použitím tandemové hmotnostní spektrometrie nebo může proběhnout v oblasti zdroj/interface. V oblasti transportu je tlak plynu stále poměrně vysoký a vytváří potřebné podmínky pro CID a efektivní shromažďování fragmentů iontů. Ve zdroji CID je obvykle indukován vhodný rozdíl napětí mezi dvěma oblastmi např. mezi tryskou kužele a skimmerem (sběrač), nebo mezi skimmerem a zdrojem iontů v závislosti na konstrukci iontového zdroje. Stejný přístup je použit ve zdroji CID s ionizací pomocí elektrospreje.^{28, 29, 30, 31, 32, 33}

Mechanismus ionizace → odpaření roztoku → ionizace reakčního plynu → ionizace analytu

Reakční plyn: MF + zmlžovací plyn

Příklad ionizace přenosem proton: $N_2 + e^- \rightarrow N_2^+$



H_3O^+ (donor protonu); $[M+H]^+$ ionizace analytu

Kladný mód: Závisí na protonové afinitě, použité rozpouštědlo má mít menší protonovou afinitu jak analyzovaná látka.

Mechanismy ionizace:	přenos protonu	$H_3O^+ + M \rightarrow [M+H]^+ + H_2O$
	vznik aduktu	$X^+ + M \rightarrow MX^+$
	přenos náboje	$X^+ + M \rightarrow MX^+ + X$

Pozn.: přenos náboje závisí na ionizační energii

Záporný mód: Závisí na aciditě látek v plynné fázi.

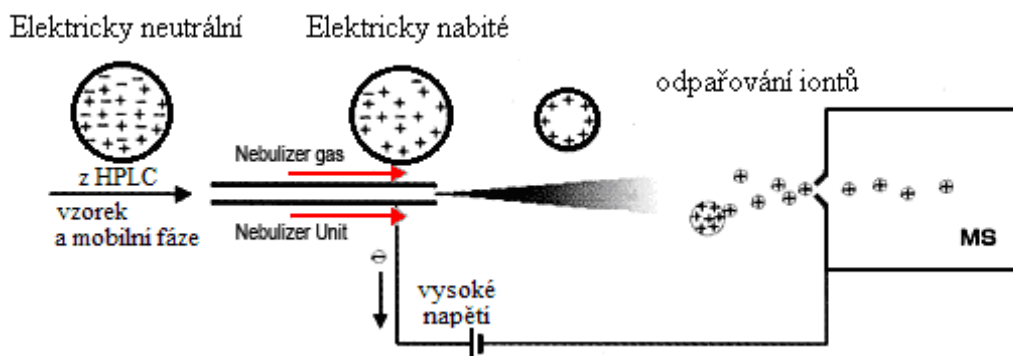
Mechanismy ionizace:	deprotonace	$A^- + M \rightarrow [M-H]^- + HA$
	vznik aduktu	$A^- + M \rightarrow MA^-$
	záchyt elektronu	$M + e^- \rightarrow M^-$ ($AB + e^- \rightarrow A^- + B$)

Pozn.: záchyt elektronu probíhá u látek s elektronegativní funkční skupinou ($-NO_2$, halogeny)

2.2.3.2 Elektrosprej

Je považován za nejuniverzálnější ionizační techniku pro neutrální sloučeniny a iony v roztoku a je zároveň univerzální interface pro LC-MS.³²⁻⁴² V elektrospreji se tvoří ionty v roztoku a pak jsou následně převedeny do plynné fáze. To je odlišné od APCI, kde jsou neutrální molekuly prvně převedeny do plynné fáze a ty jsou pak ionizovány ion-molekulovou reakcí

v plynné fázi. Srdcem zdroje elektrospreje je kovová kapilára, kterou protéká roztok vzorku. Na kapiláru je vložen potenciál 3-6 KV a tvoří sprej malých kapek zaměřených na protielektrodu. Vzorkovací otvor se nachází asi 1-3 cm od hrotu kapiláry. Pozitivní potenciál aplikovaný na kapiláru produkuje pozitivní ionty (dochází k vybití negativních iontů prostřednictvím elektrochemického výboje na kovové stěně sprejovací kapiláry), negativní potenciál aplikovaný na kapiláru produkuje negativní ionty. Přizpůsobení různým průtokům kapaliny na tvorbu kapek je nápomocna optimalizace průměru trysky kapiláry rozprašovače, použití koaxiálního průtoku plynu a tepla pro zvýšení rychlosti odpařování rozpouštědla. V produkci plynných kapek jsou důležité tři kroky. (1) Tvorba nabitých kapek na hrotu kapiláry → (2) smrštění nabitých kapek v důsledku odpaření rozpouštědla → (3) opakované rozpady kapek a produkce plynných iontů z velmi malých vysoce nabitých kapek. Kapky pohybující se směrem k otvoru odběru se zmenšují v důsledku odpařování rozpouštědla. V místě, kde jsou Coulombovi síly odpuzování mezi částicemi vyšší než povrchové napětí kapky (Rayleighův limit stability) se kromě výsledné nestability slzy kapičky vytvářejí ještě menší kapičky. V závislosti na modelu iontového odpařování, kdy je dosaženo velikosti kapky asi 10 nm je hustota náboje tak vysoká, že jsou ionty desorbovány z kapky do plynné fáze. U sloučenin menších než 1000 Da elektrosprej vyrábí hlavně proponované molekulární ionty MH^+ pro bazické sloučeniny a deprotonované molekulární ionty $(M-H)^-$ pro kyselé sloučeniny. Některé ionty aduktů obsahují např. $(MNH_4)^+$, $(MNa)^+$, $(MK)^+$ nebo $(M-H+Na)^-$, které někdy mohou být použity k detekci neefektivně ionizovaných sloučenin převodem protonu.⁴³ Sloučeniny o vyšší molekulové hmotnosti vytvářejí několikanásobně nabité ionty typu $(M+nH)^+$ nebo $(M-nH)^-$ za podmínek elektrospreje.



Obrázek 8: ionizace elektrosprejem

2.2.3.3 HESI (termosprej)

Termosprej je kombinace iontového zdroje a rozhraní pro KCh-HS a jiných aplikačních systému kapalných vzorků.⁴⁴⁻⁴⁷ Neustálý tok kapaliny se rychle vypařuje v proudem zahříváné kovové kapilární trubce vytvářející trysku kapiček pohybujících se nadzvukovou rychlostí, z nichž některé mají elektrický náboj, když je roztok částečně kapalný, za přítomnosti těkavého pufu, jako je např. acetát čpavku. Vytváří se množství kladně a záporně nabitých kapiček, což vede k vytvoření kladných i záporných iontů. Většina zdrojů termospreje je opatřena vláknem nebo odtokovou elektrodou k pomoci při výrobě iontů. Elektron z vlákna nebo odtoku (plazmasprej) ionizuje pára solventu, tedy vzorku, procesy chemické ionizace. Přítomnost elektrolytu (např. 50-100 mM acetátu čpavku) je velmi důležitá, protože bez něj se vyrobí malé množství iontů. Počáteční kapičky vytvořeného spreje se nadále smršťují důsledkem vypařování rozpouštědla kvůli žáru a vakuu při pohybu zdrojem k otvoru při vstupu do analyzátoru hmotnosti. Nakonec se zmenší do dostatečné velikosti, aby volné ionty byly uvolněny z kapiček. Je také možné vytvářet ionty ve dvojfázovém procesu podobném běžné chemické ionizaci, kdy iont elektrolytu, např. NH_4^+ se uvolňuje z kapičky, reaguje s molekulou vzorku v plynném skupenství a vytváří iont. Typy iontů vysledované při obou procesech jsou obvykle molekulární adukty iontů, jako MH^+ , $(\text{M}+\text{NH}_4)^+$, $(\text{M}-\text{H})^-$, $(\text{MO}_2\text{CCH}_3)^-$ atd., které doprovází několik fragmentárních iontů nízké intenzity. Možná je i přítomnost aduktů rozpouštědla jako např. $(\text{M}+\text{CH}_3\text{CN})\text{H}^+$ a $(\text{M}+\text{CH}_3\text{CN})\text{NH}_4^+$, které ztěžují spektrum. Termosprej rozhodně není univerzálním ionizačním procesem a v některých případech může být třeba posílit produkci iontů pomocí ionizace vlákna nebo odvodu plazmy. Pro vzorky s rozpouštědlem nízké polarit, které nerozpouští těkavé elektrolyty se toto stává povinným.^{28, 44, 48, 49, 50}

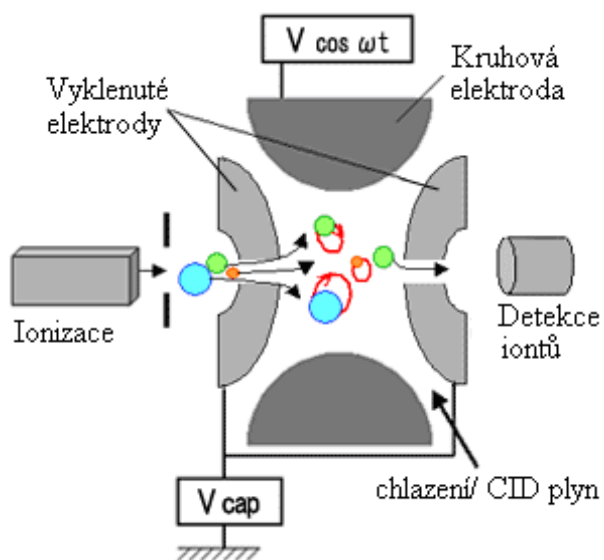
2.2.4 Hmotnostní analyzátoři

V dnešní době je k dispozici mnoho typů hmotnostních analyzátorů, ze kterých lze uvést např. sektorové přístroje, iontové pasti, kvadrupolové a průletové analyzátoři, přístroje pracující na principu iontové cyklotronové rezonance a orbitální pasti. Vybrané typy jsou popsány níže.

2.2.4.1 Iontová past

Je tvořena z jedné kruhové elektrody a dvou vyklenutých elektrod. Dále ze vstupního otvoru umožňujícího přívod iontů a vystupního otvoru, který separované ionty pošle do detektoru.

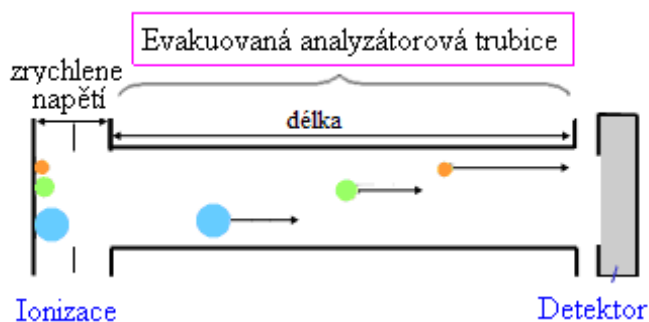
Ionty přivedené do pasti jsou vhodnými poměry napětí vloženého na elektrody zadrženy. Následnými pozvolnými změnami napětí jsou tyto ionty vypuzovány podle jejich hodnoty m/z výstupním otvorem na detektor.



Obrázek 9: iontová past

2.2.4.2 Průletový analyzátor (analyzátor doby letu)

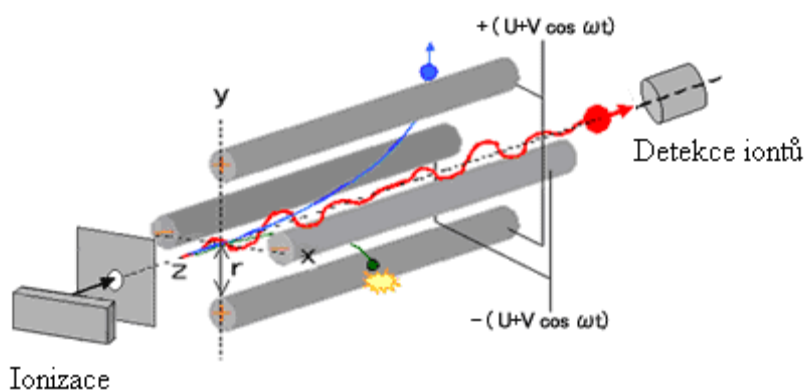
Nejprve jsou ionty při vstupu do evakuované průletové trubice urychleny krátkým pulsem (dodání stejné kinetické energie) a následně je měřena jejich doba letu (zaznamenáno detektorem), která není urychlena žádným polem. Podle času letu jednotlivých iontů se určí hodnoty m/z . Ionty s menší hodnotou m/z o stejné kinetické energii se pohybují v oblasti bez pole rychleji, tím se dostanou dříve do detektoru.



Obrázek 10: TOF⁵¹

2.2.4.3 Kvadrupolový analyzátor

Kvadrupolový analyzátor se běžně uplatňuje ve spojení LC/MS, nebo GC/MS. Konstrukčně se jedná o čtyři kovové tyče kruhového či hyperbolického průřezu, které jsou připojeny ke zdrojům stejnosměrného a vysokofrekvenčního střídavého napětí. Ionty, které vlétnou do prostoru mezi tyče, se dostanou do střídavého elektrického pole a začnou oscilovat. Při vhodně zvolených hodnotách stejnosměrného a střídavého napětí a jejich vhodném poměru projdou kvadrupólem pouze hodnoty o určité hodnotě m/z , ostatní se dostanou na nestabilní dráhy a zachytí se na tyčích kvadrupólu, nebo na stěnách přístroje. Zařízení se chová jako hmotnostní filtr nastavený na určitou hodnotu m/z . Postupnou změnou napětí vkládaných na kvadrupól tzv. skenováním je možné nechat tímto filtrem postupně projít ionty ve zvoleném intervalu hodnot m/z .⁵²

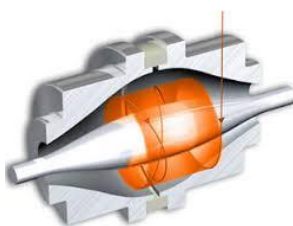


Obrázek 10: kvadrupolový analyzátor⁵¹

2.2.4.4 Orbitrap (orbitální past)

Ionty jsou zachyceny ve statickém elektrickém poli (nepoužívá se magnet), obíhají středovou elektrodu a oscilují kolem ní s frekvencí úměrnou $(\frac{m}{z})^{-\frac{1}{2}}$. V důsledku oscilací iontů je indukován proud a použitím FT je zaznamenaný signál převeden na spektrum. Orbitrap umožňuje vysoké rozlišení a určení přesné hmotnosti na několik ppm. Jsou kladeny vysoké

požadavky na vakuum. $\omega = \sqrt{k \cdot \frac{z \cdot e}{m}}$ k – zakřivení pole, z – , e – , m – hmotnost



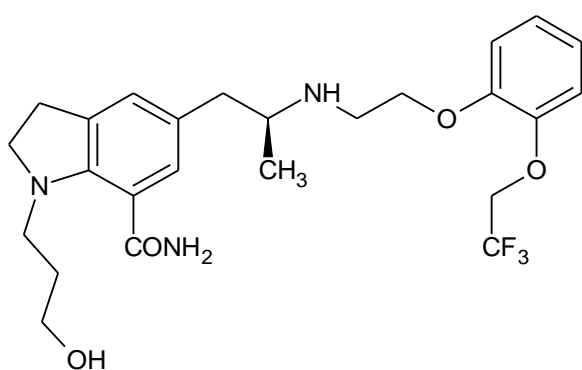
Obrázek 11: iontová past⁵³

3 Experimentální část

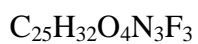
3.1 Silodosin

3.1.1 Stukturní vzorec, sumární vzorec, molekulová hmotnost, fyzikálně chemické vlastnosti (vzhled, rozpustnost) a syntéza Silodosinu

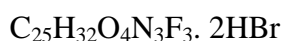
Strukturní vzorec:



Sumární vzorec:



CAS RN/160970-54-7/



CAS RN/169107-04-4/

Molekulová hmotnost:

495,53 g.mol⁻¹

Chemický název:

2,3-Dihydro-1-(3-hydroxypropyl)-5-[(2*R*)-2-[[2-[2-(2,2,2-trifluoroethoxy) phenoxy]ethyl] amino]propyl]-1*H*-indole-7-carboxamide(*R*)-1-(3-Hydroxypropyl)
-5-[(2-[[2-[2-(2,2,2-trifluoroethoxy)phenoxy]ethyl]amino]propyl]indoline-7-carboxamide
(-)-1-(3-Hydroxypropyl)-5-[2(*R*)-[2-(2,2,2-trifluoroethoxy)phenoxy]ethylamino]propyl]
indoline-7-carboxamide

3.2 Zkoumané látky

3.2.1 Strukturální vzorce, sumární vzorce, molekulové hmotnosti, fyzikálně chemické vlastnosti (vzhled, rozpustnost)

Sumární vzorec látky č.1:

(R)-5-(2-Aminopropyl)-1-(3-benzoyl-oxopropyl)inuline-7-carbonitrile tartarate

pozn: dále jen Tartarát

Sumární vzorec látky č.2:

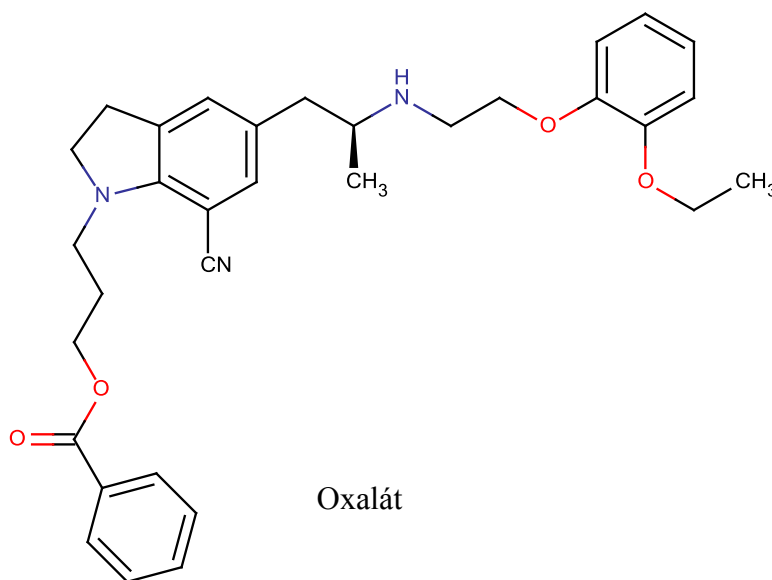
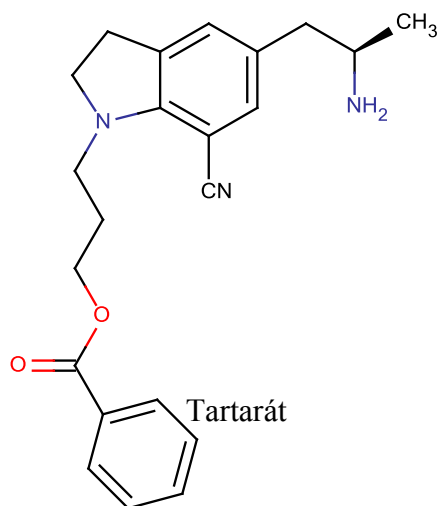
(R)-5-(2-Aminopropyl)-1-(benzoyl-oxopropyl)inuline-7-carbonitrile tartarate

1-[3-(benzoyloxy)propyl]-2,3-dihydro-5-[(2R)-2-[[2-[2-(2,2,2-trifluoroethoxy)

phenoxy]ethyl]amino]propyl]-1H-indole-7-carbonitrile oxalate

pozn: dále jen Oxalát

Strukturální vzorce:



Molekulová hmotnost Tartarátu:

364,20 g.mol⁻¹

Molekulová hmotnost Oxalátu:

582,26 g.mol⁻¹

3.2.1.1 Rozpustnost zkoumaných látek

Rozpustnost zkoumaných látek.(jednotlivě pro Tartarát a Oxalát) byla postupně testována na navážkách 2mg do 10 ml odměrné baňky vždy v pořadí organické rozpouštědlo, nebo jejich směs a následné přidání H₂O s výjimkou, kdy jako rozpouštědlo byla použita pouze voda. Výsledky jsou uvedeny v tabulce č. 1.

Tabulka č. 1			
Rozpouštědlo	Poměr rozpouštědel	Oxalát	Tartarát
H ₂ O	-	NE	NE ¹
ACN	-	ANO	NE
ACN/H ₂ O	(50/50)	ANO	ANO ²
MeOH	-	ANO	ANO
MeOH/H ₂ O	(50/50)	ANO	ANO
MeOH/ACN/H ₂ O	(20/20/60)	ANO	ANO
THF	-	ANO	NE
THF/MeOH/H ₂ O	(20/20/60)	ANO	ANO

1 – částečně rozpustný v H₂O, 2 – rozpustný po přidání H₂O

1. stupeň: Reduktivní aminace → reakce aminu (Tartarátu) s aldehydem za přítomnosti redukčního činidla. In situ vzniklý imin (Schiffova báze) se mohl redukovat např.: kyanoborohydridem sodným (NaBH_3CN), borohydridem sodným (NaBH_4), triacetoxyborohydridem sodným ($\text{NaBH}(\text{OAc})_3$), či lithiium borohydridem (LiBH_4). Reakce se prováděla v alkoholu za přítomnosti slabé kyseliny při 25 - 40 °C⁵⁴⁻⁵⁹
2. stupeň: Hydrolýza benzolu (chirální skupiny) → lze provést:
 - a) 1% NaOH, MeOH, 20 °C, 50 min. s 90% výtěžkem⁶⁰
 - b) Et_3N , MeOH, H_2O v poměru (1:5:1), reflex, 20 hodin s 86% výtěžkem⁶¹
 - c) MeOH, KCN⁶²
3. Stupeň: Hydrolýza CN skupiny na NH_2 skupinu → Byla provedena alkalickou hydrolýzou 5M NaOH v dimethylsulfoxidu (DMSO) za přítomnosti oxidačního činidla peroxidu vodíku.⁵

3.3 Vývoj HPLC metody na stanovení čistoty pokročilého intermediátu Oxalátu

V průběhu vývoje HPLC metody na stanovení čistoty, resp. příbuzných látek pokročilého intermediátu Oxalátu byl po celou dobu nastříkovan i intermediát Tartarát z důvodu možného následného sjednocení metod pro obě sloučeniny za předpokladu optimálních podmínek. Dále byl Tartarát nastříkovan kvůli sledování retenčních časů výše jmenovaných sloučenin, ze kterých vyplývá jejich rozlišení. Vzhledem k rozdílné velikosti molekul Tartarátu a oxalátu nebyl důvod k obavám z jejich blízké eluce a špatného rozlišení.

3.3.1 Přístroje:

Sestava kapalinového chromatografu Agilent 1100 s vysokotlakým kvartérním čerpadlem a DAD detektorem, HP Chemstation verze A.10.01 označení přístroje LX15

Sestava kapalinového chromatografu Agilent 1100 s vysokotlakým kvartérním čerpadlem a UV/VIS detektorem, HP Chemstation verze A.10.01. označení přístroje LX21

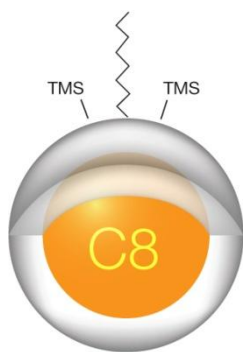
Sestava kapalinového chromatografu Agilent 1200 s vysokotlakým kvartérním čerpadlem a DAD detektorem, HP Chemstation verze B.04.02.SP1 označení přístroje LX27

3.3.2 Kolony:

Při výběru kolon bylo přihlédnuto k jejich dostupnosti. Strukturální vzorec Oxalátu obsahuje lehce polární -NH a -CN skupiny. Vzhledem ke slabé polaritě Oxalátu určené ze strukturálního vzorce jsem se rozhodla pro vývoj metody na běžně používaných reverzních fázích s za pomoci nepolárních C18, nebo lehce polárních kolon typu C18, které zadržují látky tohoto typu a jsou základem analytiky na reverzních fázích.

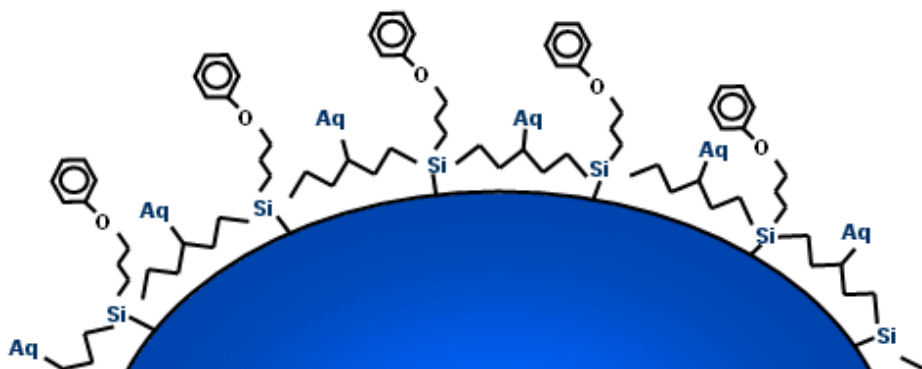
Kinetex	2.6 μm , 150 · 4,60 mm, C18 100A
Synergi Polar	4.0 μm , 150 · 4,60 mm, RP 80A
Luna	3.0 μm , 100 · 4,60 mm, C18(2) 100A

1. Kinetex 2.6 μm C18 100A HPLC Column 150 mm · 4.6 mm



Univerzální kolona vyrobená technologií core- shell tzn. je tvořena částicemi s pevným jádrem, což zvyšuje její účinnost oproti kolonám na bázi klasického, plně porézního silikagelu. Jedná se o vysoce hydrofobní, lehce polární kolonu s nízkou selektivitou k aromatickým sloučeninám s nižší silanolovou aktivitou při pH= 2.5, odolnou v rozmezí pH 1.5 – 10.

2. Synergi 4 µm Polar- RP 80A HPLC Column 150 mm · 4.6 mm



Kolona s ethericky vázanou fenylovou (fenoxypropylovou) fází s polárním endcappingem. Hydrofilní zakončení bylo speciálně navrženo pro maximální retenci a rozlišení polárních a aromatických látek, které jsou často analyzovány ve farmaceutickém průmyslu. Jedná se o částečně hydrofobní, univerzální kolonu pro polární reverzní fázi. Dosahuje vysoké selektivity pro aromatická farmaka, je stabilní v rozmezí pH 1.5 – 7 odolná vůči hydrolyze i při pH= 1.5. Kolona se střední silanolovou aktivitou při pH= 2.5.

3. Luna 3.0 µm C18(2) 100A HPLC Column 150 mm · 4.6 mm

Kolona vyrobená z extrémně hladkého, sférického, superčistého (99.999%) silikagelu, téměř beze stop kovů. Je hydrofobní, má slabou senzitivitu k aromatickým složeninám a malou silanolovou aktivitu při pH= 2.5.

3.3.3 Chemikálie:

Reagencie:

H₂O, LiChrosolv, Merck, 1.

ACN g.g., LiChrosolv, Merck, 1.00030

MeOH g.g., LiChrosolv, Merck, 1.06007

KH₂PO₄ p.a., Merck, 1.04873

K₂HPO₄ p.a., Merck, 1.05104

H₃PO₄ 85% p.a., Merck, 1.00573

KOH 30% roztok

Substance:

Oxalát

Tartarát

Aldehyd

3.3.4 Přehled použitých metod

Nejprve byly postupně měřeny směsné vzorky (Oxalátu, Tartarátu a Aldehydu) na všech kolonách viz.(3.3.2 Kolony) za pomoci výše vyjmenovaných kapalinových chromatografů viz. (3.3.1 Přístroje), kde byla MF vytvářena jednoduchou kombinací organického rozpouštědla a H₂O. Analýzami pomocí těchto MF a kolon nebyly naměřeny žádné uspokojivé výsledky, kromě spojení MF složené z ACN/H₂O a kyseliny s kolonou č.2, kde došlo k větší absorpci dvou látek. Píky ovšem nebyly symetrické a eluční čas prvního z nich T_R=1,4 min. je příliš nízký. viz. tabulka. 2

Tabulka č. 2			
Kolona	MF	Poměr	Výsledek
1	MeOH/H ₂ O	50/50	Dva špatně vydělené píky v 5 min. o plochách [2537,4 mAU·s] a [1281,3 mAU·s]
2	MeOH/H ₂ O	50/50	Největší absorpce látek v 1. min. a 13 min. při wwd 210 nm do plochy [520 mAU·s]
3	ACN/H ₂ O	50/50	Eluce píku v 1. min., pík o ploše [3471,3 mAU·s] při wwd 210 nm, při wwd 230 nm byla naměřena jeho plocha [6217,6 mAU·s]
1	MeOH/H ₂ O + K	50/50	Absorpce v 19. min. Pík o ploše [3581,4 mAU·s]. Symetrie píku v 10% výšky[5,6].
2	MeOH/H ₂ O + K	50/50	Absorpce v 2. min. a 13. min. při 210 mn do ploch [425 mAU·s]
3	ACN/H ₂ O + K	50/50	Absorpce v 1,5. min. Pík o ploše [9528,7 mAU·s]. Symetrie píku v 10% výšky[2,1]. Absorpce v 5,5. min. Pík o ploše [10131 mAU·s]. Symetrie píku v 10% výšky[7,9].

K – přídavek 85 % H₃PO₄ v množství 0,29 ml na 100 ml MF

Parametry metod uvedených v tabulce č. 2

Průtok MF: 1 ml/min (kolona č.2, 3); 0,6 ml/min (kolona č.1), teplota kolony: 30 °C, délka analýzy:30 min.

Pozn.: Analýzy na sestavách kapalinových chromatografů s DAD detektorem byly měřeny rozsahu vlnových délek 200 nm až 400 nm. U UV/ VIS detektoru na koloně č.1 byla zpočátku vybrána vlnová délka 254 nm.

Příprava vzorků:

Směsný vzorek: 2 mg Oxalátu + 2 mg Tartarátu byly naváženy do 10 ml erlenmeyerovi baňky a rozpuštěny za pomoci ultrazvuku v organickém rozpouštědle. Poté byla přidána H₂O. Byl zachován stejný poměr rozpouštědel jako v MF tzn. 5 ml organického rozpouštědla + 5 ml H₂O. Následně byl přidán 1 ml roztoku aldehydu.

Aldehyd: 2 mg Aldehydu byly naváženy do 10 ml erlenmeyerovi baňky a rozpuštěny za pomoci ultrazvuku v organickém rozpouštědle. Poté byla přidána H₂O. Byl zachován stejný poměr rozpouštědel jako v MF.

Oxalát: 2 mg Oxalátu byly naváženy do 10 ml erlenmeyerovi baňky a rozpuštěny za pomoci ultrazvuku v organickém rozpouštědle. Poté byla přidána H₂O. Byl zachován stejný poměr rozpouštědel jako v MF.

Tartarát: 2 mg Tartarátu byly naváženy do 10 ml erlenmeyerovi baňky a rozpuštěny za pomoci ultrazvuku v organickém rozpouštědle. Poté byla přidána H₂O. Byl zachován stejný poměr rozpouštědel jako v MF.

Pozn.: Postup přípravy vzorků byl identický do značné části vývoje metody, případné změny jsou uvedeny u konkrétních metod.

Další postup vývoje metody spočíval ve záměně H₂O za pufr. viz. tab.3

Tabulka č. 3			
P - pufr: 0,025 M KH ₂ PO ₄ ; pH pufru nebylo nijak upravováno, tzn. hodnota pH byla cca 4			
Kolona	MF	Poměr	Výsledek
2	MeOH/P	50/50	největší odezva při wwd 210 nm absorpce v 1,5 min; pík o ploše [635,2 mAU·s] absorpce v 14,6 min; pík o ploše [100,2 mAU·s]
3	ACN/P	50/50	absorpce ve 2 min.; pík o ploše [5522,9 mAU·s] při 210 nm; při wwd 230 nm se jeho plocha zvýšila na [9391,3 mAU·s]; symetrie píku v 10% výšky [2,1] absorpce v 7 min.; pík o ploše [6907,3 mAU·s] při wwd 210 nm; při wwd 230 nm se jeho plocha zvýšila na [9374,6 mAU·s]; symetrie píku v 10% výšky [8,1]
1	ACN/P „základní“ Metoda	50/50	eluce píku Tartarátu ve 3 min.; pík o ploše [20662,6 mAU·s]; symetrie píku v 10% výšky [2,4] eluce píku Oxalátu v 10 min.; pík o ploše [22359 mAU·s]; symetrie píku v 10% výšky [8,0] Píky Tartarátu a Oxalátu byly ověřeny jejich samostatnými nástřiky na kolonu. Aldehyd nebyl spolehlivě ověřen. Došlo k jeho čtyřnásobnému nástřiku na kolonu.
2	ACN/P	50/50	eluce píku Aldehydu ve 3 min.; pík o ploše [60,7 mAU·s] eluce píku Tartarátu ve 4 min.; pík o ploše [5369,3 mAU·s]; symetrie píku v 10% výšky [3,4] eluce píku Oxalátu ve 21,5 min.; pík o ploše [7591,6 mAU·s]; symetrie píku v 10% výšky [8,0] Eluce píků Aldehydu, Tartarátu a Oxalátu byly ověřeny jejich samostatnými nástřiky na kolonu.

Na C18 koloně č.1 proběhly analýzy ve větším rozsahu hodnot pH pufru oproti „základní“ metodě (0,025 M KH₂PO₄ při pH=4 ACN/MeOH 50/50) viz. tab. č. 3. Výsledky byly s touto metodou porovnány a zhodnoceny v tabulce č.4

Tabulka č. 4 Kolona č.1 C18

Podmínky metod: průtok 0,6 ml/min; teplota na koloně 30°C; detekce 230 nm; nástřik 20 µl

P - pufr: 0,025M KH₂PO₄

MF	pH pufru	Výsledek
ACN/P (50/50)	3	Snížení pH pufru vedlo k posunu píků směrem dopředu. U Aldehydu cca o 1 min. tzn. T _R =2,0 min. U Tartarátu došlo k posunu píku z T _R = 3,2min. na T _R = 2,9min. Symetrie píku Tartarátu se zhoršila z [2,4] na [2,8]. Plocha píku Tartarátu klesla z [20662,6 mAU·s] na [15911,0 mAU·s] Pík Oxalátu se posunul z T _R = 10,1 min. na T _R = 7,3 min. Jeho symetrie v 10% výšky píku se zlepšila z [8,0] na [7,4]. Plocha Oxalátu klesla z [22359,0 mAU·s] na [16925,4 mAU·s].
ACN/P (50/50)	5	Zvýšení pH pufru vedlo k posunu píků směrem dozadu. Pík aldehydu s T _R = 3,6 min. eluoval v píku Tartarátu s T _R = 3,5 min. Symetrie píku Tartarátu se zhoršila z [2,4] na [3,3]. Plocha píku Tartarátu klesla z [20662,6 mAU·s] na [19133,3 mAU·s] Pík Oxalátu se posunul z T _R = 10,1 min. na T _R = 12,0 min. Symetrie píku Tartarátu v 10% výšky se zlepšila z [8,0] na [7,8]. Plocha píku Oxalátu klesla z [22359,0 mAU·s] na [18048,4 mAU·s].
ACN/P (50/50)	6	Zvýšení pH pufru vedlo k dalšímu posunu píků (Tartarátu, Oxalátu) směrem dozadu. Pík aldehydu s T _R = 3,5-3,6 min. se oddělil od píku Tartarátu s T _R = 3,8 min. Symetrie píku Tartarátu v 10% výšky se zhoršila z [2,4] na [3,8]. Plocha píku Tartarátu klesla z [20662,6 mAU·s] na [18630,7 mAU·s]. Pík Oxalátu se posunul z T _R = 10,1min. na T _R = 25,7 min. Symetrie píku Oxalátu v 10% výšky se zlepšila z [8,0] na [3,9]. Plocha Oxalátu klesla z [22359,0 mAU·s] na [18504,7 mAU·s].
ACN/P (40/60)	6	Snížení eluční síly vedlo k dalšímu posunu všech píků směrem dozadu. Pík aldehydu absorboval T _R = 4,6 min. Pík Tartarátu eluoval v T _R =6,1 min. Symetrie píku Tartarátu v 10% výšky se zhoršila z [2,4] na [6,2]. Plocha píku Tartarátu vzrostla z [20662,6 mAU·s] na [20908,5 mAU·s]. Pík Oxalátu se posunul z T _R = 10,1min. na T _R = 90-100 min. (eluce mimo délku analýzy).

Výměna pufru: z 0,025M KH₂PO₄ o pH= 4 na 0,025 M K₂HPO₄ o pH= 4 → upraveno 85%H₃PO₄

Výměna pufru byla vyzkoušena pouze na kolonách č.1 a č.2 v kombinaci s MF na kterých proběhly separace s relativně dobrými výsledky vzhledem k fázi vývoje. Výsledky byly porovnány s totožnými metodami před výměnou pufru a komentovány v tabulce č. 5 Byly sledovány symetrie píku v 10% výšky, které jsou uvedeny níže v tabulkách symetrií č. 6, 7

Tabulka č. 5

Kolona	MF	Poměr	Výsledek
1	ACN/pufr	50/50	<p>Eluce píku Tartarátu s $T_R= 3,3$ min. je téměř totožná s $T_R= 3,7$ min. Aldehydu. Aldehyd vyeluoval ve chvostu píku Tartarátu.</p> <p>plocha píku Tartarátu [20899,3mAU·s]; symetrie píku Tartarátu v 10% výšky [2,2]</p> <p>eluce píku Oxalátu v $T_R= 11,2$ min.; pík o ploše [20528,3 mAU·s]; symetrie píku Oxalátu v 10% výšky [6,8].</p>
2	ACN/purf	50/50	<p>eluce píku Aldehydu v $T_R=3,0$ min.</p> <p>eluce píku Tartarátu v $T_R= 3,7$ min.; pík o ploše [5539,0 mAU·s]; symetrie píku v 10% výšky [2,7]</p> <p>eluce píku Oxalátu v $T_R= 19,3$ min.; pík o ploše [7006,6 mAU·s]; symetrie píku v 10% výšky [6,4]</p>

Tabulka č. 6, 7

KOLONA 1	Purf	SYMETRIE		KOLONA 2	Purf	SYMETRIE	
		Tartarát	Oxalát			Tartarát	Oxalát
	KH ₂ PO ₄	2,4	8,0		KH ₂ PO ₄	3,4	8,0
	K ₂ HPO ₄	2,2	6,8		K ₂ HPO ₄	2,7	6,4

Z jednotlivých výsledků v tabulkách č. 6 a č. 7 je patrné, že změna pufru z KH₂PO₄ na K₂HPO₄ při pH= 4 vedla ke zlepšení symetrií píků. Nicméně dosavadní výsledky symetrií i po změně pufru nejsou uspokojivé. Další postup vývoje HPLC metody na stanovení čistoty pokročilého intermediátu Oxalátu spočíval v kombinacích ACN, MeOH a pufrů při různých hodnotách pH.

Další metody: Kombinace ACN, MeOH, pufrů, jejich poměrů v MF při různých hodnotách pH na uvedených kolonách.

Další vývoj už probíhal pouze na dvou kolonách. Na koloně č.1 (klasická C18) a na lehce polární koloně č.2 z důvodu úspory chemikálií a přístrojů (zůstala jsem na dvou sestavách kapalinových chromatografů s DAD detektorem). Z používaných C18 kolon se separace na koloně č.1 prozatím zdály zdařilejší.

Tabulka č. 8 METODA: SILODOS 1

Popis metody→ MF: ACN (vol. 40%)/ MeOH (vol. 20%)/ pufr (vol. 40%) Pufr: 0,025M K₂HPO₄, úprava pufru na pH= 4 85% H₃PO₄, teplota kolony: 30°C, průtok MF: 0,6 ml/min, wwd 230 nm kolona č.1, wwd 210 nm kolona č.2

KOLONA 1	<p>eluce píku Tartarátu v $T_R= 4,3$ min.; pík o ploše [18704,7 mAU·s]; symetrie píku v 10% výšky [3,0]</p> <p>Pík Tartarátu byl špatně vydělen od nečistoty v $T_R= 4,2$ min. (udáno hodnotou rozlišení mezi píkem Tartarátu a nečistotou v $T_R= 4,2$ min.) $R= 0,8$.</p> <p>eluce píku Aldehydu v $T_R= 5,3$ min.; pík o ploše [40,1 mAU·s]</p> <p>eluce píku Oxalátu v $T_R= 14,1$ min.; pík o ploše [17381,5 mAU·s]; symetrie píku v 10% výšky [5,3]</p>
KOLONA 2	<p>eluce píku Aldehydu v $T_R= 3,8$ min.; pík o ploše [54,8 mAU·s]</p> <p>eluce píku Tartarátu v $T_R= 4,1$ min.; pík o ploše [6294 mAU·s]; symetrie píku v 10% výšky [2,2]</p> <p>Hodnota rozlišení $R= 1,5$ mezi píkem Aldehydu a píkem Tartarátu je vyhovující.</p> <p>eluce píku Oxalátu v $T_R= 17,0$ min.; pík o ploše [6993,2 mAU·s]; symetrie píku v 10% výšky [4,3]</p>

Tabulka č. 9 METODA: SILODOS 2

Popis metody→ MF: ACN (vol. 40%)/ MeOH (vol. 20%)/ pufr (vol. 40%) Pufr: 0,025M K₂HPO₄,
úprava pufru na pH= 5 85% H₃PO₄, teplota kolony: 30°C, průtok MF: 0,6 ml/min, wwd 230 nm
kolona č.1, wwd 210 nm kolona č.2

KOLONA 1

Zvýšení pH pufru způsobilo posun píku Tartarátu a píku Aldehydu a zvýšení odezvy sledovaných látek.

eluce píku Tartarátu v $T_R = 4,1$ min.; pík o ploše [17981,8 mAU·s]; symetrie píku v 10% výšky= [2,7]

Pík Tartarátu byl opět špatně vydělen od přechchozí nečistoty v $T_R = 4,0$ min. Hodnota rozlišení se zhoršila z $R=0,8$ na $R=0,7$.

eluce píku Aldehydu v $T_R = 4,9$ min.; pík o ploše [301,3 mAU·s]

eluce píku Oxalátu v $T_R = 14,2$ min.; pík o ploše [18037,5 mAU·s]; symetrie píku v 10% výšky= [1.3]

KOLONA 2

Zvýšení pH pufru způsobilo pokles odezev sledovaných píků. Došlo k posunu píku Aldehydu směrem dopředu a píků Tartarátu a Oxalátu směrem dozadu, čímž se zlepšila hodnota rozlišení mezi Aldehydem a Tartarátem. Hodnota rozlišení mezi píkem Tartarátu a Aldehydu se zvýšila z $R=1,5$ na $R=5,1$.

eluce píku Aldehydu v $T_R = 3,3$ min.; pík o ploše [32,2 mAU·s]

eluce píku Tartarátu v $T_R = 4,4$ min.; pík o ploše [5668,5 mAU·s]; symetrie píku v 10% výšky [1,7]

eluce píku Oxalátu v $T_R = 17,7$ min.; pík o ploše [6729,9 mAU·s]; symetrie píku v 10% výšky [3,7]

Tabulka č. 10 METODA: SILODOS 3**Popis metody**→ MF: ACN (vol. 38%)/ MeOH (vol. 22%)/ pufr (vol. 40%) Pufr: 0,025M KH₂PO₄, úprava pufru na pH= 4 85% H₃PO₄, teplota kolony: 30°C, průtok MF: 0,6 ml/min, wwd 230 nm**KOLONA 1**

Snížení pH pufru a přidavek MeOH v MF způsobilo posun píků sledovaných látek směrem dopředu a snížení jejich odezev oproti metodě SILODOS2.

eluce píku Tartarátu v $T_R = 3,5$ min.; pík o ploše [16759,4 mAU·s]; symetrie píku v 10% výšky= [3,0]

Zlepšila se hodnota rozlišení mezi nečistotou eluující před píkem Tartarátu a píkem Tartarátu z $R = 0,8$ (metoda SILODOS1) na $R = 1,2$.

eluce píku Aldehydu v $T_R = 4,4$ min.; pík o ploše [130,0 mAU·s]

eluce píku Oxalátu v $T_R = 8,9$ min.; pík o ploše [17748,7 mAU·s]; symetrie píku v 10% výšky= [6,2]

Posunem T_R Oxalátu směrem dopředu došlo k jeho přiblížení k nečistotě eluující před píkem Oxalátu $R = 0,6$.

Tabulka č. 11 METODA: SILODOS 4**Popis metody**→ MF: ACN (vol. 45%)/ MeOH (vol. 15%)/ pufr (vol. 40%) Pufr: 0,025M K₂HPO₄, úprava pufru na pH= 4,5 85% H₃PO₄, teplota kolony: 30°C, průtok MF: 1,0 ml/min, wwd 210 nm**KOLONA 2**

Snížení pH pufru, přidavek ACN do MF a zvýšení rychlosti průtoku MF kolonou oproti metodě SILODOS2, způsobilo posun píků sledovaných látek směrem dopředu. Odezva Aldehydu se lehce zvýšila. Odezvy Tartarátu a Oxalátu zůstaly téměř stejné. Došlo k přiblížení píku Aldehydu a Tartarátu a tím ke snížení hodnoty rozlišení oproti metodě SILODOS2 z $R = 5,1$ na $R = 2,2$.

eluce píku Aldehydu v $T_R = 3,1$ min.; pík o ploše [237,7 mAU·s]

eluce píku Tartarátu v $T_R = 3,5$ min.; pík o ploše [6669,3 mAU·s]; symetrie píku v 10% výšky [2,3]

eluce píku Oxalátu v $T_R = 11,7$ min.; pík o ploše [7045,2 mAU·s]; symetrie píku v 10% výšky [3,4]

Tabulka č. 12 METODA: SILODOS 5**Popis metody**→ MF: ACN (vol. 50%)/ pufr (vol. 50%) Pufr: 0,025M K₂HPO₄, úprava pufru na pH= 4,5 85% H₃PO₄, teplota kolony: 30°C, průtok MF: 1,0 ml/min, wwd 210 nm**KOLONA 2**

Zvýšení pH pufru na pH=4,5 oproti metodě AP55X4K2 způsobilo zlepšení rozlišení mezi Aldehydem a Tartarátém z R=3,9 na R=5,1 . Odebrání MeOH z MF zapříčinilo výrazné zhoršení symetrie píku Oxalátu oproti metodám s MeOH v MF viz. metody SILODOS1,SILODOS2,SILODOS4.

eluce píku Aldehydu v T_R= 2,7 min.; pík o ploše [133,1 mAU·s]

eluce píku Tartarátu v T_R= 3,7 min.; pík o ploše [5785,3 mAU·s]; symetrie píku v 10% výšky= [2,6]

eluce píku Oxalátu v T_R= 17,8 min.; pík o ploše [6985,0 mAU·s]; symetrie píku v 10% výšky= [4,9]

Tabulka č. 13 METODA: SILODOS 6**Popis metody**→ MF: ACN (vol. 50%)/ pufr (vol. 50%) Pufr: 0,025M K₂HPO₄, úprava pufru na pH= 6 85% H₃PO₄, teplota kolony: 30°C, průtok MF: 1,0 ml/min, wwd 210 nm**KOLONA 2**

Zvýšení pH MF mělo nepříznivý vliv na intermediát Tartarát (srovnáno s metodou SILODOS5). Dále vedlo k rozseparování píků nečistot mezi Aldehydem a Tartarátém, které eluovaly ve chvostu píku Aldehydu.

eluce píku Aldehydu v T_R= 2,7 min.; pík o ploše [91,8 mAU·s]

eluce píku Tartarátu v T_R= 5,8 min.; pík o ploše [5777,7 mAU·s]; symetrie píku v 10% výšky [3,4]

eluce píku Oxalátu v T_R= cca 33 min.(eluce mimo délku analýzy); pík o ploše [7779,3 mAU·s]; symetrie píku v 10% výšky [3,3]

Tabulka č. 14 METODA: SILODOS 7

Popis metody→ MF: ACN (vol. 35%)/ MeOH (10%)/ pufr (vol. 55%) Pufr: 0,025M K₂HPO₄, úprava pufru na pH= 4,5 85% H₃PO₄, teplota kolony: 30°C, průtok MF: 1,0 ml/min, wwd 210 nm

KOLONA 2

eluce píku Aldehydu v T_R= 6,2 min.; pík o ploše [43,4 mAU·s]

eluce píku Tartarátu v T_R= 7,4 min.; pík o ploše [5394,9 mAU·s]; symetrie píku v 10% výšky [3,5]

eluce píku Oxalátu v T_R= cca 60 min. (eluce mimo délku analýzy); pík o neznámé ploše a symetrii

Pozn. Nebyl důvod analýzu opakovat z důvodu nevyhovujících parametrů intermediátu Tartarátu a nevyhovujícího T_R Oxalátu.

Tabula č. 15 METODA: SILODOS 8

Popis metody→ MF: ACN (vol. 42%)/ MeOH (10%)/ pufr (vol. 48%) Pufr: 0,025M K₂HPO₄, úprava pufru na pH= 4,5 85% H₃PO₄, teplota kolony: 30°C, průtok MF: 1,0 ml/min, wwd 210 nm

KOLONA 2

eluce píku Aldehydu v T_R= 4,1 min.; pík o ploše [245,0 mAU·s]

eluce píku Tartarátu v T_R= 4,7 min.; pík o ploše [5776,2 mAU·s]; symetrie píku v 10% výšky= [2,5]

eluce píku Oxalátu v T_R= 23,4 min.; pík o ploše [7369,0 mAU·s]; symetrie píku v 10% výšky= [4,7]

Tabulka č. 16 METODA: SILODOS 9**Popis metody** → MF: ACN (vol. 40%) / pufr (vol. 60%) Pufr: 0,05M K₂HPO₄, úprava pufru na pH= 6 85% H₃PO₄, teplota kolony: 30°C, průtok MF: 0,6 ml/min, wwd 230 nm**KOLONA 1**

Metoda SILODOS 9 byla vymyšlena jako návaznost na metodu AP46X6K. Metody byly totožné až na sílu pufru, kde se pufrací kapacita u metody SILODOS 9 zvýšila z 0,025M roztoku na 0,5M roztok KH₂PO₄. Byl sledován vliv pufrací kapacity na symetrii píku a plochu Tartarátu.

eluce píku Aldehydu v T_R= 4,6 min.; pík o ploše [56,9 mAU·s]

eluce píku Tartarátu v T_R= 5,6 min.; pík o ploše [17732,6 mAU·s]; symetrie píku v 10% výšky [2,5]

Zvýšení pufrací kapacity vedlo ke zlepšení symetrie píku Tartarátu v 10% výšky z [6,2] na [2,5]. Dále byl sledován pokles odezvy píku Tartarátu z [17732,6 mAU·s] na [17732,6 mAU·s].

eluce píku Oxalátu v T_R= 82,6 min.; pík o ploše [16392,3 mAU·s]; symetrie píku v 10% výšky= [4,7]

Tabulka č. 17.METODA: SILODO 10**Popis metody** → MF: ACN (vol. 32%) / MeOH (22%) / pufr (vol. 48%) Pufr: 0,025M K₂HPO₄, úprava pufru na pH= 4,5 85% H₃PO₄, teplota kolony: 30°C, průtok MF: 1,0 ml/min, wwd 210 nm**KOLONA 2**

V dalším průběhu vývoje HPLC metody na stanovení čistoty pokročilého intermediátu Oxalátu jsem u některých metod přestala identifikovat pík Aldehydu jeho samostatným nástřikem. Nejednalo o látku na kterou byla vyvíjena metoda a jeho další identifikace v každé metodě byla zbytečná. Dále byl identifikován náhodně u metod, kde jsem si jeho přítomnost chtěla potvrdit a samozřejmě byl opět nástřiknut samostatně a ve směsném vzorku u konečné metody.

eluce píku Tartarátu v T_R= 6,0 min.; pík o ploše [5592,3 mAU·s]; symetrie píku v 10% výšky [2,3]

eluce píku Oxalátu v T_R= 23,4 min.; pík o ploše [7371,9 mAU·s]; symetrie píku v 10% výšky [4,5]

Tabulka č. 18 METODA: SILODO 11**Popis metody**→ MF B: ACN (vol. 35%)/ MeOH (10%)/ pufr (vol. 55%)

MF C: ACN (vol. 47%)/ MeOH (15%)/ pufr (vol. 38%)

0min – 5min 100% MF B; 5min – 30min 100% MF C

Pufr: 0,025M K₂HPO₄, úprava pufru na pH= 6 85% H₃PO₄, teplota kolony: 30°C, průtok MF: 1,0 ml/min, wwd 210 nm**KOLONA 2**

Metoda s prudkým nárůstem síly gradientu. Strmý nárůst baseline u jednotlivých nástřiků slepého pokusu a směšného vzorku.

eluce píku Tartarátu v $T_R= 5,6$ min.; pík o ploše [5362,8 mAU·s]; symetrie píku v 10% výšky [2,0]

eluce píku Oxalátu v $T_R= 13,0$ min.; pík o ploše [7239,9 mAU·s]; symetrie píku v 10% výšky [2,9]

Tabulka č. 19 METODA: SILODO 12**Popis metody**→ MF B: ACN (vol. 35%)/ MeOH (10%)/ pufr (vol. 55%)

MF C: ACN (vol. 47%)/ MeOH (15%)/ pufr (vol. 38%)

0min – 5min 100% MF B, 5min – 8min 40% MF B + 60% MF C,

8min – 30min 30% MF B + 70% MF C

Pufr: 0,025M K₂HPO₄, úprava pufru na pH= 6 85% H₃PO₄, teplota kolony: 30°C, průtok MF: 1,0 ml/min, wwd 210 nm**KOLONA 2**

Metoda s pozvolnějším nárůstem síly gradientu. Baseline jednotlivých nástřiků není tak strmá.

eluce píku Aldehydu v $T_R= 5,2$ min.; pík o ploše [82,4 mAU·s]

eluce píku Tartarátu v $T_R= 5,9$ min.; pík o ploše [5800,7 mAU·s]; symetrie píku v 10% výšky= [2,3]

eluce píku Oxalátu v $T_R= 18,6$ min.; pík o ploše [7375,6 mAU·s]; symetrie píku v 10% výšky= [3,7]

Byl nástřiknut i směšný vzorek bez Aldehydu. Prokázala se v něm jeho přítomnost, což potvrzuje jeho výskyt jako nečistoty v pokročilém intermediátu Oxalátu, který vznikl syntézou právě Aldehydu a intermediátu Tartarátu.

Tabulka č. 20 METODA: SILODO 13

Popis metody→ MF: ACN (vol. 32%)/ MeOH (20%)/ pufr (vol. 48%) Pufr: 0,025M K₂HPO₄,
úprava pufru na pH= 2 85% H₃PO₄, teplota kolony: 30°C, průtok MF: 1,0 ml/min, wwd 210 nm

KOLONA 2

Metoda podobná metodě SILODO 10. U metody SILODO 13 bylo sníženo pH z pH= 4,5 (metoda SILODO 10) na pH= 2. Opět byl potvrzen příznivý vliv nižšího pH na symetrii píků. Dále došlo podle předpokladu vlivem snížení pH k posunu píků směrem dopředu. Plochy píků zůstaly téměř stejné.

eluce píku Tartarátu v T_R= 4,2 min.; pík o ploše [5686,0 mAUs]; symetrie píku v 10%
výšky [2,2]; [2,3] u metody SILODO 10

eluce píku Oxalátu v T_R= 18,4 min.; pík o ploše [7334,6 mAUs]; symetrie píku v 10%
výšky [3,8]; [4,5] u metody SILODO 10

Tabulka č. 21 METODA: SILODO 14

Popis metody→ MF: ACN (vol. 32%)/ MeOH (20%)/ pufr (vol. 48%) Pufr: 0,025M KH₂PO₄,
úprava pufru na pH= 4,5 85% H₃PO₄, teplota kolony: 30°C, průtok MF: 1,0 ml/min,
wwd 210 nm

KOLONA 2

Metoda SILODO 14 kopírovala poměrem rozpouštědel metodu SILODO 13. Došlo ke zvýšení pH z pH= 2 (metoda SILODO 13) na pH= 4,5 a ke změně chemikálie pufru z K₂HPO₄ (metoda SILODO 13) na KH₂PO₄ a kontrole symetrie píku Tartarátu a změn v chromatogramu.

eluce píku Tartarátu v T_R= 5,7 min.; pík o ploše [7064,7 mAUs]; symetrie píku v 10%
výšky [3,2]

Zvýšením pH pravděpodobně došlo k větší absorpci a zároveň ke zhoršení symetrie píku Tartarátu v 10% jeho výšky.

eluce píku Oxalátu cca v T_R= 35 min.; pík mimo délku analýzy

Tabulka č. 22 METODA: SILODO 15

Popis metody→ MF: ACN (vol. 32%)/ MeOH (22%)/ pufr (vol. 48%) Pufr: 0,025M K₂HPO₄,
úprava pufru na pH= 4,5 85% H₃PO₄, teplota kolony: 30°C,
průtok MF: 0min – 12min 0,8ml/min; od 12min 2,0 ml/min, wwd 210 nm

KOLONA 2

eluce píku Aldehydu v T_R= 4,5 min.; pík o ploše [174,6 mAUs]

eluce píku Tartarátu v T_R= 5,4 min.; pík o ploše [5307,7 mAUs]; symetrie píku v 10%
výšky [3,0]

eluce píku Oxalátu v T_R= 19,4 min.; pík o ploše [3612,5 mAUs], symetrie píku v 10%
výšky= [4,6]

3.3.5 Finální HPLC metoda na stanovení čistoty pokročilého intermediátu Oxalátu

Tabulka č. 23 METODA: SILODO 16

Popis metody→ MF: ACN (vol. 43%)/ MeOH (22%)/ pufr (vol. 35%) Pufr: 0,025M KH₂PO₄, úprava pufru na 30% roztokem KOH, teplota kolony: 30°C, průtok MF: 1,0 ml/min, wwd 210 nm wwd 225 nm, nástřik 10 µl

KOLONA 2

Analýza byla měřena při wwd 210 nm a WWD 225 nm. Pokročilý intermediát Oxalát i intermediát Tartarát lépe absorbovaly při wwd 210 nm. U Aldehydu nebyla uvedena v následujícím přehledu hodnota symetrie píku v 10% jeho výšky a hodnoty rozlišení. Jeho výskyt ve vzorku je předpokládán pouze ve velmi nízké koncentraci. Symetrie píku v 10% výšky Tartarátu s hodnotou 2,3 je vzhledem k zadanému cíli nevyhovující (viz. Výsledky a diskuze). Na danou hodnotu nebyl brán ohled. Metoda byla vyvinuta na stanovení čistoty pokročilého intermediátu Oxalátu, ve kterém nebyla předpokládána přítomnost intermediátu Tartarátu, nebo pouze v jeho velmi nízké koncentraci. Další hodnoty metody byly uvedeny a komentovány níže.

Aldehyd	T _R (min)	PLOCHA [mAU·s] 210 nm	PLOCHA [mAU·s] 225 nm
	2,8	148,1	109,2
Tartarát	T _R (min)	PLOCHA [mAU·s] 210 nm	PLOCHA [mAU·s] 225 nm
	9,5	2932,0	6034,4
		R1	R2
		1,4	-
		Symetrie píku v 10% výšky	2,3
Oxalát	T _R (min)	PLOCHA [mAU·s] 210 nm	PLOCHA [mAU·s] 225 nm
	9,5	3684,3	5620,4
		R1	R2
		2,1	-
		Symetrie píku v 10% výšky	1,2
		Počet teoretických pater	11786

Pozn. R1→Rozlišení mezi píkem uvedeného intermediátu a nečistotou eluující v nejbližším retenčním čase před zkoumanou látkou

R2→Rozlišení mezi píkem uvedeného intermediátu a nečistotou eluující v nejbližším retenčním čase za zkoumanou látkou

Tabulka č. 24 METODA: SILODO 16

Popis metody → MF: ACN (vol. 43%)/ MeOH (22%)/ pufr (vol. 35%) Pufr: 0,025M KH₂PO₄, úprava pufru na 30% roztokem KOH, teplota kolony: 30°C, průtok MF: 1,0 ml/min, wwd 210 nm, www 225 nm, nástřik 20 µl

KOONA 1

Aldehyd nebyl dále řešen, byl pouze nástříknut v referenčním roztoku v jeho obvyklé koncentraci společně s tartarátem, jehož koncentrace byla totožná s koncentrací Aldehydu. Výskyt obou látek ve vzorku Oxalátu byl předpokládán pouze ve velmi nízké koncentraci. Další hodnoty metody byly uvedeny a komentovány níže.

Oxalát	Θ T _R (min)	Θ PLOCHA [mAU·s] 225 nm		
	21,10	8758,25		
		S.D. ploch	13,703	
		RSD ploch [%]	0,16	
		S.D. retenčních časů	0,006	
		RSD retenčních časů [%]	0,03	
		Θ R1	Θ R2	
		2,2	V každém chromatogramu nebyla integrována nečistota za píkem Oxalátu a pokud ano tak $R \geq 3,9$	
		Θ Symetrie píku v 10% výšky	1,0	
Θ Počet teoretických pater	30008			
Chromatogram	SILO-074.D- 078.D			
Slepý pokus				
Chromatogram	Hodnota šumu [mAU]	Časové rozmezí [min]		
SILO-069.D	0,192	3 – 35		
SILO-069.D	0,052	5 – 9		
0,5 % roztok Oxalátu				
Chromatogram	Θ Plocha [mAU·s]	Θ Výška píku [mAU]		
SILO-070-71.D	41,58	2,17		
Limit detekce	0,26 mg/l → 0,13 %			
Limit kvantifikace	0,88 mg/l → 0,44 %			

Koncentrace roztoků:

Základní roztok: 2mg/ 10ml rozpouštědla → 0,2 mg/ml → 200 mg/l

0,5% roztok: tzn. 200 · zředěný základní roztok → 1 mg/l

Výpočet Limitu detekce LD a limitu kvantifikace

(příklad výpočtu na pokročilém intermediátu Oxalátu)

X hodnota šumu
↑ koncentrace 0,5% roztoku (mg/l) výška píka 0,5% roztoku (mAU) ↑

X 0,192
↑ 1 mg/ml 2,17 (mAU) ↑

$$X = 0,088 \text{ mg/l}$$

$$LD = 0,088 \cdot 3 = 0,26 \text{ mg/l}$$

$$LQ = 0,088 \cdot 10 = 0,88 \text{ mg/l}$$

Přepočítání mg/l na % → ukázka na LD

koncentrace základního roztoku 100%
↑ vypočtená hodnota LD (mg/l) X% ↑

200 100%
↑ 0,26 mg/ml X% ↑

$$X = 0,13\%$$

Hodnota LQ Oxalátu byla vypočítána analogicky tak jako hodnoty LQ a LD v dalších metodách u 0,5% roztoků intermediátu Tartarátu a intermediátu Oxalátu.

0,5 % roztok Tartarátu		
Chromatogram	Plocha [mAU·s]	Výška píku [mAU]
SILO-072-73.D	43,76	7,63
Limit detekce	0,02 mg/l → 0,011 %	
Limit kvantifikace	0,07 mg/l → 0,04 %	

3.3.6 Optimalizace finální HPLC metody na stanovení čistoty pokročilého intermediátu Oxalátu

Tabulka č. 25 METODA: SILODO 16

Popis metody → MF: ACN (vol. 43%)/ MeOH (22%)/ pufr (vol. 35%) Pufr: 0,025M KH₂PO₄, úprava pufru na 30% roztokem KOH, teplota kolony: 30°C, průtok MF: 1,0 ml/min, wwd 225 nm, nástřik 20 µl

KOLONA 1

Optimalizace HPLC metody na stanovení čistoty pokročilého intermediátu Oxalátu spočívala ve zvýšení koncentrace hlavní látky v roztoku vzorku z **2mg na 5 mg v 10 ml rozpouštědla** z důvodu nižší odezvy Oxalátu a malé hodnoty výšky píku jeho 0,5% roztoku. Dále byla potřeba znovu naměřit slepý pokus a zjistit novou hodnotu šumu baseline. Z předchozí analýzy byl naměřen vysoký šum základní linie, který způsobil nedostatečné LD a LQ stanovované látky a intermediátu Tartarátu. Vysoká hodnota šumu základní linie 0,19 z předchozího měření byla způsobena nedostatečným ustálením chromatografického systému.

Navážka Oxalátu	5,02 mg
Navážka Tartarátu	5,03 mg

Oxalát	⊖ T _R (min)	⊖ PLOCHA [mAU·s] 225 nm	
	19,961	28570,08040	
		S.D. ploch	17,13
		RSD ploch [%]	0,06
		S.D. retenčních časů	0,01
		RSD retenčních časů [%]	0,06
		⊖ R1	⊖ R2
		1,48	4,33
		⊖ Symetrie píku v 10% výšky	1,34
		⊖ Počet teoretických pater	22384
Chromatogram		SILO0000013.D- 0000019.D	
Slepý pokus			
Chromatogram		Hodnota šumu [mAU]	Časové rozmezí [min]
SILO0000006.D		0,033	3 – 35
SILO0000006.D		0,012	5 – 9
0,5 % roztok Oxalátu			
Chromatogram		⊖ Plocha [mAU·s]	⊖ Výška píku [mAU]
SILO0000007-9.D		148,89301	7,86068
Limit detekce		0,033 mg/l → 0,007 %	
Limit kvantifikace		0,11 mg/l → 0,02 %	
0,5 % roztok Tartarátu			
Chromatogram		⊖ Plocha [mAU·s]	⊖ Výška píku [mAU]
SILO0000010-12.D		151,99286	24,65876
Limit detekce		0,003 mg/l → $6 \cdot 10^{-4}$ %	
Limit kvantifikace		0,010 mg/l → $2 \cdot 10^{-3}$ %	

Tabulka č. 26 METODA: SILODO 16

Popis metody → MF: ACN (vol. 43%)/ MeOH (22%)/ pufr (vol. 35%) Pufr: 0,025M KH₂PO₄, úprava pufru na 30% roztokem KOH, teplota kolony: 30°C, průtok MF: 1,0 ml/min, wwd 225 nm, nástřík 20 µl

KOLONA 1

Další krok optimalizace HPLC metody na stanovení čistoty pokročilého intermediátu Oxalátu spočíval ve snížení koncentrace hlavní látky v roztoku vzorku z **5mg na 3 mg v 10 ml rozpouštědla**. Uvedená nová koncentrace byla kompromisem mezi koncentrací původní metody a koncentrací první modifikované metody. Navážku stanovované látky z první modifikace jsem snížila z důvodu nedostatečného rozlišení mezi stanovovanou látkou a nečistotou eluující před píkem stanovované látky, které vzniklo vysokým navýšením koncentrace pokročilého intermediátu Oxalátu. Z výsledků uvedených níže vyplývá úspěšnost této optimalizace metody silodo16, která se stává konečnou analytickou HPLC metodou na stanovení čistoty pokročilého intermediátu Oxalátu.

Navážka Oxalátu	3,04 mg
Navážka Tartarátu	3,03 mg

Čistota stanovované substance (průměr)	98,58%		
Tartarát (průměr)	0,23%		
Maximální neznámá nečistota RRT= 0,91(průměr)	0,51%		
Chromatogram:	SILO0000033.D – 38.D		
Oxalát	⊖ T _R (min)	⊖ PLOCHA [mAU·s]	
	19,736	17152,73633	
		S.D. ploch	5,79
		RSD ploch [%]	0,03
		S.D. retenčních časů	0,02
		RSD retenčních časů [%]	0,09
		⊖ R1	⊖ R2
		1,55	5,22
		⊖ Symetrie píku v 10% výšky	1,20
		⊖ Počet teoretických pater	25541
	⊖ Tailing factor	1,09	
Chromatogram	SILO0000033.D-38.D		

Slepý pokus		
Chromatogram	Hodnota šumu [mAU]	Časové rozmezí [min]
SILO0000026.D	0,020	3 – 35
SILO0000026.D	0,015	5 – 9
0,5 % roztok Oxalátu		
Chromatogram	⊖ Plocha [mAU·s]	⊖ Výška píku [mAU]
SILO0000027-29.D	87,98737	4,82087
Limit detekce	0,018 mg/l → 0,006 %	
Limit kvantifikace	0,06 mg/l → 0,020 %	
0,5 % roztok Tartarátu		
Chromatogram	⊖ Plocha [mAU·s]	⊖ Výška píku [mAU]
SILO0000030-32.D	99,16027	15,20536
Limit detekce	0,003 mg/l → $9,9 \cdot 10^{-4}$ %	
Limit kvantifikace	0,010 mg/l → $3,3 \cdot 10^{-3}$ %	
Korekční faktor	0,88	

Shoda známých látek (výpočet korekčního faktoru):

$$\text{Shoda dvou látek: (\%)} = \frac{m_1}{A_1} \cdot \frac{A_2}{m_2} \cdot 100 = (98,0\% - 102,0\%)$$

⊖ plocha 0,5% roztoku Tartarátu (mAU) navážka Tartarátu (mg)

↑ X (mAU)..... navážka Oxalátu (mg) ↑

99,16 (mAU) 3,03 (mg)

↑ X..... 3,04 (mg) ↑

X= 99,49 mAU → předpokládaná plocha Tartarátu při navážce 3,04 mg

$$\frac{\text{plocha Oxalátu mAU při } m = 3,04 \text{ mg}}{\text{plocha Tartarátu mAU při } m = 3,04 \text{ mg}} = \frac{87,99}{99,49} = 0,88 \rightarrow \text{korekční faktor Tartarátu}$$

3.4 Vývoj HPLC/MS metody pro pokročilý intermediát Oxalát

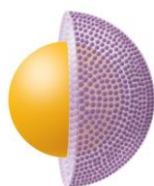
3.4.1 Přístroje:

Sestava kapalinového chromatografu s vysokotlakým kvartérním čerpadlem a MS detekcí Thermo SCIENTIFIC LCMS EXACTIVE

Sestava kapalinového chromatografu Agilent 1100 a vysokotlakým kvartérním čerpadlem a DAD detektorem, HP Chemstation verze A.10.01
označení přístroje LX15

3.4.2 Kolony:

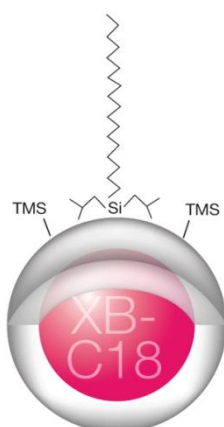
1. Poroshell 2.7 μm 120 EC- C18 HPLC Column 50 mm \cdot 2,1 mm



Kolona s částice s pevným jádrem 1.7 μm a pórovitou vrstvou silnou 0.5 μm . Vzhledem ke tvaru náplně kolony difundují částice analytu pouze do malé hloubky (menší tlak na koloně). Kolona je stabilní v rozmezí pH 2 – 8(určená spíše pro střední pH).

Kolona byla vybrána jako nejbližší možná dostupná varianta podobná koloně č.1, na které byla vyvinuta konečná HPLC metoda na stanovení čistoty pokročilého intermediátu Oxalátu.

2. Kinetex 2.6 μm XB-C18 HPLC Column 50 mm \cdot 3 mm



Silně hydrofobní, nepolární kolona se slabou selektivitou k aromatickým sloučeninám, odolná v rozmezí pH= 1,5 – 10. Ochranná butylová skupina způsobuje vynikající tvar píku u bazických sloučenin.

3.4.3 Chemikálie:

Reagencie:	Substance:
H ₂ O, LiChrosolv, Merck, 1.	Oxalát
ACN g.g., LiChrosolv, Merck, 1.00030	Tartarát
MeOH g.g., LiChrosolv, Merck, 1.06007	
COONH ₄ ,for analysis, Merck, 1.0116	
Triethylamine, SIGMA- ALDRICH, BCBJ1639V	
KOH 30% roztok	

3.4.4 Průběh vývoje:

LC/MS přístroj umožňoval dvě varianty ionizace a to pomocí HESI či APCI. Vzhledem ke struktuře stanovované látky a její polaritě by mohlo dojít k úspěšné ionizaci a fragmentaci pomocí obou nabízených ionizačních technik. S přihlédnutím k parametrům HPLC metody na stanovení čistoty intermediátu Oxalátu, obzvláště k vyššímu průtoku a parametrům vybrané kolony, byla zvolena jako vhodná varianta ionizace metoda APCI. V MF došlo k výměně pufu. Bylo za potřebí do MF dostat těkavou složku umožňující ionizaci vzorku. Proto byl místo 0,025M KH₂PO₄ dále použit 0,01M roztok octanu amonného na LC/MS sestavě. Poměr rozpouštědel i pH pufu zůstalo stejné jako v metodě SILODO 16. Dále bylo nutné snížit průtok MF kvůli vysokému tlaku na koloně a ionizaci z 1 ml/min na 0,2 ml/min. Metoda byla nejprve vyzkoušena na HLPC přístroji LX15 pro zjištění nových parametrů analýzy po změně pufu a průtoku MF a poté převedena na LC/MS sestavu.

Tabulka č. 27 METODA: SILODO 16 transfer 1

Popis metody→ MF: ACN (vol. 43%)/ MeOH (22%)/ pufr (vol. 35%) Pufr: 0,025M COONH₄, úprava pufru na pH= 7 30% roztokem KOH, teplota kolony: 30°C, průtok MF: 1,0 ml/min, wwd 225 nm, nástřik 20 µl

KOLONA Poroshell

V prvním kroku přenosu HPLC metody na LC/MS metodu byly analýzy sledovaných sloučením měřeny jen na HPLC přístroji. Na začátku přenosu byl oproti metodě SILODO 16 změněn pouze pufr (chemikálie). Bylo potřeba srovnat, co tato změna způsobí oproti základní HPLC metodě. Změna pufru zapříčinila velký posun retenčních časů směrem doředu. Maximální pozorovaná nečistota vyskytující se ve vzorku Oxalátu pohybující se okolo 0,5% se přiblížila více k hlavnímu píku a nejbližší nečistota cca 0,1% eluující před píkem Oxalátu v metodě SILODO 16 se změnou pufru při přenosu metody dostala za pík Oxalátu.

Příprava vzorku: Byl navážen 1 mg Oxalátu do 10 ml erlenmeyerovi baňky a rozpuštěn za pomoci ultrazvuku v organickém rozpouštědle. Poté byla přidána H₂O. Byl zachován stejný poměr rozpouštědel jako v MF.

Sloučenina	T _R (min)	Plocha (mAU)
Tartarát	2,9	29,7
Oxalát	12,6	10904,1
Nejbližší neznámá nečistota před píkem Oxalátu	12,1	58,05
R= 1,4 Oxalátu/ nejbližší nejbližší neznámé nečistoty		

Tabulka č. 28 METODA: SILODO 16 transfer 1 LC/MS

Popis metody→ MF: ACN (vol. 43%)/ MeOH (22%)/ pufr (vol. 35%) Pufr: 0,01M COONH₄, pufr pH= 7, teplota APCI 400°C průtok MF: 0,2 ml/min, nástřik 5 µl

KOLONA Poroshell

V transferu 1 LC/MS metody SILODO 16 byla snížena síla pufru a rychlost průtoku MF. LC/MS sestavou (ionizace vzorku při MS detekci) neumožňují tak vysoké průtoky MF v systému.

Příprava vzorku: Byl navážen 1 mg Oxalátu do 10 ml erlenmeyerovi baňky a rozpuštěn za pomoci ultrazvuku v organickém rozpouštědle. Poté byla přidána H₂O. Dále bylo odebráno 50µl vzorku do 950µl rozpouštědla. Byl zachován stejný poměr rozpouštědel jako v MF.

Na identifikaci nečistot bylo nutné nepustit pokročilý intermediát Oxalát na kolonu. Retenční čas nejbližší nečistoty eluující před píkem Oxalátu byl příliš blízký retenčnímu času Oxalátu a separace s MS detekcí se za těchto podmínek nezdařila.

Tabulka č. 29 METODA: SILODO 16 transfer 2

Popis metody → MF: ACN (vol. 43%)/ MeOH (22%)/ pufr (vol. 35%) Pufr: 0,01M COONH₄, úprava pufru na pH= 7 30% roztokem KOH, teplota kolony: 30°C, průtok MF: 0,2 ml/min, wwd 225 nm, nástřik 20 µl

KOLONA Kinetex Po nezdařilé separaci v transferu 1 LC/MS metody SILODO 16 došlo k výměně kolony a naměření nových parametrů na HPLC přístroji. Nečistota eluující v nejbližším čase před píkem Oxalátu se více oddělila od píku Oxalátu R= 1,6.
Příprava vzorku byla stejná jako u transferu metody SILODO 16 č.1

Sloučenina	T _R (min)	Plocha (mAU)
Tartarát	3,1	74,3
Oxalát	16,1	26100,1
Nejbližší neznámá nečistota před píkem Oxalátu	12,1	58,05
R= 1,6 Oxalátu/ nejbližší nejbližší neznámé nečistoty		

Tabulka č. 30 METODA: SILODO 16 transfer 2 LC/MS

Popis metody → MF: ACN (vol. 43%)/ MeOH (22%)/ pufr (vol. 35%) Pufr: 0,01M COONH₄, pufr pH= 7, teplota APCI 400°C průtok MF: 0,2 ml/min, nástřik 5 µl

KOLONA Kinetex Finální metoda (transfer metody SILODO 16 LC/MS) na stanovení nečistot pokročilého intermediátu Oxalátu.
Příprava vzorku: Stejná jako u transferu LC/MS 1 SILODO 16
Vzhledem ke změně pufru v MF, ke změně kolony a průtoku MF došlo k identifikaci pouze píku Tartarátu a maximální neznámé nečistoty s RRT= 0,91 vyskytující se v HPLC metodě SILODO 16 s 0,51% plochy píku Oxalátu.
Chromatogram: C:\Xcalibur\data\LUCKA\OX-11

Identifikace nečistot			
Nečistota	T _R (min)	Molekulová hmotnost	Sumární vzorec
Tartarát	3,18	364,20198	C ₂₂ H ₂₆ O ₂ N ₃
Maximální neznámá	16,27	580,24148	C ₃₂ H ₃₃ O ₄ N ₃ F ₃

3.5 Vývoj HPLC metody na stanovení čistoty intermediátu Tartarátu

Jak již bylo řečeno v kapitole 3.3 (Vývoj HPLC metody na stanovení čistoty pokročilého intermediátu Oxalátu), v průběhu vývoje metody na stanovení čistoty pokročilého intermediátu Oxalátu byla zároveň vyvíjena i HPLC metoda na stanovení čistoty intermediátu Tartarátu. Pro intermediát Tartarát nebyly doposud naměřeny uspokojivé výsledky. Seznam použitých přístrojů, kolon, chemikálií je taktéž popsán v kapitole 3.3.

3.5.1 Přehled dalších použitých metod

Tabulka č. 31 METODA: SILODO 18

Popis metody → MF: ACN (vol. 33%)/ MeOH (vol. 22%)/ pufr (vol. 45%) Pufr: 0,025M KH_2PO_4 , úprava pufru na pH= 4,0 85% H_3PO_4 , teplota kolony: 30°C, průtok MF: 1,0 ml/min, wwd 225 nm, nástřik 10 μl

KOLONA 2

eluce píku Tartarátu v $T_R= 5,6$ min.; pík o ploše [6034,0 mAU·s]; symetrie píku v 10% výšky [2,5]

Tabulka č. 32 METODA: SILODO 19

Popis metody → MF: ACN (vol. 43%)/ MeOH (vol. 22%)/ pufr (vol. 35%) Pufr: 0,025M K_2HPO_4 , úprava pufru na pH= 4,0 85% H_3PO_4 , teplota kolony: 30°C, průtok MF: 1,2 ml/min, wwd 225 nm, nástřik 10 μl

KOLONA 2

eluce píku Tartarátu v $T_R= 5,9$ min.; pík o ploše [12060,3 mAU·s]; symetrie píku v 10% výšky [1,8]

Tabulka č. 33 METODA: SILODO 20

Popis metody→ MF: ACN (vol. 35%)/ MeOH (vol. 21%)/ pufr (vol. 44%) Pufr: 0,025M K₂HPO₄, úprava pufru na pH= 5 85% H₃PO₄, teplota kolony: 30°C, průtok MF: 1,0 ml/min, wwd 225 nm, nástřik 20µl

KOLONA 2

eluce píku Tartarátu v $T_R = 5,9$ min.; pík o ploše [12060,3 mAU·s]; symetrie píku v 10% výšky [1,8]

Tabulka č. 34 METODA: SILODO 21

Popis metody→ MF: ACN (vol. 35%)/ MeOH (vol. 21%)/ pufr (vol. 44%) Pufr: 0,05M KH₂PO₄, úprava pufru na pH= 5 85% H₃PO₄, teplota kolony: 30°C, průtok MF: 1,0 ml/min, wwd 225 nm, nástřik 20µl

KOLONA 2

Metoda vytvořená na základě metody SILODO 20, došlo pouze ke zvýšení síly pufru.

eluce píku Tartarátu v $T_R = 4,8$ min.; pík o ploše [11368,0 mAU·s]; symetrie píku v 10% výšky [1,7]

Tabulka č. 35 METODA: SILODO 22

Popis metody→ MF: ACN (vol. 35%)/ MeOH (vol. 21%)/ pufr (vol. 44%) Pufr: 0,05M K₂HPO₄, úprava pufru na pH= 5 85% H₃PO₄, teplota kolony: 40°C, průtok MF: 1,0 ml/min, wwd 225 nm, nástřik 20µl

KOLONA 2

Metoda vytvořená na základě metody SILODO 21. Byla zvýšena teplota na koloně.

eluce píku Tartarátu v $T_R = 4,3$ min.; pík o ploše [11765,1 mAU·s]; symetrie píku v 10% výšky [1,9]

Tabulka č. 36 METODA: SILODO 22- A

Popis metody→ MF: ACN (vol. 35%)/ MeOH (vol. 21%)/ pufr (vol. 44%) Pufr: 0,1M KH₂PO₄, úprava pufru na pH= 5 85% H₃PO₄, teplota kolony: 40°C, průtok MF: 1,0 ml/min, wwd 210 nm

KOLONA 2

Došlo k vysrážení pufru.

Tabulka č. 37 METODA: SILODO 20

Popis metody→ MF: ACN (vol. 35%)/ MeOH (vol. 21%)/ pufr (vol. 44%) Pufr: 0,025M KH₂PO₄, úprava pufru na pH= 5 85% H₃PO₄, teplota kolony: 30°C, průtok MF: 1,0 ml/min, wwd 210 nm

Pheny-hexyl

Metoda SILODO 20 zanalyzovaná na nové koloně.

eluce píku Tartarátu v $T_R = 4,2$ min.; pík o ploše [11626,7 mAU·s]; symetrie píku v 10% výšky [3,3]

Nedostatečné rozlišení mezi píkem tartarátu a nejbližší nečistotou eluující před píkem hlavní látky $R = 0,8$. Pík Tartarátu chvostuje.

Tabulka č. 38 METODA: SILODO 23

Popis metody→ MF: ACN (vol. 35%)/ MeOH (vol. 21%)/ pufr (vol. 44%) Pufr: 0,05M KH₂PO₄, úprava pufru na pH= 5 85% H₃PO₄, teplota kolony: 30°C, průtok MF: 1,0 ml/min, wwd 225 nm, nástřík 20µl

Phenyl-hexyl

Metoda shodná s metodou SILODO 21 (změna kolony).

eluce píku Tartarátu v $T_R = 5,9$ min.; pík o ploše [12509,1 mAU·s]; symetrie píku v 10% výšky [3,0]

Nedostatečné rozlišení mezi píkem tartarátu a nejbližší nečistotou eluující před píkem hlavní látky $R = 1,1$. Pík Tartarátu chvostuje.

Tabulka č. 39 METODA: SILODO 24

Popis metody→ MF: ACN (vol. 35%)/ MeOH (vol. 21%)/ pufr (vol. 44%) Pufr: 0,05M NaH₂PO₄ · H₂O, úprava pufru na pH= 5 85% H₃PO₄, teplota kolony: 30°C, průtok MF: 1,0 ml/min, wwd 225 nm, nástřík 20µl

KOLONA 2

V dalších stupních vývoje HPLC metody na stanovení čistoty intermediátu Tartarátu byly zohledněny relativně dobré výsledky metody SILODO 21 na koloně č.2. V dalších krocích vývoje byly metody vytvářeny drobnými změnami výše uvedené metody na koloně č.2. Metoda SILODO 24 byla vytvořená podobně jako metoda SILODO 21. V MF došlo k výměně chemikálie pufru.

eluce píku Tartarátu v $T_R = 5,6$ min.; pík o ploše [12343,8 mAU·s]; symetrie píku v 10% výšky [2,3]; $R_{1,2} \geq 1,5$

Tabulka č. 40 METODA: SILODO 25

Popis metody→ MF: ACN (vol. 35%)/ MeOH (vol. 21%)/ pufr (vol. 44%) Pufr: 0,05M KH₂PO₄, úprava pufru na pH= 5,2 85% H₃PO₄, teplota kolony: 30°C, průtok MF: 1,0 ml/min, wwd 210 nm, nástřík 20µl

KOLONA 2

Metoda SILODO 25 byla vytvořená podobně jako metoda SILODO 21. V MF došlo ke zvýšení pH pufru.

eluce píku Tartarátu v $T_R = 4,6$ min.; pík o ploše [11488,6 mAU·s], symetrie píku v 10% výšky [2,0]; $R_{1,2} \geq 1,5$

Tabulka č. 41 METODA: SILODO 26

Popis metody→ MF: ACN (vol. 35%)/ MeOH (vol. 21%)/ pufr (vol. 44%) Pufr: 0,05M KH₂PO₄, úprava pufru na pH= 4,8 85% H₃PO₄, teplota kolony: 30°C, průtok MF: 1,0 ml/min, wwd 225 nm, nástřík 20µl

KOLONA 2

Metoda SILODO 26 byla vytvořená podobně jako metoda SILODO 21. V MF došlo ke snížení pH pufru.

eluce píku Tartarátu v $T_R = 4,3$ min.; pík o ploše [11814,2 mAU·s]; symetrie píku v 10% výšky [1,9]; $R_{1,2} \geq 1,5$

Tabulka č. 42 METODA: SILODO 27

Popis metody→ MF: ACN (vol. 35%)/ MeOH (vol. 21%)/ pufr (vol. 44%) Pufr: 0,05M KH₂PO₄, úprava pufru na pH= 4,8 85% H₃PO₄ + 0,1% triethylaminu, teplota kolony: 30°C, průtok MF: 1,0 ml/min, wwd 225 nm, nástřik 20μl

KOLONA 2

Metoda SILODO 27 byla vytvořená podobně jako metoda SILODO 21. Do MF byl přidán triethylamin pro možné zlepšení symetrie píku.

eluce píku Tartarátu v T_R= 4,3 min.; pik o ploše [11223,3 mAU·s]; symetrie píku v 10% výšky [1,8], R_{1,2} ≥ 1,5

Tabulka č. 43 METODA: SILODO 28

Popis metody→ MF: ACN (vol. 35%)/ MeOH (vol. 21%)/ pufr (vol. 44%) Pufr: 0,05M KH₂PO₄, úprava pufru na pH= 4,8 85% H₃PO₄ + 0,3% triethylaminu, teplota kolony: 20°C, průtok MF: 1,0 ml/min, wwd 225 nm, nástřik 20μl

KOLONA 2

Metoda SILODO 28 byla vytvořená podobně jako metoda SILODO 27. Do MF byl přidán triethylamin ve větším množství jako v metodě SILODO 27 a byla sledována symetrie píku. Naměřené hodnoty analýzy odpovídaly stanovenému cíli a metoda byla následně ověřena.

Navážka Tartarátu	2,00 mg
-------------------	---------

Čistota stanovované substance (průměr)		99,44%
Maximální neznámá nečistota RRT=		0,28%
Chromatogram:		SILO0000048.D – 53.D
Tartarát	Θ T _R (min)	4,600
	Θ PLOCHA [mAU·s]	11441,40120
	S.D. ploch	12,97
	RSD ploch [%]	0,11
	S.D. retenčních časů	0,004
	RSD retenčních časů [%]	0,09
	Θ R1	Θ R2
	2,16	2,64
	Θ Symetrie píku v 10% výšky	1,58
	Θ Počet teoretických pater	5732
	Θ Tailing factor	1,29

Chromatogram	SILO0000048.D-53.D	
Slepý pokus		
Chromatogram	Hodnota šumu [mAU]	Časové rozmezí [min]
SILO0000044.D	0,022	3,3 – 4,4
SILO0000044.D	0,083	4,7 - 20
0,5 % roztok Tartarátu		
Chromatogram	⊖ Plocha [mAU·s]	⊖ Výška píku [mAU]
SILO0000030-32.D	57,52569	7,32445
Nečistoty v T_R 3,3 – 4,4 min		
Limit detekce	0,009 mg/l → 0,006 %	
Limit kvantifikace	0,03 mg/l → 0,020 %	
Nečistoty v T_R 4,7 – 20 min		
Limit detekce	0,003 mg/l → 0,003 %	
Limit kvantifikace	0,11 mg/l → 0,055 %	

4 Výsledky a diskuze

4.1 Optimální parametry vyvinutých HPLC metod

Vybrané sledované veličiny a jejich limity jsou v souladu s parametry lékopisných metod.

Tabulka č. 44 Limity vybraných naměřených veličin

Sledovaná veličina	Limit
RSD ploch	$\leq 5\%$
RSD retenčních časů	$\leq 5\%$
Tailing faktor	$\leq 2,0$
Symetrie píku v 10% výšky	$\leq 2,0$
Počet teoretických pater	≥ 5000
LQ neznámých nečistot	okolo 0,05%
LQ nečistoty Tartarátu	okolo 0,05%
Shoda známých látek (korekční faktor)	98% - 102% V rozmezí 0,8 až 1,2 nemusí být zahrnován do výpočtu

4.2 HPLC metoda na stanovení čistoty resp. příbuzných látek pokročilého intermediátu Oxalátu léčivé substance Silodosinu

Tabulka č. 45 METODA: SILODO 16

Popis metody → MF: ACN (vol. 43%)/ MeOH (22%)/ pufr (vol. 35%) Pufr: 0,025M KH₂PO₄, úprava pufru na 30% roztokem KOH, teplota kolony: 30°C, průtok MF: 1,0 ml/min, wwd 225 nm, nástřik 20 µl , kolona č. 1

Hodnota šumu slepého pokusu → 0,020 mAU (3 – 35min); 0,015 mAU (5 – 9min)

Oxalát

Čistota stanovované substance	98,58%
Tartarát	0,23%
Maximální neznámá nečistota RRT=0,91	0,51%
T _R	19,7 min.
RSD T _R	0,09%
Plocha	17152,74 mAU·s
RSD ploch	0,03%
Rozlišení Oxalát/ nejbližší nečistota	≥ 1,6
Symetrie píku v 10% výšky	1,20
Počet teoretických pater	22541
Tailing factor	1,09
Limit detekce	0,018 mg/l → 0,006 %
Limit kvantifikace	0,06 mg/l → 0,020 %
Tartarát	0,23%
Limit detekce	0,003 mg/l → 9,9 · 10 ⁻⁴ %
Limit kvantifikace	0,010 mg/l → 3,3 · 10 ⁻³ %
Korekční factor	0,88

Výše uvedené výsledky svědčí o vysoké kvalitě nově vyvinuté, optimalizované HPLC metody na stanovení čistoty resp. příbuzných látek pokročilého intermediátu Oxalátu substance Silodosinu. Vyšší hodnota T_R hlavního píku je přijatelná v rámci lékopisných metod a vzhledem k ostatním neměřeným parametrům a napočítaných veličin této HPLC metody nebyla nutná další optimalizace, která by se týkala právě T_R Oxalátu. Hodnoty RSD ploch a retenčních časů svědčí o stabilitě systému.

4.3 HPLC metoda na stanovení čistoty resp. příbuzných látek intermediátu Tartarátu lékové substance Silodosinu

Tabulka č. 46 METODA: SILODO 28

Popis metody→ MF: ACN (vol. 35%)/ MeOH (vol. 21%)/ pufr (vol. 44%) Pufr: 0,05M KH₂PO₄, úprava pufru na pH= 4,8 85% H₃PO₄ + 0,3% triethylaminu, teplota kolony: 20°C, průtok MF: 1,0 ml/min, wwd 225 nm, nástřik 20μl, kolona 2

Hodnota šumu slepého pokusu→ 0,022 mAU (3,3 – 4,4min); 0,083 mAU (4,7 – 20min)

Tartarát

Čistota stanovované substance	99,44%
Maximální neznámá nečistota	0,28%
T _R	4,6 min.
RSD T _R	0,09%
Plocha	11441,40 mAU·s
RSD ploch	0,11%
Rozlišení Tartarát/ nejbližší nečistota	≥ 2,2
Symetrie píku v 10% výšky	1,58
Počet teoretických pater	5732
Tailing factor	1,29
Limit detekce (nečistoty v T _R 3,3 – 4,4min)	0,009 mg/l → 0,006 %
Limit kvantifikace (nečistoty v T _R 3,3 – 4,4min)	0,03 mg/l → 0,02 %
Limit detekce (nečistoty v T _R 4,7 – 20min)	0,003 mg/l → 0,003 %
Limit kvantifikace (nečistoty v T _R 4,7 – 20min)	0,11 mg/l → 0,055 %

Výše uvedené výsledky nově vyvinuté HPLC metody na stanovení čistoty resp. příbuzných látek intermediátu Tartarátu lékové Substance Silodosinu vyhovují stanovenému cíli. Horší hodnoty limitu detekce a kvantifikace souvisí s naměřenou hodnotou šumu a nerovnostmi v základní linii. Vysoká hodnota šumu mohla být způsobena nedostatečným ustálením chromatografického systému. Nerovnosti (eluce menšího píku) v základní linii pravděpodobně pochází z rozpouštědel. Hodnoty RSD ploch a retenčních časů svědčí o stabilitě systému.

4.4 LC/MS metoda na identifikaci nečistot pokročilého intermediátu Oxalátu

Tabulka č. 47 METODA: SILODO 16 transfer 2 LC/MS

Popis metody → MF: ACN (vol. 43%)/ MeOH (22%)/ pufr (vol. 35%) Pufr: 0,01M COONH₄, pufr pH= 7, teplota APCI 400°C průtok MF: 0,2 ml/min, nástřik 5 µl, kolona Kinetex

Identifikace nečistot			
Nečistota	T _R (min)	Molekulová hmotnost	Sumární vzorec
Tartarát	3,18	364,20198	C ₂₂ H ₂₆ O ₂ N ₃
Maximální neznámá	16,27	580,24148	C ₃₂ H ₃₃ O ₄ N ₃ F ₃

Úspěšně byly identifikovány dvě nečistoty. Jako známá nečistota byl identifikován intermediát Tartarát, vyskytující se pokročilém intermediátu Oxalátu a maximální neznámá nečistota intermediátu Oxalátu.s RRT= 0,91. Ostatní menší nečistoty nebyly identifikovány. Výměna kolony a pufru z dihydrogenfosforečnanu draselného na octan amonný oproti HLPC metodě zapříčinila změny retenčních časů a pořadí menších nečistot.

5 Závěr

Cílem této práce bylo vyvinout HPLC metodu na stanovení čistoty intermediátu Tartarátu a čistoty pokročilého intermediátu Oxalátu, u kterého se dále měly identifikovat nečistoty metodou LC/MS. Na stanovení čistoty, resp. příbuzných látek pokročilého intermediátu Oxalátu, byla postupně vytvořena a následně optimalizována metoda SILODO 16, která poskytovala dobré výsledky v rámci stanoveného cíle. Metoda SILODO 16 je uvedena a popsána v praktické části. Jedná se o izokratickou HPLC metodu. V průběhu vývoje metody se došlo k MF, která se skládala z kombinace ACN (vol. 43%)/ MeOH (vol. 22%) a pufru (vol. 35%; 0,025M KH_2PO_4). MF složené z ACN/ H_2O ; ACN/ pufr; MeOH/ H_2O či MeOH/ pufr neposkytovaly dobré výsledky v kombinaci s běžně dostupnými kolonami používajícími se v systému reverzních fází. Po přidavku MeOH do MF tvořené z ACN a vody, nebo ACN a pufru docházelo ke zlepšení sledovaných hodnot (převážně symetrie píku Oxalátu v 10% výšky). Nejzdařilejší separace v kombinaci s výše uvedenou MF probíhaly na klasické C18 koloně Kinetex 2.6 μm C18 100A; 150 mm · 4.6 mm (udáno velikostí absorpce tzn.hodnotou plochy hlavního píku [17153mAU·s], hodnotami rozlišení píků nečistot eluujících v nejbližším T_R před [1,55] a za [5,22] píkem Oxalátu, hodnotou symetrie píku v 10% výšky hlavní látky[1,20], tailing factorem [1,09], počtem teoretických pater [25541] a hodnotou LQ neznámých nečistot [0,06mg/l; 0,020%]). Výše uvedená HPLC metoda byla následně převedena na LC/MS metodu. Přenos metody spočíval ve výměně pufru (přidání těžké složky umožňující ionizaci), kolony a snížení průtoku MF. Ionizace proběhla metodou APCI, ionty byly separovány v orbitální pasti a jednotlivé izotopy M_R byly detekovány a zaznamenány v MS spektru. LC/MS metodou došlo k identifikaci nečistoty intermediátu Tartarátu v $T_R=3,2$ min. s $M_R=364,20$ a největší neznámé nečistoty (bráno z % plochy) s RRT 0,91 v $T_R=16,3$ min. s $M_R=580,24$. Vývoj HPLC metody na stanovení čistoty, resp. příbuzných látek intermediátu Tartarátu probíhal zároveň s vývojem HPLC metody na stanovení čistoty, resp. příbuzných látek u pokročilého intermediátu Oxalátu léčivé substance Silodosinu. V průběhu dalšího vývoje se došlo k metodě SILODO28, která se stala finální HPLC metodou na stanovení čistoty, resp. příbuzných látek intermediátu Tartarátu. Metodu tvoří MF složená z ACN (vol. 35%)/ MeOH (vol. 21%)/ a pufru (vol. 44%; 0,05M KH_2PO_4 , pH= 4,8) v kombinaci s lehce polární kolonou Synergi 4 μm Polar- RP 80A HPLC Column 150 mm · 4.6 mm. Byly naměřeny uspokojivé výsledky v rámci sledovaných veličin (udáno velikostí absorpce tzn.hodnotou plochy hlavního píku [11441mAU·s], hodnotami rozlišení píků nečistot eluujících v nejbližším T_R před [2,16] a za [2,64] píkem Oxalátu, hodnotou

symetrie píku v 10% výšky hlavní látky[1,58], tailing factorem [1,29], počtem teoretických pater [5732], hodnotou LQ neznámých nečistot v rozmezí T_R 3,3 – 4,4 min. [0,03mg/l; 0,020%]) a hodnotou LQ neznámých nečistot v rozmezí T_R 4,7 – 20 min. [0,11mg/l; 0,055%]).HPLC metoda vyhovovala stanovenému cíli.

Seznam použité literatury

- 1 Hui Ding, Wan Du, Zi-Zhen Hou, Han-Zhang Wang and Zhi-Ping Wang: Asian Journal of Andrology (2013) **15**, 121–128; doi:10.1038/aja.2012.102; published online 10 12. 2012
- 2 <http://en.wikipedia.org/wiki/Silodosin> – 7. 12. 2012 v 9:45
- 3 Kitazawa M., Ban M., Okazaki K., Ozawa M., Yazaki T., Yamagishi R.: US patent 5,387,603 (Kissei Pharmaceutical, JP; 1992) Yamagushi T., Tsuchiya I., Kikuchi K., Yanagi T.: EP 1 806 340 A1 (Kissei Pharmaceutical, JP; 2004)
- 4 Yamagushi T., Tsuchiya I., Kikuchi K., Yanagi T.: EP 1 806 340 A1 (Kissei Pharmaceutical, JP; 2004) Joshi S., Bhuta S., Talukdar S., Sawant S., Venkataraman D., Pise A., Metkar S., Chavan D., Luthra P. K.: WO 2011/030356 A2 (Sandoz AG, CH/IN, 2009)
- 5 Joshi S., Bhuta S., Talukdar S., Sawant S., Venkataraman D., Pise A., Metkar S., Chavan D., Luthra P. K.: WO 2011/030356 A2 (Sandoz AG, CH/IN, 2009)
- 6 Ministerstvo zdravotnictví ČR: Český lékopis 2009 ISBN 978-80-247-2994-7
- 7 Sommer, L. a kolektiv: Základy analytické chemie II. 1. vyd. Brno: Nakladatelství VUTIUM. 2000. 347 s. ISBN 80-214-1742-0
- 8 Karlíček R. a kolektiv: Analytická chemie pro farmaceuty. 3. Vyd. Praha: Karolinum. 2007. 279 s. ISBN 978-80-296-1453-3
- 9 Drbal K., Křížek M.: Analytická chemie, 1999, České Budějovice
- 10 Kellner, R. et al.: Analytical chemistry. Weinheim: Wiley-VCH. 1998. 916 s. ISBN 3-527-28881-3
- 11 www.natur.cuni.cz/~analchem/bosakova/hplc2.pdf - 7. 12. 2012 v 9: 45
- 12 Nováková L., Douša M. a kolektiv: Moderní HPLC separace v teorii a praxi 1. Vyd. Praha: Nakladatelství Europrint a. s. 2013. ISBN: 978-80-260-4243-3
- 13 <http://ach.upol.cz/ucebnice/hodnoceni3.htm> - 26. 12. 2012 v 13:52
- 14 Meyer V. R.: Practical HPLC, 4th edition, Wiley, New York, 2004
- 15 European Pharmacopoeia Edition 7.0, Volume 1, The European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare, 2011
- 16 „L.R. Snyder, J.J. Kirkland: Introduction to Modern Liquid Chromatography, 2nd Edition, John Wiley & Sons, New York, 1979
- 17 Classens H. A., Straten M. A.: J. Chromatogr. A 1060 (2004) 23.

- 18 Mendez A., Bosch E., Roses M., Neue U. D.: J. Chromatogr. A 986 (2003) 33.
- 19 Laurent C. J. C. M., Ph. D. práce, Technische Hogeschool, Delft (1983)
- 20 Storer M. K., McEntyre C. J., Lever M.: J. Chromatogr. A 1104 (2006) 63.
- 21 Dong M. W.: Modern HPLC for practicing scientist, Wiley, New York, 2006, ISBN 0-471-72789-7
- 22 Churáček J. a kol.: Analytická separace látek, SNTL Praha, 1990
- 23 www.natur.cuni.cz/~analchem/bosakova/hplc1.pdf - 7. 12. 2012 v 9:50
- 24 Praus P., Plachá D.: Vybrané kapitoly z instrumentální analýzy, studijní opora, Ostrava, VŠB- TUO, 2009, 206 s.
- 25 Holler, Skoog, Crouch: Principles of Instrumental Analysis 6th Edition, United States, ISBN: 978-0-495-12570-9
- 26 Kellner R., Mermet J.-M., Otto M., Valcárcel M., Widmer H. M.: Analytical chemistry Second Edition, Wiley-VCH, ISBN 3-527-30590-4
- 27 Thermo Fischer Scientific: Exactive Operating Manual, 2012
- 28 Gross L. M. and Caprioli R. (EDS.): The Encyclopedia of Mass Spectrometry, V. 1-5, Elsevier, Oxford, 2000
- 29 Chapman J. R.: Practical Organic Mass Spektrometry, A Guide for Chemical and Biochemical Analysis, Wiley, Chichester, 1993
- 30 Vestal M. L.: Chem. Rev. 101 (2001) 361
- 31 Harrison A. G.: Chemical Ionization Mass Spektrometry, CRC Press, Boca Raton, FL, 1992.
- 32 Bruins A. P.: Trends Anal. Chem. 13 (1994), 37 and 81
- 33 Bruins A. P.: Mass Spectrom., Rev. 10 (1991), 53
- 34 Kebarle P. and Tang L.: Anal Chem. 65 (1993), 972A
- 35 Gaskell S. J.: J. Mass Spectrom. 32 (1997), 677
- 36 Hirabayashi A., Sakairi M., Takada Y. and Koizumi H.: Trends Anal. Chem. 16 (1997), 45
- 37 Cole(Ed.) R. B.: Electrospray Ionization Mass Spektrometry, Wiley, New York, NY, 1997
- 38 Bruins A. P.: J. Chromatogr. A 794 (1988), 345
- 39 Dass C.: Current Org. Chem. 3 (1999), 193
- 40 Smyth W. F.: Trends Anal. Chem. 18 (1999), 335
- 41 Niessen W. M. A.: J. Chromatogr. A 856 (1999), 179

- 42 Sjoberg P. J. R., Bokman C. F., Bylund D. and Markides K. E.: J. Am. Soc. Mass Spectrom. 12 (2001), 1002
- 43 Karlson K. E.: J. Chromatogd. A 794 (1988), 359
- 44 Ashcroft A. E.: Ionization Methods in Organic Mass Spektrometry, The Royal Society of Chemistry, Cambridge, UK, 1997
- 45 Yergey A. L., Edmonds C. G., Lewis I. A. S. and Vestel M. L.: Liquid Chromatography/Mass Spectrometry, Techniques and Applications, Plenum Press, New York, NY, 1989
- 46 Arpino P.: Mass Spectrom. Rev. 9 (1990), 631
- 47 Arpino P.: Mass Spectrom. Rev. 11 (1992), 3
- 48 Caprioli R. M.: Continous-Flow Fast Atom Bombardment Mass Spectrometry, Wiley, Chichester, 1990
- 49 Sunner J.: Org. Mass Spectrom. 28 (1993), 805
- 50 Busch K. L.: J. Mass Spectrom. 30 (1995), 233
- 51 <http://holcapek.upce.cz/vyuka-ms-org-anal.php> - 5. 8. v 2013 21:10
- 52 Štulík K.a kol.: Analytické separační metody, Karolinum UK v Praze, Praha 2004
- 53 Watson J. T., Sparman O. D.: Introdution to Mass Spectrometry, Instrumentation, Applications and Strategies for Data Interpretation Fourth Edition, Wiley, 2007 ISBN 978-0-470-51634-8
- 54 Tajbakhsh M., Hosseinzadeh R., Alinezad H., Ghahari S., Heydari A., Khaksar S.: Synthesis, 2011, 3, 490-496
- 55 Pandit Ch. R., Mani N. S.: Synthesis, 2009, 23, 4032-4036
- 56 Gribble G. W., Jasinski J. M., Pellicone J. T., Panetta J. A.: Synthesis, 1978, 766-768
- 57 Ecker G., Fleischhacker W., Noe Ch. R.: Arch. Pharm., 1994, 327, 691-695
- 58 Pippel D. J., Young L. K., Letavic M. A., Ly K. S., Naderi B., Soyode-Johnson A., Stocking E. M., Carruthers N. I., Mani N. S.: J. Org. Chem., 2010, 75, 4463-4471
- 59 Abdel-Magid A. F., Carson K. G., Harris B. D., Maryanoff C. A., Shah R. D.: J. Org. Chem.1996, 61, 3849-3862
- 60 Mashimo K. and Sato Y., Tetrahedron, (1970), 26, 803
- 61 Tsuzuki K., Nakajima Y., Watanabe T., Yanagiya M. and Matsumoto T.: Tetrahedron Lett., (1978), 989
- 62 Herzig J., Nudelman A., Gottlieb H. E. and Fischer B.: J. Org. Chem., (1986), 51, 727

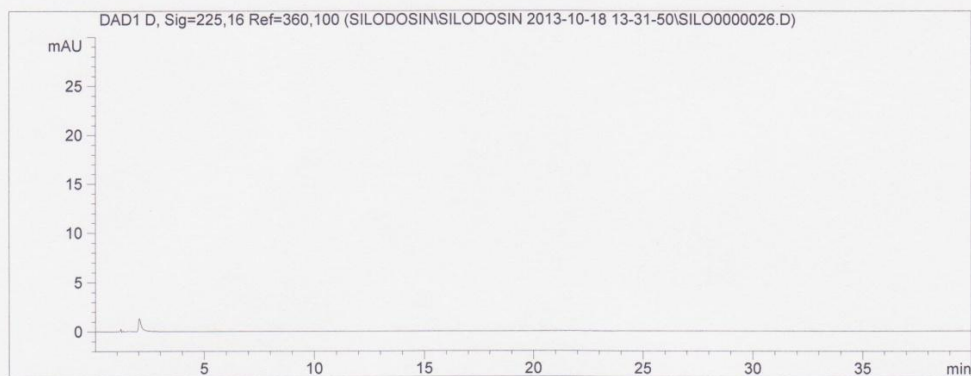
SEZNAM PŘÍLOH

1 SILODO16:Blank

Data File C:\CHEM32\1\DATA2013\SILODOSIN\SILODOSIN 2013-10-18 13-31-50\SILO0000026.D
Sample Name: Blank

```
=====
Acq. Operator   : Petra Hulicna           Seq. Line :    1
Acq. Instrument : LX 27                   Location  : Vial 1
Injection Date  : 18.10.13 16:59:50      Inj       :    6
                                           Inj Volume: 20.0 µl
Acq. Method     : C:\CHEM32\1\DATA2013\SILODOSIN\SILODOSIN 2013-10-18 13-31-50\
SILODO16.M
Last changed    : 15.10.13 10:41:49 by Mgr.Linhartova
Analysis Method : C:\CHEM32\1\DATA2013\SILODOSIN\SILODOSIN 2013-10-18 13-31-50\
SILODO16.M (Sequence Method)
Last changed    : 21.10.13 11:25:33 by Lucie Hankova
                 (modified after loading)
Method Info     : Silodosin
                 Column:Kinetex C18, (150x 4.60 mm,2.6µm)
                 ACN + MeOH pufr KH2PO4 pH 7 (43/22/35)

Sample Info     : Silodosin - purity
                 Solvent run
=====
```



```
=====
Area Percent Report with Performance and Noise
=====
```

Calib. Data Modified : 21.10.13 11:14:07
Multiplier: : 1.0000
Dilution: : 1.0000
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

Signal 1: DAD1 D, Sig=225,16 Ref=360,100

Noise determination:

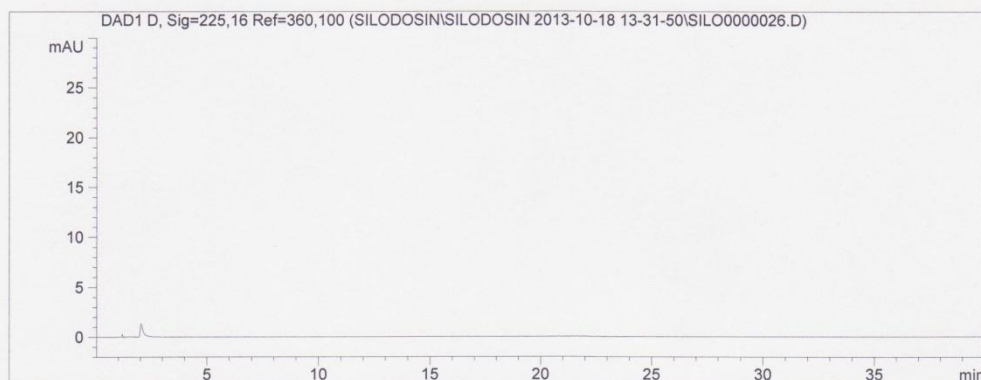
Time range	Noise	Noise	Noise	Wander	Drift
from to	(6*SD)	(PtoP)	(ASTM)		
[min] [min]	[mAU]	[mAU]	[mAU]	[mAU]	[mAU/h]
----- ----- ----- ----- ----- -----					
3.000 35.000	1.568e-2	1.973e-2	8.965e-3	7.492e-3	6.486e-2

2 SILODO16: Blank

Data File C:\CHEM32\1\DATA2013\SILODOSIN\SILODOSIN 2013-10-18 13-31-50\SILO0000026.D
Sample Name: Blank

```
=====
Acq. Operator   : Petra Hulicna                Seq. Line :    1
Acq. Instrument : LX 27                       Location  : Vial 1
Injection Date  : 18.10.13 16:59:50           Inj       :    6
                                                Inj Volume: 20.0 µl
Acq. Method     : C:\CHEM32\1\DATA2013\SILODOSIN\SILODOSIN 2013-10-18 13-31-50\
SILODO16.M
Last changed    : 15.10.13 10:41:49 by Mgr.Linhartova
Analysis Method : C:\CHEM32\1\DATA2013\SILODOSIN\SILODOSIN 2013-10-18 13-31-50\
SILODO16.M (Sequence Method)
Last changed    : 23.10.13 11:18:07 by Mgr.Linhartová
                (modified after loading)
Method Info     : Silodosin
                Column:Kinetex C18, (150x 4.60 mm,2.6µm)
                ACN + MeOH pufr KH2PO4 pH 7 (43/22/35)

Sample Info     : Silodosin - purity
                Solvent run
=====
```



```
=====
Area Percent Report with Performance and Noise
=====
```

Calib. Data Modified : 21.10.13 11:14:07
Multiplier: : 1.0000
Dilution: : 1.0000
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

Signal 1: DAD1 D, Sig=225,16 Ref=360,100

Noise determination:

Time range	Noise	Noise	Noise	Wander	Drift
from to	(6*SD)	(PtoP)	(ASTM)	[mAU]	[mAU/h]
[min] [min]	[mAU]	[mAU]	[mAU]	[mAU]	[mAU/h]
5.000 9.000	1.578e-2	1.502e-2	3.395e-3	8.933e-3	7.298e-2

3 SILODO16: Limitní roztok Oxalátu

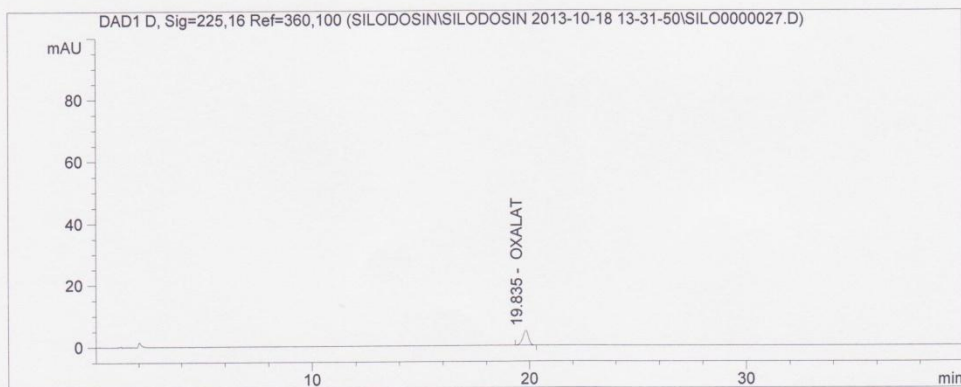
C:\CHEM32\1\DATA2013\SILODOSIN\SILODOSIN 2013-10-18 13-31-50\SILO0000027.D

Silodosin - purity
limit solution 0.5 %

```

=====
Injection Date   : 18.10.13   17:41:26           Seq Line   :           2
Sample Name     : lim OX                Location    :           Vial 2
Acq Operator    : Petra Hulicna         Inj. No.    :           1
                                           Inj. Vol.   :          20 µl
Acq. Method     : C:\CHEM32\1\DATA2013\SILODOSIN\SILODOSIN 2013-10-18
                                           13-31-50\SILODO16.M
Analysis Method : C:\CHEM32\1\DATA2013\SILODOSIN\SILODOSIN 2013-10-18
                                           13-31-50\SILODO16.M (Sequence Method)
Last Changed    : 21.10.13             11:14:12
    
```

Silodosin
Column:Kinetex C18, (150x 4.60 mm,2.6µm)
ACN + MeOH pufr KH2PO4 pH 7 (43/22/35)



=====
Area Percent Report:
=====

Sorted By Signal
Calib. Data Modified : 21.10.13 11:14:07
Multiplier : 1.000000
Dilution : 1.000000
Uncalibrated Peaks : not reported

Signal Description : DAD1 D, Sig=225,16 Ref=360,100

#	RT [min]	Type	Width [min]	Area [mAU*s]	Area % [%]	Name
1	0.000		0.000	0.000	0.0000	TARTARAT
2	19.835	BB	0.279	87.973	100.0000	OXALAT

Totals: 100.0000

=====
*** End of Report ***

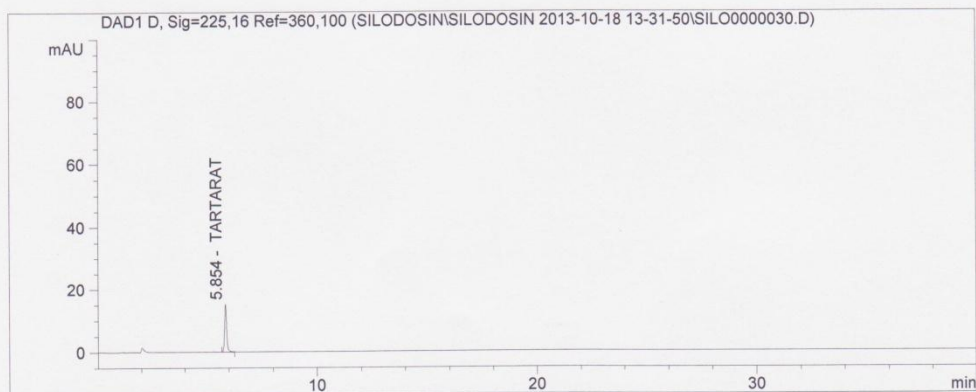
4 SILODO16: Limitní roztok Tartarátu

C:\CHEM32\1\DATA2013\SILODOSIN\SILODOSIN 2013-10-18 13-31-50\SILO0000030.D

Silodosin - purity
limit solution 0.5 %

```
=====
Injection Date   : 18.10.13   19:46:01       Seq Line   :           3
Sample Name     : lim TAR           Location   :           Vial 3
Acq Operator    : Petra Hulicna      Inj. No.   :           1
                                           Inj. Vol.  :           20 µl
Acq. Method     : C:\CHEM32\1\DATA2013\SILODOSIN\SILODOSIN 2013-10-18
                                           13-31-50\SILODO16.M
Analysis Method : C:\CHEM32\1\DATA2013\SILODOSIN\SILODOSIN 2013-10-18
                                           13-31-50\SILODO16.M (Sequence Method)
Last Changed    : 21.10.13           11:14:12
=====
```

Silodosin
Column:Kinetex C18, (150x 4.60 mm,2.6µm)
ACN + MeOH pufr KH2PO4 pH 7 (43/22/35)



=====
Area Percent Report:
=====

```
Sorted By Signal
Calib. Data Modified : 21.10.13           11:14:07
Multiplier           : 1.000000
Dilution             : 1.000000
Uncalibrated Peaks   : not reported
```

Signal Description : DAD1 D, Sig=225,16 Ref=360,100

#	RT [min]	Type	Width [min]	Area [mAU*s]	Area % [%]	Name
1	5.854	BB	0.098	99.310	100.0000	TARTARAT
2	0.000		0.000	0.000	0.0000	OXALAT

5 SILODO16: Oxalát

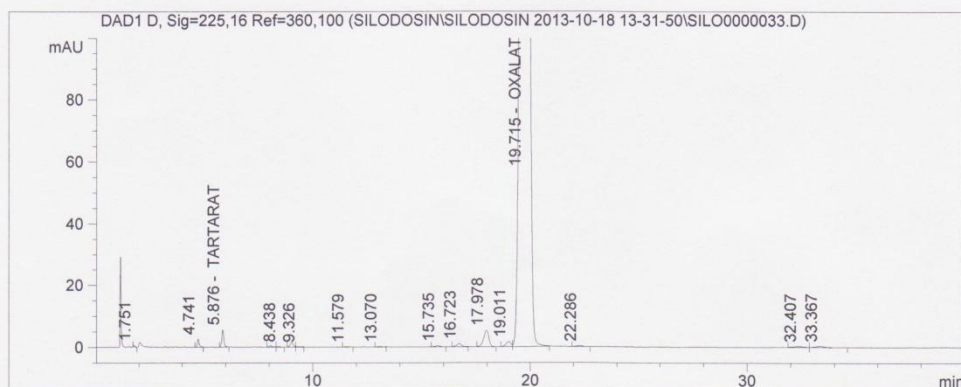
C:\CHEM32\1\DATA2013\SILODOSIN\SILODOSIN 2013-10-18 13-31-50\SILO0000033.D

Silodosin - purity

```

=====
Injection Date : 18.10.13 21:50:47      Seq Line :      4
Sample Name    : Oxalat                  Location  :      Vial 4
Acq Operator   : Petra Hulicna          Inj. No. :      1
                                           Inj. Vol.:     20 µl
Acq. Method    : C:\CHEM32\1\DATA2013\SILODOSIN\SILODOSIN 2013-10-18
                                           13-31-50\SILODO16.M
Analysis Method : C:\CHEM32\1\DATA2013\SILODOSIN\SILODOSIN 2013-10-18
                                           13-31-50\SILODO16.M (Sequence Method)
Last Changed   : 21.10.13                11:14:12
    
```

Silodosin
 Column:Kinetex C18, (150x 4.60 mm,2.6µm)
 ACN + MeOH pufr KH2PO4 pH 7 (43/22/35)



Area Percent Report:

```

=====
Sorted By Signal
Calib. Data Modified : 21.10.13          11:14:07
Multiplier           : 1.000000
Dilution             : 1.000000
Uncalibrated Peaks   : not reported
    
```

Signal Description : DAD1 D, Sig=225,16 Ref=360,100

#	RT [min]	Type	Width [min]	Area [mAU*s]	Area % [%]	Name
1	1.751	BB	0.063	2.019	0.0116	
2	4.741	BB	0.086	15.371	0.0884	
3	5.876	BB	0.098	36.354	0.2091	TARTARAT
4	8.068	BB	0.134	3.765	0.0216	
5	8.438	BB	0.127	1.123	0.0065	
6	9.046	BV	0.130	13.778	0.0792	
7	9.326	VB	0.174	1.169	0.0067	
8	11.579	BB	0.146	1.073	0.0062	
9	13.070	BB	0.166	1.332	0.0077	
10	15.735	BB	0.215	5.240	0.0301	
11	16.723	BB	0.237	16.079	0.0925	
12	17.978	BB	0.252	87.488	0.5031	
13	19.011	BV	0.242	25.993	0.1495	
14	19.715	VB	0.279	17156.756	98.6642	OXALAT

6 SILODO16: Oxalát

C:\CHEM32\1\DATA2013\SILODOSIN\SILODOSIN 2013-10-18 13-31-50\SILO0000033.D

Silodosin - purity

#	RT [min]	Type	Width [min]	Area [mAU*s]	Area % [%]	Name
15	22.286	BB	0.228	3.397	0.0195	
16	32.407	BV	0.411	8.986	0.0517	
17	33.367	VB	0.354	9.124	0.0525	

Totals: 100.0000

*** End of Report ***

7 SILODO16: Tartarát

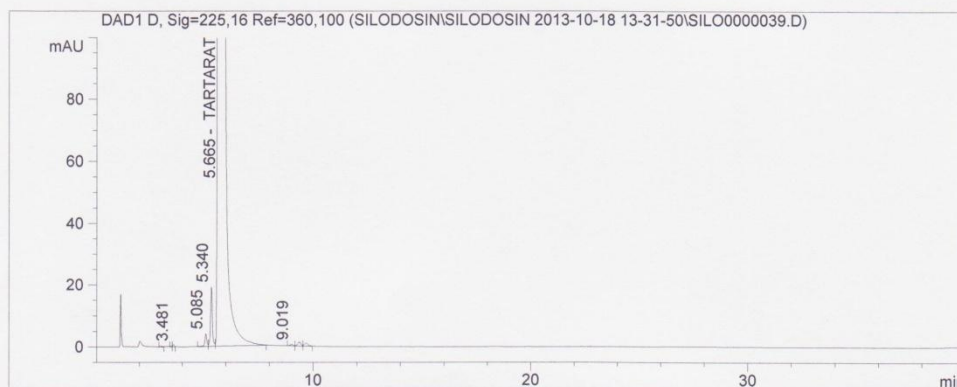
C:\CHEM32\1\DATA2013\SILODOSIN\SILODOSIN 2013-10-18 13-31-50\SILO0000039.D

Silodosin - purity

```

=====
Injection Date : 19.10.13   2:00:23           Seq Line   :           5
Sample Name    : Tartatrat                Location    :           Vial 5
Acq Operator   : Petra Hulicna            Inj. No.   :           1
                                           Inj. Vol.  :           20 µl
Acq. Method    : C:\CHEM32\1\DATA2013\SILODOSIN\SILODOSIN 2013-10-18
                                           13-31-50\SILODO16.M
Analysis Method : C:\CHEM32\1\DATA2013\SILODOSIN\SILODOSIN 2013-10-18
                                           13-31-50\SILODO16.M (Sequence Method)
Last Changed   : 21.10.13                 11:28:14
    
```

Silodosin
 Column:Kinetex C18, (150x 4.60 mm,2.6µm)
 ACN + MeOH pufr KH2PO4 pH 7 (43/22/35)



Area Percent Report:

```

Sorted By Signal
Calib. Data Modified : 21.10.13           11:14:07
Multiplier           : 1.000000
Dilution             : 1.000000
Uncalibrated Peaks   : not reported
    
```

Signal Description : DAD1 D, Sig=225,16 Ref=360,100

#	RT [min]	Type	Width [min]	Area [mAU*s]	Area % [%]	Name
1	2.979	BV	0.080	1.890	0.0097	
2	3.481	VV	0.061	1.335	0.0068	
3	3.582	VV	0.069	3.344	0.0171	
4	5.085	VV	0.092	25.953	0.1330	
5	5.340	VV	0.088	111.400	0.5708	
6	5.665	VB	0.178	19344.688	99.1169	TARTARAT
7	9.019	BV	0.148	4.206	0.0215	
8	9.372	VV	0.152	13.120	0.0672	
9	9.685	VB	0.169	11.103	0.0569	
10	0.000		0.000	0.000	0.0000	OXALAT

Totals: 100.0000

8 SILODO16: Statistika 0,5 % roztoku Oxalátu

Sequence File C:\CHEM32\1\DATA2013\SILODOSIN\SILODOSIN 2013-10-18 13-31-50\SILODOSIN.S

Statistic Report

Sequence table: C:\CHEM32\1\DATA2013\SILODOSIN\SILODOSIN 2013-10-18 13-31-50\SILODOSIN.S
Data directory path: C:\CHEM32\1\DATA2013\SILODOSIN\SILODOSIN 2013-10-18 13-31-50\
Operator: Lucie Hankova
Method file name: C:\CHEM32\1\DATA2013\SILODOSIN\SILODOSIN 2013-10-18 13-31-50\SILODO16.

Run #	Location	Inj #	Inj. Date/Time	File Name	Sample Name
1	Vial 2	1	18.10.13 17:41:26	SILO0000027.D	lim OX
2	Vial 2	2	18.10.13 18:22:58	SILO0000028.D	lim OX
3	Vial 2	3	18.10.13 19:04:30	SILO0000029.D	lim OX

Statistic results for compound TARTARAT not available.

Compound: OXALAT (Signal: DAD1 D, Sig=225,16 Ref=360,100)

Run #	Type	RetTime [min]	Amount [ng/ul]	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Width [min]	Symm.
1	BB	19.835	87.97298	87.97298	4.81129	0.2793	1.19
2	BB	19.840	88.01250	88.01250	4.81894	0.2791	1.18
3	BB	19.848	87.97663	87.97663	4.83238	0.2804	1.19

Mean:	19.841	87.98737	87.98737	4.82087	0.2796	1.19
S.D.:	6.68e-3	2.18405e-2	2.18405e-2	1.06755e-2	7.03e-4	5e-3
RSD :	0.034	2.48223e-2	2.48223e-2	2.21444e-1	0.2514	0.46
95% CI:	0.017	5.42549e-2	5.42549e-2	2.65194e-2	1.75e-3	0.01

9 SILODO16: Statistika 0,5 % roztoku Tartarátu

Sequence File C:\CHEM32\1\DATA2013\SILODOSIN\SILODOSIN 2013-10-18 13-31-50\SILODOSIN.S

Statistic Report

Sequence table: C:\CHEM32\1\DATA2013\SILODOSIN\SILODOSIN 2013-10-18 13-31-50\
SILODOSIN.S
Data directory path: C:\CHEM32\1\DATA2013\SILODOSIN\SILODOSIN 2013-10-18 13-31-50\
Operator: Lucie Hankova
Method file name: C:\CHEM32\1\DATA2013\SILODOSIN\SILODOSIN 2013-10-18 13-31-50\SILODO16.

Run #	Location	Inj #	Inj. Date/Time	File Name	Sample Name
1	Vial 3	1	18.10.13 19:46:01	SILO0000030.D	lim TAR
2	Vial 3	2	18.10.13 20:27:36	SILO0000031.D	lim TAR
3	Vial 3	3	18.10.13 21:09:12	SILO0000032.D	lim TAR

Compound: TARTARAT (Signal: DAD1 D, Sig=225,16 Ref=360,100)

Run #	Type	RetTime [min]	Amount [ng/ul]	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Width [min]	Symm.
1	BB	5.854	99.31016	99.31016	15.20536	0.0982	0.82
2	BB	5.860	99.26809	99.26809	15.18043	0.0983	0.82
3	BB	5.867	98.90256	98.90256	15.15123	0.0982	0.83
----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- -----							
Mean:		5.860	99.16027	99.16027	15.17900	0.0982	0.82
S.D.:		6.56e-3	2.24173e-1	2.24173e-1	2.70933e-2	6.88e-5	5e-3
RSD :		0.112	2.26071e-1	2.26071e-1	1.78492e-1	0.0701	0.60
95% CI:		0.016	5.56877e-1	5.56877e-1	6.73036e-2	1.71e-4	0.01

Statistic results for compound OXALAT not available.

10 SILODO16: Statistika

Sequence File C:\CHEM32\1\DATA2013\SILODOSIN\SILODOSIN 2013-10-18 13-31-50\SILODOSIN.S

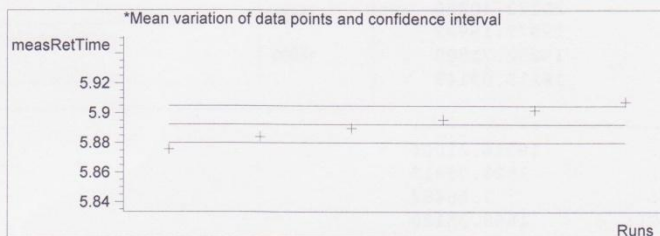
Statistic Report

Sequence table: C:\CHEM32\1\DATA2013\SILODOSIN\SILODOSIN 2013-10-18 13-31-50\SILODOSIN.S
 Data directory path: C:\CHEM32\1\DATA2013\SILODOSIN\SILODOSIN 2013-10-18 13-31-50\
 Operator: Lucie Hankova
 Method file name: C:\CHEM32\1\DATA2013\SILODOSIN\SILODOSIN 2013-10-18 13-31-50\SILODO16

Run #	Location	Inj #	Inj. Date/Time	File Name	Sample Name
1	Vial 4	1	18.10.13 21:50:47	SILO0000033.D	Oxalat
2	Vial 4	2	18.10.13 22:32:23	SILO0000034.D	Oxalat
3	Vial 4	3	18.10.13 23:14:00	SILO0000035.D	Oxalat
4	Vial 4	4	18.10.13 23:55:36	SILO0000036.D	Oxalat
5	Vial 4	5	19.10.13 0:37:13	SILO0000037.D	Oxalat
6	Vial 4	6	19.10.13 1:18:48	SILO0000038.D	Oxalat

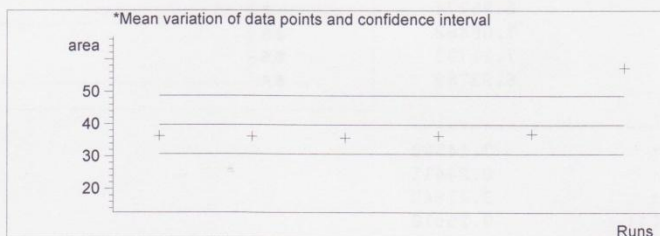
Compound: TARTARAT (Signal: DAD1 D, Sig=225,16 Ref=360,100)

Run #	RetTime [min]
1	5.87575
2	5.88402
3	5.88974
4	5.89562
5	5.90203
6	5.90756



Mean: 5.89245
 S.D.: 0.01172
 RSD: 0.19896
 95% CI: 0.01230

Run #	Peak area [mAU*s]
1	36.35352
2	36.17976
3	35.75922
4	36.31657
5	36.93682
6	57.37085

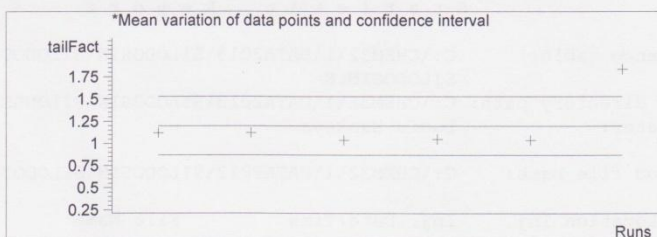


Mean: 39.81946
 S.D.: 8.60671
 RSD: 21.61432
 95% CI: 9.03218

11 SILODO16: Statistika

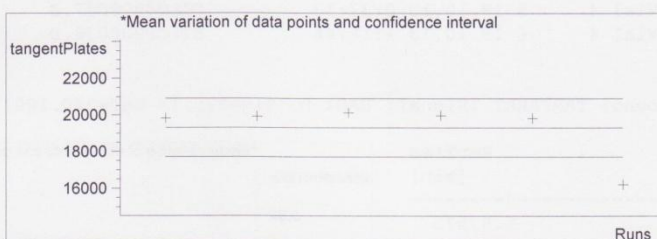
Sequence File C:\CHEM32\1\DATA2013\SILODOSIN\SILODOSIN 2013-10-18 13-31-50\SILODOSIN.S

Run #	Tailing factor
1	1.12020
2	1.12008
3	1.03885
4	1.04786
5	1.03757
6	1.83408



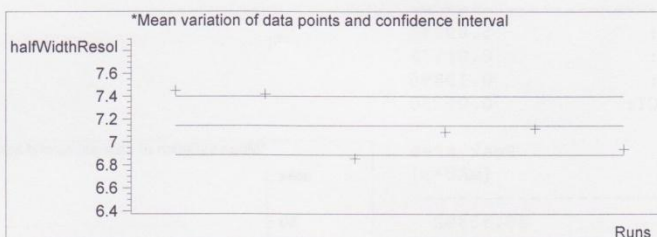
 Mean: 1.19977
 S.D.: 0.31315
 RSD : 26.10073
 95% CI: 0.32863

Run #	Plates (tangent method)
1	19834.77980
2	19914.10258
3	20123.40220
4	19977.16922
5	19832.71500
6	16215.09143



 Mean: 19316.21004
 S.D.: 1523.05813
 RSD : 7.88487
 95% CI: 1598.35128

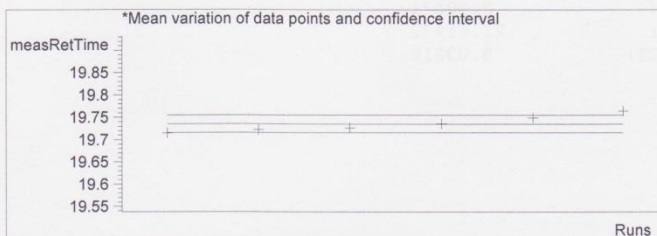
Run #	Resolution (halfwidth method)
1	7.45032
2	7.41958
3	6.85774
4	7.08882
5	7.11733
6	6.93789



 Mean: 7.14528
 S.D.: 0.24411
 RSD : 3.41640
 95% CI: 0.25618

Compound: OXALAT (Signal: DAD1 D, Sig=225,16 Ref=360,100)

Run #	RetTime [min]
1	19.71497
2	19.72223
3	19.72657
4	19.73579
5	19.74924
6	19.76435



12 SILODO16: Statistika

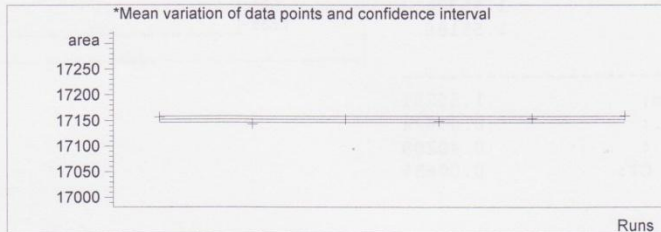
Sequence File C:\CHEM32\1\DATA2013\SILODOSIN\SILODOSIN 2013-10-18 13-31-50\SILODOSIN.S

RetTime
[min]

Mean: 19.73553
S.D.: 0.01843
RSD : 0.09340
95% CI: 0.01934

Run Peak area
[mAU*s]

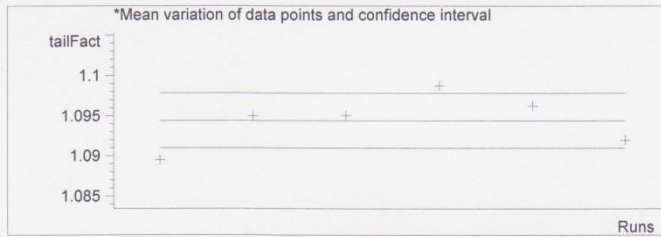
1	17156.75586
2	17143.59180
3	17152.65820
4	17148.95898
5	17154.64648
6	17159.80664



Mean: 17152.73633
S.D.: 5.79123
RSD : 0.03376
95% CI: 6.07752

Run Tailing factor
#

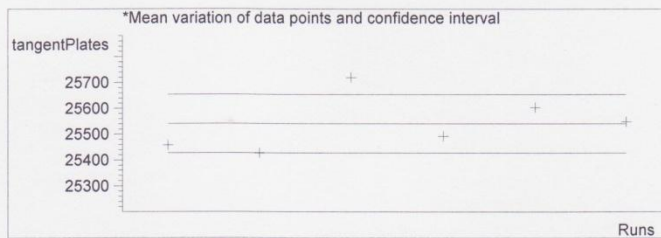
1	1.08949
2	1.09497
3	1.09505
4	1.09874
5	1.09623
6	1.09197



Mean: 1.09441
S.D.: 0.00326
RSD : 0.29753
95% CI: 0.00342

Run Plates
(tangent method)

1	25458.31650
2	25426.40380
3	25719.93960
4	25492.31164
5	25603.59688
6	25548.18146

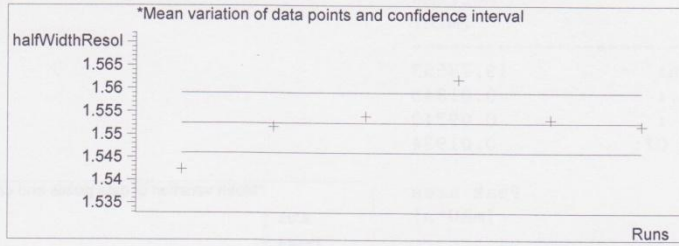


Mean: 25541.45831
S.D.: 108.00692
RSD : 0.42287
95% CI: 113.34629

13 SILODO16: Statistika

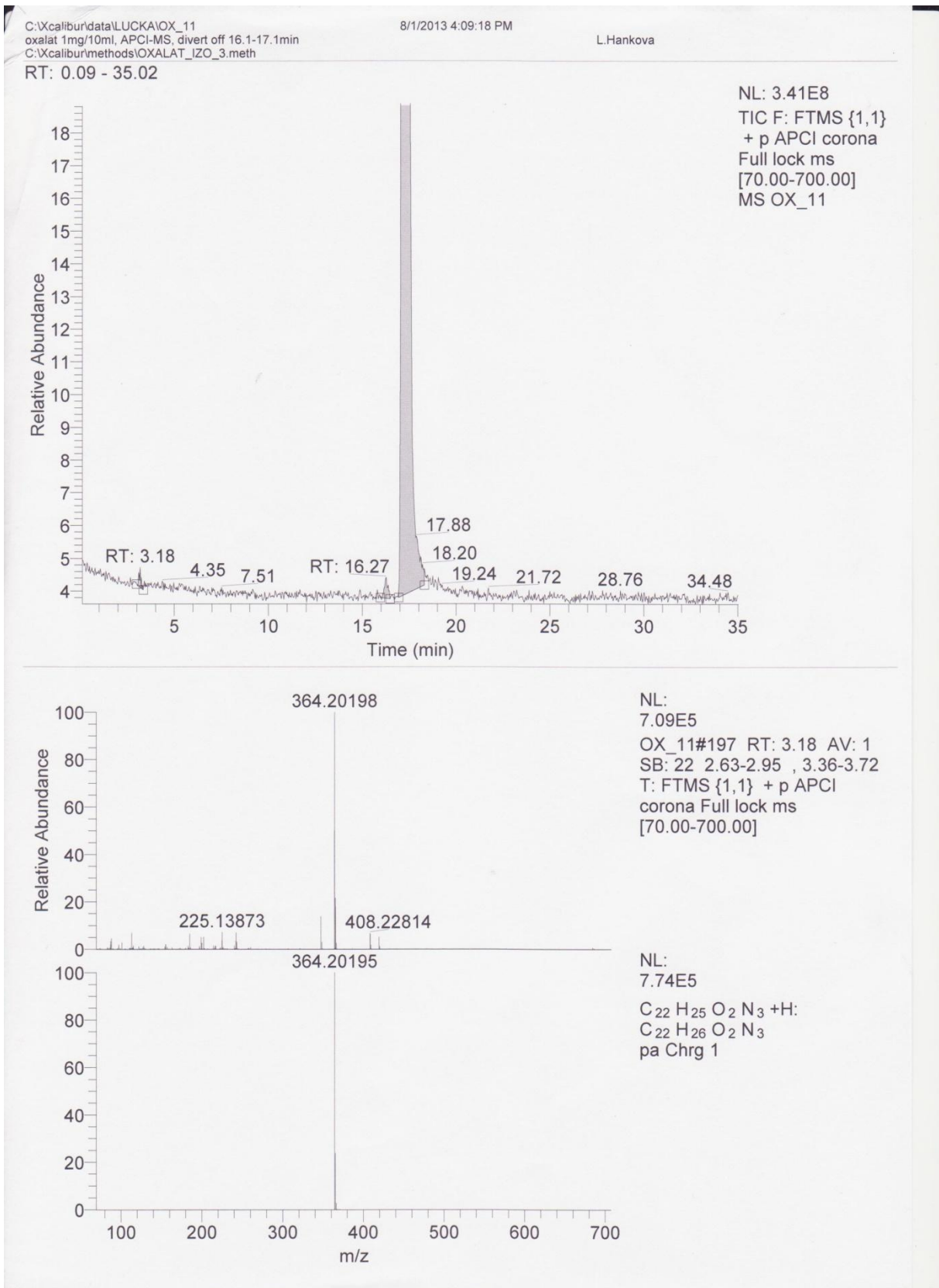
Sequence File C:\CHEM32\1\DATA2013\SILODOSIN\SILODOSIN 2013-10-18 13-31-50\SILODOSIN.S

Run #	Resolution (halfwidth method)
1	1.54239
2	1.55169
3	1.55396
4	1.56193
5	1.55324
6	1.55186

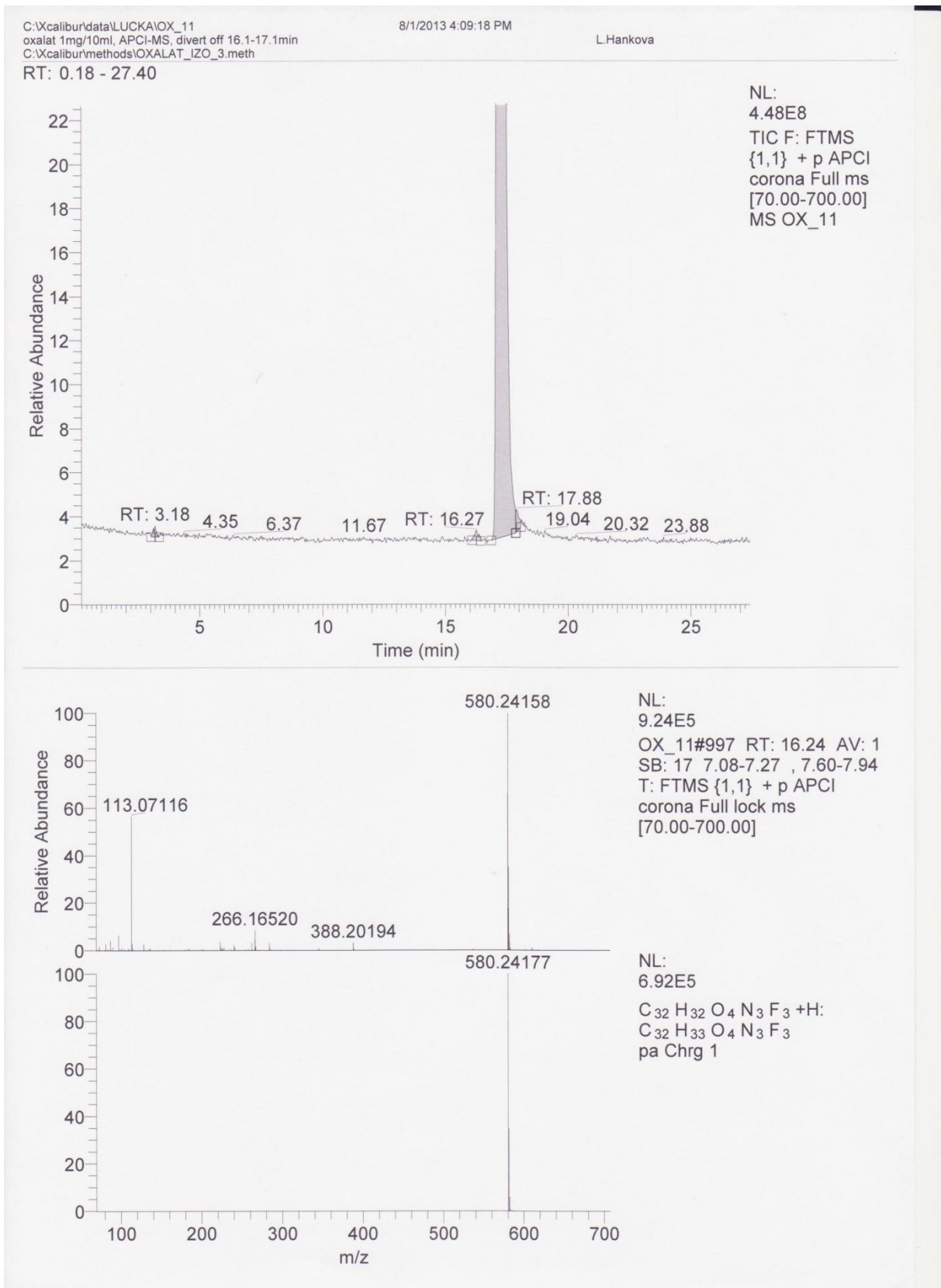


 Mean: 1.55251
 S.D.: 0.00624
 RSD : 0.40209
 95% CI: 0.00655

14 LC/ MS metoda: Nečistota RRT 0,91



15 LC/ MS metoda: Oxalát



16 SILODO28: Blank

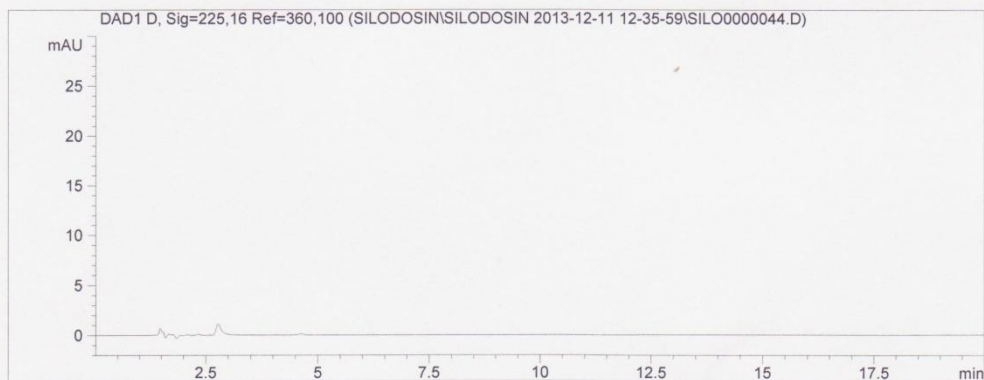
Data File C:\CHEM32\1\DATA2013\SILODOSIN\SILODOSIN 2013-12-11 12-35-59\SILO0000044.D
 Sample Name: Blank

```

=====
Acq. Operator   : Lucie Hanková                Seq. Line :    2
Acq. Instrument : LX 27                      Location  : Vial 1
Injection Date  : 11.12.13 13:41:41          Inj       :    3
                                           Inj Volume: 20.0 µl

Acq. Method     : C:\CHEM32\1\DATA2013\SILODOSIN\SILODOSIN 2013-12-11 12-35-59\
SILODO28.M
Last changed    : 11.12.13 11:16:25 by Lucie Hanková
Analysis Method : C:\CHEM32\1\DATA2013\SILODOSIN\SILODOSIN 2013-12-11 12-35-59\
SILODO28.M (Sequence Method)
Last changed    : 12.12.13 12:24:18 by Lucie Hanková
                 (modified after loading)
Method Info     : Silodosin Tartarat
                 Column:Synergi Polar-RP 80A, (150x 4.60 mm,4.0um)
                 ACN/MeOH/pufr K2HPO4 0.05M pH 4.8 + 0.3% triethylaminu (35/21/44)

Sample Info     : Silodosin - purity
                 Solvent run
  
```



=====
 Area Percent Report with Performance and Noise
 =====

Calib. Data Modified : 12. December 2013 12:08:04
 Multiplier: : 1.0000
 Dilution: : 1.0000
 Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

Signal 1: DAD1 D, Sig=225,16 Ref=360,100

Noise determination:

Time range	Noise	Noise	Noise	Noise	Wander	Drift
from to	(6*SD)	(PtoP)	(ASTM)	(ASTM)	[mAU]	[mAU/h]
[min] [min]	[mAU]	[mAU]	[mAU]	[mAU]	[mAU]	[mAU/h]
3.300 4.400	3.241e-2	2.156e-2	4.522e-3	1.463e-2	-6.388e-1	
4.700 20.000	3.420e-2	8.286e-2	1.391e-2	1.559e-2	1.837e-1	

17 SILODO28: 0,5 % roztok Tartarátu

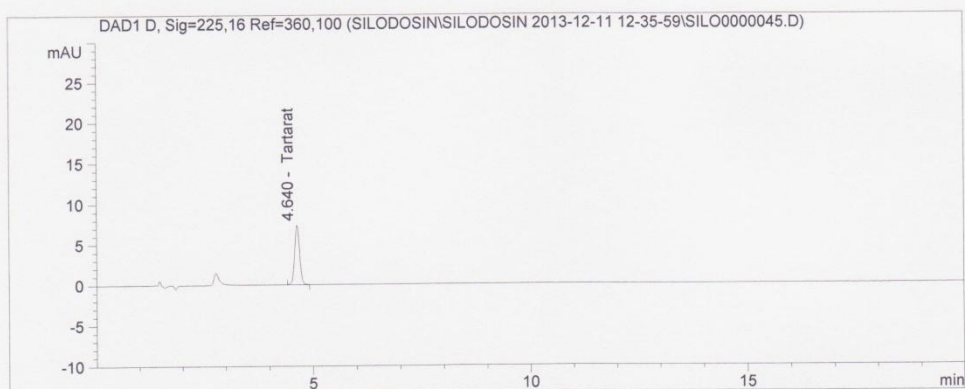
C:\CHEM32\1\DATA2013\SILODOSIN\SILODOSIN 2013-12-11 12-35-59\SILO0000045.D

Silodosin - purity
limit solution 0.5 %

```
=====
Injection Date : 11.12.13   14:03:15           Seq Line   :           3
Sample Name    : lim TAR                               Location   :           Vial 2
Acq Operator   : Lucie Hanková                       Inj. No.   :           1
                                                    Inj. Vol.  :           20 µl

Acq. Method    : C:\CHEM32\1\DATA2013\SILODOSIN\SILODOSIN 2013-12-11
                12-35-59\SILODO28.M
Analysis Method : C:\CHEM32\1\DATA2013\SILODOSIN\SILODOSIN 2013-12-11
                12-35-59\SILODO28.M (Sequence Method)
Last Changed   : 12.12.13   12:21:09
=====
```

Silodosin Tartarat
Column:Synergi Polar-RP 80A, (150x 4.60 mm,4.0um)
ACN/MeOH/pufr K2HPO4 0.05M pH 4.8 + 0.3% triethylaminu (35/21/44)



=====
Area Percent Report:
=====

Sorted By Signal
Calib. Data Modified : 12.12.13 12:08:04
Multiplier : 1.000000
Dilution : 1.000000
Uncalibrated Peaks : not reported

Signal Description : DAD1 D, Sig=225,16 Ref=360,100

#	RT [min]	Type	Width [min]	Area [mAU*s]	Area % [%]	Name
1	4.640	BB S	0.121	57.383	100.0000	Tartarat

Totals: 100.0000

=====
*** End of Report ***

18 SILODO28:Tartarát

C:\CHEM32\1\DATA2013\SILODOSIN\SILODOSIN 2013-12-11 12-35-59\SILO0000048.D

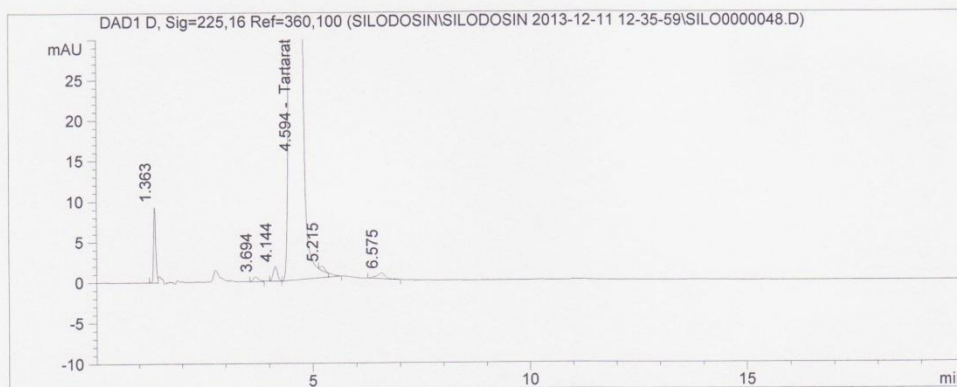
Silodosin - purity

```

=====
Injection Date : 11.12.13   15:07:47       Seq Line   :      4
Sample Name    : Tartarat          Location    :    Vial 3
Acq Operator   : Lucie Hanková       Inj. No.   :      1
                                           Inj. Vol.  :    20 µl

Acq. Method    : C:\CHEM32\1\DATA2013\SILODOSIN\SILODOSIN 2013-12-11
                                           12-35-59\SILODO28.M
Analysis Method : C:\CHEM32\1\DATA2013\SILODOSIN\SILODOSIN 2013-12-11
                                           12-35-59\SILODO28.M (Sequence Method)
Last Changed   : 12.12.13           12:21:09
    
```

Silodosin Tartarat
 Column: Synergi Polar-RP 80A, (150x 4.60 mm, 4.0µm)
 ACN/MeOH/pufr K2HPO4 0.05M pH 4.8 + 0.3% triethylaminu (35/21/44)



Area Percent Report:

```

=====
Sorted By Signal
Calib. Data Modified : 12.12.13           12:08:04
Multiplier           : 1.000000
Dilution             : 1.000000
Uncalibrated Peaks   : not reported
    
```

Signal Description : DAD1 D, Sig=225,16 Ref=360,100

#	RT [min]	Type	Width [min]	Area [mAU*s]	Area % [%]	Name
1	1.363	BV	0.054	32.284	0.2805	
2	3.694	BB	0.118	4.761	0.0414	
3	4.144	BV	0.107	12.342	0.1072	
4	4.594	VB S	0.145	11445.374	99.4527	Tartarat
5	5.215	BB X	0.123	4.275	0.0371	
6	6.575	BB	0.194	9.324	0.0810	

Totals: 100.0000

*** End of Report ***

19 SILODO28: Statistika 0,5 % roztoku Tartarátu

Sequence File C:\CHEM32\1\DATA2013\SILODOSIN\SILODOSIN 2013-12-11 12-35-59\SILODOSIN.S

Statistic Report

Sequence table: C:\CHEM32\1\DATA2013\SILODOSIN\SILODOSIN 2013-12-11 12-35-59\SILODOSIN.S
Data directory path: C:\CHEM32\1\DATA2013\SILODOSIN\SILODOSIN 2013-12-11 12-35-59\
Operator: Lucie Hanková
Method file name: C:\CHEM32\1\DATA2013\SILODOSIN\SILODOSIN 2013-12-11 12-35-59\SILODO28.

Run #	Location #	Inj #	Inj. Date/Time	File Name	Sample Name
1	Vial 2	1	11.12.13 14:03:15	SILO0000045.D	lim TAR
2	Vial 2	2	11.12.13 14:24:46	SILO0000046.D	lim TAR
3	Vial 2	3	11.12.13 14:46:17	SILO0000047.D	lim TAR

Compound: Tartarat (Signal: DAD1 D, Sig=225,16 Ref=360,100)

Run #	Type	RetTime [min]	Amount [ng/ul]	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Width [min]	Symm.
1	BB S	4.640	44.61683	57.38323	7.32555	0.1214	0.94
2	BB S	4.645	44.84113	57.67170	7.32238	0.1219	0.93
3	BB S	4.647	44.72483	57.52213	7.32542	0.1216	0.94
----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- -----							
Mean:		4.644	44.72760	57.52569	7.32445	0.1216	0.94
S.D.:		3.66e-3	1.12172e-1	1.44268e-1	1.79239e-3	2.50e-4	5e-3
RSD :		0.079	2.50790e-1	2.50790e-1	2.44714e-2	0.2056	0.54
95% CI:		9.10e-3	2.78651e-1	3.58383e-1	4.45255e-3	6.21e-4	0.01

20 SILODO28: Statistika

Sequence File C:\CHEM32\1\DATA2013\SILODOSIN\SILODOSIN 2013-12-11 12-35-59\SILODOSIN.S

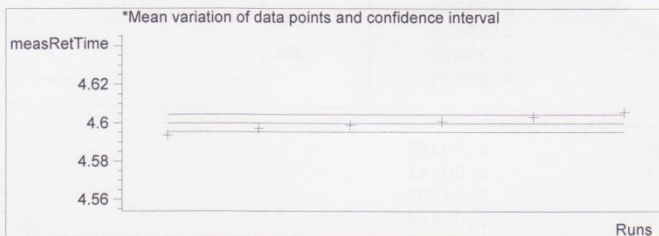
Statistic Report

Sequence table: C:\CHEM32\1\DATA2013\SILODOSIN\SILODOSIN 2013-12-11 12-35-59\SILODOSIN.S
 Data directory path: C:\CHEM32\1\DATA2013\SILODOSIN\SILODOSIN 2013-12-11 12-35-59\
 Operator: Lucie Hanková
 Method file name: C:\CHEM32\1\DATA2013\SILODOSIN\SILODOSIN 2013-12-11 12-35-59\SILODO28.

Run #	Location	Inj #	Inj. Date/Time	File Name	Sample Name
1	Vial 3	1	11.12.13 15:07:47	SILO0000048.D	Tartatrat
2	Vial 3	2	11.12.13 15:29:23	SILO0000049.D	Tartatrat
3	Vial 3	3	11.12.13 15:50:57	SILO0000050.D	Tartatrat
4	Vial 3	4	11.12.13 16:12:32	SILO0000051.D	Tartatrat
5	Vial 3	5	11.12.13 16:34:06	SILO0000052.D	Tartatrat
6	Vial 3	6	11.12.13 16:55:40	SILO0000053.D	Tartatrat

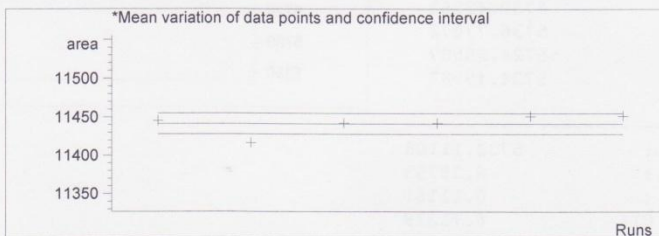
Compound: Tartarat (Signal: DAD1 D, Sig=225,16 Ref=360,100)

Run #	RetTime [min]
1	4.59368
2	4.59708
3	4.59899
4	4.60090
5	4.60329
6	4.60564



Mean: 4.59993
 S.D.: 0.00431
 RSD : 0.09369
 95% CI: 0.00452

Run #	Peak area [mAU*s]
1	11445.37402
2	11416.35645
3	11442.20801
4	11441.79590
5	11451.14160
6	11451.53125



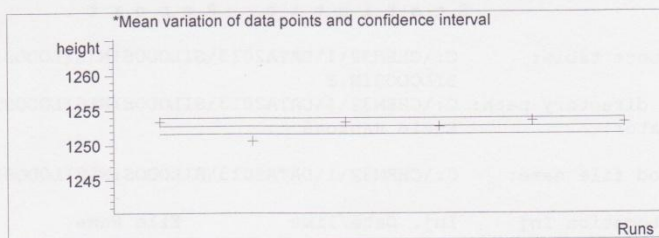
Mean: 11441.40120
 S.D.: 12.97169
 RSD : 0.11337
 95% CI: 13.61295

21 SILODO28: Statistika

Sequence File C:\CHEM32\1\DATA2013\SILODOSIN\SILODOSIN 2013-12-11 12-35-59\SILODOSIN.S

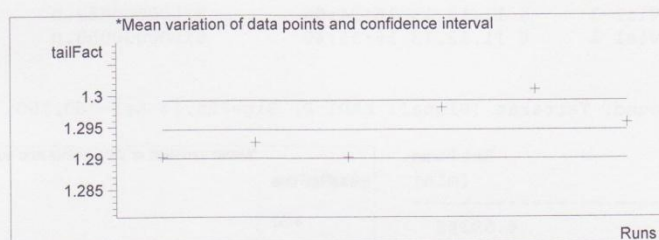
Run #	Peak height [mAU]
1	1253.35938
2	1250.64087
3	1253.31799
4	1252.69531
5	1253.53625
6	1253.29175

 Mean: 1252.80693
 S.D.: 1.09887
 RSD : 0.08771
 95% CI: 1.15320



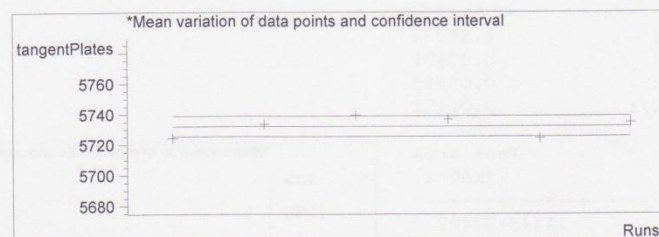
Run #	Tailing factor
1	1.29016
2	1.29254
3	1.29015
4	1.29816
5	1.30099
6	1.29572

 Mean: 1.29462
 S.D.: 0.00444
 RSD : 0.34281
 95% CI: 0.00466

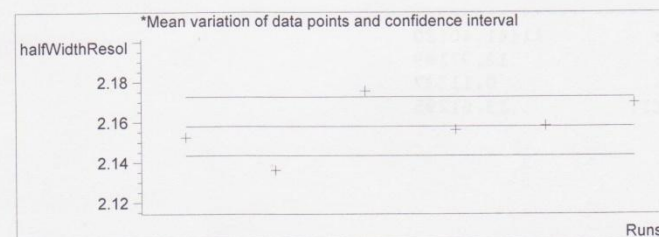


Run #	Plates (tangent method)
1	5724.33830
2	5733.37612
3	5739.42563
4	5736.77072
5	5724.25587
6	5734.49987

 Mean: 5732.11108
 S.D.: 6.39753
 RSD : 0.11161
 95% CI: 6.71379



Run #	Resolution (halfwidth method)
1	2.15241
2	2.13605
3	2.17562
4	2.15624
5	2.15830
6	2.16976



22 SILODO28: Statistika

Sequence File C:\CHEM32\1\DATA2013\SILODOSIN\SILODOSIN 2013-12-11 12-35-59\SILODOSIN.S

	Resolution (halfwidth method)
Mean:	2.15806
S.D.:	0.01389
RSD :	0.64377
95% CI:	0.01458