

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

Katedra analytické chemie

Využití HPLC ve farmaceutické analýze

Diplomová práce

Hradec Králové 2007

Anton Krivda

Děkuji PharmDr. Ludmile Matysové za její odborné vedení, cenné rady, připomínky a pomoc při vypracování této diplomové práce. Děkuji také Ing. Renatě Hájkové za ochotu a odbornou pomoc a ostatním pracovníkům Katedry analytické chemie za trpělivost a vstřícné jednání.

Obsah

1	Úvod a cíl práce.....	6
1.1	Úvod a cíl práce.....	7
2	Teoretická část.....	8
2.1	Použité zkratky	9
2.2	Fenistil [®] gel	11
2.2.1	Pojem „gel“	11
2.2.2	Charakteristika přípravku	11
2.3	Dimetindenil maleas	12
2.3.1	Chemická a fyzikálně-chemická charakteristika.....	12
2.3.2	Farmakologická charakteristika	13
2.4	Chromatografické metody	13
2.4.1	Obecné principy chromatografických metod	13
2.4.2	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC).....	15
2.4.2.1	Kapalinový chromatograf.....	17
2.4.2.2	Chromatografické kolony a eluční činidla	17
2.4.2.3	Přímá detekce v HPLC	21
2.5	Validace analytických metod	22
2.5.1	Přesnost (precision)	22
2.5.2	Správnost (accuracy)	23
2.5.3	Detekční limit (limit of detection, LOD).....	24
2.5.4	Kvantitativní limit (limit of quantitation, LOQ)	24
2.5.5	Selektivita (selectivity).....	24
2.5.6	Linearita (linearity) a rozsah (range).....	25
2.5.7	Robustnost (robustness)	25
2.5.7.1	Stabilita standardů a vzorků	25
2.5.8	Dělicí účinnost systému.....	26
2.5.9	Asymetrie chromatografického píku	26
2.5.10	Rozlišení chromatografických píků.....	26
2.5.11	Opakovatelnost analýzy	27
2.6	Analytické metody hodnocení Dimetindenil maleas.....	27

3	Experimentální část	30
3.1	Přístrojové vybavení	31
3.2	Chemikálie.....	31
3.2.1	Příprava zásobních a pracovních roztoků.....	32
3.3	Vývoj metody – optimalizace chromatografických podmínek	33
3.4	Vzorky léčivých přípravků	33
3.4.1	Příprava vzorku	33
4	Výsledky a diskuse	35
4.1	Vývoj metody – optimalizace chromatografických podmínek	36
4.1.1	Vlnová délka detektoru	36
4.1.2	Hledání vhodné analytické kolony a složení mobilní fáze.....	36
4.1.3	Hledání vnitřního standardu	44
4.1.4	Souhrn optimálních chromatografických podmínek	47
4.2	Validace metody	47
4.2.1	Výtěžnost.....	48
4.2.2	Test vhodnosti HPLC systému	50
4.2.2.1	Účinnost kolony	50
4.2.2.2	Asymetrie chromatografických píků	50
4.2.2.3	Rozlišení chromatografických píků.....	51
4.2.2.4	Opakovatelnost analýzy	51
4.2.3	Linearita.....	53
5	Závěr.....	56
6	Použitá literatura.....	58

1 Úvod a cíl práce

1.1 Úvod a cíl práce

Fenistil[®] gel je přípravek vyráběný již dlouhou dobu. Používá se díky svému antihistaminickému působení hlavně jako prostředek ke zmírnění svědění u dermatitid, urtikárií, štípnutí hmyzem, u spálení od sluníčka a povrchových popálenin. Zájem o něj lze předpokládat i do budoucna, neboť přípravek podobné indikace v obdobné lékové formě u nás není k dispozici.

K zajištění hlavních cílů farmacie, a to kvality, účinnosti a bezpečnosti léčivého přípravku, slouží mnoho analytických metod, které se liší principem, náročností provedení, citlivostí a selektivitou. Účinná látka přípravku, dimetinden-maleinát, je v ČL 2005 stanovována nevodnou titrací. Vzrůstající nároky na produkty farmaceutických firem se sebou nesou požadavky na zavádění modernějších, přesnějších a spolehlivějších analytických metod do kontrolní praxe.

Většina léčivých přípravků je složena z mnoha různých chemických substancí, a proto jsou výhodné zejména metody, které umožňují separaci jednotlivých složek a jejich následnou identifikaci a kvantifikaci. Takovou metodou je i vysokoúčinná kapalinová chromatografie, která díky svojí vysoké selektivitě a citlivosti patří mezi oblíbené analytické metody pro analýzu chemických individuí i léčivých přípravků.

Cílem této práce bylo vyvinout a validovat metodu pro stanovení Dimetinden maleas (dimetinden-maleinátu) v přípravku Fenistil[®] gel.

2 Teoretická část

2.1 Použité zkratky

ACN	Acetonitril
AK	Analytická kolona
ČL	Český Lékopis
D	Dimetinden
DH	Diltiazemi hydrochloridum
DM	Dimetinden maleas
GC	Gas Chromatography (Plynová chromatografie)
GLC	Gas-Liquid Chromatography (Plynová rozdělovací chromatografie)
GSC	Gas-Solid Chromatography (Plynová adsorpční chromatografie)
HILIC	Hydrophilic Interacion Liquid Chromatography (Kapalinová chromatografie hydrofilních interakcí)
HPLC	High Performance Liquid Chromatography (Vysokoučinná kapalinová chromatografie)
IEC	Ion-Exchange Chromatography (Iontově výměnná chromatografie)
IS	Internal Standard (Vnitřní standard)
LC	Liquid Chromatography (Kapalinová chromatografie)
LLC	Liquid-Liquid Chromatography (Kapalinová rozdělovací chromatografie)
LOD	Limit Of Detection (Limit detekce)
LOQ	Limit Of Quantitation (Limit kvantifikace)
LSC	Liquid-Solid Chromatography (Kapalinová adsorpční chromatografie)
MF	Mobilní fáze
N	Nečistota
NPLC	Normal Phase Liquid Chromatography (Kapalinová chromatografie na normální fázi)

PR	Průtoková rychlost
RP	Reversed Phase (Reverzní fáze)
RPLC	Reversed Phase Liquid Chromatography (Kapalinová chromatografie na reverzní fázi)
SEC	Size Exclusion Chromatography
SF	Stacionární fáze
SÚKL	Státní Ústav pro Kontrolu Léčiv
USP	United States Pharmacopeia (Americký lékopis)
UV	Ultra-Violet (Ultrafialové spektrum)

2.2 Fenistil[®] gel¹

2.2.1 Pojem „gel“

„Gel“ je ve farmacii velice široký pojem, není definován v žádném dostupném platném lékopise (naposledy v USP 24 jako „polotuhé soustavy tvořené jednak suspenzemi malých anorganických částic nebo velkými organickými molekulami prostoupenými kapalinami“).

Reologicky patří mezi viskoelastické soustavy, mají vlastnosti jak látek pevného skupenství (elastická deformace), tak látek kapalného skupenství (difuzivita). Gely jsou tedy bikoherentní polotuhé až tuhé systémy. První koherentní fází je gelotvorná látka (biopolymery, syntetické polymerní látky, anorganické látky), druhou koherentní fází je kapalina. Gely vznikají buď bobtnáním (samovolnou difúzí rozpouštědla do polymeru) nebo síťováním (vznik chemických vazeb mezi řetězci polymeru jednak po přidání troj- a vícefunkční složky nebo spojením funkčních skupin z různých polymerních řetězců v tavenině).

2.2.2 Charakteristika přípravku

Fenistil[®] gel odstraňuje svědění nejrůznějšího původu. Má velmi dobré uplatnění v léčbě reakcí z přecitlivělosti. Nejčastěji se používá při svědivých onemocněních kůže, kopřivce, po pokousání a poštípání hmyzem, při poškození kůže slunečním zářením a u mírných povrchových popálenin. Výjimečně se při používání gelu může objevit mírná přechodná kožní reakce (pocit suchosti a pálení). Ojedinele se mohou vyskytnout alergické kožní reakce projevující se např. vyrážkou. Přípravek je balen po 30 g v hliníkových tubách a je prodejný bez lékařského předpisu.

Přípravek je homogenní, bezbarvý, čirý až slabě opalescentní gel. Účinnou látkou je dimetindeni maleas v koncentraci 0,1 g na 100 g gelu. Gelotvornou látkou je sodná sůl carbopolu 974 P. Kompletní složení je uvedeno v Tab.1.

¹ Kapitola 2.2. byla vypracována ze zdrojů [1], [2], [3], [4], [5]

Tab.1.: Složení přípravku Fenistil® gel

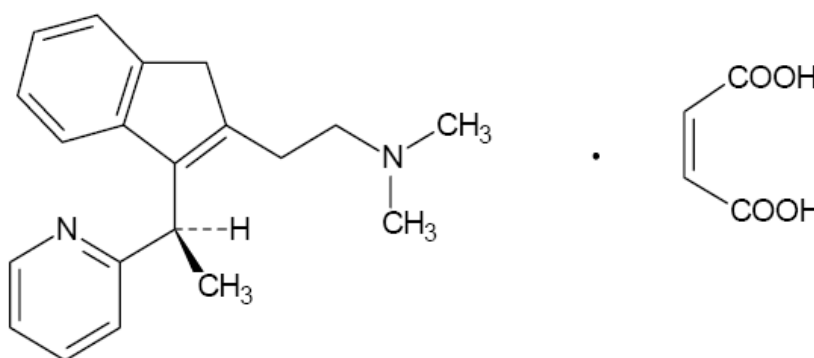
Látka	Množství ve 100 g přípravku
Dimetinden maleas	0,1 g
Carbopol 974 P	
Benzalkonii chloridum	
Natrii edetas	
Sodium hydroxide 30 %	
Propylene glycol	
Aqua purificata	

2.3 Dimetinden maleas ²

2.3.1 Chemická a fyzikálně-chemická charakteristika

Dimetinden maleas (Dimetinden-maleinát) je bílý nebo téměř bílý krystalický prášek. Je těžce rozpustný ve vodě, dobře rozpustný v methanolu. Chemicky jde o N,N-dimethyl-2-{3-[(RS)-1-(pyridin-2-yl)ethyl]-1H-inden-2-yl}ethanamin-(Z)-butendioát. Chemická struktura je uvedena na Obr.1.

Obr.1.: Struktura dimetinden-maleinátu



Sumární vzorec: C₂₄H₂₈N₂O₄

M_r: 408,50

Synonyma: Dimetindeniummaleinat, Dimetinden-maleinát

² Kapitola 2.3. byla vypracována ze zdrojů [1], [5], [6], [7]

Látka je uvedena v ČL 2005 i v ostatních dostupných zahraničních lékopisech.

2.3.2 Farmakologická charakteristika

Dimetinden-maleinát patří farmakologicky mezi H₁-antihistaminika, tedy látky, které antagonizují většinu alergických projevů vyvolaných uvolňováním histaminu jako jednoho ze základních mediátorů alergické reakce, tlumí také zvýšenou vaskulární permeabilitu po histaminu, a tím i tvorbu edémů a kožních pupenů, tlumí svědění a bolest v místě působení histaminu, má taky lokálně anestetický účinek (blokuje Na⁺ kanály podobně jako lokální anestetika). Používá se lokálně ve formě gelu, emulze, nebo nasálního spreje, vnitřně ve formě kapslí nebo roztoku (kapky). Díky přechodu přes hematoencefalickou bariéru má nežádoucí antimuskarinový a sedativní účinek, různě vyznačené gastrointestinální obtíže, ojediněle kožní obtíže. Všechny tyto vedlejší efekty jsou závislé na aplikační cestě.

2.4 Chromatografické metody³

2.4.1 Obecné principy chromatografických metod

Chromatografické metody jsou v analýze využívány velice široce, patří mezi vysoce účinné separační techniky, které slouží k oddělení složek analyzované směsi s možností jejich kvalitativního a kvantitativního hodnocení.

Společným principem chromatografie je postupné, mnohokrát opakující se vytváření rovnováhy analyzovaných látek mezi dvěma vzájemně nemísitelnými fázemi. Jde o sorpci na stacionární fázi, která je nepohyblivá a desorpci do mobilní fáze, která unáší separované látky a je tedy hybnou silou chromatografického procesu. K separaci dochází na základě různé afinity látek analyzované směsi ke stacionární a mobilní fázi. V případě, že mobilní i stacionární fázi jsou kapaliny, podstatou separace je rozdílná rozpustnost dělených

³ Kapitola 2.4. byla vypracována ze zdrojů [8], [9], [10], [11], [12], [13], [14], [15], [16]

látek v těchto navzájem nemísitelných kapalinách.

Chromatografické metody lze rozdělit podle různých hledisek:

- dle charakteru (skupenství) mobilní fáze na:
 - plynovou chromatografii (GC)
 - kapalinovou chromatografii (LC)

- dle podstaty separačního děje existují chromatografie:
 - adsorpční – podstatou je rozdílná adsorbovatelnost dělených látek na aktivní povrch adsorbentu (LSC – pevná fáze-kapalina, GSC – pevná fáze-plyn)
 - rozdělovací – separace je založena na rozdílné rozpustnosti dělených látek ve dvou vzájemně nemísitelných kapalinách (LLC), případně jde o rozdělování v systému kapalina-plyn (GLC)
 - iontově výměnná – stacionární fází jsou iontoměniče (katexy nebo anexy) a mechanismem separace je rozdílná afinita k iontovýměnným skupinám iontoměniče, která je dána rozdílnými hodnotami disociačních konstant ionogenních skupin, velikostí a mocnostvím iontů dělených látek
 - gelová pemeační – separace probíhá na základě různé velikosti molekul dělené směsi, které jsou unášeny kapalinou protékající přes kolonu naplněnou porézním materiálem. Molekuly dle velikosti pronikají nebo nepronikají do pórů určitých rozměrů a tím je dána míra jejich zadržování v koloně
 - afinitní – pomocí této techniky může být izolována jakákoliv molekula, která reaguje specificky a reverzibilně s jinou molekulou. Těmito dvěma molekulami mohou být např.: protilátka - antigen, enzym - kofaktor, inhibitor - substrát nebo případně hormon či léčivo a příslušný bílkovinný receptor nebo přenašeč.

- dle použité techniky:

- sloupcová chromatografie
- papírová chromatografie
- chromatografie na tenké vrstvě

Stručný přehled chromatografických technik uvádí Tab.2.

Tab.2.: Stručný přehled chromatografických technik

Mobilní fáze	Stacionární fáze	Uspořádání	Chromatografická technika
plyn <i>plynová chromatografie – GC</i>	kapalina tuhá látka	kolonové	<i>plynová rozdělovací chromatografie – GLC</i> <i>plynová adsorpční chromatografie – GSC</i>
		kolonové	<i>gelová permeační chromatografie – GPC</i> <i>kapalinová rozdělovací chromatografie – LLC</i>
kapalina <i>kapalinová chromatografie – LC</i>	kapalina	plošné	<i>tenkovrstvá rozdělovací chromatografie – TLC</i> <i>papírová rozdělovací chromatografie – PC</i>
		kolonové	<i>kapalinová adsorpční chromatografie – LSC</i> <i>iontově výměnná chromatografie – IEC</i>
		plošné	<i>tenkovrstvá adsorpční chromatografie – TLC</i>
	tuhá látka		

2.4.2 Vysokoučinná kapalinová chromatografie (HPLC)

HPLC je jedna z nejprogresivnějších analytických metodik. Její hlavní

výhodou je možnost automatizace, potřeba malého množství vzorku, rychlost a vysoká citlivost analýzy s možností kvalitativního i kvantitativního hodnocení směsi látek a její univerzálnost. Umožňuje analýzu tepelně nestálých nebo netěkavých látek a polymerů, čímž odstraňuje hlavní nedostatky plynové chromatografie.

Při této metodě nastává dělení látek mezi stacionární fází naplněnou v koloně a mobilní kapalnou fází procházející kolonou za vysokého tlaku. Může být využito téměř všech mechanismů separace, tedy lze nalézt selektivní a účinný systém k dělení různých směsí látek.

HPLC analýzu lze realizovat pomocí dvou typů eluce. Neliší-li se příliš eluční parametry látek, použije se isokratická eluce mobilní fází s konstantním složením. Jestliže se látky hodně liší svými elučními parametry, využívá se gradientové eluce s plynule se měnícím složením mobilní fáze, při čemž se vytváří pH popřípadě koncentrační gradient.

Po nástřiku analyzovaného vzorku na kolonu je tento unášen mobilní fází (eluční činidlo), ustavuje se rovnováha mezi stacionární (náplň kolony) a mobilní fází a dochází k separaci složek směsi. Rozdělené látky prochází detektorem, který identifikuje jejich přítomnost a na chromatografickém záznamu se jako odezva na signál detektoru zakreslí pík.

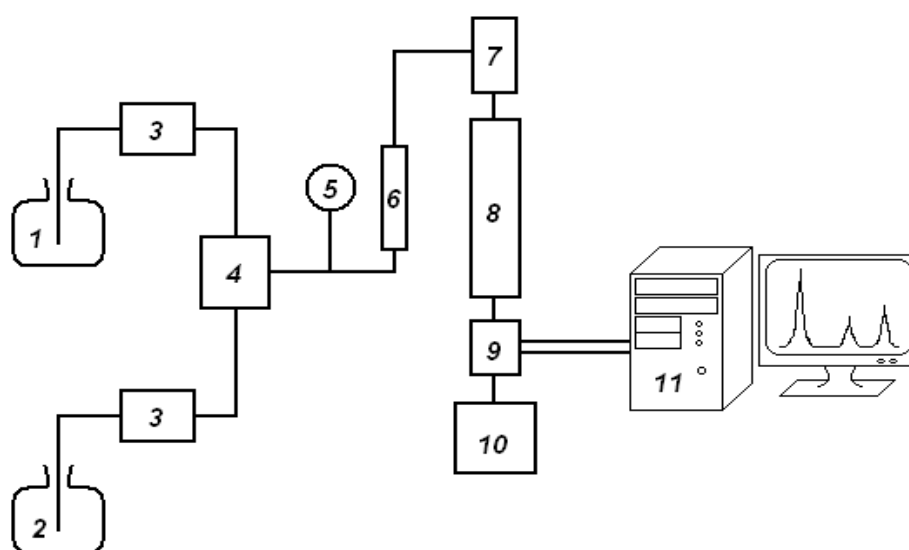
Na separaci látek má vliv výběr kolony a mobilní fáze, citlivost měření je limitována použitým detektorem.

Identifikační charakteristikou látky je za přesně stanovených chromatografických podmínek její retenční čas t_R , což je čas od nástřiku vzorku na kolonu k maximu chromatografického píku. Kvantifikace látek může být učiněna buď pomocí výšky píku, nebo plochy píku na chromatografickém záznamu za použití vnitřního nebo vnějšího standardu. Výhodnější je provedení s vnitřním standardem, protože analýza pak probíhá pro sledované látky i standard za stejných experimentálních podmínek.

2.4.2.1 *Kapalinový chromatograf*

Kapalinový chromatograf se skládá z částí, které umožňují dávkování vzorku, průchod mobilní fáze, separaci látek a jejich detekci. Sestava chromatografu pro HPLC je buď kompaktní konstrukce s fixním uspořádáním komponent, nebo stavebnicového typu kdy jednotlivé součásti jsou odděleny a dají se přestavovat.

Obr.2.: Schéma kapalinového chromatografu



Základní součásti sestavy znázorňuje Obr.2. Jsou to: zásobníky mobilní fáze (1, 2), vysokotlaké čerpadlo (3), směšovač (4), manometr (5), dávkovací zařízení (6), předkolona (7), analytická kolona (8), detektor (9), sběrač frakcí (10), počítač se speciálním softwarem (11). Přítomen může být ještě odplyňovač (degasser).

2.4.2.2 *Chromatografické kolony a eluční činidla*

HPLC chromatografické kolony jsou trubice z nerezové oceli nebo ze speciálně tvrzeného skla o délce 5–30 cm o vnitřním průměru 2–8 mm. Důležité je, aby náplň kolony byla naprosto rovnoměrná a homogenní. Kolona musí odolávat relativně vysokým tlakům, chemickému působení mobilní fáze a separovaných látek, na něž nesmí působit rozkladně.

Důležité jsou předklony, které se používají k analýze složitých směsí, zejména biologického materiálu, jejichž analýza zkracuje životnost analytických kolon. Předklony slouží k ustálení průtoku mobilní fáze, může na ní také docházet k zachycování různých nečistot a vzorky tak přicházejí na analytickou kolonu „čistší“.

Kvalita sorbentu má hlavní vliv na účinnost separace. Důležitá je velikost a stejnoměrnost částic, podobně i tvar, struktura a porozita. Pro většinu HPLC analýz se používají nemoifikovaná nebo chemicky modifikovaná zrnka silikagelu (chemickou reakcí navázané radikály na –OH skupiny silikagelu) o velikosti 1,8 - 10 μm nebo oxid hlinitý (alumina). K dělení látek pomocí HPLC lze využít všech vratných dvoufázových separačních mechanismů (adsorbce, rozdělování, iontová výměna, síťový efekt gelu).

Používaná rozpouštědla a jiné složky mobilní fáze musí mít vhodnou kvalitu. Složky mobilní fáze se obvykle filtrují, aby z nich byly odstraněny částice větší než 0,45 μm . Rozpouštědla jsou před čerpáním do systému obvykle odplynována probubláváním heliem, v ultrazvukové lázni nebo se používají membránová či vakuová zařízení zařazená přímo do systému, která zabraňují tvorbě bublin v cele detektoru.

Výběr mechanismu retence, stacionární fáze a elučního činidla se odvíjí od charakteru stanovované látky. Z tohoto hlediska rozlišujeme několik způsobů provedení HPLC:

- ***RPLC (Reverse phase liquid chromatography)***

Tento způsob provedení HPLC byl dlouho zodpovědný za rozšířenou popularitu HPLC jako separační metody. RPLC, neboli chromatografie na „reverzní“ fázi, vyžaduje nepolární stacionární fázi a polární mobilní fázi. Mobilní fáze se většinou skládá ze směsi vody (případně pufru), methanolu, acetonitrilu, 2-propanolu a jiných polárních rozpouštědel. Typickou stacionární fází jsou chemicky modifikovaná zrnka silikagelu (viz Tab.3.). Nevýhodou těchto fází je, že při pH vyšším než 8 dochází k částečnému rozpouštění silikagelu, což snižuje životnost kolon. RPLC kolony mohou být použita k analýze rozmanitého okruhu

sloučenin, od slabě polárních a nepolárních sloučenin až po kyselé, bazické a amfoterní směsi. Pro analýzu látek, které pro svou separaci potřebují bazické pH se používají různé jiné polymerní látky.

Tab.3.: Stručný přehled modifikujících skupin pro RPLC

Modifikující skupina	Chemický vzorec
Dokosyl	$-(\text{CH}_2)_{21}\text{CH}_3$
Oktadecyl	$-(\text{CH}_2)_{17}\text{CH}_3$
Oktyl	$-(\text{CH}_2)_7\text{CH}_3$
Hexyl	$-(\text{CH}_2)_5\text{CH}_3$
Ethyl	$-\text{CH}_2\text{CH}_3$
Trimethyl	$-\text{Si}(\text{CH}_3)_3$
Fenyl	$-\text{C}_6\text{H}_5$
Difenyl	$-(\text{C}_6\text{H}_5)_2$

- *NPLC (Normal phase liquid chromatography)*

Chromatografie na „normální“ fázi má opačné uspořádání než RPLC. NPLC užívá polární stacionární fázi (např. silikagel) a nepolární mobilní fázi (nejčastěji organická rozpouštědla jako je heptan, cyklohexan, tetrachlormethan, toluen a jiné). Polární povrch může být taky získán derivatizací základu částicemi, které obsahují polární funkční skupiny (viz. Tab.4.). NPLC je cestou volby pro analýzu velice polárních a hydrofilních sloučenin.

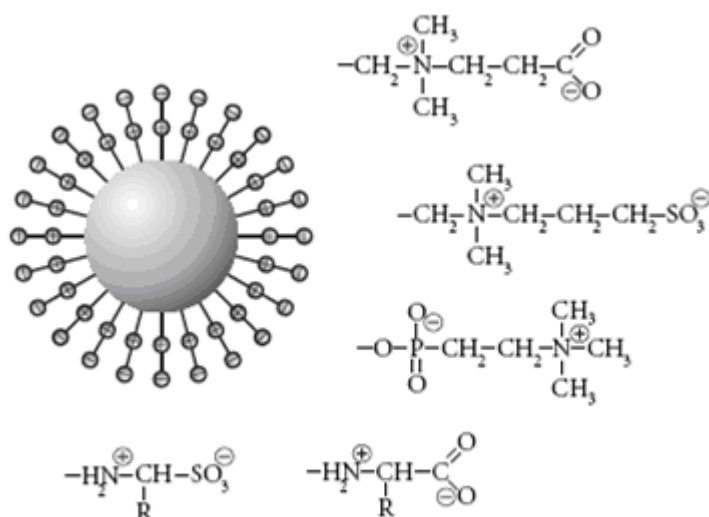
Tab.4.: Stručný přehled modifikujících skupin pro NPLC

Modifikující skupina	Chemický vzorec
Amino	$-\text{NH}_2$
Alkylamino	$-(\text{CH}_2)_n\text{NH}_2$
Kyano	$-\text{C}\equiv\text{N}$
Alkylkyano	$-(\text{CH}_2)_n\text{C}\equiv\text{N}$
Diol	$-\text{CH}(\text{OH})-\text{CH}_2\text{OH}$

▪ **HILIC (Hydrophilic-interaction liquid chromatography)**

Kapalinová chromatografie založena na hydrofilních interakcích je alternativou NPLC, s tím rozdílem, že místo 100% organické mobilní fáze používá směs organických rozpouštědel a ultračisté vody. Typický eluent se skládá ze 40–97% acetonitrilu, zbytek (min. 3%) tvoří voda, případně pufr. Stacionární fáze je více polární než u NPLC, používají se zejména tzv. ZIC (zwitterionic – obojetně iontové) SF (Obr.3.).

Obr.3.: Přehled ZIC stacionárních fází



Mechanismy retence, které se uplatňují při separaci, spočívají v elektrostatických interakcích a „hydrofilním rozdělávání“.

▪ **IEC (Ion-exchange chromatography)**

Pro dělení látek iontového charakteru se používají stacionární fáze s vlastnostmi iontoměníčů (viz Tab.5.). Mechanismus IEC je popsán v Kap.2.4.1.

Tab.5.: Stručný přehled modifikujících skupin s vlastnostmi iontoměníčů

Obecný název modifikující skupiny	Chemický vzorec	Charakter stacionární fáze
Amino	$-(\text{CH}_2)_3\text{NH}_2$	slabě bazický anex
Ethylendiamino	$-(\text{CH}_2)_3\text{NH}(\text{CH}_2)_2\text{NH}_2$	anex
Kvarterní amin	$-(\text{CH}_2)_3-\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$	silně bazický anex
Karboxylová kyselina	$-(\text{CH}_2)_2-\text{COOH}$	slabě kyselý katex
Sulfonová kyselina	$-(\text{CH}_2)_3-\text{SO}_3\text{H}$	silně kyselý katex

▪ **SEC (Size exclusion chromatography)**

Tento způsob separace není založen na interakcích se stacionární a mobilní fází (míněno adsorpce a rozdělování), ale na síťovém efektu polymerních gelů (Sephadex), tedy na rozlišování jednotlivých komponent vzorku na základě jejich velikosti (mechanismus popsán v Kap.2.4.1.). SEC má dominantní postavení v separaci výšemolekulárních sloučenin. Využívá se například v biochemii pro izolaci frakcí proteinů, nebo pro finální čištění biotechnologických produktů.

2.4.2.3 Přímá detekce v HPLC

Úkolem detektorů je monitorování mobilní fáze vycházející z kolony. Výstupem detektoru je signál, kterého intenzita je závislá na koncentraci látky přítomné v eluátu. Z citlivosti použitého detektoru vychází citlivost celé analytické metody. Na detektory jsou kladeny mimořádné požadavky a to:

- univerzální nebo selektivní odpověď na složky eluátu
- vysoká citlivost
- linearita odezvy
- reprodukovatelnost a spolehlivost
- co nejmenší ovlivnění detektoru vnějšími podmínkami (teplota, složení mobilní fáze)

Přehled používaných detektorů je v Tab.6.

Tab.6.: Přehled detektorů používaných v HPLC

Detektor	Měřená veličina	Citlivost v g/ml	Selektivita
amperometrický	elektrický proud	10^{-10}	ano
fluorimetrický	fluorescenční tok	$10^{-9} - 10^{-15}$	ano
hmotnostní spektrometr	molekulová hmotnost	10^{-9}	ano
infračervený	transmitance	10^{-6}	ano
kapacitní	relativní permitivita	10^{-7}	ano
konduktometrický	elektrická vodivost	10^{-8}	ano
refraktometrický	index lomu	10^{-7}	ne
ultrafialový	absorbance	10^{-10}	ano

Nejpoužívanější detektory jsou spektrofotometry pracující v oblasti UV a VIS, následují fluorimetrické, konduktometrické a ampermetrické detektory.

2.5 Validace analytických metod⁴

Validace analytických metod je definována jako proces, kterým se zjišťují nejdůležitější charakteristiky metody, demonstruje, že vypracovaná metoda je pro daný účel vhodná a poskytuje použitelná analytická data. Cílem je určit podmínky, za kterých je zkušební postup použitelný, a zajistit stejnou spolehlivost při opakovaném použití v různých laboratořích.

2.5.1 Přesnost (precision)

Přesnost analytické metody představuje míru shody mezi jednotlivými výsledky metody opakovaně získanými s jedním homogenním vzorkem za předepsaných podmínek. Podle podmínek opakování se rozlišují tři úrovně přesnosti:

⁴ Kapitola 2.5. byla vypracována ze zdrojů [8], [10], [12], [18], [19]

- Opakovatelnost (repeatability) vyjadřuje přesnost změřenou za stejných podmínek (jeden analytik se stejnými činidly na tomtéž přístroji).
- Mezilehlá přesnost (intermediate precision) se provádí v jedné laboratoři se stejným zhomogenizovaným vzorkem, ale v různý den s různými činidly, analytiky i přístroji.
- Reprodukovatelnost (reproducibility) vyjadřuje přesnost mezi laboratořemi, ověřuje zda metoda bude dávat stejné výsledky v různých laboratořích.

Obvykle se tento vzorek nezávisle šestkrát analyzuje kompletním postupem včetně přípravy vzorku. Změří se odpovídající plochy píků (A_i) pro hlavní látku i pro přítomné vedlejší látky a získané hodnoty se použijí pro výpočet průměrné hodnoty (A_p), směrodatné odchylky (s) a relativní směrodatné odchylky (s_R) podle vzorců:

$$A_p = \frac{(\sum A_i)}{n} \quad s = \sqrt{\left\{ \frac{\sum (A_i - A_p)^2}{(n-1)} \right\}} \quad s_R = \frac{100 \cdot s}{A_p}$$

Požadavek je $s_R < 5\%$.

2.5.2 *Správnost (accuracy)*

Správnost analytické metody vyjadřuje shodu mezi naměřenou hodnotou a správnou hodnotou. Vymezení správnosti vyžaduje referenční hodnotu, což je známý obsah látky nebo obsah zjištěný jinou nezávislou metodou s ověřenou správností. Statisticky se správnost testuje pomocí výtěžnosti R (recovery), která udává poměr množství (koncentrační) analytu získaného danou analytickou metodou (C_i) k přijaté referenční hodnotě (C_0):

$$R_i (\%) = \frac{100 \cdot c_i}{c_0} \quad R_p = \frac{(\sum R_i)}{n} \quad s = \sqrt{\frac{\sum (R_i - R_p)^2}{(n-1)}}$$

$$s_R = \frac{100 \cdot s}{R_p}$$

Požadavek je, aby $R_p = 95\% - 105\%$ a $s_R < 5\%$.

2.5.3 Detekční limit (limit of detection, LOD)

Limit detekce vyjadřuje citlivost metody. Je to nejnižší detekovatelná koncentrace látky, nestanovované kvantitativně. Může se určit jako koncentrace analyzované látky s poměrem signálu k šumu základní linie s hodnotou 3.

2.5.4 Kvantitativní limit (limit of quantitation, LOQ)

Limit kvantifikace analytické metody je nejnižší koncentrace analytu ve vzorku, která je stanovitelná s vhodnou přesností a správností. LOQ je parametrem kvantitativních zkoušek pro analýzu nečistot a degradačních produktů. Za limitující relativní směrodatnou odchylku se považuje 10%, proto je možné LOQ vyjádřit jako koncentraci, při jejíž analýze se dosáhne této relativní směrodatné odchylky. Obvykle to bývá trojnásobek detekčního limitu, nebo se vyjadřuje jako koncentrace s poměrem signálu k šumu s hodnotou 10.

2.5.5 Selektivita (selectivity)

Selektivita popisuje vlastnost analytické metody změřit správně a specificky danou látku v přítomnosti jiných očekávaných látek, kterými mohou být další účinné látky u složených přípravků, pomocné látky, nečistoty z výroby a rozkladné produkty. V HPLC se zjišťuje porovnáváním chromatogramů roztoků standardů a placebo. Zjišťuje se, zda se na záznamu placebo nevyskytují interferující píky v retenčních časech stanovovaných látek.

2.5.6 Linearita (linearity) a rozsah (range)

Linearita je chápána jako přímková závislost mezi dvěma náhodnými proměnnými. Linearita je schopnost dávat výsledky přímo úměrné koncentraci stanovované látky. Obvykle se stanovuje sérií tří až šesti nástřiků minimálně pěti roztoků standardů, jejichž koncentrace je v rozmezí 50 – 150% nebo 80 – 120% deklarované koncentrace. Výsledky se zpracovávají standardním postupem lineární regrese.

Rozsahem metody se rozumí koncentrační hranice, v kterých může být metoda používaná, přičemž výsledky jsou správné a přesné.

2.5.7 Robustnost (robustness)

Vyjadřuje míru vlivu proměnných podmínek na výsledky analýzy. Pro vyjádření robustnosti chromatografické metody se mění určité parametry: složení mobilní fáze, pH vodné složky mobilní fáze, průtoková rychlost, teplota na koloně, vlnová délka detekce a vymezi se míra vlivu těchto změn na přesnost stanovení.

2.5.7.1 Stabilita standardů a vzorků

Připravené roztoky standardu a vzorku rozdělené na dvě části se po 4 dny uchovávají při teplotě 2 - 8°C v temnu a při teplotě místnosti za přístupu světla. Každý den se takto skladované roztoky analyzují a plochy píku se srovnávají s plochami píků získaných z čerstvě připravených roztoků. Stabilita $S_T(\%)$ se vypočte:

$$S_T(\%) = \frac{100 \cdot (A - A_T)}{A}$$

A_T průměr dvou měření ploch píků u roztoku skladovaného

A průměr dvou měření ploch píků u roztoku čerstvě připraveného

Požadavek je, aby hodnota S_T byla $< 1\%$.

2.5.8 Dělicí účinnost systému

Účinnost analytické kolony může být vyjádřena jako zdánlivý počet teoretických pater (N):

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

t_R retenční čas odpovídající látky

w_h šířka píku v polovině jeho výšky

Požadavek na 5-cm kolonu je $N > 900$.

2.5.9 Asymetrie chromatografického píku

Tato veličina vyjadřuje míru symetrie chromatografického píku.

Asymetrie T se vypočte:

$$T = \frac{w_{0,05}}{2 \cdot f}$$

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

f menší část úsečky, která vznikla protnutím úsečky vedené v jedné dvacetině výšky píku rovnoběžně se základní linií a kolmicí spuštěnou z vrcholu píku.

Pro symetrický pík je $T = 1$ a tato hodnota se s rostoucí asymetrií zvětšuje. Požadavek pro HPLC je $T < 2$.

2.5.10 Rozlišení chromatografických píků

Rozlišení vyjadřuje míru odlišení látek, které eluují blízko sebe.

U píku sledované látky a píku nejbližše eluované látky (může být i nečistota) se odměří úseky na základní linii (w_i a w_j) a odpovídající retenční časy (t_{Ri} a t_{Rj}).

Rozlišení se vypočítá:

$$R_{ij} = \frac{2 \cdot (t_{Ri} - t_{Rj})}{w_i + w_j}$$

Rozlišení větší než 1,5 odpovídá rozdělení píků na základní linii. (Pro píky, které se vzájemně značně liší svými výškami, nemusí být výše uvedený vzorec vhodný.)

2.5.11 Opakovatelnost analýzy

Opakovatelnost odezvy se vyjadřuje jako odhad relativní směrodatné odchylky (s_R) v procentech pro plochy píku ($A_I - A_i$) a retenční časy ($t_{RI} - t_{Ri}$) pro řadu (šest až deset) následných měření porovnávacího roztoku standardu a vypočítá se ze vzorců:

$$x_p = \frac{\sum x_i}{n} \quad s = \sqrt{\left\{ \frac{\sum (x_i - x_p)^2}{(n-1)} \right\}} \quad s_R = \frac{100 \cdot s}{x_p}$$

Požadavek je, aby jak pro A tak i pro t_R byla $s_R < 1\%$.

2.6 Analytické metody hodnocení Dimetinden maleas

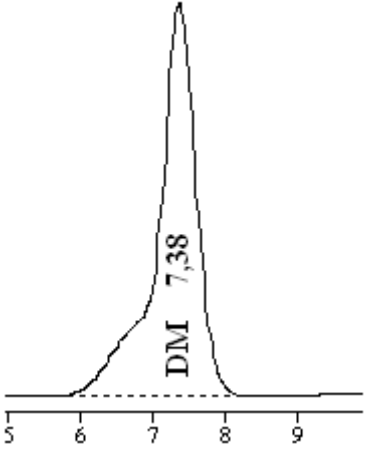
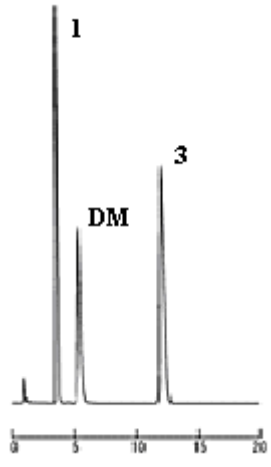
Byla vypracována literární rešerše zaměřena na nalezení informací prakticky využitelných pro vývoj metody stanovení dimetinden-maleinátu pomocí HPLC.

Výsledky rešerše na hodnocení dimetinden-maleinátu jsou uvedeny v Tab.7. a v Tab.8.

Tab.7.: Stanovení dimetinden-maleinátu

Citace	[6]
Úprava vzorku	0,150 g se rozpustí v 80 ml bezvodé kyseliny octové
Vlastní stanovení	titruje se kyselinou chloristou 0,1 mol/l za potenciometrické indikace bodu ekvivalence (1 ml kyseliny chloristé 0,1 mol/l odpovídá 20,43 mg $C_{24}H_{28}N_2O_4$)

Tab.8.: Přehled HPLC analýzy dimetinden-maleinátu

Citace		[17]
Kolna	Discovery Zr – PBD (150 x 4,6 mm; 5 μ m)	Wakosil – II 5C18AR (100 x 4,6 mm, 5 μ m))
Mobilní fáze	ACN / H ₂ O (NaOH) pH 12,9; 40/60 (v/v)	H ₂ O / CH ₃ OH / 0.5M H ₂ SO ₄ ; 110/90/0.6 (v/v/v)
Průtok [ml/min]	1,0	1,0
Detekce	Amperometrická	UV při 260 nm
Hodnocené látky	X	sodná sůl kys. benzoové (1), kyselina p-hydroxybenzoová (3)
Ukázka chromatografického záznamu		

V průběhu analýzy byla rešerše doplněna ještě o analýzu dusíkatých bází pomocí HILIC (viz Tab.9.).

Tab.9.: Stanovení dusíkatých bází pomocí HILIC

Citace	[11]
Kolona	ZIC [®] - HILIC (150 x 2,1 mm, 5 µm)
Mobilní fáze	ACN / 25 mM CH ₃ COOH, 2,5 mM CH ₃ COONH ₄ , 80/20 (v/v)
Průtok [ml/min]	0,1
Detekce	UV při 254 nm
Hodnocené látky	adenin, cytosin, guanin, thymin, uracil

3 Experimentální část

3.1 *Přístrojové vybavení*

Analytické váhy:	Sartorius 2004 MP, Germany
Centrifuga:	EBA 21, Hettich Zentrifugen, Germany
Kapalinový chromatograf:	SHIMADZU LC-2010 Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan
Laboratorní pH metr:	Microprocessor pH Meter, pH 112, HANNA Instruments, Germany
Ultrazvuková lázeň:	BANDELIN, SONOREX Digitec, Germany
UV spektrofotometr:	Hewlett Packard 8453, USA
Vyhodnocení:	Chromatografická stanice Shimadzu CLASS-VP, verze 6.12 SP4

3.2 *Chemikálie*

Acetonitril CHROMASOLV[®] for HPLC (š.č. 60550), Sigma-Aldrich, Inc. Germany

Ambroxol-hydrochlorid 99,7% (š.č. 821/92/1), Galena, Opava

Butamirát-citrát 99% (č.š. 701/92/1), Galena, Opava

Diltiazem-hydrochlorid (š.č. DIL/M-086/2000), Herbacos-Bofarma, Pardubice

Dimetinden-maleinát (VV 085/06, š.č. DMM/070502), Herbacos-Bofarma, Pardubice

Ethylmorfin-hydrochlorid (š.č. 0030900), RNDr. Jan Kulich s.r.o., Hradec Králové

Hexachlorofen 99% ALDRICH[®] (š.č. 01928HW-432), Sigma-Aldrich, Inc. Germany

Imidazol 99,5% (š.č. 2060192), Fluka-Chemika, Germany

Ketoprofen (š.č. 93451), Herbacos-Bofarma, Pardubice

Kyselina 4-chlorbenzoová 99% (š.č. 27708-053), Sigma-Aldrich, Inc. Germany

Kyselina citronová monohydrát p.a. (š.č. 100403), Penta, Chrudim

Kyselina fosforečná 85% p.a., Merck, Germany
Kyselina gallová SIGMA[®] (š.č. 023K0117), Sigma-Aldrich, Inc. Germany
Kyselina octová 99,0% (š.č. 1196501), Flukachemika, Germany
Methanol CHROMASOLV[®] for HPLC (š.č. 6047M), Sigma-Aldrich, Inc. Germany
Methylparaben (š.č. 021228), Herbacos-Bofarma, Pardubice
Nimesulid (š.č. NS 663 1102XL), Herbacos-Bofarma, Pardubice
Octan amonný (š.č. 31648), Lachema, Brno
Propylparaben (š.č. 20040201), Herbacos-Bofarma, Pardubice
Sulfadimidin 100,6% (š.č. 214081), IVAX, Opava
Terbinafin-hydrochlorid (š.č. TRBFHOC-501), Herbacos-Bofarma, Pardubice
Tetrakainhydrochlorid (š.č. 1140/88/9), Galena, Opava
Ultračistá voda, čištěná systémem Milli-Q (Millipore, Bedford, MA, USA)

3.2.1 Příprava zásobních a pracovních roztoků

Jako rozpouštědlo pro přípravu zásobních a pracovních roztoků zkoušené látky, dimetinden-maleinátu, byl použit methanol nebo acetonitril podle použité mobilní fáze a analytické kolony pro danou analýzu. Látka je v obou rozpouštědlech dobře rozpustná.

Pro zásobní roztok byla zvolena koncentrace 25 mg/100 ml.

Pracovní roztoky byly připraveny ze zásobních roztoků tak, aby jejich koncentrace odpovídaly koncentraci roztoku získaného extrakcí 0,5 g přípravku „Fenistil[®] gel“ do 20,00 ml rozpouštědla při 100% výtěžnosti, tedy o koncentraci 2,5 mg/100 ml desetinásobným zředěním zásobních roztoků.

Jako rozpouštědlo pro přípravu zásobních a pracovních roztoků látek, které byly zkoušeny jako potenciální vnitřní standard byl použit (podle použité analytické kolony) methanol popřípadě acetonitril.

Pro zásobní roztok IS byla zvolena koncentrace 50 mg/100 ml.

Pracovní roztoky byly připravované o koncentraci 1 mg/100 ml ze zásobních roztoků jejich padesátinásobným zředěním.

3.3 Vývoj metody – optimalizace chromatografických podmínek

Nejdříve bylo nutné najít vhodné chromatografické podmínky. Těmito podmínkami byly vlnová délka detekce, složení mobilní fáze a analytická kolona s vhodným sorbentem a vhodný vnitřní standard. Při hledání vlnové délky detektoru bylo proměřeno UV spektrum stanovované látky. Při měření spektra byla snaha vyhnout se krátkým vlnovým délkám pod cca 240 nm, kde by mohly absorbovat složky gelového základu, případně jiné balastní látky. Po nalezení vhodné vlnové délky byly zkoušeny různé analytické kolony a různé mobilní fáze. Byly zkoušeny kolony s různě polárními sorbenty – Supelco Discovery C18 (12,5 cm x 4,6 mm; 5 µm), Thermo Quest Hypersil Division (250 x 4,6 mm; 5 µm), Thermo Electron Corporation ODS Hypersil (250 x 4,6 mm; 5 µm) a Agilent Zorbax TMS (250 x 4,6 mm; 5 µm). U každé kolony bylo testováno několik mobilních fází. Výsledky nebyly uspokojivé, proto byla rešerše doplněna o další metodu vhodnou pro separaci polárních dusíkatých sloučenin – HILIC a byla změněna celá metodika práce. Poslední zkoušenou kolonou byla hydrofilní analytická kolona SeQuant ZICTM Column(50 x 2.1 mm; 5 µm). Neméně důležitým krokem optimalizace chromatografických podmínek bylo nalezení vnitřního standardu. Bylo testováno několik látek.

3.4 Vzorky léčivých přípravků

Fenistil[®] gel (š.č. F00395A), NOVARTIS s.r.o., Praha, ČR

3.4.1 Příprava vzorku

Vzorek byl připravován postupem, vycházejícím ze zkušeností s hodnocením léčivých přípravků podobných vlastností v kontrolní laboratoři na katedře analytické chemie Farmaceutické fakulty UK v Hradci Králové. Do centrifugační zkumavky se naváží 0,5 g gelu přesně, přidá se 20,00 ml roztoku vnitřního standardu a umístí se na 15 minut do ultrazvukové lázně. Poté se nechá 15 minut centrifugovat při 3000 otáčkách za minutu. V tomto extrakčním postupu

je možno modifikovat jednotlivé parametry a to složení extrakční směsi, délku umístění v ultrazvukové lázni popřípadě délku a rychlost centrifugace.

4 *Výsledky a diskuse*

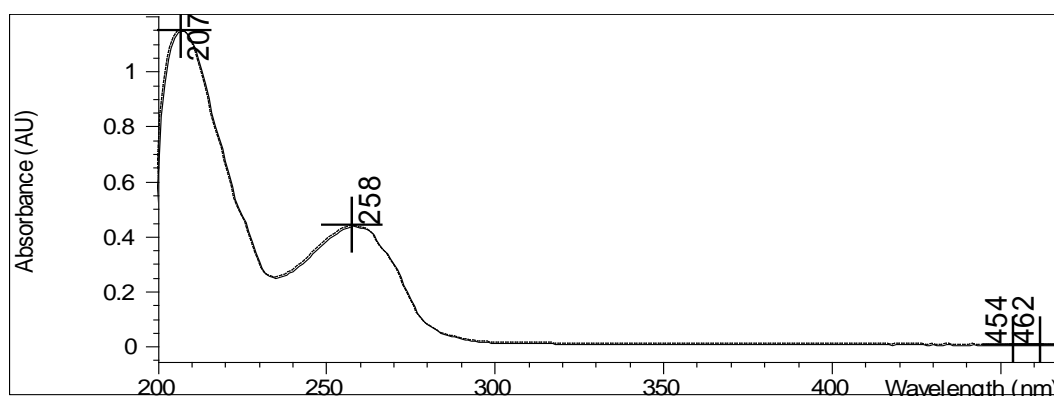
4.1 Vývoj metody – optimalizace chromatografických podmínek

Ke všem měřením byla použita výše uvedená HPLC sestava Shimadzu a pět analytických kolon – čtyři pro RPLC a jedna pro HILIC. Na kolonu bylo nastříkováno 20 μ l vzorku při RPLC a 10 μ l při HILIC. Cílem bylo nalézt optimální podmínky pro provádění analýzy, tzn. takové, za kterých bude možné provést separaci, identifikaci a kvantifikaci sledované látky a poté validaci vyvinuté metody.

4.1.1 Vlnová délka detektoru

Pro stanovení optimální vlnové délky pro detekci stanovované látky posloužilo UV spektrum naměřené v roztoku standardu dimetinden-maleinátu v methanolu (viz Obr.4.), ale také výsledky rešerše. Koncentraci měřeného roztoku nebylo nutné pro tento účel definovat.

Obr.4.: UV spektrum dimetinden-maleinátu



Na základě polohy maxim na výše uvedeném spektru a s ohledem na zdroje z rešerše byla jako optimální vlnová délka detekce zvolena hodnota 258 nm.

4.1.2 Hledání vhodné analytické kolony a složení mobilní fáze

Při hledání optimálního složení mobilní fáze a optimální analytické kolony bylo využito poznatků rešerše.

Při metodě založené na teorii separace na RP byl pracovní roztok pro měření připraven desetinásobným zředěním zásobního methanolického roztoku dimetindem-maleinátu o koncentraci 24,56 mg/100 ml. Ve složení mobilní fáze byl měněn poměr vodné a methanolické složky. Pro úpravu pH vodní složky MF byla místo H_2SO_4 (pro její destruktivní vliv na SF) zvolena H_3PO_4 . pH vodné fáze bylo upravováno na hodnoty mezi 2 – 7 pomocí zásobního roztoku kyseliny fosforečné o koncentraci 0,085% (v/v), případně byl do mobilní fáze přidán konkrétní objem 0,085% (v/v) kyseliny fosforečné. Přehled připravených MF znázorňuje Tab.10.

Tab.10.: Přehled připravených MF

MF č.	H ₂ O [ml]	pH	MeOH [ml]	0,085% (v/v) H ₃ PO ₄ [ml]
1	110,0	×	90,0	0,6
2	55,0	×	90,0	55,0
3	110,0	2,95	90,0	×
4	130,0	2,97	70,0	×
5	140,0	2,63	60,0	×
6	160,0	2,43	40,0	×
7	180,0	2,55	20,0	×
8	140,0	×	60,0	×
9	140,0	×	60,0	0,6

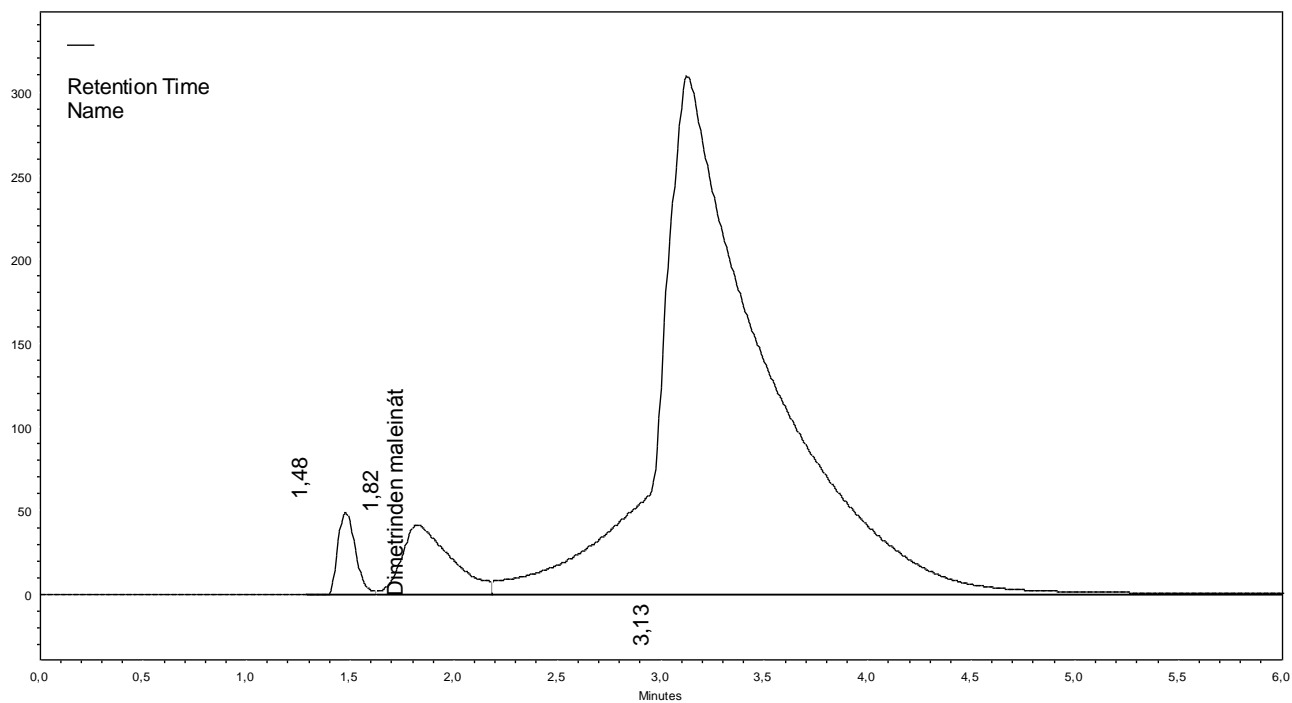
Měření bylo prováděno na čtyřech analytických kolonách, které nebyly termostatovány. Nástřik analytu na kolonu byl 20 μ l, průtoková rychlost byla měněna v rozmezí 0,7 ml/min – 1,0 ml/min. Přehled kombinací MF a AK použitých pro jednotlivá měření uvádí Tab.11.

Tab.11.: Přehled kombinací MF a AK

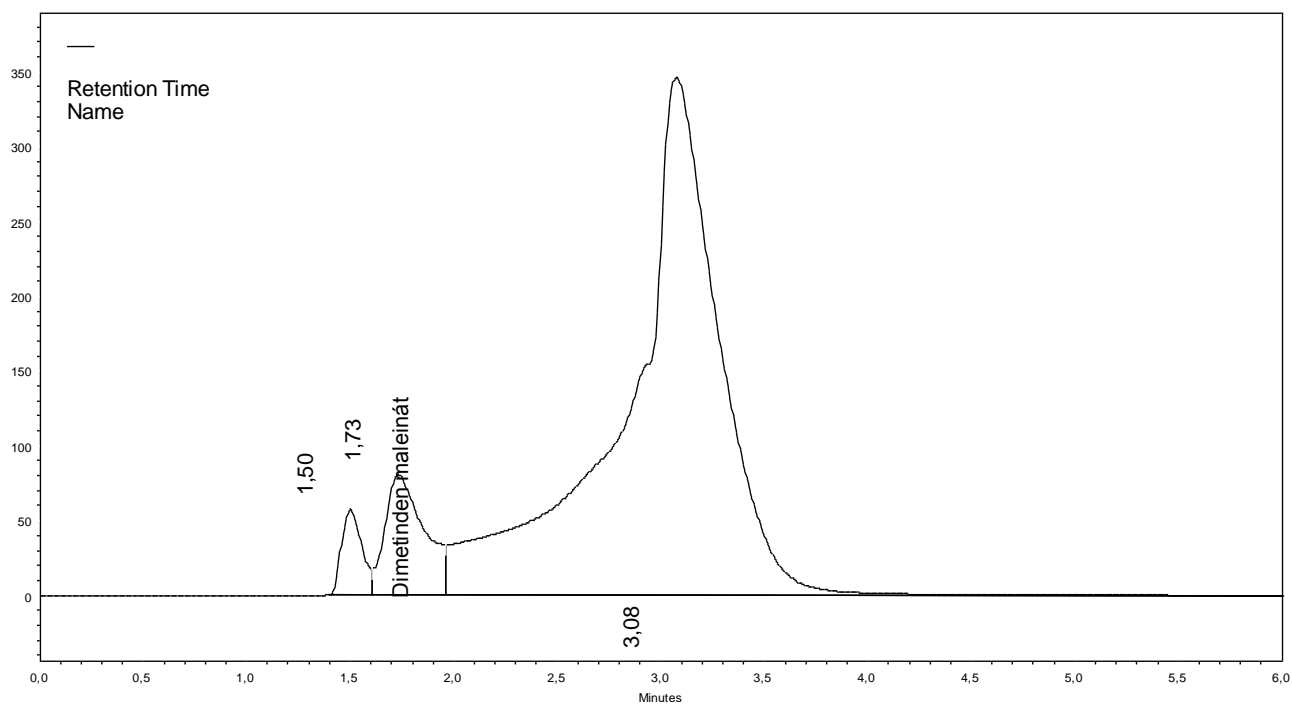
AK \ MF	Supelco Discovery C18 (12,5 cm x 4,6 mm; 5 µm)	Thermo Quest Hypersil Division (250 x 4,6 mm; 5 µm)	Thermo Electron Corporation ODS Hypersil (250 x 4,6 mm; 5 µm)	Agilent Zorbax TMS (250 x 4,6 mm; 5 µm)
1	✓	✓	✗	✗
2	✓	✓	✗	✗
3	✓	✓	✗	✗
4	✗	✓	✗	✗
5	✗	✗	✓	✓
6	✓	✗	✓	✓
7	✗	✗	✓	✓
8	✗	✗	✓	✗
9	✓	✗	✗	✗

Žádná z výše uvedených kombinací použitých kolon a mobilních fází nevedla k dokonalému separačnímu procesu. Docházelo k nežádoucím jevům, především rozmývání píků, tzv. chvostování, k výskytu negativních píků, popřípadě retenční čas dimetinden-maleinátu byl shodný s tzv. mrtvým objemem kolony. Dalším problémem byla „neopakovatelnost“ analýzy, kdy dva po sobě jdoucí nástřiky na AK se ve finálním výsledku lišily retenčním časem nebo tvarem píku. Pro ilustraci uvádím několik chromatografických záznamů z těchto měření (Obr.5. –Obr.8.).

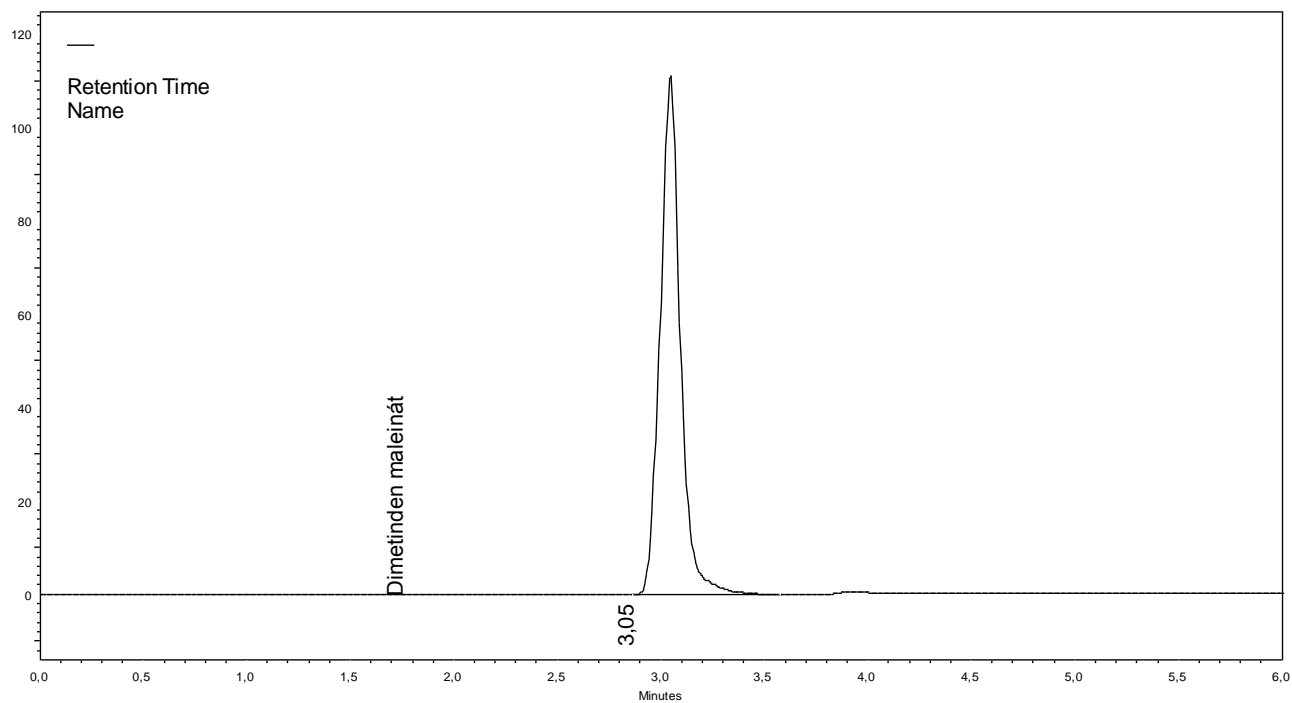
Obr.5.: Supelco Discovery C18 (12,5 cm x 4,6 mm; 5 µm), H₂O:MeOH:H₃PO₄ (110:90:0,6), průtok 1,0 ml/min, nástřik č.1



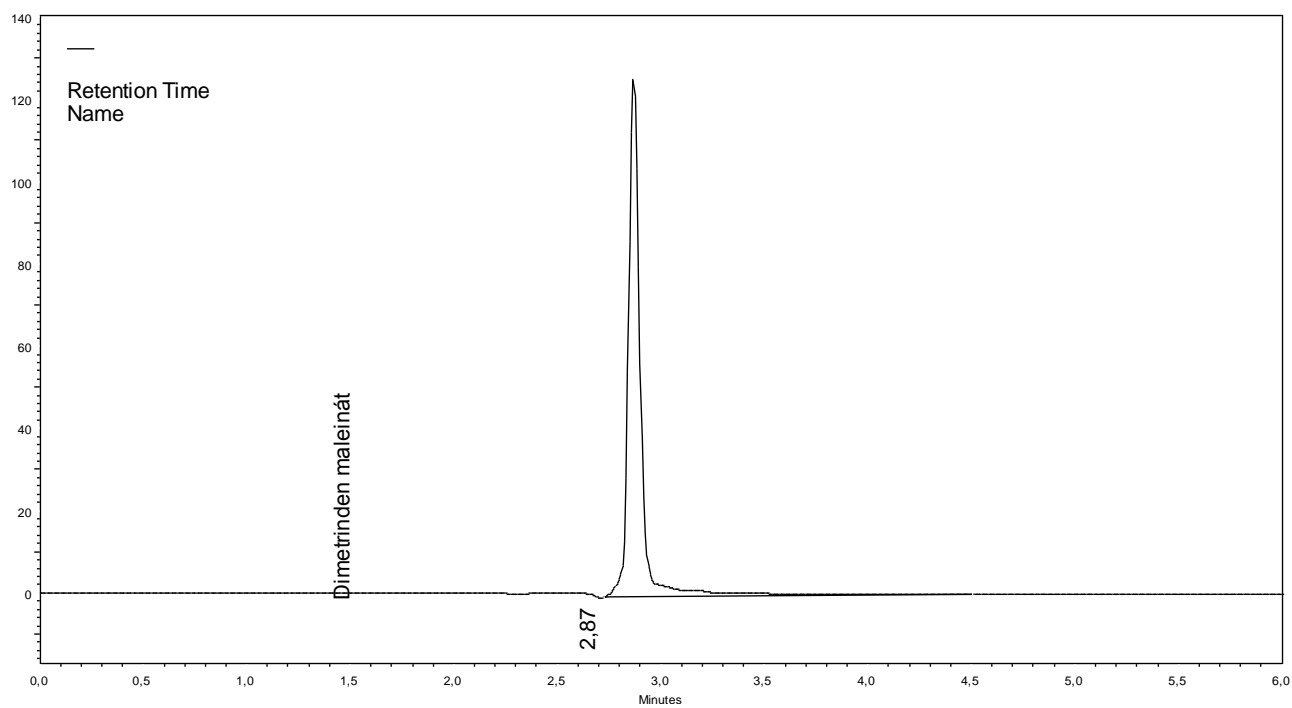
Obr.6.: Supelco Discovery C18 (12,5 cm x 4,6 mm; 5 µm), H₂O:MeOH:H₃PO₄ (110:90:0,6), průtok 1,0 ml/min, nástřik č.2



Obr.7.: Thermo Quest Hypersil Division (250 x 4,6 mm; 5 μ m), H₂O(pH 2,97):MeOH (130:70), prútok 1,0 ml/min



Obr.8.: Agilent Zorbax TMS (250 x 4,6 mm; 5 μ m), H₂O(pH 2,55):MeOH (180:20), prútok 1,0 ml/min

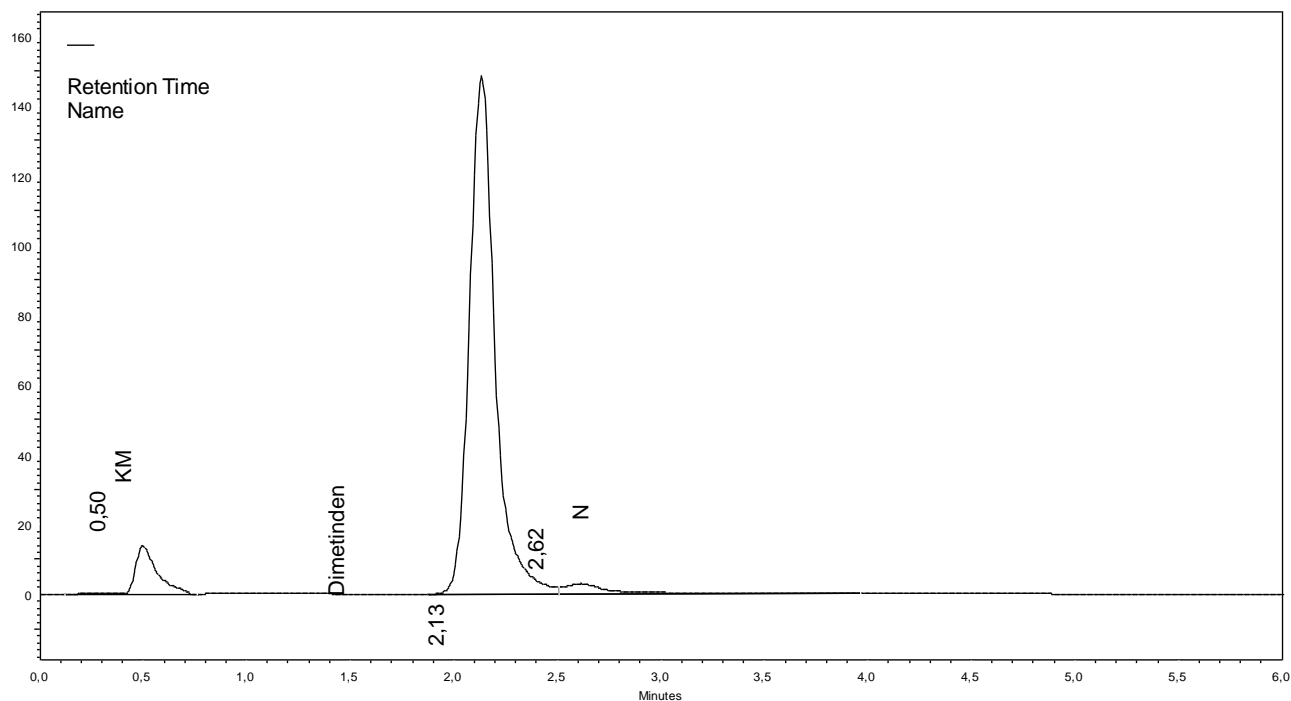


Jako vhodná kolona se jevila kolona Agilent Zorbax TMS (250 x 4,6 mm; 5 µm), která byla nejvíc polární z dosud použitých kolon, ale získané výsledky nebyly reprodukovatelné. Taky orientační hledání vnitřního standardu nebylo úspěšné.

Na základě těchto skutečností nebylo vhodné pokračovat ve vývoji metody pro stanovení dimetinden-maleinátu pomocí HPLC tímto směrem. Proto byla zvolena metoda založená na jiné teorii separace – HILIC.

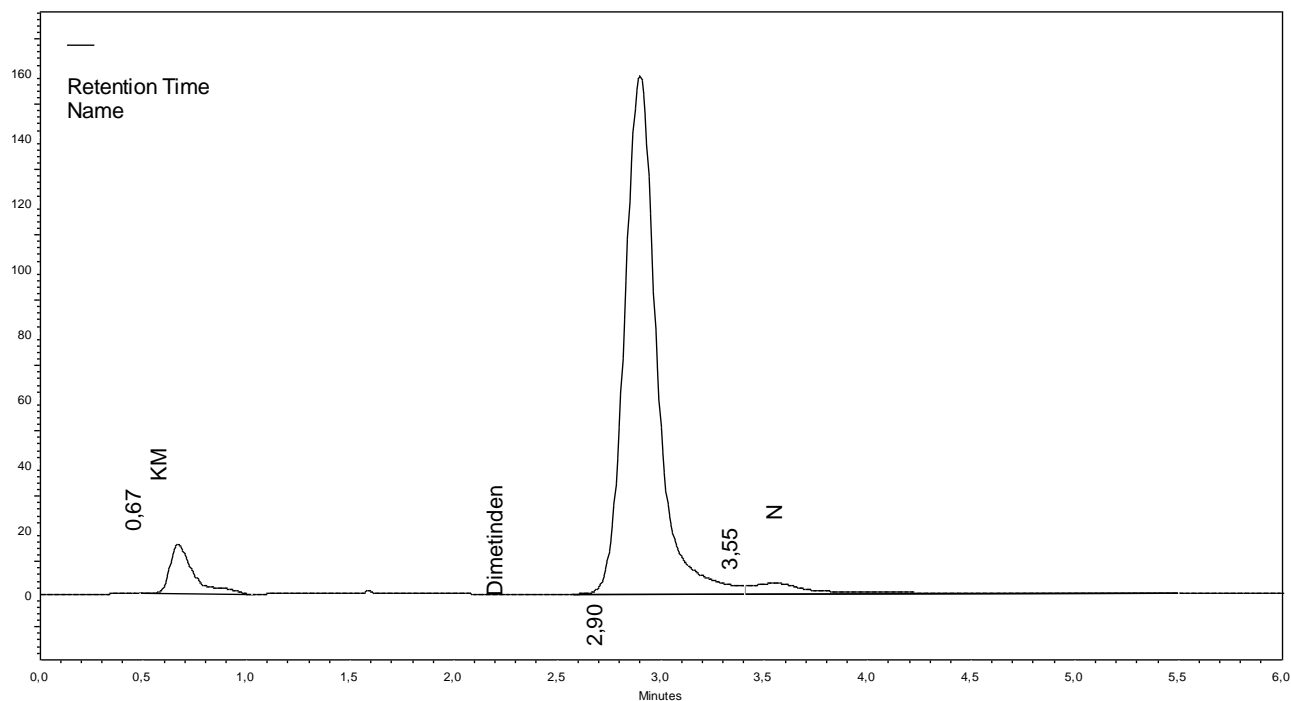
Pro další měření byla použita analytická kolona SeQuant ZICTM Column(50 x 2.1 mm; 5 µm). Musely být proto změněny taky jiné parametry separačního procesu, nastříkovaný objem se snížil na 10 µl, průtoková rychlost byla měněna v rozmezí 0,15 – 0,5 ml/min. Neméně důležitou změnou byla i změna rozpouštědla. Byl připraven nový zásobní roztok standardu dimetinden-maleinátu v acetonitrilu o koncentraci 26,56 mg/100 ml, ze kterého byl desetinásobným zředěním připraven pracovní roztok o koncentraci 2,656 mg/100 ml. Mobilní fáze se skládala z acetonitrilu a vodného roztoku kyseliny octové (25 mM) a octanu amonného (2,5 mM). pH vodného roztoku bylo 3,69. První mobilní fáze byla připravena na základě rešerše a to v poměru 80 : 20 (v/v, nevodná / vodná složka).

Obr.9.: SeQuant ZICTM Column(50 x 2.1 mm; 5 µm), ACN:vodný roztok kyseliny octové(25 mM) a octanu amonného(2,5 mM) (80:20), průtok 0,4 ml/min



Došlo k následujícímu separačnímu procesu: látka dimetinden-maleinát se díky novým chromatografickým podmínkám (charakter stacionární fáze a složení mobilní fáze) neeluovala jako dimetinden-maleinát, ale jako dvě látky – kyselina maleinová a dimetinden (viz. Obr.9). Zvolená průtoková rychlost (0,4 ml/min) nedovolovala dostatečné odlišení píku dimetindenu a přítomné nečistoty (blíže neidentifikovaný rozkladný produkt dimetindenu). Měření bylo zopakováno při nižší PR, konkrétně 0,3 ml/min (viz. Obr.10.).

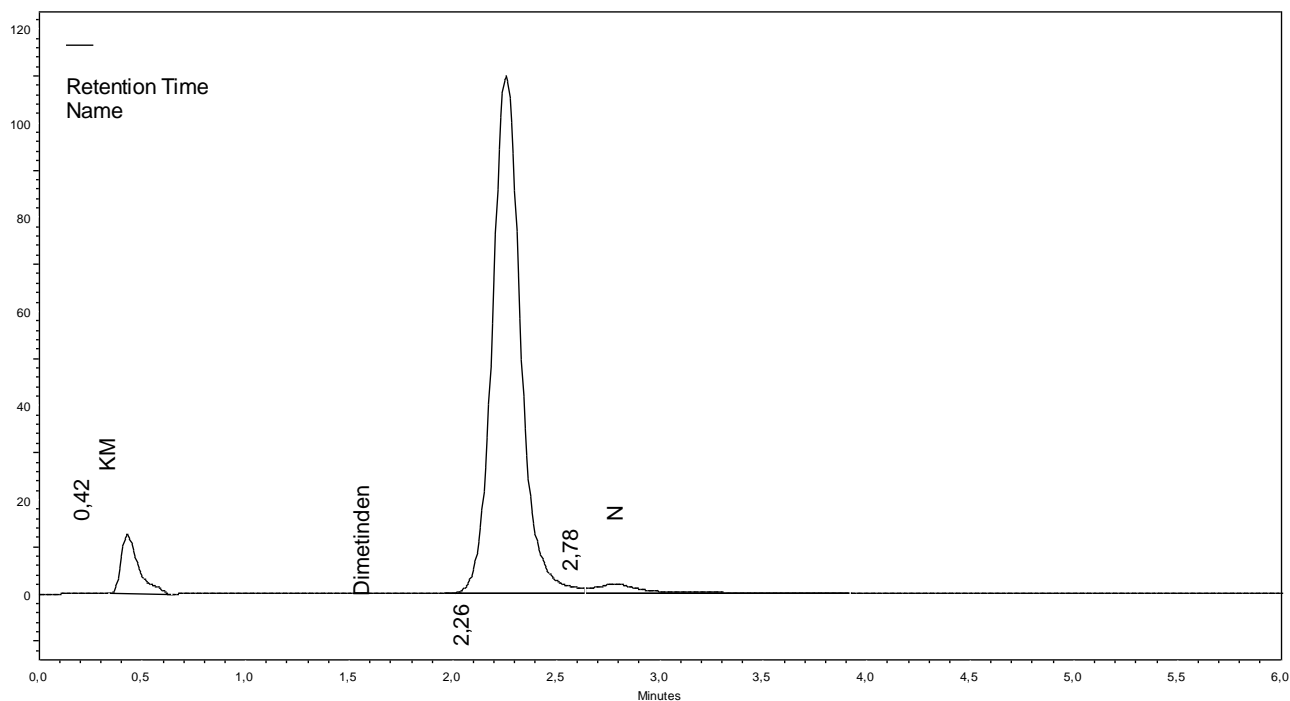
Obr.10.: SeQuant ZICTM Column(50 x 2.1 mm; 5 μm), ACN:vodný roztok kyseliny octové(25 mM) a octanu amonného(2,5 mM) (80:20), průtok 0,3 ml/min



Ani tento zásah nevedl k lepšímu rozlišení píků D a N, a další snižování PR vedlo k nereprodukovatelnosti měření. Proto bylo upraveno složení MF zvýšením podílu acetonitrilu.

Nová mobilní fáze byla připravena v poměru 87,5:12,5 (v/v, nevodná / vodná složka). Teprve toto složení MF vedlo k dostačujícímu separačnímu procesu a rozlišení píků D a N (viz. Obr.11.), bylo zvoleno za optimální a dále využíváno.

Obr.11.: SeQuant ZICTM Column(50 x 2.1 mm; 5 µm), ACN:vodný roztok kyseliny octové(25 mM) a octanu amonného(2,5 mM) (80:20), průtok 0,5 ml/min



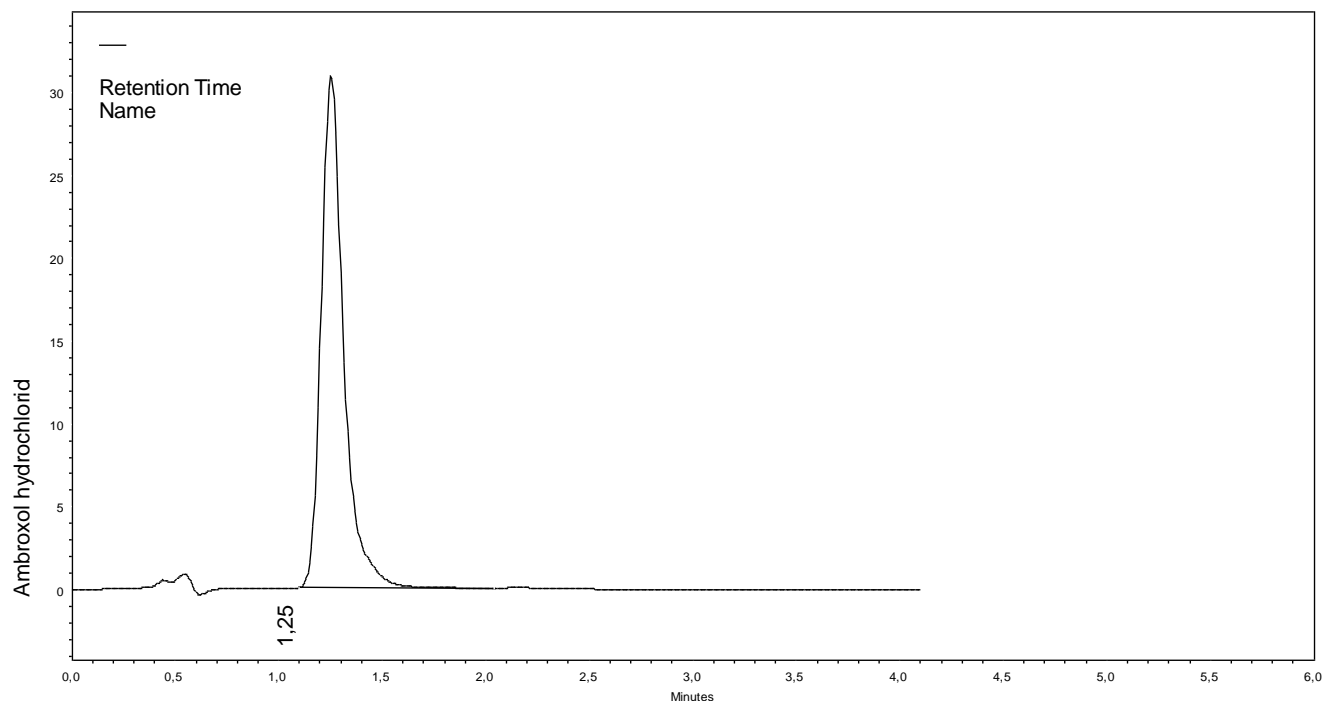
Další zvyšování podílu ACN mělo za následek asymetrii a rozmývání píku.

4.1.3 Hledání vnitřního standardu

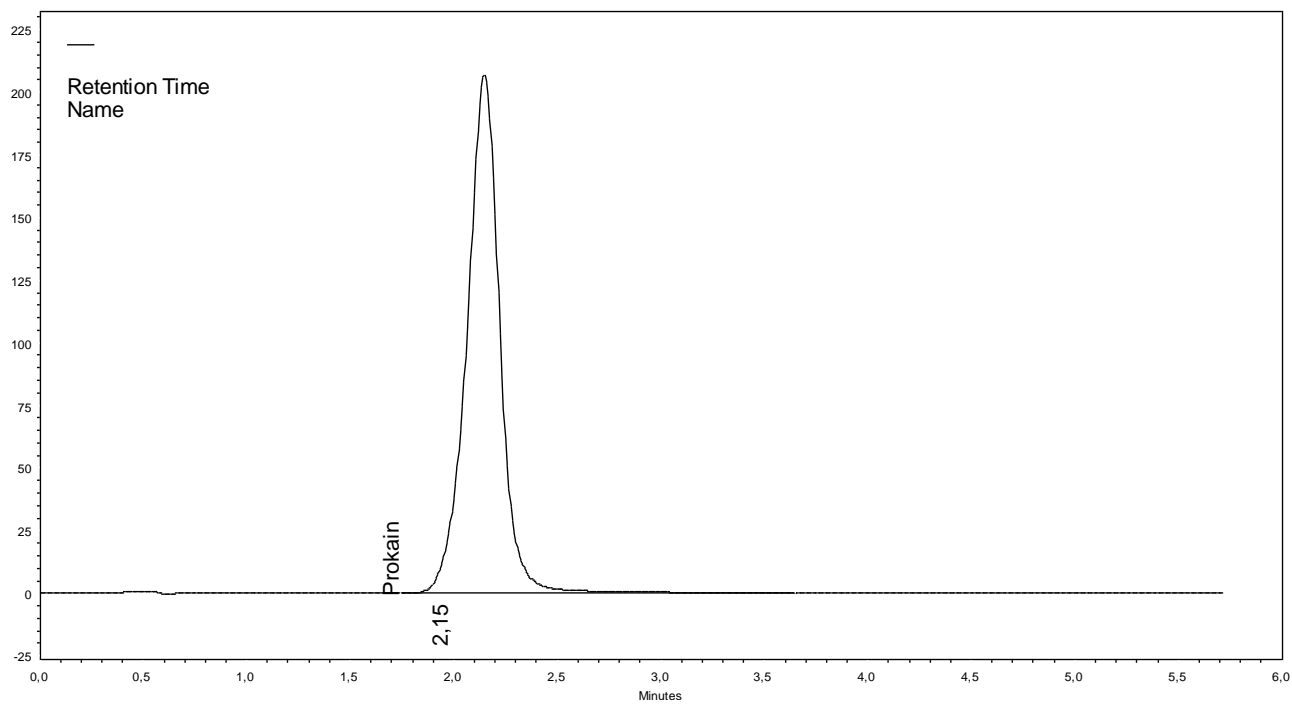
Při hledání IS bylo nutné najít takovou látku, která bude mít podobné retenční vlastnosti jako stanovovaná látka a nebude s ní interferovat.

Při hledání sehrával podstatnou roli i retenční čas této látky. Jelikož se vycházelo z toho, že případné nečistoty v přípravku Fenistil[®] gel budou hydrofilního charakteru, bylo zapotřebí najít látku, která by se eluovala za kyselinou maleinovou a současně před dimetindenem. Při hledání vhodného vnitřního standardu bylo vyzkoušeno několik látek: kyselina gallová, ethylmorfinhydrochlorid, butamirát-citrát, imidazol, ketoprofen, nimesulid, terbinafin hydrochlorid, a mnohé další. Na Obr.12 – Obr.14. jsou uvedeny chromatografické záznamy potenciálních vnitřních standardů.

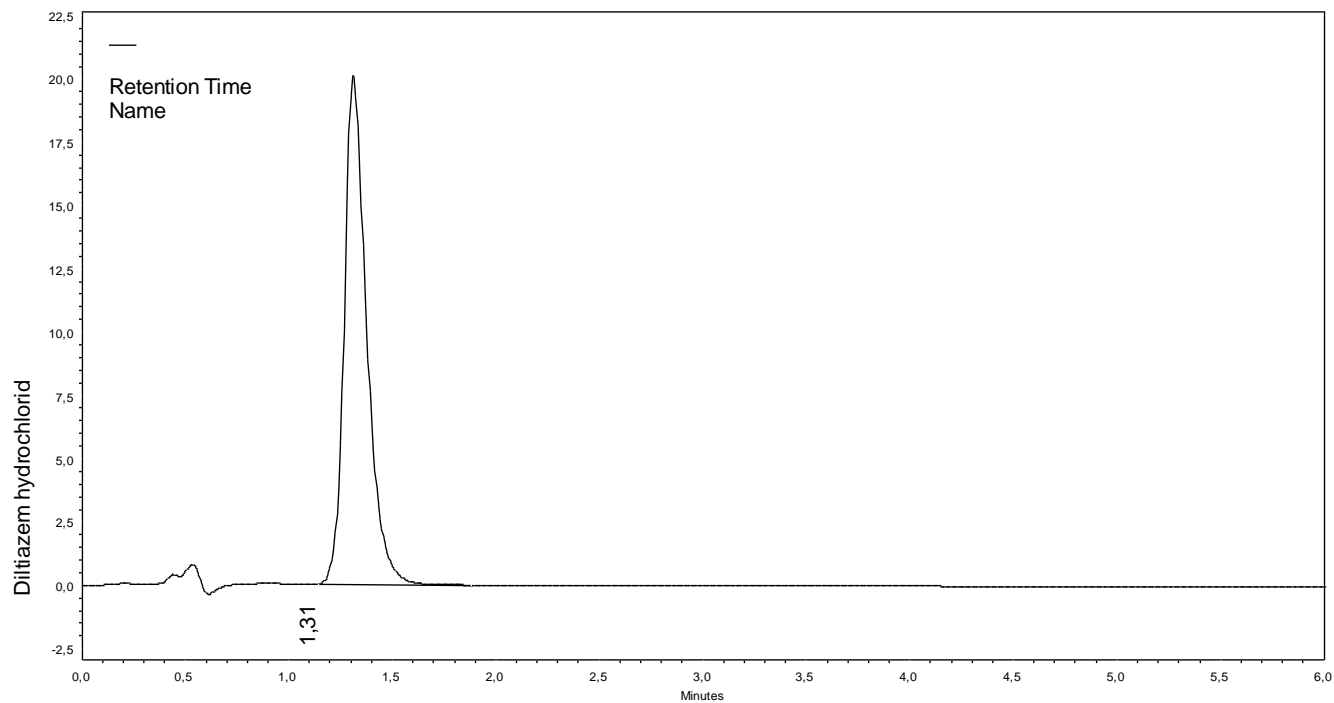
Obr.12.: Chromatografický záznam ambroxol-hydrochloridu



Obr.13.: Chromatografický záznam prokainu

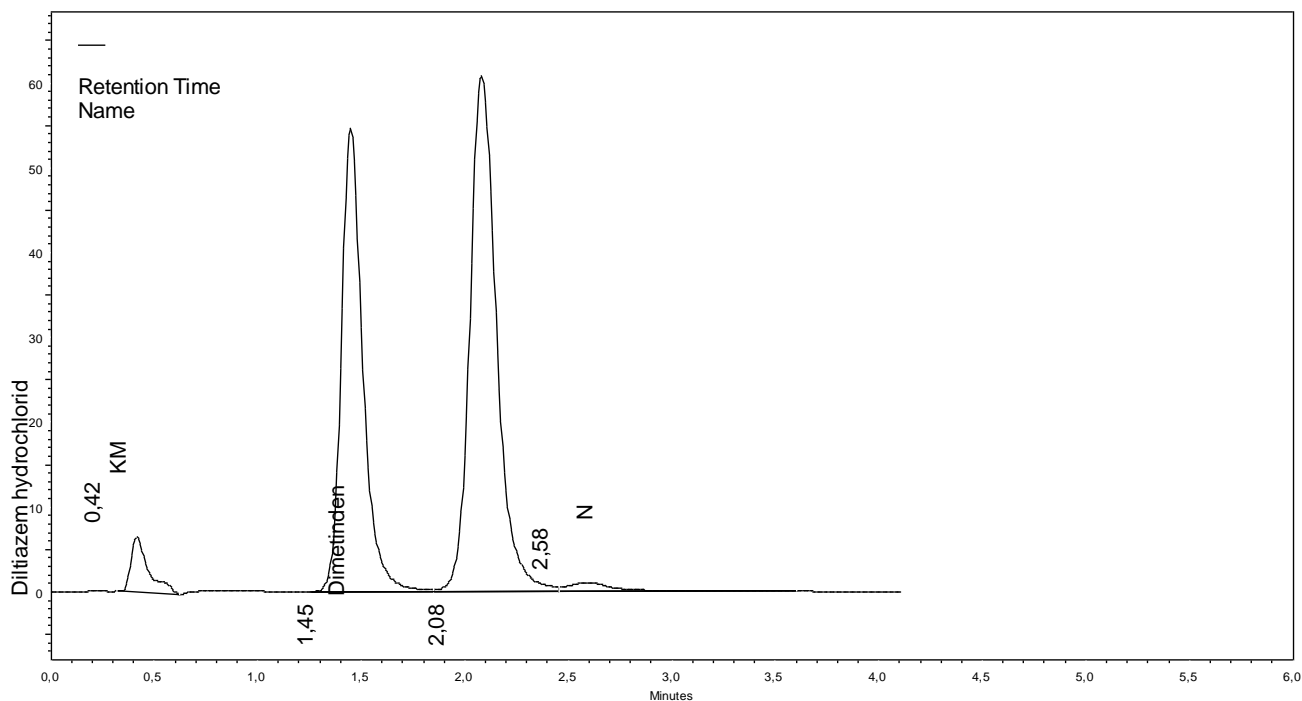


Obr.14.: Chromatografický záznam diltiazem-hydrochloridu



Jako vnitřní standard byla zvolena látka diltiazem-hydrochlorid. Na Obr.15. je uveden chromatografický záznam roztoku standardu a vnitřního standardu.

Obr.15.: Chromatogram standardu a vnitřního standardu



4.1.4 Souhrn optimálních chromatografických podmínek

Mobilní fáze:	acetonitril : vodný roztok kyseliny octové (25 mM) a octanu amonného (2,5 mM), (87,5:12,5)
Analytická kolona:	SeQuant ZIC TM Column(50 x 2.1 mm; 5 µm)
Průtoková rychlost:	0,5 ml/min
Vlnová délka detekce:	258 nm
Vnitřní standard:	Diltiazem-hydrochlorid
Dávkovaný objem:	10 µl
Režim:	izokratický

4.2 Validace metody

Celá validace sestává z testování mnoha parametrů. Z časových důvodů byly testovány jen některé validační parametry.

Byla testována výtěžnost, účinnost kolony, asymetrie chromatografických píků, rozlišení chromatografických píků, opakovatelnost analýzy a linearita. Není-li uvedeno jinak, měření bylo prováděno pomocí acetonitrilového roztoku pro opakovatelnost o koncentraci 2,656 mg/100 ml dimetindenu-maleinátu a 1,0776 mg/ 100 ml diltiazem-hydrochloridu (IS).

4.2.1 Výtěžnost

Účinnost extrakce účinné látky byla testována pomocí parametru výtěžnost. Bylo připraveno šest vzorků, postup přípravy vzorku je popsán v Kap.3.4.1.

Na kolonu byl třikrát nastříknut roztok pro opakovatelnost. Plochy píků odpovídajících látek uvádí Tab.12. Každý ze šesti vzorků připravených z přípravku Fenistil[®] gel byl nastříknut třikrát, zjištěná data jsou v Tab.13. Výtěžnost uvádí Tab.14 a byla vypočtena pomocí vzorce:

$$R_i (\%) = \frac{\frac{A_V}{A_{ISV}} \cdot w_{ST} \cdot 100 \cdot 20}{\frac{A_S}{A_{ISS}} \cdot w_{VZ} \cdot 100}$$

A_V	plocha píku dimetindenu z nástřiku roztoku vzorku
A_{ISV}	plocha píku diltiazem-hydrochloridu z nástřiku roztoku vzorku
A_S	plocha píku dimetindenu z nástřiku roztoku standardů
A_{ISS}	plocha píku diltiazem-hydrochloridu z nástřiku roztoku standardů
w_{ST}	navážka dimetindenu v g
w_{VZ}	navážka vzorku gelu v g

Tab.12.: Roztok standardů

Nástřík	Plocha píku		Průměrná plocha píku	
	Dimetinden	Diltiazem- hydrochlorid	Dimetinden	Diltiazem- hydrochlorid
1	1 178 098	304 025		
2	1 169 233	306 438	1 175 621	305 338
3	1 179 532	305 551		

Tab.13.: Vzorčky

Vzorek	Navážka v g	Plocha píku		Průměrná plocha píku	
		Dimetinden	Diltiazem- hydrochlorid	Dimetinden	Diltiazem- hydrochlorid
1	0,58929	1 674 371	401 536		
		1 692 852	398 999	1 689887	402 290
		1 702 437	406 335		
2	0,65722	1 892 279	403 230		
		1 878 865	404 247	1 884 304	402 860
		1 881 768	401 102		
3	0,531100	1 564 428	406 784		
		1 570 798	406 562	1 560 329	408 337
		1 545 762	411 666		
4	0,535400	1 551 465	403 678		
		1 563 485	405 642	1 555 138	406 976
		1 550 464	411 614		
5	0,633050	1 849 316	406 440		
		1 839 152	407 493	1 846 705	406 446
		1 851 647	405 405		
6	0,63414	1 846 604	406 146		
		1 852 495	407 879	1 850 035	407 948
		1 851 005	409 818		

Tab.14.: Výtěžnost

Vzorek	Výtěžnost R_i (%)
1	98,35
2	98,19
3	99,26
4	98,47
5	99,02
6	98,66
R_p (%)	98,65
s	0,38
s_R (%)	0,38

Požadavek aby $R_p(\%) = 95\% - 105\%$ a $s_R(\%) < 5\%$ byl splněn.

4.2.2 Test vhodnosti HPLC systému

4.2.2.1 Účinnost kolony

Pro výpočet účinnosti byly brány údaje získané jako průměr ze šesti měření. Účinnost kolony byla vyjádřena jako počet teoretických pater N , který byl počítán chromatografickou stanicí Shimadzu CLASS-VP verze 6.12 SP4 podle vzorce uvedeného v Kap.2.5.8. Počet teoretických pater pro dimetinden je $N = 893$ pro retenční čas $t_R = 2,20$ min. Požadavek pro 5 cm dlouhou kolonu je minimálně $N = 900$.

4.2.2.2 Asymetrie chromatografických píků

Asymetrie chromatografických píků T byla vypočtena podle vzorce uvedeného v Kap.2.5.9 a to odečtením z chromatogramů získaných nástřikem roztoku pro opakovatelnost. Výsledky v Tab.15. jsou průměrem ze šesti hodnot.

Tab.15.: Asymetrie chromatografických píků

Název látky	$w_{0,05}$ (min)	f (min)	T
Dimetinden	0,386	0,113	1,71
Diltiazem-hydrochlorid	0,299	0,086	1,74

Asymetrie píků u hodnocených látek byla nižší než maximální povolená hodnota $T = 2$.

4.2.2.3 Rozlišení chromatografických píků

Rozlišení bylo počítáno pomocí chromatografické stanice Shimadzu CLASS-VP, podle vzorce uvedeného v Kap.2.5.10. Výsledky uvedeny v Tab.16. jsou průměrem ze šesti hodnot.

Tab.16.: Rozlišení chromatografických píků

Název látky	R_{ij}
Kyselina maleinová – Diltiazem-hydrochlorid	4,51
Diltiazem-hydrochlorid - Dimetinden	3,23

Hodnoty rozlišení chromatografických píků splňují požadavek $R_{ij} > 1,5$.

4.2.2.4 Opakovatelnost analýzy

Na analytickou kolonu byl šestkrát nastříknut pracovní roztok pro opakovatelnost. Výpočet směrodatné odchylky pro retenční čas a plochu píku byl prováděn pomocí programu Microsoft Excel 2000.

Výsledky jsou uvedeny v Tab.17. a Tab.18.

Tab.17.: Dimetinden – opakovatelnost

Vzorek	Retenční čas	Plocha
1	2,21	1 050 554
2	2,21	1 052 244
3	2,22	1 041 103
4	2,21	1 047 391
5	2,18	1 044 672
6	2,19	1 028 847
průměr	2,20	1 044 135
<i>s</i>	0,02	8 494,30
<i>s_R</i> (%)	0,68	0,81

Tab.18.: Diltiazem-hydrochlorid – opakovatelnost

Vzorek	Retenční čas	Plocha
1	1,27	297 239
2	1,30	299 268
3	1,29	294 800
4	1,28	295 517
5	1,28	300 038
6	1,27	296 592
průměr	1,28	297 242
<i>s</i>	0,01	2 063,19
<i>s_R</i> (%)	0,91	0,69

Při testování opakovatelnosti analýzy se při šestinásobném opakování nástřiku roztoku standardu pohybovala směrodatná odchylka s_R ploch píků a retenčních časů pod 1%.

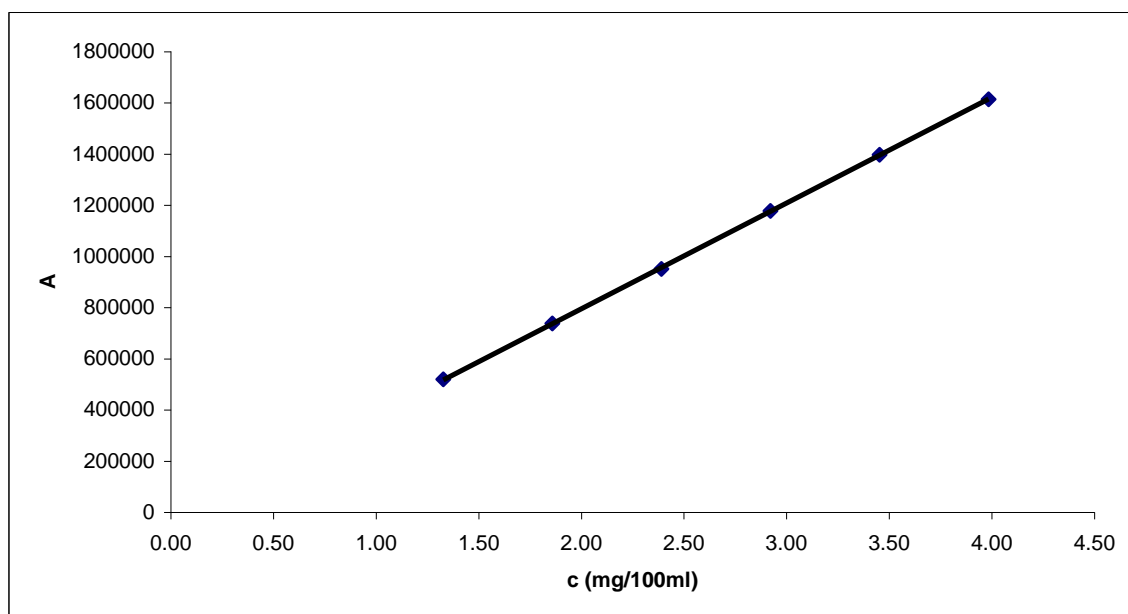
4.2.3 Linearita

Pro hodnocení linearity bylo připraveno šest roztoků pro kalibraci ze zásobního roztoku standardní látky (v rozmezí koncentrace 50 – 150 % koncentrace roztoku získaného extrakcí 0,5 g gelu do 20,00 ml rozpouštědla). Plocha jednotlivých píků je průměrem ze tří měření. V Tab.19. jsou uvedeny použité koncentrace roztoků dimetinden-maleinátu a odpovídající plochy píků. Na Obr.16. je kalibrační křivka a v Tab.20. její parametry vypočtené metodou lineární regrese v programu Microsoft Excel 2000.

Tab.19.

Koncentrace [mg/100 ml]	Plocha	průměrná plocha
1,328	517 647 520 574 519 363	519 195
1,859	733 922 732 911 746 219	737 684
2,390	943 904 949 001 961 092	951 332
2,922	1 166 423 1 177 698 1 191 445	1 178 522
3,453	1 380 428 1 405 970 1 405 750	1 397 383
3,984	1 607 067 1 619 829 1 615 322	1 614 073

Obr.16.: Kalibrační křivka



Tab.20.: Regresní parametry kalibrační křivky dimetinden-maleinátu

Regresní funkce : $y = k x + q$

počet stupňů volnosti ν		
počet bodů n =	6	= 4

Parametry regresní přímky a odhady jejich směrodatných odchylek	
směrnice	$k = 4,131E+5 \pm 1,4E+3$
absolutní člen	$q = -3,08E+4 \pm 3,9E+3$

koeficient korelace	$R = 0,999977$
reziduální odchylka	$s_{rez} = 3,08E+3$

hodnota F-statistiky	$F = 8,88E+4$
-----------------------------	---------------

Závislost y na x byla prokázána se spolehlivostí 99.9 % .

Z výše uvedených údajů vyplývá, že závislost plochy píku na koncentraci stanovované látky je lineární a metoda je použitelná pro kvantitativní analýzu.

5 Závěr

- Byly zpracovány literární údaje týkající se chromatografických metod s důrazem na HPLC s přímou detekcí.
- Byla zpracována rešerše na metody hodnocení dimetinden-maleinátu.
- Byla nalezena optimální vlnová délka pro hodnocení látek $\lambda = 258$ nm.
- Byla nalezena vhodná analytická kolona.
- Pro mobilní fázi bylo nalezeno složení acetonitril : vodný roztok kyseliny octové (25 mM) a octanu amonného (2,5 mM), (87,5:12,5).
- Jako vhodná rychlost průtoku mobilní fáze byla vybrána rychlost $f_m = 0,3$ ml/min.
- Jako vnitřní standard byl zvolen diltiazem-hydrochlorid.
- Při testování způsobilosti chromatografického systému byla zjištěna tato data:
 - Účinnost kolony vyjádřena počtem teoretických pater N byla $N < 900$.
 - Asymetrie píků byla $T < 2,0$.
 - Rozlišení chromatografických píků bylo $R_{ij} > 1,5$.
 - Opakovatelnost analýzy vyjádřena jako směrodatná odchylka byla $s_R < 1,0\%$.
- Linearita byla testována pro koncentrace látek 50 – 150% očekávané koncentrace analyzované látky. Koeficient korelace byl $R > 0,9990$.
- Byl nalezen extrakční postup, který se bude dál využívat při analýze tohoto přípravku.
- Z důvodu nedostatku času a nedostupnosti hlavních nečistot nebyla provedena kompletní validace této metody.

6 *Použitá literatura*

- [1] Mikro-verze AISLP – ČR 2006.1 pro MS Windows
- [2] příbalový leták přípravku Fenistil gel
- [3] Dittrich, M.: Gely-Gelata, In: Doležal, P. a kol.: Technologie přípravy nesterilních léčiv, Karolinum, Praha, 2003, 49-63
- [4] Chalabala, M. et al.: Technologie léků, 2. vydání, Galén, Praha, 2001, 408 S
- [5] Pharmindex Kompendium 2001, MediMedia Information, spol. s r.o., Praha, 2001, 671
- [6] Český lékopis 2005, Grada Publishing, Praha 2005
- [7] Gaier, N., Šedivý, J.: Autakoidy (lokální hormony), In: Lincová, D., Farghali H. et al.: Základní a aplikovaná farmakologie, Galén, Praha, 2002, 285-300
- [8] Klimeš, J. a kol.: Kontrola léčiv II, Karolinum, Praha, 2004
- [9] Klimeš, J. a kol.: Důkazy pomocí chromatografických metod, In: Klimeš, J. a kol.: Kontrola léčiv I, Karolinum, Praha, 2002, 22-40
- [10] Karlíček, R. a kol.: Separační metody, In: Analytická chemie pro farmaceuty, Karolinum, Praha, 2001, 265-281
- [11] SeQuant: A practical guide to HILIC, A tutorial and application book, SeQuant AB, 2005
- [12] www.fda.gov/cder/guidance/cmc3.pdf-04/07
- [13] <http://www.tosohbiosep.com/Products/HPLCColumns/ByMode/-04/07>
- [14] www.diva-portal.org/diva/getDocument?urn_nbn_se_umu_diva-153-1fulltext.pdf-04/07
- [15] <http://www.waters.com/WatersDivision/Contentd.asp?watersit=JDRS-6UUGMP>-04/07
- [16] <http://www.ymc-europe.com/ymceurope/news/HILIC.html>-04/07
- [17] <http://www.wakochem.co.jp/siyaku/info/chromato/pdfapp/Drug/06.htm#marein>-04/07
- [18] http://www.labcompliance.com/methods/meth_val.htm-04/07
- [19] <http://sweb.cz/HPLC/Suma/Validace.htm>-04/07