



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

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Vývoj stability indikující metody pro vybraný přípravek

(stanovení benzylalkoholu ve vaginálním krému pomocí HPLC)

Hradec Králové 2008

Klára Chmurová

vedoucí diplomové práce

PharmDr. Petr Kastner, Ph.D.

Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem, které jsem vypracovala samostatně. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány.

Na tomto místě bych chtěla poděkovat vedoucímu mé diplomové práce PharmDr. Petru Kastnerovi, Ph.D. za odborné vedení, trpělivost a pomoc při vypracovávání i sepisování této diplomové práce. Poděkování dále patří i celému kolektivu katedry farmaceutické chemie a kontroly léčiv za vstřícnost a ochotu pomoci i mimo rámec své vlastní práce.

Obsah

1	Úvod	7
2	Obecná část	9
2.1	Definice a rozdělení chromatografických metod	10
2.2	Obecná teorie chromatografického děje	14
2.2.1	Kvalitativní a kvantitativní analýza HPLC chromatogramu	17
2.3	Vysokoučinná kapalinová chromatografie (HPLC)	18
2.3.1	Instrumentace v HPLC	19
2.3.1.1	<i>Zásobníky mobilní fáze</i>	19
2.3.1.2	<i>Čerpadla mobilní fáze</i>	20
2.3.1.3	<i>Dávkovací zařízení</i>	20
2.3.1.4	<i>Chromatografické kolony a jejich náplně</i>	20
2.3.1.5	<i>Detektory</i>	22
2.3.1.6	<i>Zařízení pro zpracování dat</i>	25
2.4	Validace analytických metod	25
2.5	Benzylalkohol a jeho vlastnosti	27
2.5.1	Vlastnosti benzylalkoholu	27
3	Cíl práce	28
4	Experimentální část	30
4.1	Materiál a pomůcky	31
4.1.1	Chemikálie	31
4.1.2	Sestava pro HPLC	31
4.1.3	Přístroje	31
4.1.4	Další přístroje	32
4.2	Příprava mobilní fáze	32
4.3	Příprava vzorku	33
4.4	Příprava základních roztoků	38
4.4.1	Příprava zásobního, standardního roztoku	38
4.4.2	Příprava pracovních roztoků pro linearitu	38
4.4.3	Příprava pracovních roztoků pro správnost	39
4.4.4	Příprava pracovních roztoků pro opakovatelnost	40
5	Výsledky a diskuze	41
5.1	Chromatografické podmínky	42
5.1.1	Hledání optimální mobilní fáze	42
5.1.2	Hledání optimální úpravy vzorku	42
5.2	Validace metody	45
5.2.1	Linearita	45
5.2.2	Správnost	48
5.2.3	Opakovatelnost	51
5.2.4	Faktor symetrie píku	53
6	Závěr	54
7	Literatura	56
	Souhrn	59
	Abstrakt	60

1 Úvod

Jedním ze základních cílů farmacie je zajistit pacientovi kvalitní, bezpečný a účinný lék v požadovaném množství a v požadované kvalitě. Hodnocení kvality, účinnosti a bezpečnosti léku, resp. léčivého přípravku se ve většině případů opírá o různé analytické metody.

Velmi často používanou analytickou metodou je vysoce účinná kapalinová chromatografie (High Performance Liquid Chromatography, dále jen HPLC). Vzhledem k tomu, že léčivé přípravky jsou zpravidla složeny z různých směsí chemických substancí, je využití HPLC velmi výhodné, protože je možná separace jednotlivých složek léčivého přípravku a tím pádem jejich současná identifikace a kvantifikace.

Tato práce je zaměřena na vývoj stabilitu indikující metody pro hodnocení léčivého přípravku typu krému s antibakteriálním působením. Hlavní účinnou látkou tohoto vaginálního krému je klotrimazol. Jeho rozkladným produktem je imidazol. Jednou z dalších látek, kterou vaginální krém obsahuje, je stanovovaný benzylalkohol.

Benzylalkohol je pomocná látka s vlastním antiseptickým, konzervačním a lokálně anestetickým účinkem.

2 Obecná část

2.1 Definice a rozdělení chromatografických metod

Chromatografické metody jsou vysoce účinné separační metody, umožňující oddělení jednotlivých složek analyzované směsi a zároveň jejich kvalitativní i kvantitativní hodnocení. Jejich přednosti vyniknou především při analýzách směsí látek, kdy ostatní analytické metody, jako např. spektrofotometrické, nelze principiálně použít. Jelikož veškeré technické produkty a velká většina přírodních látek jsou složité směsi, mají chromatografické metody analýzy prvořadý význam. [1]

Základním obecným principem chromatografických metod je nestejněměrné rozdělování složek směsi mezi stacionární a mobilní fázi, přičemž mobilní fáze postupně jednotlivé složky směsi vymývá (eluuje) z fáze stacionární. Předpokladem nestejněměrného rozdělení je různá afinita jednotlivých složek k uvedeným fázím nebo jejich nestejná schopnost difundovat do nich. [2]

Chromatografické metody lze dělit podle:

- podstaty separačního procesu
- použité techniky
- způsobu vyvíjení (uspořádání kolony)
- skupenství nepohyblivé a pohyblivé fáze [1]

Dělení podle podstaty separačního procesu

Jedná se o nejstarší dělení chromatografických metod. Protože však jsou ve skutečnosti velmi časté přechodné typy, jde spíše o seznámení s jednotlivými mechanismy dělení než-li o přísnou a přesnou taxonomii.

Adsorpční chromatografie

K separaci dochází na základě rozdílné adsorpce. Stacionární fáze sorbuje na svůj povrch s různou afinitou látky z fáze mobilní, čímž dochází k jejich vzájemnému dělení. Mobilní fáze může být kapalná nebo plynná, stacionární fáze pak nejčastěji pevná, vzácněji kapalná. Systém plyn - kapalina (pěnová analýza) nemá velký praktický význam, u systému kapalina - kapalina se mnohem více uplatňuje mechanismus rozdělovací chromatografie. [1, 3]

Rozdělovací chromatografie

Látky, rozpuštěné v soustavě dvou kapalin navzájem nemísitelných nebo mísitelných pouze omezeně, se mezi ně dělí podle své rozpustnosti v jednotlivých složkách. Toto rozdělení lze vyjádřit rozdělovací konstantou K_D – poměrem rovnovážných koncentrací téže látky v mobilní a stacionární fázi (abychom totiž dosáhli vzájemného pohybu fází a tedy chromatografického dělení, musí být jedna z nich pevně zakotvena na vhodném nosiči). Vlastní separace konkrétních látek závisí na rozdílu jejich rozdělovacích konstant.

Zpravidla se užívá dvojfázový systém, kdy jedna fáze bývá bohatší na organická rozpouštědla a druhá na vodu, přičemž zakotvena může být fáze vodná, kdy fáze organická je mobilní, i naopak - nasycit hydrofobně impregnovaný nosič organickou fází a fází vodnou volit jako mobilní – v takovém případě hovoříme o systému reversed phase (RP, obrácených fází). Po vnesení roztoku dělené směsi dochází k jejich opakovanému rozdělování mezi stacionární a mobilní fázi. Rozdělovací chromatografii též lze uskutečnit mezi plynnou (mobilní) a kapalnou (stacionární) fází, je-li opět kapalina zakotvena na vhodném nosiči. [1, 4]

Iontově výměnná chromatografie

Na povrchu stacionární fáze (iontoměniče) dochází k elektrostatickým interakcím iontů dělených látek s ionogenními skupinami měniče a výměny iontů. Rychlost výměny závisí na mocenství náboje, velikosti a disociační konstantě iontů. [1, 5]

Gelová chromatografie

Stacionární fáze je pevná, ale pórovitá (nejčastěji je tvořena nabobtnalým gelem), a tyto póry jsou naplněny mobilní fází. K dělení molekul dochází na základě jejich rozdílné velikosti a tvaru - a to sestupně podle molekulové hmotnosti. Největší molekuly se eluují jako první - nevstupují do gelu, vyskytují se tedy pouze v mobilní fázi a jsou jí nejrychleji vymývány. Jako poslední vystupují malé molekuly, které mohou volně pronikat póry do gelu a tak se zpomalovat. [1, 6, 17]

Afinitní chromatografie

Jde o selektivní analýzu, kdy využíváme velmi specifických interakcí (protilátka - antigen, enzym - substrát). Zatímco ostatní sloučeniny projdou kolonou, reagující látka je zachycena na koloně a lze ji následně izolovat. Tato metoda se používá k izolaci biologicky aktivních látek. [2]

Dělení podle pracovní techniky

Frontální chromatografie

Technika spočívá ve stálém přivádění roztoku dělené směsi na kolonu, a to až do ukončení chromatografického procesu. Lze ji využít ke kvalitativnímu (vzdálenost píku) i kvantitativnímu (z derivační křivky) hodnocení. Nevýhodami jsou neschopnost izolovat čisté složky (s výjimkou části první složky) i nutnost složitějšího měřicího zařízení. Metoda má dnes význam již spíše historický, byla vyvinuta pro analytické účely. [2]

Vytěšňovací chromatografie

Vzorek se na kolonu vnese jednorázově, poté se kontinuálně, až do konce celého procesu přivádí roztok látky s vyšší afinitou k stacionární fázi, než mají jednotlivé dělené složky. Dochází tedy k vytěšňování složek vzorku a tyto vycházejí z kolony seřazené vzestupně podle afinity, jako poslední vytéká čisté vytěšňovadlo. Při této metodě opět nedochází k úplnému rozdělení jednotlivých složek směsi. Využití metody je spíše preparativní a poloprovozní než-li analytické. [2]

Eluční chromatografie

Na kolonu se vnese malá část směsi a kolona se kontinuálně promývá mobilní fází, která má k fázi stacionární menší afinitu než kterákoliv ze složek směsi. Dochází k opakovanému ustalování rovnováhy a pohybu složek kolonou. Jednotlivé složky směsi se vymývají vzestupně podle afinity ke stacionární fázi a mohou od sebe být oddělené, což je velkou výhodou pro analytické použití metody - jak kvalitativní, tak kvantitativní. Nevýhodou je vyšší spotřeba rozpouštědel a menší kapacita kolony.

Nejjednodušší variantou eluční chromatografie je prostá (izokratická) eluce - od začátku do konce chromatografie se používá stále stejná mobilní fáze. Tato metoda je vhodná, jestliže se dělené látky příliš neliší v afinitě ke stacionární fázi. Při gradientové eluci se plynule mění složení mobilní fáze tak, aby se zvyšovala jeho eluční síla a tak se zkrátila doba analýzy a zvýšila ostrost píku u látek s vyšší afinitou. [2]

Podle fází

Kapalinová – mobilní fází je kapalina a stacionární fází nemísitelná kapalina nebo pevná látka

Plynová – mobilní fází je plyn, stacionární fází kapalina nebo pevná látka. [1,17]

Podle uspořádání aparatury

Sloupcová (kolonová)

V plošném uspořádání - papírová

- tenkovrstvá [1, 17]

2.2 Obecná teorie chromatografického děje

Chromatografie je proces, při kterém se chromatografovaná látka pohybuje systémem dvou fází - stacionární a mobilní. Chromatografovaná látka je stále rozdělena mezi obě fáze, takže s mobilní fází se pohybuje vždy jen část jejího celkového množství. Vzhledem k toku mobilní fáze probíhá neustálé ustavování rovnováhy. V zóně výskytu dané látky tak lze rozlišit tři oblasti. V přední části zóny je koncentrace látky v mobilní fází vyšší než rovnovážná a dochází k sorpci látky na fázi stacionární. Uprostřed je stav blízký rovnováze a v zadní části zóny dochází k desorpci látky (vzhledem k její vyšší koncentraci ve stacionární fází) a následně jejímu pohybu s mobilní fází, až dosáhne přední části zóny, kde se opět sorbuje. Takto se látka pohybuje kolonou. [2]

V daném chromatografickém procesu má každá látka svůj specifický retenční (eluční) čas t_R nebo retenční objem V_R . Retenční čas je doba od nástřiku vzorku do maxima píku, retenční objem je pak objem mobilní fáze, který proteče kolonou od nástřiku vzorku do eluce maxima píku. Vzájemný vztah lze vyjádřit vztahem:

$$V_R = t_R \cdot v$$

kde v je průtoková rychlost mobilní fáze.

Retenční objem je dán součtem:

$$V_R = V'_R + V_0$$

kde V'_R je skutečný retenční objem a V_0 (mrtvý objem) odpovídá celkovému objemu mobilní fáze od nástřiku až po detektor. U většiny dobře sestrojených přístrojů lze tento objem zanedbat.

Analogický vztah platí i pro retenční čas:

$$t_R = t'_R + t_0$$

kde t'_R je skutečný retenční čas a t_0 je mrtvý čas kolony, tj. čas látky, která se v koloně vůbec nezadržuje.

K charakteristice retence se používá kapacitní faktor k' (též retenční faktor k , hmotnostní distribuční poměr D_m), pro který platí vztahy:

$$k = \frac{V_R - V_0}{V_0} = \frac{V'_R}{V_0} = \frac{t_R - t_0}{t_0} = \frac{t'_R}{t_0}$$

Kapacitní faktor vyjadřuje poměr mezi celkovým množstvím chromatografované látky ve stacionární fázi k celkovému množství této látky ve fázi mobilní. Je přímo úměrný rovnovážnému distribučnímu koeficientu K_C (též distribuční konstanta), který je vyjádřením poměru koncentrací chromatografované látky v obou fázích.

$$k = K_C \frac{V_S}{V_0}$$

kde V_S je objem stacionární fáze a V_M objem mobilní fáze. Kapacitní faktor dovoluje odhadnout eluci látek z kolony v přijatelném čase a retenčním objemu. Za optimální se považuje hodnota k v rozmezí 2 až 5. Hodnotu k lze ovlivnit mnoha způsoby (množstvím stacionární fáze, velikostí pórů, složením mobilní fáze aj.).

K popisu účinnosti separace látek se používá rozlišení R_S . Rozlišením se rozumí rozdíl vzdálenosti dvou píků separovaných látek a platí pro ně vztah:

$$R_S = \frac{1,18(t_2 - t_1)}{w_1 + w_2} \quad (t_2 > t_1)$$

kde $t_{1,2}$ jsou retenční časy píků a $w_{1,2}$ jsou šířky píků v poloviční výšce. Dokonalého rozlišení až na základní linii se dosáhne při hodnotě $R = 1,5$. Rozlišení souvisí s kapacitním poměrem, distribuční konstantou a účinností.

K popisu separační účinnosti kolony se používá počet teoretických pater N , pro který platí:

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

kde se při výpočtu množství teoretických pater používá retenční čas testované látky t_R a šířka píku v polovině jeho výšky w_h . Zdánlivý počet teoretických pater se mění podle stanovované látky, kolony a retenčního času.

Abychom mohli srovnat účinnost různých kolon, používá se výškový ekvivalent patra H dle vztahu:

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

kde L je délka kolony v metrech a N počet teoretických pater.

Výškový ekvivalent teoretického patra závisí na řadě parametrů, důležitá je například průtoková rychlost U , mimokolonový mrtvý objem a objem analyzovaného vzorku. Pro dosažení účinné separace je nutné, aby hodnota ekvivalentu teoretického patra činila 0,01 – 1,00 mm.

Dalším důležitým parametrem je selektivita kolony, tedy míra relativní separace dvou složek směsi.

$$\alpha = \frac{t'_{R2} - t_0}{t'_{R1} - t_0} = \frac{k_2}{k_1}$$

kde t'_{R1} a t'_{R2} jsou retenční časy těchto složek a t_0 mrtvý retenční čas.

Selektivitu v kapalinové chromatografii lze ovlivnit změnou složení nebo pH mobilní fáze, teplotou a také náplní kolony. [8, 9]

Další parametr, důležitý hlavně pro kvantitativní stanovení, je poměr signálu k šumu:

$$S/N = \frac{2H}{h}$$

kde H je výška píku odpovídajícího dané látce na chromatogramu předepsaného porovnávacího roztoku.

h značí absolutní hodnotu největší výchylky signálu šumu od základní linie na chromatogramu kontrolního roztoku získaného při slepé zkoušce a sledovaného v rozsahu úměrném 20–ti násobku šířky píku v polovině jeho výšky na chromatogramu předepsaného porovnávacího roztoku pozorovaného v místě situovaného okolo místa, kde by se tento pík nacházel. [4, 10, 11]

2.2.1 Kvalitativní a kvantitativní analýza HPLC chromatogramu

K analýze chromatografického záznamu slouží chromatografická křivka. Základní *kvalitativní* charakteristikou v HPLC je retenční (eluční) čas t_R , tedy čas od nástřiku vzorku do systému po maximum příslušného chromatografického píku. Důkazem totožnosti je shoda t_R chromatografického píku léčiva v analyzovaném vzorku s t_R píku standardu. Stanovení léčiv za pomoci HPLC může být spojeno se zkouškami na čistotu. Plocha píku, případně jeho výška, je úměrná koncentraci dané látky. Samotné určení obsahu látky ve vzorku se provádí z ploch píků vzorku a standardu. Lze použít metodu vnitřního nebo vnějšího standardu. [12, 17]

Metoda vnějšího standardu

V prvním kroku se na kolonu nastříkne roztok analyzovaného vzorku, v druhém pak vnější standard, a poté porovnáme oba chromatogramy. Jako vnější standard se používá chemická referenční látka - nejčastěji některá z analyzovaných složek. Koncentrace jednotlivých stanovovaných látek směsi se pak vypočítá z poměru plochy (příp. výšky) píku této látky a plochy píku vnějšího standardu. [17]

Metoda vnitřního standardu

Základem je přidavek přesně známého množství standardu (jiné látky s podobnou chemickou strukturou a podobnými fyz. - chem. vlastnostmi) do analyzované směsi před vlastní analýzou. Po důkladném zhomogenizování se vzorek nastříkuje na kolonu. Koncentrace stanovovaných složek se opět vypočítá z poměru ploch (výšek) píků jednotlivých separovaných složek a plochy píku vnitřního standardu. Metoda je méně časově náročná a zároveň přesnější, protože není zatížena chybou dvojího nástřiku. Vnitřní standard musí být eluován v blízkosti hodnocených píků, musí mít podobnou koncentraci jako hodnocené látky a musí být chemicky inertní. Po vyhodnocení ploch píků vypočítáme poměr ploch a sestrojíme kalibrační křivku jako závislost poměru ploch na koncentraci (linearitu odezvy). [17]

2.3 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC)

Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (high performance liquid chromatography – HPLC) je velmi progresivní a oblíbená metoda užívaná ve všech oblastech analýzy, včetně analýzy léčiv. Užívá se ve všech lékopisných monografiích a na rozdíl od plynové chromatografie (gas chromatography – GC) umožňuje snazší analýzu tepelně nestálých nebo netěkavých látek.

Stručná historie

Pojem chromatografie a chromatogram použil jako první na přelomu 19. a 20. století ruský chemik a botanik Cvet, když pomocí skleněné kolonky naplněné uhličitanem vápenatým dokázal rozdělit pigmenty chloroplastů (proto *chromatografie*). Z jeho prací vychází celý obor chromatografie. Přesto k dalšímu využití jeho poznatků došlo až v třicátých letech a v letech čtyřicátých se kapalinová chromatografie rozvinula ve své klasické podobě. Tiselius a Claesson tehdy také rozdělili chromatografické postupy dle provedení na

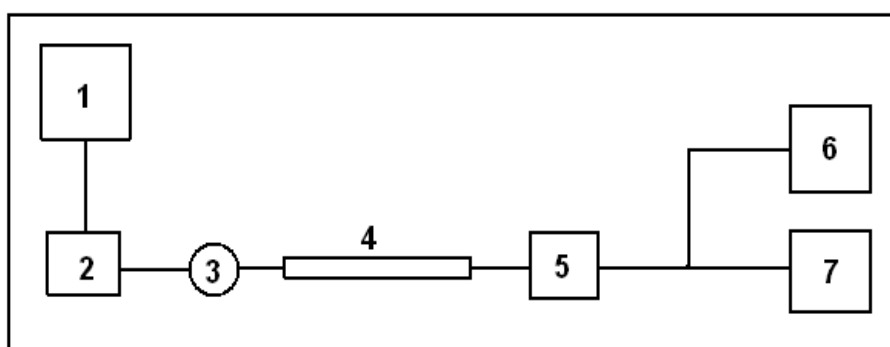
- 1) frontální
- 2) vytěšňovací a
- 3) eluční chromatografii.

V té době Martin a Synge sestrojili extrakční přístroj pro dělení acetylovaných aminokyselin na základě rozdílných rozdělovacích koeficientů mezi vodnou a chloroformovou fází, ale ještě toho roku jej nahradili opravdovou chromatografickou kolonou, naplněnou zrnky silikagelu se zakotvenou vodnou fází. Takto vzniká rozdělovací chromatografie, za jejíž objev obdrželi oba v roce 1952 Nobelovu cenu.

Roku 1952 byla též zavedena gradientová eluce, výrazně rozšiřující možnosti všech kolonových chromatografických metod, roku 1959 je navržena gelová chromatografie, která přichází do praktického užití v šedesátých letech. Dále se rozvíjí instrumentace, na přelomu šedesátých a sedmdesátých let se objevují přístroje pracující s vyššími tlaky, přesnější detektory, v sedmdesátých letech se výrazně zvyšuje účinnost kolon díky plnění mikroparticulárními sorbenty (velikost částic 5 – 10 μm).

2.3.1 Instrumentace v HPLC

Kapalinový chromatograf (viz Obr. 1) se skládá z mnoha částí, které můžeme rozdělit dle jejich funkce na části zajišťující: a.) složení a pohyb mobilní fáze (zásobník(y) mobilní fáze, vysokotlaké čerpadlo, zařízení tvořící gradient v mobilní fázi), b.) dávkování vzorku (dávkovač manuální či automatický), c.) separaci látek (vlastní chromatografická kolona), d.) detekci látek, registraci signálu a vyhodnocení chromatografického záznamu (historicky zapisovač, integrátor, dnes počítač s tiskárnou). [8, 9, 17]



Obr. 1 Blokové schéma kapalinového chromatografu

1-zásobník(y) mobilní fáze; 2-vysokotlaké čerpadlo; 3-dávkovací zařízení;
4-kolona; 5-detektor; 6,7-registrační a vyhodnocovací zařízení

2.3.1.1 Zásobníky mobilní fáze

Mobilní fáze může být vedena buď z jednoho zásobníku rovnou do vysokotlakého čerpadla, nebo lze použít mobilní fáze z více zásobníků, které se mísí ve směšovacím zařízení buď před nebo až za čerpadlem. Zásobníky jsou vyráběny nejčastěji ze skla, plastu (polyethylen, polytetrafluorethylen, polypropylen) nebo nerezové oceli. Mohou být uzavřené víčkem se dvěma vývody - jeden pro přívod helia nebo jiného inertního plynu, druhý pro připojení na vakuovou linku. K vzájemnému propojení chromatografických systémů se používají nejčastěji plastové kapiláry (polyethylen, teflon). [8, 16]

2.3.1.2 Čerpadla mobilní fáze

Kolísání průtoku mobilní fáze významně ovlivňuje přesnost retenčních dat i ploch píků, proto je důležité, aby čerpadlo poskytovalo stabilní, bezpulzní tok mobilní fáze. Měla by být schopna pracovat v relativně širokém rozmezí tlaku i průtokové rychlosti (výstupní tlak na čerpadlech od 1 do 60 MPa, průtoková rychlost v rozmezí 0,1 až 10 ml/min). Důležitá je i reprodukovatelnost průtoku s vysokou přesností. Nejčastěji se používají dvou nebo tří pístová čerpadla využívající princip zpětné vazby - měří se okamžitý tlak a podle něj je regulována frekvence impulzů řídicích chod elektromotoru pumpy. Pro zajištění co nejmenšího kolísání tlaku je zapotřebí dokonalé odplynění mobilní fáze. K tomu se používá probublávání mobilní fáze inertním plynem (heliem nebo dusíkem), vakuum za stálého míchání nebo ultrazvuk. [8, 16]

2.3.1.3 Dávkovací zařízení

Přesnost celé analýzy je mimo jiné závislá na správném dávkování vzorku. Dávkovač je umístěn před vstupem mobilní fáze do kolony. Starší dávkovací zařízení s nástřikem injekční stříkačkou přes septum nebo při zastaveném průtoku mobilní fáze (tzv. stop – flow dávkovače) se již nepoužívají. U moderních přístrojů nalezneme buď smyčkové dávkovače na principu přepínacích ventilů nebo dávkovače automatické. Základem je pevné pouzdro s otočným jádrem a teflonovými kroužky. Injekční stříkačkou se naplní dávkovací kapilára bez přerušení průtoku mobilní fáze a otočením jádra se zařadí do průtoku. Vzorek je vytlačen proudící mobilní fází na chromatografickou kolonu. Dávkovací smyčky umožňují vpravení konstantního objemu do kolony, a tak není nutné odměřovat přesné množství vzorku. [8, 16]

2.3.1.4 Chromatografické kolony a jejich náplně

Chromatografická kolona je trubice (převážně z antikorózní oceli s leštěným vnitřním povrchem) naplněná sorbentem. Do tlaků kolem 20 MPa lze použít i kolony ze speciálně tvrzeného skla, vložených z bezpečnostních důvodů do kovového pouzdra. [19]

Pro analytické účely se používají kolony v délce 5 – 30 cm s vnitřním průměrem 3 – 5 mm. Částice náplně mívají velikost 3 – 10 μm . Díky tomuto zrnění dosahují kolony hodnoty až 5000 nebo 10000 teoretických pater na 10 cm délky. Sorbenty lze rozdělit podle jejich polarit. Základním sorbentem je polární silikagel. Je vhodný pro většinu látek mimo silně bazických, které chemicky reagují s jeho slabě kyselým centrem. Modifikací jeho hydroxylových skupin méně polárními skupinami lze získat sorbenty s nižší polaritou. Středně polární fázi představuje silikagel modifikovaný tříuhlíkatým řetězcem obsahujícím skupinu -CN, -NH₂, -OH. Nepochárním sorbentem je pak silikagel modifikovaný alifatickým řetězcem s 8 nebo 18 uhlíky. Jedná se o tzv. reverzní fáze. Mezi sorbenty nevycházející ze silikagelu patří oxid hlinitý (vhodný pro dělení nepříliš polárních látek lišících se stéricky) a polární oxid hořečnatý. [8, 9, 16, 17]

Pokrokem v analýze léčiv je zavedení monolitických a zirkoniových kolon do praxe. Monolitické kolony nejsou tvořeny částicemi silikagelu, ale jeho monolitem, jehož povrch může být různě modifikován. Výhodou je jejich využití při analýze za použití vyšších tlaků a dokonce i při gradientu tlaků. Zirkoniové kolony jsou tvořeny částicemi oxidu zirkoničitého, jejichž povrch může být také modifikován. Jejich předností je překonání omezení pH hodnot pro silikagel. [16]

Někdy se používá tzv. předkolonka (krátká kolona, často plněná stejným sorbentem jako hlavní kolona). Zapojuje se do systému před hlavní kolonu a slouží k zachycení větší části nečistot při analýze vzorků, kde je velké riziko zanesení kolony nečistotami (např. z neúplně přečištěného biologického materiálu), a prodlužuje tak životnost kolony.

Moderní přístroje umožňují použít při dělení látek i několik kolon najednou. Jde o techniku přepínání spřažených kolon (column switching). Kolony jsou řazeny za sebou a mohou se navzájem lišit náplní i délkou atd. Výhodou je lepší separace látek a zkrácení času analýzy. [19]

2.3.1.5 Detektory

Detektory slouží k identifikaci a případně kvantifikaci látek vycházejících z kolony. Volba detektoru významně ovlivní selektivitu i citlivost stanovení, a proto jsou na detektory kladeny velké nároky:

- vysoká citlivost (dle definice změna signálu detektoru při jednotkové změně koncentrace analytu)
- dostatečně velký poměr mezi šumem a měřenou hodnotou
- reprodukovatelnost a linearita odezvy
- nezávislost odezvy na změně složení mobilní fáze při gradientové eluci
- dobré dynamické vlastnosti (signál detektoru by měl být věrným obrazem časové funkce koncentrace analytu ve vzorku, protože zkreslení koncentračního profilu, rozšíření a deformace zón zhoršují citlivost a spolehlivost měření a rozdělení látek, které bylo dosaženo na koloně) - malá citlivost ke změnám tlaku a rychlosti průtoku mobilní fáze [1, 4, 19]

Detektory lze rozdělit na selektivní a univerzální. U selektivních je signál úměrný koncentraci samotné detekované látky v eluátu, u univerzálních pak některé celkové vlastnosti eluátu, a to jak detekované látky, tak i složek mobilní fáze. [19]

Nejpoužívanějšími jsou fotometrické detektory pracující v ultrafialové nebo viditelné oblasti světelného záření, méně pak detektory fluorimetrické, elektrochemické a refraktometrické, stále častější jsou velmi citlivé, ale drahé a na obsluhu náročné detektory hmotnostní. [19]

Fotometrické detektory

Poskytují vysokou selektivitu i citlivost. Nejčastěji se využívá absorpce v UV spektru. Ve viditelné oblasti většina látek neabsorbují, čehož lze využít pro specifické měření barevných látek nebo látek, jež po přidání činidla selektivně tvoří barevné produkty. Patří sem detektory:

- s jednou pevně nastavenou vlnovou délkou (nejčastěji 254 nebo 280 nm, při kterých absorbují většina léčiv). Mají dvoupaprskové uspořádání a měří rozdíl absorbance mezi měrnou a srovnávací celou. Zdrojem záření bývá nízkotlaká rtuťová výbojka.
- s několika předem nastavenými vlnovými délkami

- s deuteriovou výbojkou (zdrojem polychromatického záření) a monochromátorem. Umožňují pro detekci volit libovolnou vlnovou délku záření (nejčastěji 190 až 400 nm)

- spektrofotometrické detektory s rychlým záznamem spektra bez přerušení chromatografické separace (tzv. photodiode–array detektory). Současným měřením signálu velkým počtem miniaturních fotodiod lze detekovat při několika vlnových délkách najednou, tedy i při vlnové délce odpovídající absorpčnímu maximu každé stanovované látky, čímž se zlepšuje selektivita i citlivost detekce. [1, 17, 19]

Spektrofotometrické detektory jsou nejpoužívanější metodou detekce v HPLC. Jejich výhodou je vysoká selektivita, citlivost, (detekční limit je 10^{-8} až 10^{-10} g/ml), široké rozmezí linearit odezvy a také umožňují volit jako mobilní fázi mnoho různých rozpouštědel, která neabsorbují záření při použité vlnové délce. Při vhodné volbě rozpouštědel umožňují i gradientovou eluci. [1,17]

Fluorimetrické detektory

Fluoreskující látka absorbuje UV záření (zdrojem je v detektoru rtuťová výbojka) a přitom vydává fluorescenční záření o vyšší vlnové délce, než má záření excitační. Toto emitované záření dopadá na elektrický fotonásobič a přemění se na elektrický signál, jehož velikost je úměrná koncentraci látky. U látek bez přirozené fluorescence lze připravit fluoreskující deriváty vhodnou derivatizací. Tyto detektory jsou vysoce selektivní s mezí detekce 10^{-9} až 10^{-15} g/ml. [16, 17, 19]

Elektrochemické detektory

Slouží k detekci látek schopných elektrochemické reakce, tj. oxidačně - redukčních změn, jež probíhají na fázovém rozhraní roztok – elektroda.

Ampérometrické detektory měří proud vyvolaný průchodem redukovatelné nebo oxidovatelné látky průtokovou celou, v níž jsou umístěny elektrody s vloženým pracovním napětím. Používá se dvouelektrodových nebo častěji třielektrodových systémů (skládající se z měrné, srovnávací a pomocné elektrody).

Měrné elektrody ampérometrických detektorů bývají zhotoveny nejčastěji ze skelného uhlíku, grafitových vláken, grafitové pasty nebo kovů. Nevýhodou těchto materiálů je zanášení a postupná dezaktivace jejich povrchu produkty oxidace

a redukce a nečistotami z mobilní fáze, což vyžaduje častou recalibraci detektoru při kvantitativní analýze.

Polarografické detektory pracují se rtuťovou kapkovou elektrodou, u níž se pravidelným odkapáváním obnovuje povrch.

Elektrochemické detektory se vyznačují velmi vysokou citlivostí (detekční limit 10^{-9} až 10^{-11} g/ml) Důležité je však důkladné odplynění mobilní fáze, abychom dosáhli stabilní základní linie a měli tak reprodukovatelné výsledky. I samotná mobilní fáze musí být vodivá, takže tyto detektory nelze použít při chromatografii v systémech s normálními fázemi.

Coulometrické detektory měří náboj potřebný k oxidaci či redukci celkového množství látky při průtoku měrnou celou. Umožňují dosáhnout větší citlivosti detekce než ampérometrické detektory. [16, 19]

Refraktometrické detektory

V kontrole léčiv nemá významné užití. Odezva je zde úměrná rozdílu indexu lomu eluátu v měrné cele a srovnávací kapaliny (samotná mobilní fáze) v referenční cele. Nevýhodou je závislost indexu lomu na teplotě, nižší citlivost (detekční limit 10^{-6} g/ml) a nemožnost použití při gradientové eluci. Užití nalezne nejvíce tehdy, jestliže vzorek neabsorbuje v UV oblasti nebo v této oblasti vykazuje velkou absorpční mobilní fáze. [16, 17, 19]

Hmotnostní detektor

Stále častější je využití spojení HPLC s hmotnostní spektrometrií (MS). Před samotnou detekcí je nejprve zapotřebí odstranit z eluentu mobilní fázi, molekuly léčiva v plynném stavu jsou pak v hmotnostním spektrometru ionizovány (nárazy elektronů, termoionizací či elektroionizací). Nabité částice (molekulární a fragmentární ionty) se v magnetickém nebo vysokofrekvenčním poli separují podle hmotnosti a náboje. Záznam tvoří hmotnostní spektrum (četnost iontů vztažená k poměru hmotnost/počet nábojů). Spojení HPLC - MS je vysoce selektivní, citlivé a poskytuje řadu údajů i pro identifikaci léčiv. Nevýhodou je bohužel hlavně finanční náročnost. [17]

2.3.1.6 Zařízení pro zpracování dat

Dříve se používaly jedno nebo vícekanálové integrátoři vybavené mikroprocesorem. Dnes se k vyhodnocování a dalšímu zpracování chromatografických dat používají v naprosté většině případů počítače vybavené speciálním softwarem. Ten navíc přímo ovládá i pracovní parametry chromatografu (složení a průtok mobilní fáze, teplota na koloně, nastavení detektoru apod.). [19]

2.4 Validace analytických metod

Validace je proces, při kterém se experimentálně zjišťuje a dokládá vhodnost, přesnost a spolehlivost dané analytické metody. Validace a revalidace se provádí u každé analytické metody před jejím uvedením do praxe a při každé změně podmínek nebo postupu dané metodiky. Základním cílem je definovat rozsah, ve kterém bude metoda spolehlivá při dodržení validačních charakteristik. Obecně se stanovují tyto parametry:

správnost, přesnost (opakovatelnost, reprodukovatelnost), selektivita, detekční a kvantitativní limit, rozsah a linearita, robustnost, přičemž není potřeba u každé metody stanovovat všechny parametry. Budou se lišit postupy validace limitních zkoušek, metod pro stanovení hlavní složky přípravku či třeba zkoušky lékové formy.

Správnost

Jde o shodu naměřených výsledků a skutečných hodnot. Tuto je možné zjistit pomocí nezávislé (referenční) metody, analýzou vzorku se známým obsahem nebo metodou standardního přídatku. Lze ji vyjádřit jako rozdíl naměřené a správné hodnoty, nebo jako tzv. výtěžnost (recovery):

$$\frac{\text{Naměřená hodnota} \times 100}{\text{skutečná hodnota}}$$

Přesnost

Přesnost metody je míra shody mezi jednotlivými výsledky, získanými opakovaným měřením homogenního vzorku. Podle podmínek rozeznáváme opakovatelnost a reprodukovatelnost. *Opakovatelnost* je prováděna jedním

analytikem, na jednom přístroji, se stejnými činidly a na jednom homogenním vzorku. *Reprodukovatelnost* (mezilaboratorní zkoušení) je pak měření v různých laboratořích, různými analytiky, na různých přístrojích a za použití různých šarží činidel.

Přesnost se stanoví jako relativní směrodatná odchylka minimálně 9 stanovení v rozsahu metody (např. 3 paralelní stanovení 3 koncentrací vzorku) nebo 6 stanovení jedné koncentrace. Vyjadřuje se chyba celého analytického postupu, tedy každé stanovení se provádí včetně samostatné přípravy vzorku (nestačí tedy stanovit pouze jeden vzorek šesti nástřiky).

Selektivita

Selektivita je schopnost správně a specificky změřit stanovovanou látku v přítomnosti jiných látek - ostatních účinných složek u kombinovaných přípravků, nečistot z výroby, rozkladných produktů nebo jiných, neznámých látek.

Selektivita se vyjadřuje jako rozdíl mezi výsledky analýzy vzorku bez nečistot (pouze stanovované látky) a vzorku s přidanými rozkladnými produkty nebo různými nečistotami. Jsou-li nečistoty nebo rozkladné produkty neznámé nebo nedostupné, je možné selektivitu prokázat jako výtěžnost standardního přídatku čisté látky k materiálu, obsahujícímu stálé množství jiných látek.

Detekční a kvantitativní limit (citlivost metody)

Jedná se o parametry potřebné pro stanovení nečistot. *Detekční limit* se používá pro limitní testy, tj. testy zjišťující, zda je látka nad nebo pod určitou hranicí. Jde o nejnižší detekovatelnou koncentraci látky, nikoliv o stanovení množství látky. *Kvantitativní limit* je pro kvantitativní stanovení obsahu nečistot. Je to nejnižší koncentrace látky, stanovitelná s přijatelnou přesností a správností. Stanovení obou limitů pak závisí na tom, zda jde o metodu instrumentální (limity se zjišťují na základě šumu) nebo neinstrumentální (limity se hledají experimentálně).

Rozsah a linearita

Rozsah je interval mezi dvěma hladinami koncentrace stanovované látky (včetně nich), v němž lze látku stanovit s takovou přesností, správností a linearitou, jak dokládají výsledky validace.

Linearita je pak schopnost dávat výsledky přímo úměrné koncentraci stanovované látky ve vzorku. Tento rozsah se ověřuje experimentálně, a to ověřením přesnosti, správnosti a linearitu pro krajní hodnoty i uvnitř intervalu.

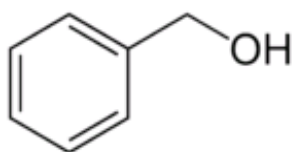
Linearitu analytické metody lze doložit graficky jako závislost výsledků na koncentraci stanovované látky nebo matematicky pomocí výsledků lineární regresní analýzy. Uvádí se korelační faktor (míra linearitu), směrnice (míra citlivosti), úsek (míra vedlejších vlivů) a chyby stanovení všech těchto hodnot.

Robustnost

Jde o schopnost metody dávat správné a přesné výsledky i při menších změnách pracovních podmínek, ke kterým nutně dochází při provádění metody jiným pracovníkem v jiné laboratoři apod., i když popsaný postup zůstává zachován. Znamená míru vlivu proměnných podmínek při provedení metody na její výsledky. [15]

2.5 Benzylalkohol a jeho vlastnosti

Strukturní vzorec:



Sumární vzorec: C₇H₈O

M_R: 108,13 [26]

Chemický název: Benzylalkohol,

Phenylmethanol

2.5.1 Vlastnosti benzylalkoholu

Benzylalkohol je dobře rozpustný v lihu 95% a olejích. V parenterálních přípravcích se používá v množství do 4 % na snížení viskozity olejových roztoků. Má vlastní antiseptický, konzervační a lokálně anestetický účinek. Ulehčuje rozpouštění steroidních hormonů v olejích. Spolehlivě nedráždivé je množství do 2 %, nad 5 % je jednoznačně dráždivý. [26]

3 Cíl práce

Diplomová práce se zabývá stanovením benzylalkoholu v léčivém přípravku pomocí HPLC. Hodnoceným léčivým přípravkem je topický krém Jenamazol 2%.

Bude hledána taková úprava léčivého přípravku a takové chromatografické podmínky, aby při nich bylo možno současně analyzovat jak benzylalkohol tak imidazol, jakožto rozkladný produkt hlavní účinné látky krému (klotrimazol).

Dalším úkolem bude validace metody. Práce bude tímto dále zaměřena na prozkoušení analytických parametrů požadovaných pro validaci metody. Jedná se o přesnost, především z hlediska opakovatelnosti, linearitu, správnost a faktor symetrie píku.

Paralelně bylo pracováno na diplomové práci, která se zabývá hodnocením imidazolu.

4 Experimentální část

4.1 **Materiál a pomůcky**

4.1.1 **Chemikálie**

Methylalkohol p.a., Penta, Chrudim, Česká republika

Kyselina fosforečná 85%, Lachema n.p. Brno, závod Neratovice, Česká republika

Triethylamin, Fluka Chemie GmbH, Steinheim, Německo

Hydrogenfosforečnan didraselný p.a., RNDr. J. Kulich

Sodná sůl kyseliny hexansulfonové, approx. 98%, Sigma - Aldrich, Německo

Voda čištěná reverzní osmózou

Léčivý přípravek použitý pro analýzu: Jenamazol 2% krém, GLO Ostrava, Česká Republika

98,93% roztok benzylalkoholu, šarže č.: 1003005310/2110606

imidazol

placebo

4.1.2 **Sestava pro HPLC**

Schimadzu Corporation, LC - 20, DGU - 20A3

Čerpadlo: LC - 10AD VP Shimadzu

Chromatografická kolona: LiChrosphere RP 18,5 µm, 125 mm x 4,6 mm, SUPELCO, sériové číslo: 03100018, šarže: P325211

UV detektor: SPD - 20A, Schimadzu

PC program: LC Solution, Schimadzu

Autosampler: Schimadzu

Kontrolní jednotka: SCL – 10 A VP, Schimadzu

Termostatické kolony: CTO - 10 AS VP, Scimadzu

Degasser: DGU – 14 A, Schimadzu

4.1.3 **Přístroje**

Digitální váhy, A&D HR 120, Helado s.r.o

Acidimetr 333, Druopta, Praha, Česká republika

Ultrazvuková lázeň K10, Kraittek, Slovensko

Magnetická míchačka, Laboratorní přístroje Praha, Česká republika

Centrifuga: T51, VEB MLW, Engelsdorf, SRN

Mrazicí box, vodní lázeň

4.1.4 **Další pomůcky**

Laboratorní sklo, membránový nylonový filtr 45 µm – Chromafil AO – 45/25, injekční stříkačka, filtrační papír

4.2 **Příprava mobilní fáze**

Optimální složení mobilní fáze pro kolonu LiChrosphere RP 18,5 µm, 125 mm x 4,6 mm, SUPELCO nebylo známo, proto se zkoušela řada mobilních fází, která vyhovovala pro stanovení imidazolu i benzylalkoholu v Jenamazolu 2%.

Mobilní fáze č.1.: methanol : voda 50 : 50 (v/v)

Mobilní fáze č.2.: methanol : pufr (na 250 ml vody přidáno 1,05 ml triethylaminu, pH=7, upraveno 85% H₃PO₄) v poměru 50 : 50 (v/v)

Mobilní fáze č.3.: methanol : pufr (na 250 ml vody přidáno 1,05 ml triethylaminu, pH=12, upraveno 85% H₃PO₄) v poměru 50 : 50 (v/v)

Mobilní fáze č.4.: methanol : pufr (na 250 ml vody přidáno 1,05 ml triethylaminu, pH=4,8, upraveno 85% H₃PO₄) v poměru 50 : 50 (v/v)

Mobilní fáze č.5.: methanol : pufr (na 250 ml vody přidáno 1,05 ml triethylaminu, pH=7, upraveno 85% H₃PO₄) v poměru 40 : 60 (v/v)

Mobilní fáze č.6.: methanol : pufr (na 250 ml vody přidáno 1,05 ml triethylaminu, pH=7, upraveno 85% H₃PO₄) v poměru 30 : 70 (v/v)

Mobilní fáze č.7.: methanol : pufr (na 250 ml vody přidáno 1,05 ml triethylaminu, pH=7, upraveno 85% H₃PO₄) v poměru 20 : 80 (v/v)

Mobilní fáze č.8.: methanol : pufr (na 250 ml vody přidáno 1,05 ml triethylaminu, pH=7, upraveno 85% H₃PO₄) v poměru 15 : 85 (v/v)

Mobilní fáze č.9.: methanol : pufr (na 250 ml vody přidáno 1,05 ml triethylaminu, 0,333g sodné soli kyseliny hexansulfonové, pH=7, upraveno 85% H₃PO₄) v poměru 30:70 (v/v)

Pro validaci byla použita mobilní fáze č.9. Příprava: Nejprve byla připravena vodná fáze. Dle požadovaného množství destilované vody byla do kádinky navážena sodná sůl kyseliny hexansulfonové, přidána voda a odpipetováno ekvivalentní množství triethylaminu (na 250 ml vody přidáno 1,05 ml triethylaminu a 0,333 g sodné soli kyseliny hexansulfonové). Poté byla kádinka postavena na magnetickou míchačku, vnořeno míchadlo a elektrody pH metru. Za soustavného míchání byla pomocí pipetky přidávána 85% kyselina fosforečná až pH roztoku dosáhlo hodnoty 6,9.

Poté bylo pomocí odměrného válce odměřeno příslušné množství metanolu a ve vhodné nádobě smícháno s vodnou fází. Na závěr byla mobilní fáze zbavena mechanických nečistot přefiltrováním za podtlaku pomocí vývěvy přes fritu.

4.3 **Příprava vzorku**

Na základě požadavku stanovit jednou metodou imidazol i benzylalkohol v Jenamazolu 2% musela být nalezena vhodná úprava vzorku.

Úprava vzorku č. 1: do 100ml odměrné baňky bylo pomocí injekční stříkačky a na ní nasazené gumové hadičky naváženo 7,5 g Jenamazolu 2% a methanolem doplněno po značku. Vzorek byl dán na 30 minut na ultrazvuk, vyjmut a na 15 minut umístěn do mrazícího boxu. Poté byla nezakalená část roztoku ihned zfiltrována pomocí injekční stříkačky a membránového filtru do vialky.

Úprava vzorku č. 2: 10 g placebo bylo naváženo do porcelánové třenky, rozetřeno se 100 μ l imidazolu (4 mg/ml) a 7,5 g tohoto vzorku bylo pomocí injekční stříkačky s nasazenou gumovou hadičkou odváženo do 100ml odměrné baňky a methanolem doplněno po rysku. Vzorek byl dán na 30 minut na ultrazvuk, vyjmut a na 15 minut umístěn do mrazícího boxu. Poté byla nezakalená část roztoku ihned zfiltrována pomocí injekční stříkačky a membránového filtru do vialky.

Úprava vzorku č. 3: 10 g placebo bylo naváženo do porcelánové třenky, rozetřeno se 100 μ l imidazolu (4 mg/ml) a 7,5 g tohoto vzorku bylo pomocí injekční stříkačky s nasazenou gumovou hadičkou odváženo do 100ml odměrné baňky a vodou doplněno po rysku. Vzorek byl dán na 30 minut na ultrazvuk,

vyjmut a na 15 minut umístěn do mrazicího boxu. Poté byla nezakalená část roztoku ihned zfiltrována pomocí injekční stříkačky a membránového filtru do vialky.

Úprava vzorku č. 4: 10 g placebo bylo naváženo do porcelánové třenky, rozetřeno se 100 μ l imidazolu (4 mg/ml) a 7,5 g tohoto vzorku bylo pomocí injekční stříkačky s nasazenou gumovou hadičkou odváženo do 100ml odměrné baňky a po rysku doplněno methanolem. Vzorek byl na 15 minut umístěn na ultrazvuk, vyjmut a přemístěn na vodní lázeň o teplotě 60 °C. Zde byl při této teplotě ponechán 15 minut a během této doby 2 krát promíchán. Následovalo ochlazení na pokojovou teplotu. Poté byl vzorek dán do mrazicího boxu na 15 minut a následně ihned zfiltrován pomocí injekční stříkačky a membránového filtru do vialky.

Úprava vzorku č. 5: 5 g placebo bylo naváženo do porcelánové třenky, rozetřeno s 50 μ l imidazolu (4 mg/ml) a 4 g tohoto vzorku bylo pomocí injekční stříkačky s nasazenou gumovou hadičkou odváženo do 50ml odměrné baňky a po rysku doplněno methanolem. Vzorek byl na 15 minut umístěn na ultrazvuk, vyjmut a přemístěn na vodní lázeň o teplotě 60 °C. Zde byl při této teplotě ponechán 15 minut a během této doby dvakrát promíchán. Následovalo ochlazení na pokojovou teplotu. Poté byl vzorek dán do mrazicího boxu na 15 minut a následně ihned zfiltrován pomocí injekční stříkačky a membránového filtru do vialky.

Úprava vzorku č. 6: 2,5 g placebo bylo naváženo do porcelánové třenky, rozetřeno s 25 μ l imidazolu (4 mg/ml) a 1,25 g tohoto vzorku bylo pomocí injekční stříkačky s nasazenou gumovou hadičkou odváženo do 50ml odměrné baňky a po rysku doplněno methanolem. Vzorek byl na 30 minut umístěn na ultrazvuk, vyjmut a přemístěn na vodní lázeň o teplotě 60 °C. Zde byl při této teplotě ponechán 15 minut a během této doby dvakrát promíchán. Následovalo ochlazení na pokojovou teplotu. Poté byl vzorek dán do mrazicího boxu na 15 minut a ihned zfiltrován pomocí injekční stříkačky a membránového filtru do vialky.

Úprava vzorku č. 7: 2,5 g placebo bylo naváženo do porcelánové třenky, rozetřeno s 25 μ l imidazolu (4 mg/ml) a 1,25 g tohoto vzorku bylo pomocí injekční stříkačky s nasazenou gumovou hadičkou odváženo do 50ml odměrné baňky a po rysku doplněno methanolem. Vzorek byl na 30 minut umístěn

na ultrazvuk, vyjmut, přemístěn na 15 minut do mrazícího boxu a poté ihned zfiltrován pomocí injekční stříkačky a membránového filtru do vialky.

Úprava vzorku č. 8: 5 g placebo bylo naváženo do porcelánové třenky, rozetřeno s 50 µl imidazolu (4 mg/ml) a 4 g tohoto vzorku bylo pomocí injekční stříkačky s nasazenou gumovou hadičkou odváženo do 50ml odměrné baňky a po rysku doplněno methanolem. Vzorek byl na 30 minut umístěn na ultrazvuk, vyjmut. Roztok byl nasát do injekční stříkačky a dán na 15 minut do mrazícího boxu. Poté byl roztok ihned zfiltrován do vialky.

Úprava vzorku č. 9: 5 g placebo bylo naváženo do porcelánové třenky, rozetřeno s 50 µl imidazolu (4 mg/ml) a 4 g tohoto vzorku bylo pomocí injekční stříkačky s nasazenou gumovou hadičkou odváženo do 50ml odměrné baňky a po rysku doplněno methanolem. Vzorek byl umístěn na 30 minut na ultrazvuk, vyjmut a na 15 minut přemístěn do mrazícího boxu. Poté následovala ihned filtrace pomocí injekční stříkačky a membránového filtru do vialky.

Úprava vzorku č. 10: 5 g placebo bylo naváženo do porcelánové třenky, rozetřeno s 50 µl imidazolu (4 mg/ml) a 4 g tohoto vzorku bylo pomocí injekční stříkačky s nasazenou gumovou hadičkou odváženo do 50ml odměrné baňky a po rysku doplněno methanolem. Vzorek byl na 15 minut umístěn na ultrazvuk, poté přemístěn do mrazícího boxu na 20 minut a zfiltrován přes membránový filtr pomocí injekční stříkačky. Dále se odebraly 3 ml tohoto filtrátu a bylo přidáno 7 ml fosforečnanového pufru o pH = 6,7. (Příprava pufru: na 250 ml vody bylo přidáno 1,05 ml triethylaminu a za pomoci pH metru a kyseliny fosforečné bylo upraveno pH tohoto roztoku na 6,7.) Tento roztok byl přefiltrován pomocí skládaného filtru. Filtrát byl natáhnut do injekční stříkačky a na 10 minut umístěn na mrazícího boxu. Poté následovala ihned konečná filtrace do vialky pomocí injekční stříkačky a membránového filtru.

Úprava vzorku č. 11: 5 g placebo bylo naváženo do porcelánové třenky, rozetřeno s 50 µl imidazolu (4 mg/ml) a 4 g tohoto vzorku bylo pomocí injekční stříkačky s nasazenou gumovou hadičkou odváženo do 50ml odměrné baňky a po rysku doplněno methanolem. Vzorek byl na 15 minut umístěn na ultrazvuk, poté přemístěn do mrazícího boxu na 15 minut. K 7,5 ml tohoto zmrazeného roztoku bylo přidáno 17,5 ml fosforečnanového pufru o pH = 6,7. (Příprava pufru: na 250 ml vody bylo přidáno 1,05 ml triethylaminu a za pomoci pH metru a kyseliny fosforečné bylo upraveno pH tohoto roztoku na 6,7.) Výsledný roztok byl

zfiltrován přes skládaný filtr. Filtrát byl natáhnut do injekční stříkačky a ihned zfiltrován pomocí membránového filtru do vialky.

Úprava vzorku č. 12: 5 g placebo bylo naváženo do porcelánové třenky, rozetřeno s 50 µl imidazolu (4 mg/ml) a 4 g tohoto vzorku bylo pomocí injekční stříkačky s nasazenou gumovou hadičkou odváženo do 50ml odměrné baňky a k tomu bylo odpipetováno 15 ml methanolu. Vzorek byl dán na 30 minut na ultrazvuk, poté na 15 minut do mrazicího boxu a pak byl dolit do 50 ml fosforečnanovým pufrům o pH = 6,7. (Příprava pufru: na 250 ml vody bylo přidáno 1,05 ml triethylaminu a za pomoci pH metru a kyseliny fosforečné bylo upraveno pH tohoto roztoku na 6,7.) Tento roztok byl zfiltrován přes skládaný filtr. Filtrát byl natáhnut do injekční stříkačky a ihned zfiltrován pomocí membránového filtru do vialky.

Úprava vzorku č. 13: 5 g placebo bylo naváženo do porcelánové třenky, rozetřeno s 50 µl imidazolu (4 mg/ml) a 4 g tohoto vzorku bylo pomocí injekční stříkačky s nasazenou gumovou hadičkou odváženo do 50ml odměrné baňky a k tomu bylo odpipetováno 15 ml methanolu. Vzorek byl dán na 30 minut na ultrazvuk, vyjmut a doplněn do 50 ml fosforečnanovým pufrům o pH = 6,7. (Příprava pufru: na 250 ml vody bylo přidáno 1,05 ml triethylaminu a za pomoci pH metru a kyseliny fosforečné bylo upraveno pH tohoto roztoku na 6,7.) Tento roztok byl zfiltrován přes skládaný filtr. Filtrát byl natáhnut do injekční stříkačky a ihned zfiltrován pomocí membránového filtru do vialky.

Úprava vzorku č. 14: 5 g placebo bylo naváženo do porcelánové třenky, rozetřeno s 50 µl imidazolu (4 mg/ml) a 4 g tohoto vzorku bylo pomocí injekční stříkačky s nasazenou gumovou hadičkou odváženo do 50ml odměrné baňky a k tomu bylo odpipetováno 15 ml metanolu. Vzorek byl umístěn na vodní lázeň o teplotě 50 °C. Zde byl při této teplotě ponechán 10 minut a během této doby dvakrát promíchán. Poté byl vzorek na 15 minut ponechán v ultrazvukové lázni a na dalších 15 minut přesunut do mrazicího boxu a poté doplněn do 50 ml fosforečnanovým pufrům o pH = 6,7. (Příprava pufru: na 250 ml vody bylo přidáno 1,05 ml triethylaminu a za pomoci pH metru a kyseliny fosforečné bylo upraveno pH tohoto roztoku na 6,7.) Tento roztok byl ihned zfiltrován přes skládaný filtr. Filtrát byl natáhnut do injekční stříkačky a ihned zfiltrován pomocí membránového filtru do vialky.

Úprava vzorku č. 15: 5 g placebo bylo naváženo do porcelánové třenky, rozetřeno s 50 µl imidazolu (4 mg/ml) a 4 g tohoto vzorku bylo pomocí injekční stříkačky s nasazenou gumovou hadičkou odváženo do 50ml odměrné baňky a k tomu bylo odpipetováno 15 ml metanolu. Vzorek byl umístěn na vodní lázeň o teplotě 50 °C. Zde byl při této teplotě ponechán 10 minut a během této doby dvakrát promíchán. Dále byl vzorek přemístěn na 15 minut na ultrazvuk. Poté doplněn do 50 ml fosforečnanovým pufrem o pH = 6,7. (Příprava pufru: na 250 ml vody bylo přidáno 1,05 ml triethylaminu a za pomoci pH metru a kyseliny fosforečné bylo upraveno pH tohoto roztoku na 6,7) Poté byl ihned zfiltrován přes skládaný filtr. Filtrát byl natáhnut do injekční stříkačky a ihned zfiltrován pomocí membránového filtru do vialky.

Úprava vzorku č. 16: 5 g placebo bylo naváženo do porcelánové třenky, rozetřeno s 50 µl imidazolu (4 mg/ml) a 4 g tohoto vzorku bylo pomocí injekční stříkačky s nasazenou gumovou hadičkou odváženo do 50ml odměrné baňky a k tomu bylo odpipetováno 15 ml metanolu. Vzorek byl umístěn na vodní lázeň o teplotě 50 °C. Zde byl při této teplotě ponechán 10 minut a během této doby dvakrát promíchán. Dále byl vzorek přemístěn na 15 minut do mrazícího boxu. Poté doplněn do 50 ml fosforečnanovým pufrem o pH = 6,7 (Příprava pufru: na 250 ml vody bylo přidáno 1,05 ml triethylaminu a za pomoci pH metru a kyseliny fosforečné bylo upraveno pH tohoto roztoku na 6,7.) a následně ihned zfiltrován přes skládaný filtr. Filtrát byl natáhnut do injekční stříkačky a ihned zfiltrován pomocí membránového filtru do vialky.

Příprava vzorku pro validaci metody:

Do 50ml odměrné baňky byly naváženy pomocí injekční stříkačky a gumové hadičky 4 g Jenamazolu 2% a k tomu bylo odpipetováno 15 ml metanolu. Vzorek byl umístěn na vodní lázeň o teplotě 50 °C. Zde byl při této teplotě ponechán 10 minut a během této doby dvakrát promíchán. Po ochlazení vzorku na pokojovou teplotu byl doplněn do 50 ml fosforečnanovým pufrem o pH = 6,88. (Příprava pufru: na 250 ml vody bylo přidáno 1,05 ml triethylaminu a za pomoci pH metru a kyseliny fosforečné bylo upraveno pH tohoto roztoku na 6,88.) Vzorek byl následně ihned zfiltrován přes skládaný filtr. Filtrát byl natáhnut do injekční stříkačky a ihned zfiltrován pomocí membránového filtru do vialky.

4.4 **Příprava základních roztoků**

4.4.1 **Příprava zásobního, standardního roztoku**

Jako rozpouštědlo pro zásobní roztok benzylalkoholu nám sloužil methanol, ve kterém je benzylalkohol dobře rozpustný.

Příprava zásobního roztoku: Do 50ml odměrné baňky se zábrusem bylo naváženo přibližně přesně 0,260 g benzylalkoholu a po rysku doplněno methanolem.

Příprava standardního roztoku: Do 50ml odměrné baňky bylo odpipetováno 10 ml zásobního roztoku benzylalkoholu (viz výše), 5 ml methanolu a doplněno po značku 35 ml fosforečnanového pufru. Koncentrace benzylalkoholu je rovna 1,040 mg/ml. Chromatografický záznam viz. Obr. 2

4.4.2 **Příprava pracovních roztoků pro linearitu**

Pro hodnocení linearity bylo připraveno 5 pracovních roztoků.

Pracovní roztoky pro linearitu 1 - 5: roztoky byly připraveny do 50ml odměrných baněk. Roztok příslušné koncentrace byl tvořen zásobním roztokem benzylalkoholu (příprava viz. Kapitola 4.4.1), k tomu bylo přidáno ekvivalentní množství methanolu (koncentrace, množství zásobního roztoku benzylalkoholu a množství methanolu specifikovány v následující tabulce) a po značku doplněno 35 ml fosforečnanovým pufrem (na 250 ml vody bylo přidáno 1,05 ml triethylaminu a na magnetické míchače za pomoci kyseliny fosforečné bylo pH upraveno na 6,88).

Tab. 1 Příprava pracovních roztoků pro linearitu

vzorek č.	koncentrace benzylalkoholu ve vzorku [mg/ml]	množství zásobního roztoku benzylalkoholu [ml]	množství methanolu [ml]
1	0,520	5,0	10,0
2	0,788	7,5	7,5
3	1,040	10,0	5,0
4	1,300	12,5	2,5
5	1,562	15,0	0,0

4.4.3 Příprava pracovních roztoků pro správnost

Pro měření správnosti metody bylo použito 6 rozdílných šarží Jenamazolu 2% a tudíž bylo připraveno 6 roztoků.

Pracovní roztoky pro správnost 1 - 6: Do 50ml odměrné baňky byly naváženy pomocí injekční stříkačky a gumové hadičky přesně asi 4,0000 g Jenamazolu 2% (šarže a navážky specifikovány v následující tabulce) a k tomu bylo odpipetováno 15 ml methanolu. Vzorek byl umístěn na vodní lázeň o teplotě 50 °C. Zde byl při této teplotě ponechán 10 minut a během této doby dvakrát promíchán. Po ochlazení vzorku na pokojovou teplotu byl doplněn do 50 ml fosforečnanovým pufrům o pH = 6,88. (Příprava pufru: na 250 ml vody bylo přidáno 1,05 ml triethylaminu a za pomoci pH metru a kyseliny fosforečné bylo upraveno pH tohoto roztoku na 6,88.) Vzorek byl následně ihned zfiltrován přes skládaný filtr. Filtrát byl natáhnut do injekční stříkačky a zfiltrován pomocí membránového filtru do vialky.

Tab. 2 Příprava pracovních roztoků pro správnost

šarže č.	navážka Jenamazolu 2% [g]
1	3,9844
2	3,9923
3	4,1779
4	4,0902
5	4,0203
6	4,1573

4.4.4 **Příprava pracovních roztoků pro opakovatelnost**

Pro měření opakovatelnosti metody bylo připraveno 6 roztoků jedné šarže Jenamazolu 2%

Pracovní roztoky pro opakovatelnost 1 - 6: Do 50ml odměrné baňky byly naváženy pomocí injekční stříkačky a gumové hadičky přesně asi 4,0000 g Jenamazolu 2% (navážky specifikovány v následující tabulce) a k tomu bylo odpipetováno 15 ml methanolu. Vzorek byl umístěn na vodní lázeň o teplotě 50 °C. Zde byl při této teplotě ponechán 10 minut a během této doby dvakrát promíchán. Po ochlazení vzorku na pokojovou teplotu byl doplněn do 50 ml fosforečnanaovým pufrem o pH = 6,88. (Příprava pufru: na 250 ml vody bylo přidáno 1,05 ml triethylaminu a za pomoci pH metru a kyseliny fosforečné bylo upraveno pH tohoto roztoku na 6,88.) Vzorek byl následně ihned zfiltrován přes skládaný filtr. Filtrát byl natáhnut do injekční stříkačky a zfiltrován pomocí membránového filtru do vialky.

Tab. 3 Příprava pracovních roztoků pro opakovatelnost

vzorek č.	navážka Jenamazolu 2% [g]
1	4,1514
2	4,0697
3	4,1670
4	3,9474
5	4,0232
6	3,9844

5 Výsledky a diskuze

5.1 Chromatografické podmínky

Pro všechny analýzy byla používána výše uvedená chromatografická sestava a kolona typu LiChrospher RP 18,5 μm , 125 mm x 4,6 mm, SUPELCO. Směšování jednotlivých složek mobilní fáze bylo prováděno manuálně. Na čerpadle byl nastaven požadovaný průtok mobilní fáze, jehož hodnota byla při všech měřeních 1 ml/min. Vzorky byly proměřovány při vlnové délce 223 nm (maximum), která byla zjištěna proměřením UV spektra. Nástřiky roztoků vzorků byly prováděny po ustálení chromatografických podmínek. Nástřikovaný objem byl 20 μl .

5.1.1 Hledání optimální mobilní fáze

Cílem optimalizace složení mobilní fáze je získat takovou směs, která by umožňovala dokonalou separaci všech látek obsažených ve vzorku.

Směs methanol : voda se ukázala nevhodná, protože nedocházelo k dokonalé separaci píků. Poté byla testována řada směsí methanol : fosfátový pufr v různých poměrech těchto složek a pH. Tyto úpravy mobilní fáze byly nutné pro stále neuspokojivé píky imidazolu. K výraznému zlepšení elučních vlastností došlo po přidání sodné soli kyseliny hexansulfonové do vodné fáze. Jako nejvhodnější byla vybrána směs methanol : fosfátový pufr (na 250 ml vody 1,05 ml triethylaminu, 0,33 g sodné soli kyseliny hexansulfonové, pH=6,9 upraveno pomocí 85% H_3PO_4) v poměru 30:70. Jednalo se o nalezení optimálního složení mobilní fáze pro dokonalou separaci píku imidazolu. Separace píku benzylalkoholu byla během změn mobilních fází bez problému, vycházel stále uspokojivý pík.

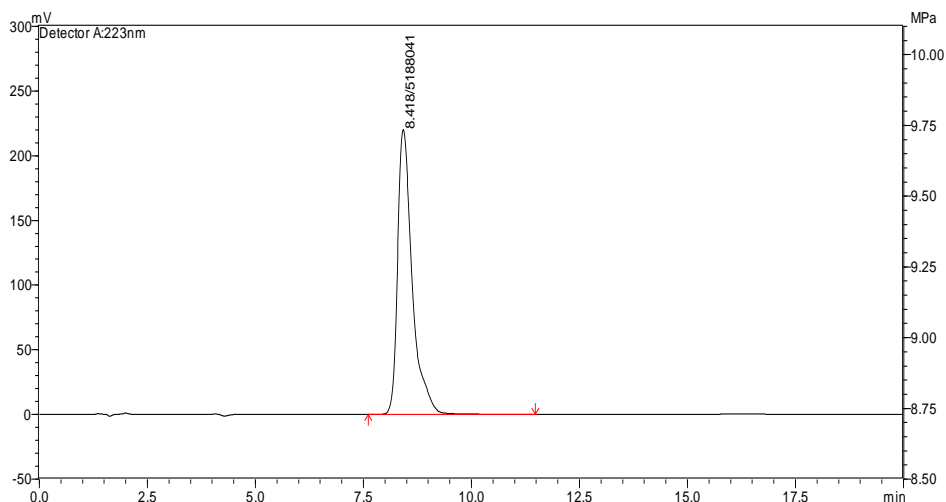
5.1.2 Hledání optimální úpravy vzorku

Cílem optimalizace úpravy vzorku bylo nalézt takový postup, kterým by bylo možno za daných chromatografických podmínek stanovit současně benzylalkohol a imidazol.

Při úpravě vzorku byla vyzkoušena řada postupů a kombinací (volba a množství rozpouštědla, doba ponechání vzorku na ultrazvuku, v mrazícím boxu, ve vodní lázni, způsoby filtrací).

Jako nejvhodnější byla vybrána tato varianta přípravy:

Do 50ml odměrné baňky byly naváženy pomocí injekční stříkačky a gumové hadičky 4 g Jenamazolu 2% a k tomu bylo odpipetováno 15 ml metanolu. Vzorek byl umístěn na vodní lázeň o teplotě 50 °C. Zde byl při této teplotě ponechán 10 minut a během této doby dvakrát promíchán. Po ochlazení vzorku na pokojovou teplotu byl doplněn do 50 ml fosforečnanovým pufrem o pH = 6,88. (Příprava pufru: na 250 ml vody bylo přidáno 1,05 ml triethylaminu a za pomoci pH metru a kyseliny fosforečné bylo upraveno pH tohoto roztoku na 6,88.) Vzorek byl následně zfiltrován přes skládaný filtr. Filtrát byl natáhnut do injekční stříkačky a zfiltrován pomocí membránového filtru do vialky.

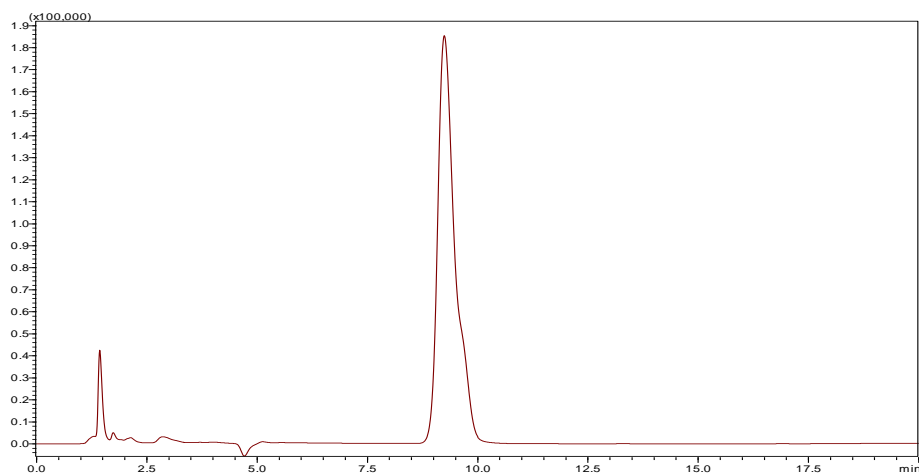


Obr. 2 Chromatografický záznam standardního roztoku benzylalkoholu

Příprava viz. Kapitola 4.4.1

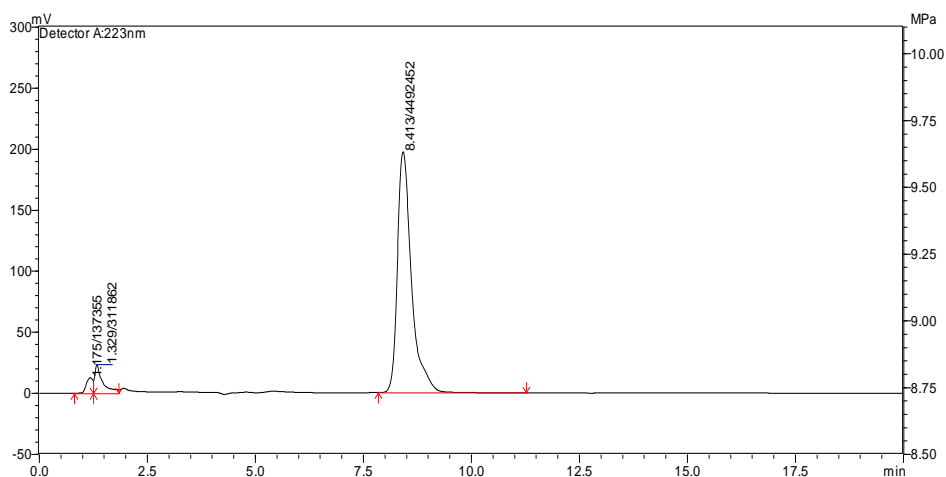
Chromatografické podmínky viz. Kapitola 5.1

Byl připraven i extrakt z placeba (viz. Obr. 3), aby bylo ověřeno, zda se některá analyzovaná látka neeluje v oblasti nečistot, pocházejících z lékové formy. Placebo je krém bez klotrimazolu, bohužel nebyl k dispozici krém bez benzylalkoholu.



Obr. 3 Chromatografický záznam placeba
Chromatografické podmínky viz. Kapitola 5.1

A následně byla provedena i extrakce z krému k ověření, zda lze analýzu použít i u reálného vzorku (viz. Obr. 4)



Obr. 4 Chromatografický záznam reálného krému
Chromatografické podmínky viz. Kapitola 5.1

5.2 Validace metody

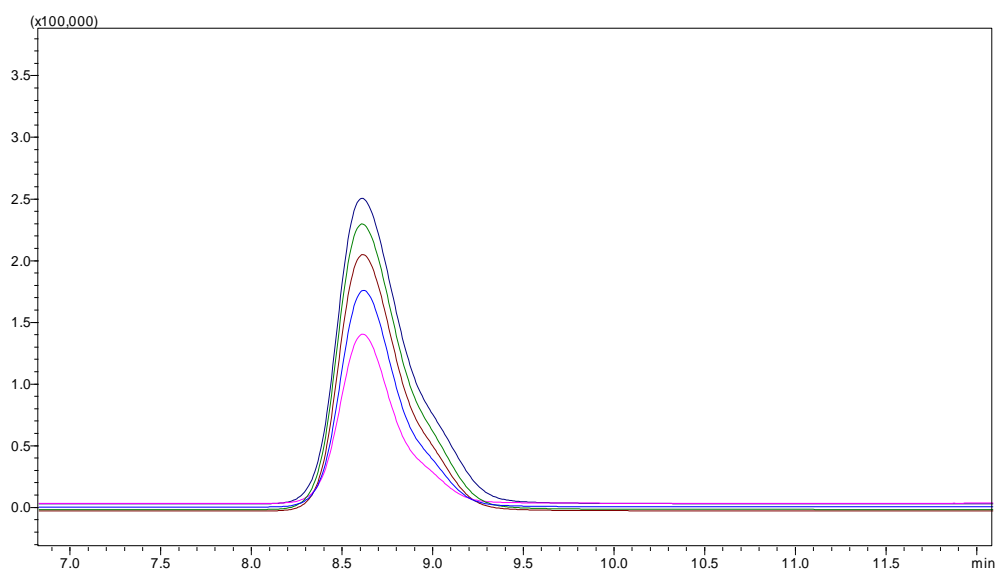
5.2.1 Linearita

V rámci zjištění linearity bylo proměřeno 5 pracovních roztoků pro kalibraci s odstupňovanou koncentrací benzylalkoholu od 50% do 150%, přičemž 100% koncentraci obsahuje standardní roztok.

Byla prokázána lineární závislost pro benzylalkohol v koncentracích od 0,5 mg/ml do 1,5 mg/ml (Obr. 5).

Tab. 4 Linearita, naměřené hodnoty benzylalkoholu

koncentrace benzylalkoholu [mg/ml]	vzorek č./ měření č.	plocha píku benzylalkoholu	průměr ploch píků benzylalkoholu
0,520	1/1	3017776	3028665
	1/2	3039553	
	1/3	3028666	
0,788	2/1	4103794	4052183
	2/2	4000572	
	2/3	4052183	
1,040	3/1	5002535	5002785
	3/2	5003035	
	3/3	5002785	
1,300	4/1	5906513	5939106
	4/2	5971698	
	4/3	5939107	
1,562	5/1	6764599	6826552
	5/2	6888504	
	5/3	6826553	



Obr. 5 Chromatografický záznam pracovních roztoků pro linearitu

Tmavě modrá křivka – koncentrace benzylalkoholu 1,562 mg/ml

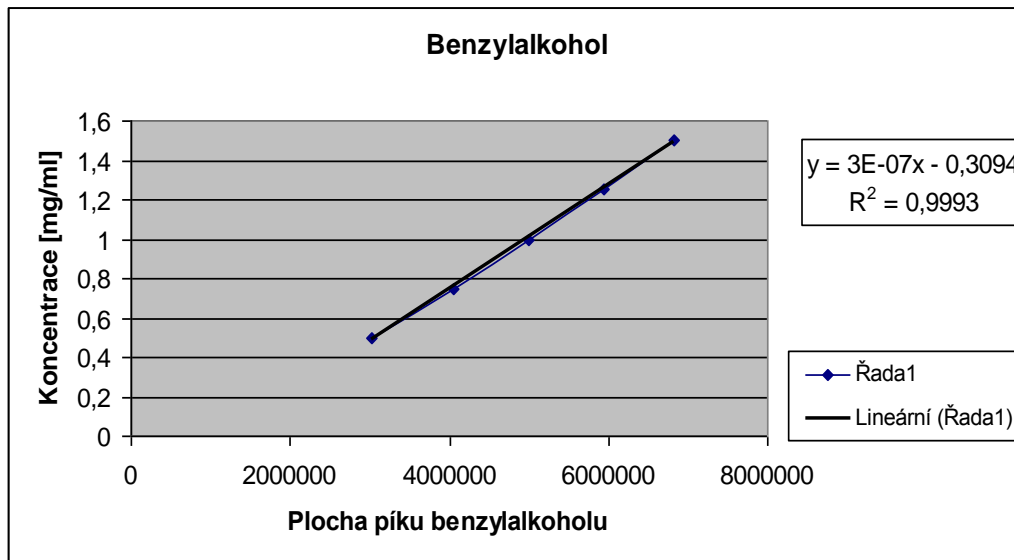
Zelená křivka – koncentrace benzylalkoholu 1,300 mg/ml

Hnědá křivka – koncentrace benzylalkoholu 1,040 mg/ml

Jasně modrá křivka – koncentrace benzylalkoholu 0,788 mg/ml

Růžová křivka – koncentrace benzylalkoholu 0,520 mg/ml

Po vyhodnocení chromatografických záznamů byla sestrojena kalibrační křivka (závislost ploch píku stanovované látky na rostoucí koncentraci stanovované látky), která je v rozmezí stanovovaných koncentrací lineární.



Obr. 6 Linearita benzylalkoholu, lineární regrese

Naměřený korelační faktor linearity (0,9993) vyhovuje normě (min. 0,999).

5.2.2 Správnost

Pro zjištění správnosti metody bylo proměřeno 6 pracovních roztoků pro správnost a standardní roztok. Správnost byla zjištěna na základě nezávislé, referenční metody. Srovnávací metoda je dosud používána při výstupní kontrole přípravku.

Tab. 5 Správnost, naměřené hodnoty benzylalkoholu

navážka vzorku [g]	vzorek č./ měření č.	plocha píku benzylalkoholu	průměr ploch píků benzylalkoholu
3,9844	1/1	4178064	4195783,7
	1/2	4192040	
	1/3	4217247	
3,9923	2/1	4175206	4196490
	2/2	4199881	
	2/3	4214383	
4,1779	3/1	4361334	4364083,3
	3/2	4372829	
	3/3	4358087	
4,0902	4/1	4303329	4303117
	4/2	4300426	
	4/3	4305596	
4,0203	5/1	4256145	4264206,3
	5/2	4250231	
	5/3	4286243	
4,1573	6/1	4405975	4421553,3
	6/2	4426200	
	6/3	4432485	

Tab. 6 Správnost, naměřené hodnoty standardu benzylalkoholu

navážka standardu [g]	Vzorek/číslo měření standardu	plocha píku standardu	průměr ploch píků standardu
0,260	1,2/1	5014043	5068088,8
	1,2/2	5002156	
	1,2/3	5020658	
	1,2/4	5382412	
	1,2/5	4921175	
	3,4/1	4960482	4987208
	3,4/2	4904062	
	3,4/3	4997080	
	5,6/1	5072535	5056303,2
	5,6/2	5043700	
	5,6/3	5053377	
	5,6/4	5059116	
	5,6/5	5052788	

Množství benzylalkoholu v krému Jenamazol 2% [mg/g krému]:

$$g = \frac{\phi A_{vz} \times nav._{st} \times \%_{st} \times 2}{\phi A_{st} \times nav._{vz}}$$

Ø Avz. – průměrná plocha píku benzylalkoholu ve vzorku, Ø Ast.- průměrná plocha píku benzylalkoholu ve standardu, vz. – vzorek, nav. – navážka, St. – standard, %st. – 98,93% roztok benzylalkoholu, 2 – ředění

Tab. 7 Množství benzylalkoholu v krému

vzorek č.	obsah benzylalkoholu ve vzorku [mg/g krému]	obsah benzylalkoholu stanoven referenční metodou [mg/g krému]	výtěžnost (recovery) [%]
1	10,79	10,61	101,70
2	10,78	10,76	100,19
3	10,78	10,74	100,37
4	10,86	10,67	101,78
5	10,8	10,65	101,41
6	10,82	10,66	101,50
průměr	Ø 10,805	Ø 10,68	Ø 101,16
RSD [%]			0,69

$$recovery[\%] = \frac{S_{nam}}{S_{ref}} \times 100$$

S_{nam} : naměřený obsah benzylalkoholu ve vzorku, S_{ref} : obsah benzylalkoholu stanoven referenční metodou

Průměrný obsah benzylalkoholu je 10,805 mg v 1g krému. Tato hodnota vyhovuje normě (9 - 11 mg/g).

Výtěžnost metody je 101,16%. Tato hodnota je přijatelná pro správnost HPLC metody (98,0 - 102,0%). Relativní směrodatná odchylka byla 0,69 % (má být do 2,0 %).

5.2.3 Opakovatelnost

Pro zjištění opakovatelnosti metody bylo proměřeno 6 pracovních roztoků pro opakovatelnost a standardní roztok.

Tab. 8 Opakovatelnost, naměřené hodnoty benzylalkoholu

navážka vzorku [g]	vzorek č./ měření č.	plocha píku benzylalkoholu	průměr ploch píků benzylalkoholu
4,1514	1/1	4403035	4400474,7
	1/2	4394937	
	1/3	4403452	
4,0697	2/1	4343017	4359593
	2/2	4363459	
	2/3	4372303	
4,167	3/1	4575959	4533552,3
	3/2	4508545	
	3/3	4516153	
3,9474	4/1	4292381	4283203,6
	4/2	4282166	
	4/3	4275064	
4,0232	5/1	4453003	4477894,3
	5/2	4488228	
	5./3	4492452	
3,9844	6/1	4486935	4433457,7
	6/2	4406651	
	6/3	4406787	

Tab. 9 Opakovatelnost, naměřené hodnoty standardu benzylalkoholu

navážka standardu [g]	vzorek/číslo plocha píku standardu	plocha píku standardu	průměr ploch píků standardu
0,260	1,2/1	5072535	5056303,2
	1,2/2	5043700	
	1,2/3	5053377	
	1,2/4	5059116	
	1,2/5	5052788	
3,4/1	3,4/1	5119859	5120263
	3,4/2	5120042	
	3,4/3	5120890	
5,6/1	5,6/1	5168026	5182943,6
	5,6/2	5195761	
	5,6/3	5188041	
	5,6/4	5200604	
	5,6/5	5162286	

Množství benzylalkoholu v krému Jenamazol 2% [mg/g krému]:

$$g = \frac{\phi A_{vz} \times nav_{st} \times \%_{st} \times 2}{\phi A_{st} \times nav_{vz}}$$

ϕA_{vz} - průměrná plocha píku benzylalkoholu ve vzorku, ϕA_{st} - průměrná plocha píku benzylalkoholu ve standardu, vz. - vzorek, nav. - navážka, St. - standard, %st - 98,93% roztok benzylalkoholu, 2 - ředění

Tab. 10 Množství benzylalkoholu v krému

vzorek č.	obsah benzylalkoholu ve vzorku [mg/g krému]	relativní směrodatná odchylka
1	10,88	0,2482%
2	10,89	
3	10,93	
4	10,90	
5	11,00	
6	11,00	

Průměrný obsah benzylalkoholu je 10,93 mg/g krému. Hodnota vyhovuje normě (9 - 11 mg/g). Relativní směrodatná odchylka je rovněž v normě (≤ 2).

5.2.4 **Faktor symetrie píku**

Faktor symetrie píku A_s se vypočte ze vzorce:

$$A_s = \frac{w_{0,05}}{2d}$$

$w_{0,05}$ - šířka píku v jedné dvacetině jeho výšky, d - vzdálenost mezi kolmicí spuštěnou z vrcholu píku a vzestupnou částí píku v jedné dvacetině jeho výšky [5]

Faktor symetrie píku benzylalkoholu je roven hodnotě 1,634. Tato hodnota je o něco vyšší než doporučuje PhEur 6.0 (0,8 – 1,5). Na základě validace metody však bylo ověřeno, že naměřená hodnota faktoru symetrie píku nemá vliv na použitelnost metody.

6 Závěr

1. Byly zpracovány literární údaje týkající se hodnocení benzylalkoholu pomocí HPLC a problematiky validace.
2. Byl nalezen vhodný postup pro úpravu krému.
3. Byly nalezeny vhodné chromatografické podmínky. Byla vybrána chromatografická kolona LiChrosphere RP 18,5 μm , 125 mm x 4,6 mm, SUPELCO, která v kombinaci se zvolenou mobilní fází dostatečně separuje benzylalkohol od ostatních složek masti. Mobilní fází byla zvolena směs methanol : fosfátový pufr v poměru 30 : 70. Byla také zjištěna optimální rychlost průtoku mobilní fáze – 1 ml/min. Bylo proměřeno UV – VIS spektrum benzylalkoholu, čímž bylo zjištěno jeho absorpční maximum, tj. 223 nm.
4. Byla prozkoušena linearita metody. Byla prokázána lineární závislost pro benzylalkohol v koncentracích od 0,5 mg/ml do 1,5 mg/ml. Korelační koeficient je 0,9993.
5. Byla prozkoušena správnost metody, která byla srovnána s jinou, již validovanou metodou. Recovery metody činí 101,16%.
6. Byla ověřena přesnost metody, především jako opakovatelnost. RSD je rovna hodnotě 0,25%.
7. Byla zjištěna symetrie píku. U benzylalkoholu je rovna 1,6.

7 Literatura

- [1] Karlíček R. a kol.: Analytická chemie pro farmaceuty, Karolinum, Praha 1998
- [2] Mikeš O.: Základní typy chromatografie. In: Mikeš, O. a kol.: Laboratorní chromatografické metody, SNTL, Praha 1980
- [3] Motl O., Novotný L.: Adsorpční a rozdělovací chromatografie. In: Mikeš O. a kol.: Laboratorní chromatografické metody, SNTL, Praha 1980
- [4] Novák J.: Teorie chromatografie. In: Mikeš O. a kol.: Laboratorní chromatografické metody, SNTL, Praha 1980
- [5] Mikeš O., Štamberg J., Hejtmánek M., Šebesta K.: Iontově výměnná chromatografie. In: Mikeš, O. a kol.: Laboratorní chromatografické metody, SNTL, Praha 1980
- [6] Tomášek V.: Gelová chromatografie. In: Mikeš O. a kol.: Laboratorní chromatografické metody, SNTL, Praha 1980
- [7] Holík M.: Validace analytických metod, Přírodovědecká fakulta Masarykovy university
- [8] Meloun B.: Automatizace a mechanizace kolonových operací v kapalinové chromatografii. In: Mikeš, O. a kol.: Laboratorní chromatografické metody, SNTL, Praha 1980
- [9] Szepezi G.: How to use reverse phase HPLC, VCH Publisher Inc., USA 1992
- [10] Český lékopis 2002 (ČL 2002), Grada, Praha 2002
- [11] Český lékopis 2005 (ČL 2005), Grada, Praha 2005
- [12] Beňo P., Truplová E., Ostrovská V., Stankovičová M.: Stabilita léčiv a liekov, VEDA, Bratislava 2003
- [13] Švihovec J., Sechser T., Fendrich Z., Martínková J.: Chemoterapie mikrobiálních, virových, parazitárních a nádorových onemocnění. Lincová D., Farghali H. et al.: Základní a aplikovaná farmakologie, Galen, Praha 2002
- [14] Věstník SÚKL 1/94, Validace analytických metod v kontrole léčiv
- [15] Turková J.: Afinitní chromatografie. Mikeš O. a kol.: Laboratorní chromatografické metody, SNTL, Praha 1980
- [16] Churáček J., Jandera P.: Úvod do vysokoúčinné kapalinové kolonové chromatografie. SNTL, Praha 1984
- [17] Klimeš J. a kol.: Kontrola léčiv I., Karolinum, Praha 2002

- [18] Klimeš J. a kol.: Kontrola léčiv II., Karolinum, Praha 2004
- [19] Jandera P.: Pokroky v instrumentaci kapalinové chromatografie. Nové trendy v teorii a instrumentaci vybraných analytických metod, Academia, Praha 1993
- [20] Souhrn SPC: 65484, AISLP WIN ČR, datum revize textu 4.05.2005 (č.j. 3288/05 a 3289/05) //2005/05/04/M
- [21] Abdel-Moety, E.M.; Khattab, F.I.; Kelani, K.M.; AbouAl-Alamein A.M.: Chromatographic determination of clotrimazole, ketoconazole and fluconazole in pharmaceutical formulations.: *Il Farmaco* 57, 931-938, 2002
- [22] Solich P., Hájková R., Pospíšilová M., Sícha J.: Determination of methylparaben, propylparaben, clotrimazole and its degradation products in topical cream by RP-HPLC.: *Chromatographia* 56(SUPPL.), 181-184, 2002
- [23] Mei Lin, Nian Wu: Comparison between micellar electrokinetic chromatography and HPLC for the determination of Betamethasone, Dipropionate, Clotrimazole and their related substances.: *J. Pharm. Biomed. Anal* 19, 945-954, 1999
- [24] Tendolkar, N.M., Densai, B.S., Hinde, V.M.: The simultaneous determination of tinidazole and clotrimazole from tablets by RP-HPLC.: *Indian-Drugs*. 31, 551-553, 1994
- [25] Chalabala M. et al.: Technologie léků, GALEN, Praha 2001
- [26] Pharmaceutische Stoffliste 8. Auflage, ABDA, Frankfurt am Main, 1998

Souhrn

Vývoj stability indikující metody pro vybraný přípravek
(stanovení benzylalkoholu ve vaginálním krému pomocí HPLC)

Diplomová práce

Klára Chmurová

Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Katedra
farmaceutické chemie a kontroly léčiv

Byla vyvíjena metoda pro současné stanovení benzylalkoholu a imidazolu jakožto rozkladného produktu hlavní účinné látky krému (klotrimazol). Tato práce je zaměřena na stanovení obsahu benzylalkoholu.

Byla hledána optimální úprava léčivého přípravku – vaginálního krému, optimalizace chromatografických podmínek a následná validace metody za použití vysokoúčinné kapalinové chromatografie. Nejlepších výsledků bylo dosaženo na koloně LiChrosphere RP 18,5 μm , 125 mm x 4,6 mm, SUPELCO, mobilní fáze methanol : pufr (na 250 ml vody přidáno 1,05 ml triethylaminu, 0,333g sodné soli kyseliny hexansulfonové, $\text{pH} = 7$, upraveno 85% H_3PO_4) v poměru 30 : 70 (v/v) při průtokové rychlosti 1 ml/min. K detekci byl použit UV detektor s nastavenou vlnovou délkou 223 nm. Celková doba analýzy byla kratší než 10 minut.

Abstrakt

Development of stability indicating method for chosen preparation(HPLC determination of benzyl alcohol in vaginal cream)

Graduation thesis

Klára Chmurová

Charles University in Prague, Pharmaceutical Faculty in Hradec Králové,
Department of Pharmaceutical Chemistry and Drug Control

The task was to find out a method of simultaneous determination of benzylalcohol and imidazol (decomposition product of main substance of cream – clotrimazole). This thesis is intent on determination of benzylalcohol.

We were looking for proper modification of the pharmaceutical preparation (vaginal cream), then optimisation of chromatographic conditions and validation of this HPLC method also. The best results were obtained with LiChrosphere RP 18,5 μm column (125 mm x 4,6 mm, SUPELCO,), methanol : buffer (solution of 250 ml water, 1,05 ml triethylamine and 0,333g natrium hexasulphonate, pH = 7, set up by 85% H_3PO_4) 30 : 70 (v/v) was used as the mobile phase, flow rate was 1 ml/min. Detection was realised by UV detector with wave length set up on 223 nm. Time of analysis was shorter than 10 min.