

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
Farmaceutická fakulta v Hradci Králové
Katedra farmaceutické chemie a kontroly léčiv

Hodnocení transkarbamu a jeho nečistot pomocí HPLC

RIGORÓZNÍ PRÁCE

Vedoucí rigorózní práce: Doc. RNDr. Jaroslav Sochor, CSc.

Hradec Králové 2005

Mgr. Iveta Matyášová

Děkuji Doc. RNDr. Jaroslavu Sochorovi , CSc. za cenné rady a odborné vedení při zpracování mé rigorózní práce. Dále děkuji všem ostatním pracovníkům katedry farmaceutické chemie a kontroly léčiv za jejich ochotu a vstřícné jednání.

OBSAH

1. ÚVOD	5
2. TEORETICKÁ ČÁST	7
2.1 Chromatografické metody	8
2.1.1 Rozdělení chromatografických metod	8
2.2 Vysokoučinná kapalinová chromatografie	13
2.2.1 Základní pojmy a principy HPLC	13
2.2.2 Hodnocení látek pomocí HPLC	16
2.2.3 Instrumentace v HPLC	17
2.2.3.1 Schéma kapalinového chromatografu	17
2.2.3.2 Zásobníky mobilní fáze	18
2.2.3.3 Vysokotlaká čerpadla a tlumiče pulsů	19
2.2.3.4 Dávkovací systémy	20
2.2.3.5 Chromatografická kolona a její náplně	20
2.2.3.6 Detektory	21
2.2.3.7 Zařízení pro záznam a zpracování dat	24
2.2.4 Validace metody v HPLC	26
2.2.5 Derivatizace v HPLC	32
2.2.5.1 Derivatizace aminosloučenin	33
2.2.6 Topické přípravky a jejich úprava v HPLC	35
2.3 Tenkovrstvá chromatografie (TLC)	36
2.4 Charakteristika transkarbamů	39
2.4.1 Transkarbam 12	39
3. CÍL PRÁCE	41
4. PRAKTICKÉ PROVEDENÍ	43
4.1 Použitý materiál	44
4.2 Úprava vzorků pro HPLC analýzu	46
4.2.1 Derivatizace 3,5-dinitrobenzoylchloridem	46
4.2.2 Roztok dodecylesteru kys. 3,5-dinitrobenzoové	46
4.3 Chromatografické podmínky analýzy	47

5. VÝSLEDKY A DISKUZE	48
5.1 Kvalitativní hodnocení předpokládaných nečistot transkarbamu 12	49
5.1.1 Derivatizace, standardy.....	49
5.1.2 Příprava roztoků standardů před analýzou.....	50
5.1.3 Absorpční maxima derivátů v UV oblasti.....	51
5.1.4 Nástřik standardů pro kvalitativní hodnocení	53
5.2 Kvantitativní hodnocení laurylalkoholu	55
5.2.1 Kalibrace roztoků standardu v derivovaném masťovém základu.....	55
5.2.2 Kalibrace laurylalkoholu derivovaného s masťovým základem I.....	58
5.2.3 Kalibrace laurylalkoholu derivovaného s masťovým základem II.....	61
5.3 Validace chromatografické metody	64
5.3.1 Správnost metody.....	64
5.3.2 Přesnost metody.....	65
5.3.3 Robustnost metody.....	66
5.3.4 Selektivita metody.....	68
5.3.5 Detekční a kvantitativní limit.....	71
6. ZÁVĚR	73
7. LITERATURA	75

1. ÚVOD

Chromatografické metody jsou vysoce účinné separační metody, umožňující kvalitativní i kvantitativní analýzu látek zároveň. Jejich přednosti vyniknou především při analýzách směsí látek, kdy jiné analytické metody (např. spektrofotometrické) nelze principiálně využít. Podstatou chromatografických metod je rozdělování složek směsi mezi dvě fáze důsledkem rozdílných fyzikálně-chemických vlastností jednotlivých sloučenin.

Vysokoúčinná kapalinová chromatografie- High Performance liquid Chromatography (HPLC) patří v současné době mezi nejmodernější a nejprogresivnější separační metody. Předností kapalinové chromatografie je její citlivost, selektivita, rychlost analýzy a minimální množství vzorku potřebné k dané analýze. Výhodou této metody je také možnost kvalitativního a současně i kvantitativního hodnocení látky z jednoho chromatografického záznamu. Pro obsluhu kapalinových chromatografů je podstatným ulehčením práce i možnost plné automatizace. Současné nejmodernější HPLC přístroje, které jsou vybaveny automatickými dávkovači, mohou po vhodném nastavení příslušných parametrů provádět desítky analýz bez obsluhy pracovníka. Pro farmacii je HPLC klíčová analytická metoda, pomocí které můžeme sledovat stabilitu léčiv a vznikající rozkladné produkty, čistotu léčiv a mimo jiné také monitorovat hladinu léčiv a jejich metabolitů v tělních tekutinách.

Ve své rigorózní práci navazuji na kolegyni PharmDr. Michaelu Pošelužnou , která analyzovala transkarbam 12 ¹⁾. Jedná se o novou perspektivní látku ze skupiny akceleračních transdermální penetrace. Transkarbam 12 byl vyvinut na naší fakultě a v současné době je ve fázi intenzivního výzkumu. Mým úkolem bylo současně s transkarbamem 12 analyzovat jeho potenciální nečistotu laurylalkohol a vypracovat metodiku pro analytické hodnocení laurylalkoholu pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie. Pro usnadnění detekce obou výše zmíněných látek bylo nutné využít derivatizaci.

2. TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Chromatografické metody

Chromatografie patří do skupiny metod separačních. Separace je definována jako proces, při kterém se vzorek dělí alespoň na dva podíly odlišného složení. Vzhledem k faktu, že většina přírodních látek se vyskytuje ve směsích a ani produkty syntéz nebývají jednotné, mají tyto metody široké využití.²⁾

Princip chromatografických metod spočívá v dělení analyzovaných látek mezi dvě vzájemně nemísitelné fáze. Jedna z fází je nepohyblivá (stacionární nebo-li sorbent), ta má schopnost různou měrou zadržovat jednotlivé součásti analyzované směsi. Druhá z fází je pohyblivá (mobilní), ta vymývá (eluuje) jednotlivé složky směsi ze stacionární fáze a odnáší je ve směru toku různou rychlostí, čímž dojde k jejich dělení.³⁾

V průběhu chromatografického procesu dochází k postupnému, mnohokrát opakovanému vytváření rovnovážných stavů dělených látek mezi stacionární a mobilní fází. Při styku stacionární i mobilní fáze s dělenými látkami dochází k vzájemným interakcím, které jsou základním předpokladem pro jejich separaci. Vlastní dělení látek v systému závisí na brzdící síle, tj. na retenci ke stacionární fázi. Látky, které interagují silněji se stacionární fází, se pohybují pomaleji než látky, jejichž interakce jsou slabší. Pokud jsou distribuční konstanty separovaných látek dostatečně odlišné, dělí se jejich směs na zóny jednotlivých složek.^{3,4)}

2.1.1 Rozdělení chromatografických metod^{2,5)}

V současné době se používá mnoho typů chromatografických metod, které je možno dělit podle několika kritérií:

- podstaty separačního procesu
- pracovní techniky
- fází, mezi nimiž dochází k separaci
- uspořádání aparatury

Dle podstaty separačního procesu se chromatografické metody dělí na :

- a) adsorpční
- b) rozdělovací
- c) iontově výměnnou

- d) gelovou
- e) afinitní

Adsorpční chromatografie

Dělení látek nastává důsledkem různé adsorpce z pohyblivé fáze na povrch adsorbentu. Dělené látky mohou být buď v plynném stavu nebo v roztoku. Nejstarší a nejobvyklejší je adsorpční chromatografie založená na schopnosti pevné stacionární fáze sorbovat látky z roztoku. Adsorbentem (stacionární fází) bývá nejčastěji oxid hlinitý, oxid hořečnatý, silikagel, aktivní uhlí, práškovaná celulóza, polyamidy. Pohyblivou fází tvoří buďto čistá rozpouštědla sestavená podle eluční schopnosti do tzv. eluotropní řady nebo směsi rozpouštědel.³⁾

Rozdělovací chromatografie

K dělení látek dochází na základě jejich různých rozdělovacích koeficientů. Stacionární fáze je kapalná složka zakotvená na povrchu inertního nosiče. Tím může být silikagel, křemelina, silikáty, hydrofilní gely, celulóza nebo chemicky vázaná organická sloučenina na povrchu pevné fáze. Po vnesení roztoku dělené směsi dochází při průchodu mobilní fáze (organické rozpouštědlo nemísitelné se stacionární fází) k opakovanému rozdělování (extrakci) složek směsi mezi obě kapalně fáze, při plynové chromatografii mezi kapalnou a plynnou fází. Při rozdělovací chromatografii se zpravidla používá dvoufázový systém, přičemž jedna fáze bývá bohatší na organická rozpouštědla a druhá na vodu. Většinou bývá zakotvena vodná fáze, organická fáze bývá mobilní. V některých případech je však výhodnější nasatit hydrofobně impregnovaný nosič organickou fází a vodnou fází volit jako mobilní. Tento typ se velmi často používá v kapalinové chromatografii, jedná se o systém obrácených fází (RP- reversed phase).^{3,5)}

Iontově výměnná chromatografie

Na povrchu stacionární fáze dochází k interakci iontů dělených látek s ionogenními skupinami těchto fází. Ionty vázané na povrchu stacionární fáze se vyměňují na základě náboje, velikosti iontů a disociační konstanty za ionty přítomné v mobilní fází. Podle typu vázaného iontu pak rozlišujeme katexy (kationty) a anexy (anionty).^{3,5)}

Gelová chromatografie

Jedná se o kapalinovou chromatografii, přičemž k dělení látek dochází na základě různé velikosti a tvaru molekul. Stacionární fáze je tvořena nabobtnalým gelem, jehož póry jsou napuštěny stejným rozpouštědlem, které je použito jako mobilní fáze. Směs látek je eluována v pořadí podle klesající molekulové hmotnosti. Složky s vyšší molekulovou hmotností totiž nemohou difundovat do pórů gelu, a proto jsou unášeny mobilní fází rychleji než menší molekuly. ^{3,4,5)}

Afinitní chromatografie

Tato metoda je založena na specifických interakcích charakteristických pro některé biologické a biochemické procesy. Interakce probíhá mezi dvojicemi látek s vysokou selektivitou (např. enzym a jeho inhibitor, antigen a jeho protilátka). ^{2,5)}

Dle pracovní techniky se chromatografické metody dělí na :

- a) frontální
- b) vytěšňovací
- c) eluční

Frontální chromatografie

Tato technika spočívá ve stálém přivádění roztoku dělené směsi v mobilní fázi na kolonu až do konce chromatografického procesu. První vychází z kolony složka s nejmenší afinitou, která je tudíž nejméně bržděna. Frontální technika není vhodná k preparativním účelům, neboť v čisté formě lze izolovat jen složku vycházející první. Byla vyvinuta k účelům analytickým. ⁵⁾

Vytěšňovací chromatografie

Při vytěšňovací chromatografické analýze se vzorek přivádí na kolonu diskontinuálně, jednorázově. Potom se až do konce chromatografického procesu přivádí roztok další látky, která má ke stacionární fázi vyšší afinitu a vytěšňuje dělené složky směsi v pořadí podle vzrůstající afinity k této fázi. Složka, která má nejmenší afinitu ke stacionární fázi, opouští kolonu jako první, poslední vytéká vytěšňovadlo. Tato metoda nemůže vést k úplnému rozdělení složek. Jestliže následující složka má uvolňovat předešlou z interakce se stacionární fází, musí být všechny složky v kontaktu a dochází k částečnému mísení látek. ⁵⁾

Eluční chromatografie

Na chromatografickou kolonu se vnese malá část směsi látek a kolona se promývá mobilní fází, která má ke stacionární fázi menší afinitu než kterákoliv ze složek směsi. Přitom dochází k vývoji a migraci elučních zón jednotlivých složek směsi. Látky jsou z kolony vymývány v pořadí podle velikosti sorpce na stacionární fázi a často od sebe rozděleny mobilní fází. Při izokratické eluci se používá stále stejná mobilní fáze. Tato metoda je vhodná v případech, kdy se dělené látky od sebe příliš neliší v afinitě ke stacionární fázi, takže se eluují brzo po sobě. Gradientová eluce, při které postupně vzrůstá eluční schopnost mobilní fáze, nachází své hlavní uplatnění u analýz, kde se zóny dělených látek vymývají v příliš dlouhých intervalech nebo se vytvářejí příliš široké píky- tzv. chvostování. Princip spočívá v tom, že méně zadržované látky se eluují mobilní fází s nižší eluční silou, zatímco eluce látek se silnou afinitou ke stacionární fázi se urychlí zvýšením eluční síly mobilní fáze v závěru eluce. ^{3,5,6)}

Dle fázi, mezi nimiž dochází k separaci se chromatografické metody dělí na :

- a) kapalinovou
- b) plynovou

Kapalinová chromatografie

Mobilní fází je kapalina, přičemž stacionární fází může být buď pevná látka, nebo kapalina s prvou nemísitelná nebo mísitelná jen omezeně. Podle toho existují podskupiny:

- chromatografie kapalina- pevná látka
- chromatografie kapalina- kapalina

Stacionární kapalná fáze při druhém uspořádání musí být zakotvena na vhodném pevném nosiči.

Plynová chromatografie

Mobilní fází je plyn, stacionární fází může být pevná látka nebo netěkavá kapalina. I plynová chromatografie se dělí na podskupiny:

- chromatografie plyn- pevná látka
- chromatografie plyn- kapalina

Netěkavá kapalina musí být zakotvena na vhodném pevném nosiči.

Dle uspořádání aparatury dělíme chromatografii na:

- a) sloupcovou
 - HPLC (vysokoučinná kapalinová chromatografie)
 - GC (plynová chromatografie)

- b) v plošném uspořádání
 - PC (papírová chromatografie)
 - TLC (chromatografie na tenké vrstvě)

2.2 Vysokoučinná kapalinová chromatografie

2.2.1 Základní pojmy a principy HPLC^{2,7,8)}

Při nástřiku dvojice látek do chromatografické kolony se nejprve vytvoří eluční pás obsahující směs obou látek. Ty jsou potom unášeny mobilní fází a na náplni kolony dochází k separaci. Při průchodu dělené látky kolonou přejde každá molekula vzorku mnohokrát z protékající fáze do sorbentu a zpět. Doba, po kterou separovaná látka setrvá na sorbentu, závisí na velikosti interakcí. Po výstupu látky z kolony indikuje detektor její přítomnost v eluátu a zaznamená eluční pík.

Charakteristickou veličinou pro každou látku v daném chromatografickém systému je **retenční (eluční) čas t_R** nebo **eluční objem V_R** . Eluční čas je doba, která uplyne od nástřiku vzorku po dosažení maxima eluční křivky. Eluční objem je objem mobilní fáze, který proteče soustavou za čas t_R . Obě veličiny spolu souvisejí vztahem:

$$V_R = t_R F_m$$

F_m je objem mobilní fáze, která proteče kolonou za jednotku času (objemová rychlost toku).

Retenční čas se skládá z doby, po kterou je dělená látka unášena mobilní fází (mrtvý čas t_M) a z doby, po kterou je látka zadržena stacionární fází t'_R (redukovaný retenční čas).

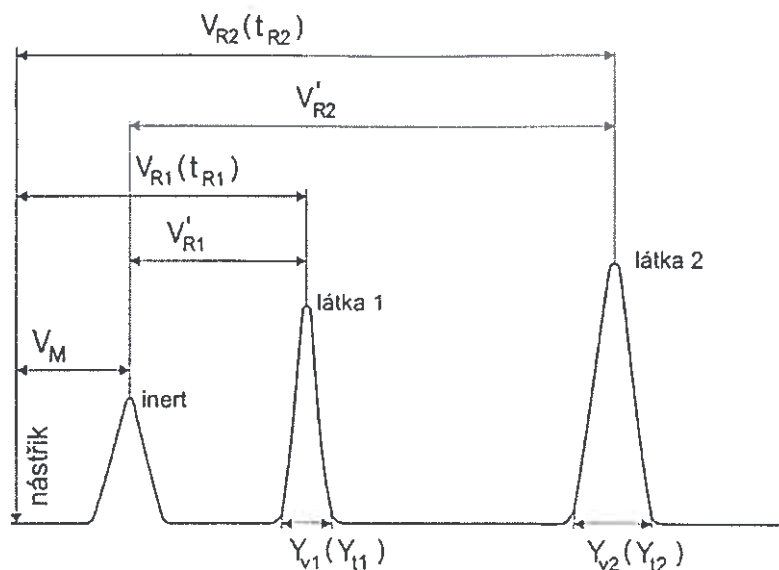
$$t_R = t_M + t'_R$$

Analogicky můžeme tento vztah vyjádřit také podle příslušných elučních objemů.

$$V_R = V_M + V'_R$$

V literatuře se často uvádějí tzv. eluční (retenční) poměry. Jedná se o poměr elučních objemů dvou látek.

$$r_{1,2} = \frac{V'_{R1}}{V'_{R2}}$$



Obrázek 1: Chromatografický záznam dvou látek a nesorbujícího se inertu

K hodnocení účinnosti kolony byly zavedeny pojmy **počet teoretických pater n** a **výškový ekvivalent teoretického patra H** . Počet teoretických pater kolony se zjistí experimentálně dosazením naměřených hodnot do vztahu:

$$n = 5,545 \left(\frac{t_R}{b_{0,5}} \right)^2$$

kde $b_{0,5}$ je šířka píku v polovině jeho výšky. Známe-li tedy počet teoretických pater a celkovou délku kolony L , můžeme zjistit výškový ekvivalent teoretického patra jako :

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

Pro vyjádření účinnosti dělení byla zavedena veličina **rozlišení R_s** . Rozlišení se udává jako rozdíl retenčních časů separovaných látek 1 a 2 dělený průměrnou hodnotou šířky píku v základně (Y_v).

$$R_S = \frac{2(t_{R2} - t_{R1})}{Y_{v1} + Y_{v2}}$$

Pokud vycházíme ze šířky píku v polovině jeho výšky ($b_{0,5}$), můžeme vztah upravit jako :

$$R_S = \frac{1,18(t_{R2} - t_{R1})}{b_{0,5(1)} + b_{0,5(2)}}$$

Další parametry pro posouzení kvality chromatografického záznamu jsou :

Faktor symetrie píku A_S :

$$A_S = \frac{b_{0,05}}{2d}$$

kde $b_{0,05}$ je šířka píku v jedné dvacetině jeho výšky a d je vzdálenost mezi kolmicí spuštěnou z vrcholu píku a vzestupnou částí píku v jedné dvacetině jeho výšky. A_S by měl být v rozsahu 0,80 až 1,50 (ideálně 1,0).

Poměr signálu k šumu S/N :

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

kde H je výška píku odpovídající dané složce a h je absolutní hodnota nejvyšší výchylky signálu šumu od základní linie.

Poměr výšky píku k sedlu p/v :

Jestliže není zcela oddělena nečistota od analyzované látky, lze použít jako kritérium způsobilosti systému poměr výšky píku k sedlu:

$$p/v = \frac{H_p}{H_v}$$

kde H_p je výška píku nečistoty nad extrapolovanou základní linií a H_v je výška nejnižšího bodu křivky oddělující píky nečistoty a analyzované látky (sedlo) nad extrapolovanou základní linií.

2.2.2 Hodnocení látek pomocí HPLC

Ke kvalitativní a kvantitativní analýze slouží chromatografická křivka. Základní kvalitativní charakteristikou v HPLC je retenční (eluční) čas t_R , což je čas od nástřiku vzorku na kolonu k maximu chromatografického píku. Identifikace složek ve vzorku je založena na faktu, že stejné látky mají za stejných chromatografických podmínek shodné retenční časy. Důkazem totožnosti je tedy shoda retenčního času (objemu) chromatografického píku léčiva v analyzovaném vzorku s retenčním časem (objemem) píku standardu. Některé moderní UV detektory umožňují v maximu píku sejmout UV spektrum. Shoda UV spekter vzorku a standardu je identifikační charakteristikou.

Stanovení léčiv metodou HPLC je v řadě lékopisných článků spojeno se zkouškami na čistotu. Plocha pod eluční křivkou, případně výška křivky, je kvantitativním údajem a je tedy úměrná koncentraci separované látky. Na základě zjištěných ploch píků se obsah látky ve vzorku určuje s použitím standardu. Používá se buď metoda vnitřního, nebo vnějšího standardu.^{9,10,11)}

Metoda vnějšího standardu

Spočívá ve dvou krocích, ve dvojitým dávkování. V prvním kroku se na kolonu nastříkne roztok analyzovaného vzorku a po registraci chromatografického záznamu se pak nastříkne roztok vnějšího standardu a opět se registruje jeho chromatogram. Jako vnější standard se používá u substancí tzv. chemická referenční látka, nebo u složených lékových přípravků jedna z analyzovaných složek směsi. Koncentrace stanovovaných složek směsi se pak zjistí porovnáním ploch (výšek) píků jednotlivých stanovovaných látek a plochy píku vnějšího standardu.¹⁰⁾

Metoda vnitřního standardu

Zakládá se na přidavku přesně známého množství standardní látky do analyzované směsi před vlastní analýzou. Po důkladném promíchání se vzorek nastříkuje na kolonu. Koncentrace stanovovaných složek se vypočítá z poměru ploch (výšek) píků jednotlivých separovaných složek a plochy píku vnitřního standardu. Protože standard a vzorek jsou při

současném chromatografování vystaveny stejným vlivům, dochází tím k eliminaci chyby dvojího nástřiku. Metoda vnitřního standardu je méně časově náročná a hlavně přesnější. Vnitřní standard však musí být eluován v blízkosti píků, které budou vyhodnocovány, musí mít podobnou koncentraci jako hodnocené látky a musí být chemicky inertní. Po vyhodnocení ploch píků vypočítáme poměr ploch a sestojíme kalibrační křivku jako závislost poměru ploch na koncentraci.^{10,11)}

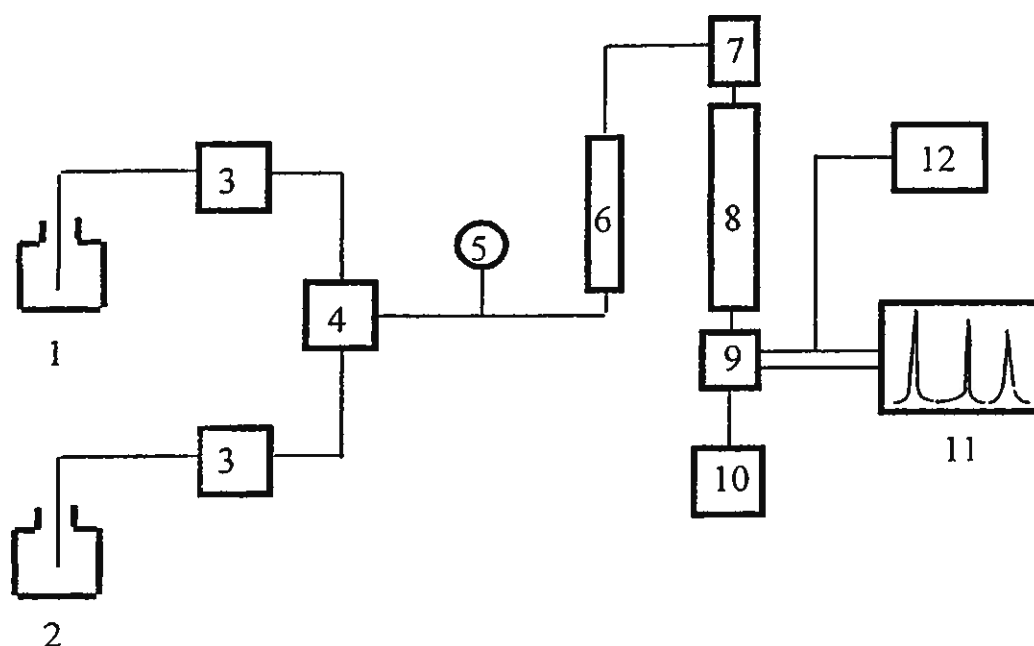
2.2.3 Instrumentace v HPLC

Přístroje pro HPLC jsou značně rozdílné po stránce vybavenosti i z hlediska koncepce jednotlivých funkčních součástí. V praxi se vyskytují dva přístupy k technickému řešení kapalinového chromatografu:

- stavebnicový systém- toto řešení má výhody v ekonomické nenáročnosti a v postupném dovybavení celého systému dle potřeb uživatele.
- kompletní skříňová sestava- dražší volba, která má navíc nevýhodu v nesnadné přístupnosti jednotlivých součástí přístroje. Pro tento typ chromatografu je velkou výhodou, že redukuje mrtvý objem na minimum.²⁾

2.2.3.1 Schéma kapalinového chromatografu²⁾

Kapalinový chromatograf se skládá z částí, které zabezpečují transport mobilní fáze, dávkování vzorku, separaci látek a jejich detekci. Blokové schéma moderního kapalinového chromatografu je uvedeno na obrázku 2. Může mít řadu obměn, v zásadě však musí být zachováno řazení základních elementů za sebou, i když lze mnohé při speciálních typech měření buď vynechat, nebo naopak přidat.



Obrázek 2: Schéma kapalinového chromatografu

1,2-zásobníky mobilní fáze, 3-čerpadla, 4- směšovač, 5-manometr, 6-ochranná kolonka, 7-dávkovací zařízení, 8-kolona, 9-detektor, 10-jímač frakcí, 11-zapisovač, 12-integrátor

Mobilní fáze je (při izokratické eluci) vedena buď z jednoho zásobníku do vysokotlakého čerpadla, anebo (při gradientové eluci) se přiváděné proudy z více zásobníků mísí podle programu ve směšovači. Podle druhu čerpadla (jež může být pulsní nebo bezpulsní) je zařazen do toku mobilní fáze tlumič tlakových pulsů. Mobilní fáze dále prochází přes zařízení pro dávkování vzorku do chromatografické kolony, která je spojena přímo s detektorem. Z detektoru je veden signál přes zesilovač do zapisovače, eventuelně i do integrátoru.

2.2.3.2 Zásobníky mobilní fáze ¹²⁾

Většina rozpouštědel používaných jako mobilní fáze je hořlavá a jedná se vesměs o značně těkavé látky. Proto musí být zásobníky konstruovány tak, aby umožňovaly vyhovující uzavření nádoby (takové, aby kapalina mohla dobře odtékat a přitom její páry neunikaly do okolní atmosféry). Tyto zásobníky jsou nádoby vyrobené zpravidla ze skleněného či nerezového materiálu o objemu cca do dvou litrů, umístěné v samostatném uzavřeném prostoru chromatografu a chráněné před světlem a otevřeným ohněm. Částičky větší než pět μm mechanicky poškozují čerpadlo, proto je mobilní fáze nasávána přes filtr. Tato část

chromatografu je spojena se směšovačem a vysokotlakým čerpadlem pomocí trubiček z plastu či nerezové oceli.

Při mísení dvou a více složek mobilní fáze dochází k uvolnění mísícího tepla. Tato energie způsobí, že dojde ke změně rozpustnosti plynů a tím k uvolnění plynu ve formě bublin. Bubliny způsobují v chromatografickém systému kolísání tlaků (jsou snadno stlačitelné) provázené snížením elektrické stability a také velmi výrazně negativně ovlivňují odezvu detektorů.

Odplynit mobilní fázi je možné několika způsoby:

- vakuem za současného intenzivního míchání. Tento způsob má tu nevýhodu, že složky mobilní fáze s vysokou tenzí par těkají, což mění složení mobilní fáze.
- ultrazvukem
- probubláváním inertním plynem, zejména heliem, které má velmi malou rozpustnost ve většině organických rozpouštědel.

2.2.3.3 Vysokotlaká čerpadla a tlumiče pulsů ^{2,12)}

Vysokotlaké čerpadlo musí splňovat mnoho kritérií. Především musí umožnit konstantní bezpulsní tok mobilní fáze o malé rychlosti (0,1-10 ml/min) za vysokého tlaku až 40MPa tak, aby byla umožněna kvalitativní a kvantitativní analýza. Čerpadla pracují zpravidla tak, že ze zásobníku vytlačují pístem či membránou mobilní fázi.

Principiálně se vysokotlaká čerpadla dělí do dvou hlavních skupin podle toho, zda pracují při konstantním tlaku nebo při konstantním objemovém průtoku. U čerpadel s konstantním tlakem se využívá tlak plynu přiváděného z tlakové nádoby přes redukční ventil. Druhý typ čerpadel využívá k pohybu pístu nebo membrány mechanický pohon, čímž se dosahuje konstantního průtoku čerpané mobilní fáze.

Z praktického hlediska bývají čerpadla rozdělena na pulsni a bezpulsni. Pulsni čerpadla mají objem pracovní komory poměrně malý a potřebného průtoku se dosahuje mnohokrát opakovaným stlačením a vypuzením mobilní fáze z pracovní komory. Bezpulsni čerpadla pracují s daleko větším objemem pracovní komory (100 -500 ml) , což umožňuje provést bez opětovného plnění čerpadla řadu analýz. Tento typ také poskytuje hladší průtok mobilní fáze a nevyžaduje speciální přídavné zařízení pro tlumení tlakových pulsů. Bezpulsni čerpadla jsou však dražší a mají podstatně horší přesnost tvorby gradientu mobilní fáze.

U čerpadel se sinusovou časovou závislostí polohy pístů je třeba tlumení tlakových pulsů. To lze uskutečnit dvěma způsoby:

- Můžeme použít současně dvou i více čerpadel, jejichž činnost je fázově posunuta. Nejjednodušší je kombinace dvou pump, které pracují v opačné fázi. V okamžiku, kdy je jedno čerpadlo ve fázi sání, druhé musí být ve fázi výtlačku. Tím získáme téměř hladký průtokový profil.
- Podstatně levnější způsob je potlačení pulsace pomocí tlumičů pulsů, které využívají pružného odporu. Nevýhodou je nižší účinnost než u duálového čerpadla, dále pak vnesení dalších mrtvých prostorů do chromatografického systému.

2.2.3.4 Dávkovací systémy^{2,12)}

Dávkovač vzorku je umístěn před vstupem do kolony. K dávkování se dnes využívá dávkovací ventil bez použití septa s vyměnitelnou smyčkou (o vhodném objemu), umožňující okamžité dávkování vzorku do proudu mobilní fáze. Dávkovací ventil je složen z pevného pouzdra s otočným jádrem, na které je napojena také dávkovací smyčka. Po naplnění smyčky mikrostríkačkou a otočením jádra dojde k zařazení smyčky do průtoku. Vzorek je okamžitě vytlačen proudem mobilní fáze.

Dávkovací zařízení musí dovolovat co nejpřesnější dávkování definovaných objemů vzorku a co nejméně přispívat k rozšiřování eluční křivky. Dávkuje se pouze vzorek dokonale rozpuštěný ve vhodném rozpouštědle, nejlépe v mobilní fázi.

Dávkovací zařízení využívající techniky nástřiku injekční stříkačkou přes septum nebo při zastaveném průtoku mobilní fáze (stop-flow dávkovače) se již prakticky nepoužívají.

2.2.3.5 Chromatografická kolona a její náplně^{2,5,6,9)}

Chromatografické kolony jsou trubice z různého materiálu naplněné sorbentem. V dnešní době se zhotovují převážně z trubic z antikorozi oceli s leštěným vnitřním povrchem. Do tlaků cca 20 MPa lze použít i kolony ze speciálně tvrzeného skla, které se z bezpečnostních důvodů umísťují do kovového pouzdra.

Pro analytické měření se používají analytické kolony v délce 5 – 30 cm s vnitřním průměrem 3 – 5 mm. Náplně mají velikost částic 3 – 10 μ m. Díky uvedenému zrnění dosahují tyto kolony až 5 000 nebo i 10 000 teoretických pater na 10 cm délky. Sorbenty lze

rozdělit podle jejich polarit. Nepochárním sorbentem je silikagel modifikovaný na svých hydroxylových skupinách alifatickým řetězcem s osmi nebo osmnácti uhlíky. V průběhu analýzy dochází k interakcím analyzovaného vzorku s alkylovými řetězci na principu tvorby vodíkových můstků nebo Van der Waalsových sil. Jedná se o tzv. reverzní fáze. Středně polární fázi představuje tříuhlíkatý řetězec obsahující skupiny -CN, -NH₂, -OH. Jako polární sorbent se používá silikagel. Je vhodný pro většinu látek mimo silně bazických, které interagují s jeho slabě kyselým centrem. Mezi polární sorbenty patří také oxid hořečnatý, nebo i oxid hlinitý, který se používá pro dělení nepřilíš polárních látek, které se od sebe stéricky liší.

Moderní přístroje umožňují použít při dělení látek několik kolon najednou, jedná se o techniku přepínání sprážených kolon (column switching). Kolony bývají spojeny za sebou, a mohou se lišit délkou, náplní apod. Metoda se používá ke zlepšení separace látek a zkracuje čas analýzy.

2.2.3.6 Detektory^{3,6,13)}

Detektory slouží k identifikaci látek vycházejících z kolony. Sledují některou z vlastností eluátu pomocí vhodného snímače a signál se po zesílení převádí do zapisovače. Ten pak poskytuje závislost intenzity daného signálu na čase nebo je vyhodnocen počítačovým systémem. Detektor může významně ovlivnit výsledek stanovení, a proto by se měly používat jen kvalitní detektory splňující tyto požadavky:

- vysoká citlivost (definovaná jako 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, kterého bylo dosaženo na koloně)
- malá citlivost ke změnám tlaku a rychlosti průtoku mobilní fáze

Detektory lze rozdělit na selektivní a univerzální. U selektivních je signál úměrný koncentraci samotné detekované látky v eluátu a u univerzálních je odezva úměrná určité celkové vlastnosti eluátu, jak analyzované látky tak i složek mobilní fáze.

Nejpoužívanější jsou fotometrické detektory pracující v ultrafialové nebo viditelné oblasti světelného záření, následují detektory fluorimetrické, elektrochemické a refraktometrické.

Tabulka 1: Nejčastěji používané detektory v HPLC

Detektor	Selektivita	Snímaná veličina	Citlivost [g/ml]
Ultrafialový	ano	absorpce záření	10^{-9} až 10^{-10}
Fluorimetrický	ano	fluorescence	10^{-9} až 10^{-12}
Elektrochemický	ano	oxido-redukční změny	10^{-9} až 10^{-12}
Refraktometrický	ne	index lomu	10^{-6}

Fotometrické detektory ^{3,6,9)}

Fotometrické detektory pracují nejčastěji v oblasti ultrafialového, viditelného, případně také infračerveného záření. Nejčastěji se používá absorpce v UV oblasti a u barevných látek ve viditelné oblasti. Patří sem detektory:

- s jednou nastavenou vlnovou délkou – mají dvoupaprskové uspořádání a měří rozdíl absorbance mezi měrnou a srovnávací celou. Jako zdroj záření využívají většinou nízkotlakou rtuťovou výbojku .
- s několika předem nastavenými vlnovými délkami (nejčastěji 254 nm nebo 280 nm)
- s deuteriovou výbojku (polychromatický zdroj záření) a monochromátorem. Umožňují pro detekci volit libovolnou vlnovou délku záření (nejčastěji 190 nm až 400 nm). Některé snímají celé absorpční spektrum eluátu každou sekundu.
- spektrofotometrické detektory s rychlým záznamem spektra bez přerušení chromatografické separace (tzv. photodiode-array detektory) – tyto detektory jsou založeny na současném měření signálu velkého počtu miniaturních plošných fotodiod, a proto umožňují současnou detekci signálu při několika vlnových délkách, tzn. i detekci při vlnové délce odpovídající absorpčnímu maximu každé látky, čímž zvyšují selektivitu a citlivost detekce.

Spektrofotometrické detektory zaručují vysokou selektivitu, citlivost (detekční limit 10^{-8} až 10^{-10} g/ml) a širokou oblast linearitní odezvy. Umožňují volit jako mobilní fázi mnoho různých rozpouštědel, které neabsorbují záření při používaných vlnových délkách. Při vhodné volbě rozpouštědel umožňují i gradientovou eluci.

Fluorimetrické detektory ^{2,6)}

Při fluorimetrické detekci prochází eluovaná látka průtokovou celou detektoru, absorbuje UV záření z intenzivního zdroje (rtuťová výbojka) a přitom vydává fluorescenční záření o větší vlnové délce, než jakou má záření excitační.

Emitované záření dopadá na elektrický fotonásobič a přemění se na elektrický signál, jehož velikost je úměrná toku fluorescenčního záření. Intenzita emitovaného záření je přímo úměrná koncentraci látky. U látek, které nejsou přirozeně fluorescenční, lze vhodnou derivací připravit fluoreskující deriváty. Tyto detektory jsou vysoce selektivní a v praxi bylo dosaženo meze detekce 10^{-9} až 10^{-15} g/ml.

Elektrochemické detektory ^{2,6)}

Slouží k detekci látek schopných elektrochemické reakce, tj. oxidačně-redukčních změn, jež probíhají na fázovém rozhraní roztok – elektroda. Amperometrické 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 tříelektrodových systémů (skládajících se z měrné, srovnávací a pomocné elektrody).

Amperometrické detektory používají tuhých měrných elektrod zhotovených nejčastěji ze skelného uhlíku, grafitových vláken, grafitové pasty nebo z kovů. Nevýhodou těchto materiálů je jejich zanášení a postupná deaktivace 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 pravidelně obnovuje povrch.

Elektrochemické detektory umožňují dosáhnout velmi vysoké citlivosti (detekční limit 10^{-9} – 10^{-11} g/ml). Důležité při jejich používání je však důkladné odplynění mobilní fáze, abychom dosáhli stabilní nulové linie a tím získali reprodukovatelné výsledky. Mobilní fáze musí být vodivá, takže tyto detektory nelze použít při chromatografii v systémech s fázemi bez náboje.

Coulometrické detektory měří náboj potřebný k oxidaci či redukci celkového množství látky při průtoku měrnou celou. Umožňují dosáhnout větší citlivosti detekce než amperometrické detektory.

Refraktometrické detektory^{2,6,9)}

Patří mezi nejčastěji užívané nespecifické, univerzální detektory. Jejich odezva je úměrná rozdílu indexu lomu eluátu v měrné cele a srovnávací kapaliny (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. Používá se hlavně tehdy, když vzorek neabsorbuje v UV oblasti nebo když má mobilní fáze příliš velkou absorbanci.

Hmotnostní spektrometr (MS)¹²⁾

V poslední době se pro detekci látek využívá též spojení HPLC s hmotnostní spektrometrií. Po výstupu eluátu z kolony je nutno z něj odstranit mobilní fázi a molekuly látky v plynném stavu jsou v hmotnostním spektrometru ionizovány nárazy elektronů, termoionizací a elektroionizací. Nabité částice (molekulární a fragmentární ionty) jsou v magnetickém nebo vysokofrekvenčním poli separovány podle hmotnosti a náboje a zaznamená se jejich hmotnostní spektrum (tj. četnost iontů ve vztahu k poměru hmotnost/počet iontů). Tyto detektory jsou značně citlivé, ale většinu z nich nelze použít při gradientové eluci.

2.2.3.7 Zařízení pro záznam a zpracování dat^{2,5)}

Z detektoru vychází signál, který je veden k zapisovači. Grafický záznam průchodu jednotlivých komponent detektorem v závislosti na čase je reprodukován ve tvaru píku na chromatogramu. Jejich tvar se v ideálním případě blíží Gaussově křivce, přičemž plocha píku je úměrná koncentraci látky prošlé detektorem.

K hodnocení chromatogramů se používají zařízení, která jsou schopná automaticky vyhodnotit a zaznamenat veškerá eluční data a poskytnout i kvantitativní údaje ze zabudovaného integrátoru. V dnešní době se využívá především počítačové techniky vybavené vhodným chromatografickým programem.

2.2.4 Validace metody v HPLC ^{14,15,16)}

Validaci můžeme definovat jako proceduru, jejímž úkolem je demonstrovat a dokumentovat kvalitu analytické metody. Cílem validace chromatografické metody je prokázat pomocí experimentálních dat a jejich matematického a statistického zpracování, že metoda je vhodná pro zamýšlené použití a získané výsledky analýz jsou spolehlivé. Validace se provádí vždy při zavádění nové metody nebo při kontrole způsobilosti systému. Validace a následný validační protokol by měl mít tři části: podrobně vypracovaný analytický postup, test vhodnosti použité metody a vlastní validaci analytické metody.

Dále se zaměříme jen na vlastní validaci chromatografické metody. Jedná se o prokázání toho, že výsledky získané touto metodou jsou správné, přesné a reprodukovatelné. Testujeme:

- přesnost stanovení
- správnost stanovení
- linearitu
- robustnost
- selektivitu
- detekční a kvantitativní limit (u látek vedlejších)

PŘESNOST METODY

Cílem tohoto testu je určit těsnost shody výsledků vzájemně nezávislých měření za předem specifikovaných podmínek. Přesnost závisí pouze na rozdělení náhodných chyb a nemá vztah k pravé hodnotě.

Přesnost metody stanovíme tak, že opakovaně analyzujeme stejný vzorek za stejných chromatografických podmínek. Z chromatogramu odečteme odpovídající plochy píků (a_i) pro hlavní látku i pro látky vedlejší (nečistoty, degradační produkty) a získané hodnoty se použijí pro výpočet následujících údajů:

- **průměrná hodnota plochy píku \bar{a}**

$$\bar{a} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n a_i$$

- **směrodatná odchylka s**

Směrodatná odchylka charakterizuje rozptýlení jednotlivých hodnot a_i okolo průměru \bar{a} . Vypočítá se jako:

$$s = \sqrt{\left[\frac{1}{n-1} \sum_{i=1}^n (a_i - \bar{a})^2 \right]}$$

kde n je počet paralelních stanovení.

- **relativní směrodatná odchylka R_s**

Pokud směrodatnou odchylku vztáhneme na průměrnou hodnotu a vyjádříme ji v procentech, získáme relativní směrodatnou odchylku R_s :

$$R_s = \frac{100 \cdot s}{\bar{a}} [\%]$$

Požadavek je $R_s < 1\%$ pro hlavní látku a $R_s < 5\%$ pro vedlejší látku, která se ve vzorku za normálních okolností vyskytuje v 0,1- 1,0%-ním množství.

- **interval spolehlivosti $L_{1,2}$**

Interval spolehlivosti se stanovuje pro zvolenou hladinu významnosti α . Hladina významnosti udává pravděpodobnost, že skutečná hodnota parametru neleží uvnitř tohoto $100(1-\alpha)$ %-ního intervalu. V praxi volíme nejčastěji $\alpha = 0,05$, tedy $(1-\alpha) = 0,95$.

Interval spolehlivosti $L_{1,2}$ pro daný vzorek stanovíme jako :

$$L_{1,2} = \bar{a} \pm k_n \cdot R$$

Kde R je rozdíl hodnot $a_{\max} - a_{\min}$, k_n je koeficient zahrnující počet nástřiků stejného vzorku a hladinu významnosti.

• **vyloučení odlehlých výsledků**

K vyloučení odlehlých výsledků je v analytické praxi nejvhodnější Grubbsův test T za použití míry rozpětí. Když testujeme na odlehlost výsledek největší (a_{\max}), platí :

$$T_{\max} = \frac{a_{\max} - \bar{a}}{s_{\sigma}}$$

Pokud testujeme na odlehlost nejmenší výsledek (a_{\min}), platí :

$$T_{\min} = \frac{\bar{a} - a_{\min}}{s_{\sigma}}$$

Hodnota s_{σ} odpovídá populační směrodatné odchylce, která je dána vztahem :

$$s_{\sigma} = \sqrt{\frac{\sum (a_i - \bar{a})^2}{n}}$$

Vypočtená hodnota T_{\max} nebo T_{\min} se porovná s kritickou hodnotou Grubbsova rozdělení T_{α} . Je-li T_{\max} nebo $T_{\min} \geq T_{\alpha}$, je výsledek odlehlý. V opačném případě se testovaný výsledek nevylučuje.

SPRÁVNOST METODY

Správnost metody je definována jako těsnost shody mezi výsledkem analýzy (c_i) a přijatou referenční hodnotou (c_o). Touto referenční hodnotou může být skutečný známý obsah látky nebo obsah zjištěný jinou nezávislou metodou, jejíž správnost je zaručena.

Statisticky se správnost testuje pomocí výtěžnosti (R), která se vypočítá podle vzorce:

$$R_i = \frac{100 \cdot c_i}{c_o} [\%]$$

LINEARITA

Linearita je definována jako schopnost metody poskytovat v definovaném intervalu výsledky úměrné koncentraci analytu ve vzorku. Tento test hodnotí kvalitu závislosti plochy píku na koncentraci analyzované látky v rozmezí 50-150 % očekávané koncentrace. Kvalita této závislosti je vyjádřena tzv. korelačním koeficientem r . Pokud se $r=1$ jedná se o lineární závislost plochy píku na koncentraci analytu. V praxi je vhodný korelační koeficient větší než 0,98.

Pro počet n vzorků známého obsahu analytu c_i se odečte odpovídající plocha píku a_i . Pak se pro každou z n naměřených hodnot vypočítají odchylky od průměru $A_i = a_i - \bar{a}$; $C_i = c_i - \bar{c}$. Pro lineární závislost se pak může odhadnout korelační koeficient r jako :

$$r = \frac{\sum (C_i \cdot A_i)}{\sqrt{[\sum (C_i)^2 \cdot \sum (A_i)^2]}}$$

ROBUSTNOST METODY

Robustnost metody je definována jako míra vlivu kolísání úrovně jednotlivých parametrů na výsledek analytického stanovení. Dle uvážení experimentátora se mění ty pracovní podmínky, které by mohly ovlivnit průběh a výsledek analýzy. Pracovní podmínky se mění na dvou úrovních- horní a dolní (příčemž spodní i horní úrovně těchto

změn by měly představovat reálné možné odchylky během dané analýzy). Analytická metoda je robustní, jestliže přesnost stanovení není ovlivněna malými změnami pracovních podmínek. K tomuto testu se připraví jeden vzorek standardu analyzované látky a před každým nástřikem se změni pracovní podmínky na obou úrovních.

SELEKTIVITA

Selektivita analytické metody je definována jako schopnost přesného a správného hodnocení analytu i v přítomnosti interferujících látek (nečistot, degradačních produktů, pomocných látek). Selektivní metoda je tedy taková metoda, která za určitých podmínek umožňuje přesné a správné stanovení obsahu složky ve vymezené směsi jiných složek. Selektivita analytické metody je testována porovnáním výsledků vzorků standardů s výsledky vzorků s matricí. Selektivita se testuje tak, že se připraví jeden roztok standardu analyzované látky s přídatkem asi 5% látek vedlejších. Třikrát se nástříkne, změří se plocha analyzované látky a vypočítá se průměrná hodnota A_1 . Selektivita S se vypočte podle vzorce:

$$S = \frac{100 \cdot (A_o - A_1)}{A_o} [\%]$$

kde A_o je plocha píku analyzované látky odečtená ze samotného standardu.

Požadavek je, aby selektivita $S > 99\%$.

DETEKČNÍ A KVANTITATIVNÍ LIMIT

Mez detekce (LOD-Limit of Detection) udává skutečnou úroveň signálu, která ještě umožňuje detekci koncentrace. Je definována jako trojnásobek směrodatné odchylky šumu tj. odezvy slepého pokusu.

Mez stanovitelnosti (LOQ-Limit of Quantification) je nejnižší koncentrace stanovované látky, která je stanovitelná s přijatelnou přesností a správností. Je definována jako desetinásobek směrodatné odchylky šumu tj. odezvy slepého pokusu.

Směrodatnou odchylku šumu lze odhadnout při měření placebo ze záznamu šumu v okolí retenčního času stanovované látky. Středem šumu se narýsuje nulová linie a od ní se změří největší kladná (r^+) a záporná (r^-) amplituda šumu. Z tohoto rozpětí šumu je možno odhadnout jeho směrodatnou odchylku vydělením pěti:

$$s_n = \frac{r^+ - r^-}{5}$$

LOD a LOQ se pak vypočtou ze vzorců :

$$\text{LOD} = \frac{3 \cdot s_n \cdot K}{b}$$

$$\text{LOQ} = \frac{10 \cdot s_n \cdot K}{b}$$

kde K je poměr plochy píku ku výšce píku a b je poměr plochy píku ku koncentraci analytu.

2.2.5 Derivatizace v HPLC ^{12,17)}

Chemická derivatizace látek se využívá ke změně jejich vlastností takovým způsobem, aby se umožnilo nebo zcitlivělo jejich stanovení. V HPLC je hlavním problémem nedostatek univerzálních a přitom vysoce citlivých detektorů. Nejpoužívanější UV fotometrický detektor pro řadu látek neposkytuje odezvu nebo není dostatečně citlivý pro jejich stopovou analýzu. Proto se derivatizací v HPLC látky modifikují tak, aby je bylo možno detekovat spektrofotometrickými, fluorimetrickými či elektrochemickými detektory, tj. do jejich molekul se zavedou chromofory, fluorofory či redox skupiny. Hlavní výhody derivatizace lze shrnout takto :

- zlepšení parametrů detekce obtížně detekovatelných látek
- zvýšení selektivity pro složky obsažené ve složitých maticích
- modifikace chromatografických vlastností, která vede ke zkrácení doby analýzy a zvýšení a zúžení elučních křivek
- zvýšení rozlišení

Derivatizaci je možno provádět izolovaně před celou chromatografickou analýzou nebo může být součástí chromatografického systému. V druhém případě existuje několik způsobů provedení, jsou to :

- **předkolonová derivatizace** (pre-column derivatization)-chemická reakce probíhá před separací analyzované látky na koloně
- **postkolonová derivatizace** (post-column derivatization)- vyeluovaná látka z kolony reaguje s derivatizačním činidlem a vytvořený komplex je kontinuálně detekován
- **derivatizace na koloně** (on-column derivatization)- chemická reakce probíhá přímo na koloně

Použití **předkolonové derivatizace** se neobejde bez obtíží způsobených vznikem vedlejších derivatizačních produktů, které mohou rušit chromatografický záznam. Veškeré derivatizační reakce při předkolonové derivatizaci vyžadují maximální opatrnost při zajištění podmínek nutných pro optimální reakci. Na deriváty vzniklé při předkolonové derivatizaci jsou kladeny zvláštní požadavky. Musí být dostatečně stabilní, reakce musí probíhat kvantitativně a měla by být selektivní. Reakční podmínky (pH, teplota) při tomto typu derivatizace musí být mírné.

Použití **postkolonové derivatizace** určitým způsobem minimalizuje nedostatky předkolonové derivatizace. Derivatizační reakce musí být rychlá, může však probíhat i za extrémních podmínek. Reakce nemusí být selektivní a nemusí probíhat kvantitativně, rozhodující je dobrá reprodukovatelnost. Jsou s ní ovšem spojeny některé problémy. Potřebné reakční médium může být nekompatibilní s optimální mobilní fází a nemůžeme použít gradientovou eluci. Všechny používané postkolonové reaktory pracují na principu průtokových zařízení.

K odstranění nezreagovaného derivačního činidla, které vychází z derivačního reaktoru, se užívá tzv. extrakčního detektoru. Jeho konstrukce je velice komplikovaná, proto může být příčinou vzniku analytických chyb.

2.2.5.1 Derivatizace aminosloučenin ¹⁷⁾

Při HPLC hodnocení aminosloučenin se eluát detekuje nejčastěji UV fotometrickým nebo fluorimetrickým detektorem. Přímá detekce je ale u většiny aminosloučenin spojena s nízkou citlivostí, proto je pro zvýšení odpovědi při analýze nutné převést tyto aminosloučeniny na vhodné deriváty. Jedná se především o ty aminosloučeniny, které nevykazují vlastní fluorescenci, nebo které neobsahují ve své molekule seskupení atomů, jež by způsobilo výraznou absorpci v UV popř. viditelné oblasti světla.

Většina derivatizačních reakcí je založena na reaktivitě aminoskupiny. Nejčastěji používanými derivačními činidly jsou: o-ftalaldehyd (OPA), fenylisothiokyanát (PITC), dansylchlorid (DNS-Cl) a 9-fluorenylmethyloxykarbonylchlorid (FMOC-Cl). Jejich důležité charakteristiky shrnuje tabulka 2.

Tabulka 2: Porovnání vlastností derivačních činidel používaných k derivatizaci aminoskupin

Deriv. činidlo	Rychlost reakce	Detekce	Stabilita derivátu	Sek. aminoskup.
OPA	velká	UV, FLD	nízká	ne
DNS-Cl	malá	UV, (FLD)	vysoká	ano
PITC	střední	UV	střední	ano
FMOC-Cl	velká	FLD	vysoká	ano

OPA reaguje pouze s primárními aminoskupinami, reakce je rychlá a probíhá za laboratorní teploty. Stabilita produktů však není vždy dostatečná, neboť často dochází ke spontánním přesmykům. Proto se reakce uplatňuje častěji při derivatizaci za kolonou. Výhodou je, že OPA sám nefluoreskuje, ale jeho deriváty s aminoskupinami mají výrazné fluorescenční vlastnosti.

DNS-Cl reaguje s primárními i sekundárními aminoskupinami za vzniku derivátů absorbujících v UV spektru, pro hodnocení se však může použít i fluorescenční detekce. Reakce s DNS-Cl se používá výhradně k derivatizaci před kolonou. Největším nedostatkem je velmi dlouhý reakční čas (2-60 min), vysoká reakční teplota (60-100°C) a tvorba multiderivátů u bazických aminokyselin.

PITC se používá výhradně pro předkolonovou derivatizaci s následným vznikem phenylthiokarbamylu (PTC) příslušné aminokyseliny. Detekce probíhá UV fotometricky při vlnové délce 254 nm. Nevýhodou je, že samotné činidlo reaguje s reziduálními kyselinami ve vzorku a ty dávají interferující píky. Stabilita vzniklých derivátů závisí na teplotě: za laboratorní teploty dochází k degradaci, při -20°C může být derivát uskladněn až týden.

FMOC-Cl reaguje s primárními i sekundárními aminoskupinami za vzniku fluoreskujících derivátů. Používá se výhradně k derivatizaci před kolonou. Nevýhodou je, že se činidlo používá ve velkém nadbytku, který musí být odstraněn v následném extrakčním kroku pentanem nebo reakcí s nepolárními aminy. Reakce FMOC-Cl s aminosloučeninami se provádí v prostředí acetonu a může docházet ke srážení derivátů hydrofobních aminokyselin, proto se reakce může provádět také v acetonitrilu, kde je rozpustnost těchto derivátů vyšší.

Dalšími činidly, které se využívají k derivatizaci aminosloučenin jsou např. dabsylchlorid, ninhydrin, 2,4,6-trinitrobenzensulfonová kyselina a 3,5-dinitrobenzoylchlorid (DNBC).

2.2.6 Topické přípravky a jejich úprava pro HPLC ¹⁸⁾

Topické polotuhé přípravky jsou určeny k aplikaci na kůži nebo některé slizniční povrchy. Léčiva, která obsahují, účinkují místně na povrchu kůže nebo v ní. Mají homogenní vzhled; jejich účinek může být změkčující nebo ochranný. Topické polotuhé přípravky se skládají z jednoduchého nebo složeného základu, ve kterém je léčivo (léčiva) rozpuštěno nebo jemně dispergováno. Podle svého složení může základ ovlivňovat účinek léku a uvolňovat léčivo (léčiva). Ve skupině polotuhých topických přípravků se rozlišují masti, krémy, pasty a gely.

Topické polotuhé přípravky, jako výchozí materiál pro chromatografickou analýzu, jsou vzhledem ke svým specifickým chemickým vlastnostem upravovány. Při úpravě mastí a krémů pro HPLC analýzu musíme brát v úvahu dvě základní skutečnosti:

- charakter a vlastnosti účinné látky
- druh použitého masťového nebo krémového základu
(jednotlivé základy se navzájem liší svými vlastnostmi, které závisí na použitých látkách)

Možnosti úpravy vzorků pro HPLC analýzu jsou následující:

- bez zvláštní úpravy, pouze mast rozpustíme ve vhodném rozpouštědle a nastříkujeme na kolonu; k účinnější separaci sledovaných látek od balastů je vhodné použít předklonky
- sledované látky je vhodné vyextrahovat vhodným extrakčním činidlem. V úvahu připadají dva postupy: buď extrahujeme přímo a po případné centrifugaci použijeme extrakt k vlastnímu stanovení (pokud analyzovaná látka nepodléhá změnám při vyšších teplotách než je běžná laboratorní, je možné extrahovat zahřátým činidlem), nebo nejdříve mast rozpustíme ve vhodném rozpouštědle (vodném nebo organickém) a danou látku pak extrahujeme do fáze s opačnou polaritou než mělo použité rozpouštědlo. Pro zvýšení extrakční účinnosti je vhodné upravit kyselost / zásaditost jednotlivých fází.
- další způsob extrakce hodnocených látek nabízí extrakce na pevných fázích s využitím extrakčních kolonek.

2.3 Tenkovrstvá chromatografie (TLC) ^{3,19,20)}

Chromatografie na tenké vrstvě je plošnou aplikací sloupcové adsorpční a rozdělovací chromatografie. Nepohyblivou fází tvoří tenká vrstva sorbentu naneseného na inertní podložce, mobilní fáze protéká vrstvou vlivem kapilárních sil. Složky na chromatogramu putují v podobě skvrn, detekují se vhodnou fyzikální nebo chemickou metodou. Výhodou plošného uspořádání je možnost současné analýzy libovolného počtu standardů k potvrzení identity jednotlivých komponent.^{19,20)}

TLC má i další přednosti, které zapříčiňují její široké používání, zejména jednoduché provedení, rychlost dělení látek, snadné vyhodnocování a možnost používání mikrogramových množství vzorků. TLC je nepostradatelná v každé laboratoři zabývající se syntézou nebo analýzou organických látek. Metoda totiž umožňuje kromě identifikace látek samotných nebo ve směsích určit též čistotu, tj. zjistit přítomnost průvodních látek, rozkladných produktů, produktů vedlejších reakcí a též stanovení rozdělených látek.³⁾

V současné době se tenké vrstvy sorbentu s pojidlem vyrábějí a dodávají komerčně, což značně zjednodušuje provedení analýzy, materiál má standardní, neměnné vlastnosti a vrstva je poměrně odolná vůči mechanickému poškození. U nás vyráběné folie Silufol (silikagel s pojidlem na hliníkové folii) a Lucefol (prášková celulóza na hliníkové folii) se dodávají v rozměrech 15x15 nebo 20x20 cm; menší rozměry je možné jednoduše odstříhnout nůžkami. Folie Silufol UV 254 nebo 366 obsahují ve vrstvě sorbentu zároveň fluorescenční indikátor umožňující detekci při uvedených vlnových délkách.³⁾

Tenkovrstvá chromatografie se provádí ve vzestupném uspořádání, kdy je vrstva spodním okrajem namočena do mobilní fáze. Vzorek nanášíme na vyznačený start, který by měl být alespoň 1 cm nad hladinou mobilní fáze, rozestupy mezi jednotlivými nanášenými vzorky by měli být alespoň 0,5 až 1 cm. Vzorek se nanáší po odstranění rušících látek (např. extrakcí) ve vhodném rozpouštědle mikropipetou nebo injekční stříkačkou tak, aby skvrna vznikající na startu nebyla příliš rozměrná (raději postupné nanášení po vyschnutí předchozí dávky). Příliš velké množství látky ve vzorku zapříčiňuje tvorbu rozvleklých skvrn, optimální množství látky ve vzorku je proto 0,1 až 100 µg v závislosti na její rozpustnosti. Protože nanášený objem se pohybuje v rozmezí 2 až 20 µl, je vhodná koncentrace nanášeného roztoku 0,1 až 5%. Před zahájením vyvíjení chromatogramu je třeba naplnit chromatografickou komoru (vyšší skleněná nádoba s dobře těsnícím víkem) mobilní fází a přibližně 15 až 20 minut nechat ustavit v komoře rovnováhu par mobilní fáze.²⁰⁾

Veličina, která charakterizuje chromatografované látky a používá se k jejich identifikaci, je tzv. hodnota R_F (retenční faktor). Protože tato hodnota je silně závislá na použité vrstvě, rozpouštědle, teplotě a způsobu provedení, je obvykle pro identifikaci látek nutné provést chromatografii standardu za stejných podmínek, nejlépe souběžně. V praxi je hodnota R_F dána poměrem vzdálenosti středu skvrny od startu ke vzdálenosti čela mobilní fáze od startu.³⁾

Detekce v TLC ²⁰⁾

V plošném uspořádání chromatografie je třeba odhalit místa na chromatogramu, kde se vyskytují rozdělené složky výchozí směsi.

Fyzikální způsoby detekce spočívají ve využití záření - viditelného, ultrafialového nebo infračerveného dopadajícího na chromatogram. Některé látky se projevují jako fluoreskující skvrny, jiné naopak UV světlo zhašejí a projeví se jako tmavé skvrny na svítícím pozadí (tenká vrstva je v tomto případě impregnována např. fluorescenčním indikátorem).

Chemické způsoby detekce spočívají v tom, že se chromatogram postříká vhodným detekčním činidlem, které vyvolá barevnou reakci s rozdělenými látkami. Pro detekci na tenkých vrstvách se používá řada univerzálních detekčních činidel, zpravidla agresivních chemikálií (kyselina dusičná, kyselina sírová, roztok dichromanu sodného, manganistanu draselného apod.). Selektivní způsoby detekce umožňují detegovat určitou skupinu látek, např. acidobazické indikátory rozliší na chromatogramu kyseliny a báze, Ehrlichovo činidlo (2-dimethylaminobenzaldehyd) reaguje pouze s aminy, ninhydrin reaguje s aminokyselinami a některými aminy atd. Ke zvýšení citlivosti detekce a mnohdy i k umožnění detekce vůbec se často provádí derivatizace.

Hodnocení chromatogramu v TLC ²⁰⁾

- kvalitativní hodnocení

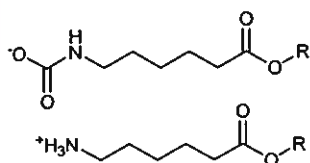
Při potvrzování identity analyzované látky s látkou již známou se vychází ze skutečnosti, že pro každou sloučeninu je za daných podmínek charakteristická její poloha na chromatogramu (R_F) a chování při detekci (zbarvení, fluorescence apod.).

- kvantitativní hodnocení

Při kvantitativním vyhodnocování se uplatňují jak postupy přímé (in situ), tak postupy nepřímé. Nepřímý postup spočívá v extrakci látky z vrstvy a následném stanovení spektrofotometricky v UV, VIS, IČ, případně fluorimetricky, nebo nejsou-li eluované látky barevné, fotometrují se po reakci s barvotvorným činidlem. Přímé hodnocení složek na tenké vrstvě se běžně provádí denzitometrickým měřením hustoty a plochy skvrny nebo přímou fluorimetrií skvrn na desce. Pro kvantitativní hodnocení je základní podmínkou reprodukovatelné nanášení přesného objemu vzorků.

2.4 Charakteristika transkarbamů ²¹⁾

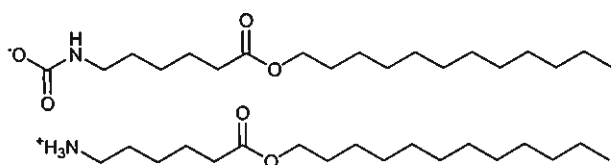
Transkarbamy jsou skupinou akceleračních transdermálních penetračních založené na symetrických amoniových solích karbamové kyseliny. Vznikají reakcí esterů 6-aminohexanové kyseliny s oxidem uhličitým. Jejich strukturní vzorec je uveden na obrázku 3.



Obr. 3: Strukturní vzorec transkarbamů

Jedná se o bezbarvé až slabě nažloutlé mikrokrytalické látky, velmi málo rozpustné ve vodě a nerozpustné ve většině organických rozpouštědel. Beze změny struktury se rozpouštějí dobře v toluenu, ze kterého se je daří krystalizovat. Výborně se rozpouštějí v chloroformu, ovšem za rozkladu soli karbamové kyseliny a uvolnění oxidu uhličitého. K rozkladu karbamátu dochází také působením velmi slabých kyselin v bezvodém prostředí a působením ultrazvuku. K rozkladu kyseliny karbamové dochází také působením tepla.

2.4.1 Transkarbam 12



Obr. 4: Strukturní vzorec transkarbamu 12

Sumární vzorec:	$C_{37}H_{74}N_2O_6$
Molekulová hmotnost:	643,0
Analýza (%)	C 69,11; H 11,60; N 4,36; O 14,93
Teplota tání:	61-64°C

log P (Hyperchem):

9,2

Rozpustnost:

toluen

špatně ethanol a vyšší alkoholy

nerozpustný v etherech, uhlovodících a v halogenovaných

uhlovodících

3. CÍL PRÁCE

Cílem mé rigorózní práce bylo analytické hodnocení laurylalkoholu současně s transkarbamem 12 (což je akcelerant transdermální penetrace) v topických přípravcích pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie. Laurylalkohol je předpokládáný degradační produkt transkarbamu 12 vznikající při nevhodném skladování léčivých přípravků.

Dílčí úkoly:

- ověřit chromatografické podmínky a derivační postup při HPLC hodnocení laurylalkoholu současně s transkarbamem 12
- vypracovat kalibrační křivku pro kvantitativní hodnocení laurylalkoholu v topickém přípravku
- validovat zvolenou chromatografickou metodu

4. PRAKTICKÉ PROVEDENÍ

4.1 Použitý materiál

Chemikálie

transkarbam 12 (KAOCH, FaF UK, Hradec Králové, ČR)
3,5-dinitrobenzoylderivát transkarbamu 12 (KAOCH, FaF UK, Hradec Králové, ČR)
laurylalkohol (KAOCH, FaF UK, Hradec Králové, ČR)
dodecylester kyseliny 3,5-dinitrobenzoové (KAOCH, FaF UK, Hradec Králové, ČR)
hexadecylester kyseliny 3,5-dinitrobenzoové (KAOCH, FaF UK, Hradec Králové, ČR)
cholesterylester kyseliny 3,5-dinitrobenzoové (KAOCH, FaF UK, Hradec Králové, ČR)
6-(3,5-dinitrobenzoyl)-aminohexanová kyselina (KAOCH, FaF UK, Hradec Králové, ČR)
3,5-dinitrobenzoylchlorid čistý (Fluka Chemie AG, Buchs, Švýcarsko)
chloroform p.a. stabilizovaný 1% ethylalkoholu (Penta, Chrudim, ČR)
triethylamin čistý (Fluka Chemie AG, Buchs, Švýcarsko)
nitril kyseliny octové p.a. (Lachema a.s., Neratovice, ČR)
kyselina octová 98% (Lachema a.s., Neratovice, ČR)
voda destilovaná
2-propanol (Lachema a.s., Neratovice, ČR)
methanol p.a. (Lachema a.s., Neratovice, ČR)
n-butanol (Lachema a.s., Neratovice, ČR)
amoniak koncentrovaný čistý (Lachema a.s., Neratovice, ČR)
dusík N₂ (Linde, Pardubice, ČR)
helium He (Linde, Pardubice, ČR)

Chromatografický materiál

skleněná analytická kolona pro HPLC Separon SGX C₁₈ (150 × 3,0 mm I.D., 5 μm),
(Tessek Ltd., Praha, ČR)
Silufol UV 254 a 366 nm (150 × 150mm), (Kavalier, Sázava, ČR)

Přístroje

programovací jednotka Solvent delivery systém SP 8700 (Spectra-Physics, St.Clara, CA,
USA)

dávkovací zařízení Rheodyne s 20 μ l smyčkou (Rheodyne, Cotati, CA, USA)

UV detektor Hewlett Packard 1050 series (Waldbronn, Německo)

PC s chromatografickým programem CSW (Data Apex s.r.o., Praha, ČR)

spektrofotometr Shimadzu UV-2401-PC (Kyoto, Japonsko)

analytické váhy (AND, Japonsko)

analytické váhy (Sartorius analytic, NSR)

centrifuga T 51 (Zentrifugbau, Angelsdorf, NDR)

elektromagnetická míchačka MM 2A (Laboratorní přístroje, Praha, ČR)

vodní vývěva

Pomůcky

mikrostřikačka 25 μ l (Hamilton, Švýcarsko)

4.2 Úprava vzorků pro HPLC analýzu

4.2.1 Derivatizace 3,5-dinitrobenzoylchloridem

Postup pro derivatizaci transkarbamu 12, který jsem získala od pracovníků KAOCH naší fakulty¹⁾, jsem aplikovala na laurylalkohol. K naváženému množství vzorku 0,1g jsem přidala chloroformový roztok laurylalkoholu (v množství dle požadované koncentrace), 3 ml chloroformu a 0,2 ml triethylaminu (TEA). Nakonec jsem navázila 20 mg 3,5-dinitrobenzoylchloridu (DNBC). Tento roztok jsem vařila při 65°C na vodní lázni pod zpětným chladičem po dobu 30 minut.

4.2.2 Roztok dodecylesteru kys. 3,5-dinitrobenzoové

Po ukončení derivatizace byl roztok odfoukán dusíkem do sucha. Suchý produkt jsem rozpustila v 1 ml mobilní fáze a dávkovala přímo na kolonu. Dle potřeby byl roztok před analýzou centrifugován při 3600 ot./min.

4.3 Chromatografické podmínky analýzy

Analýzu laurylalkoholu v jeho derivované podobě (dodecylester kys. 3,5-dinitrobenzoové) jsem prováděla na koloně Separon SGX C₁₈ (150 × 3,0 mm I.D., 5 μm).

Mobilní fáze zvolená pro analýzu nečistot transkarbamu 12 je směs acetonitril- voda- kyselina octová 98% v poměru 80:20:1. Její složení jsem převzala z postupu při hodnocení transkarbamu 12¹⁾.

Tabulka 3: Fyzikálně-chemické vlastnosti jednotlivých složek mobilní fáze⁸⁾

Rozpouštědlo	UV absorpce	Teplota varu	Hustota	Parametr polarity	Viskozita
acetonitril	190 nm	81,6 °C	0,783	6,2	0,37
voda	180 nm	100,0 °C	1,0	9,0	1,0
kys. octová	230 nm	117,9 °C	1,049	6,2	1,26

Hustota je uvedena v g/cm³, viskozita v mPa·s; obě veličiny jsou měřeny při teplotě 20 °C.

Před analýzou jsem obě hlavní složky mobilní fáze odplynila vakuem pomocí vodní vývěvy, vodu po dobu 20 minut a acetonitril po dobu 10 minut. Po opatrném smíchání odpovídajících poměrů obou složek jsem přidala podíl kyseliny octové a směs byla po dobu dalších 10 minut probublávána heliem.

Na kolonu jsem nanášela 20 μl vzorku. Průtok mobilní fáze byl 0,5 ml/min. Pro UV detekci byla použita vlnová délka 230 nm.

Vyhodnocení chromatografického záznamu bylo prováděno na PC s chromatografickým systémem CSW.

Pro kvantitativní analýzu modelových vzorků byla použita metoda vnějšího standardu.

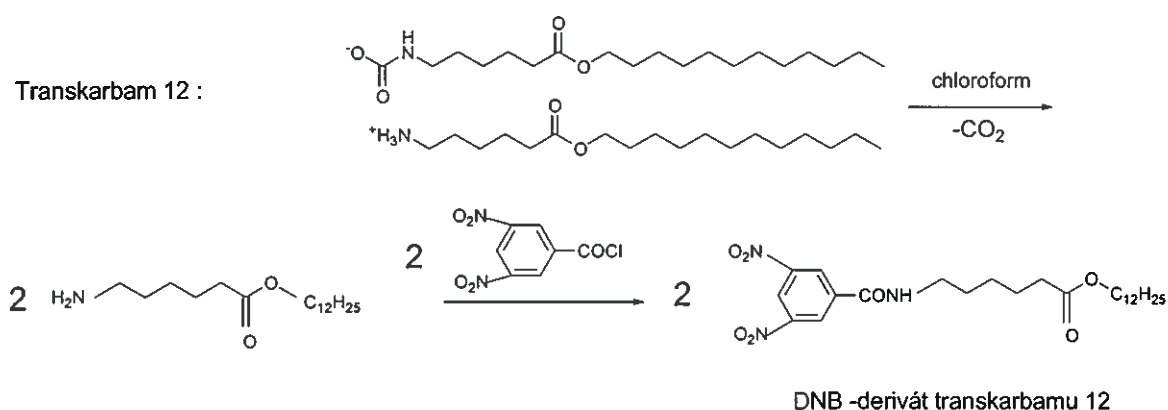
5. VÝSLEDKY A DISKUZE

5.1 Kvalitativní hodnocení předpokládaných nečistot transkarbamu 12

5.1.1 Derivatizace, standardy

Transkarbam 12 neobsahuje ve své molekule žádné chromofory, které by způsobily výraznou absorpci světla v UV oblasti. Aby byla zvýšena citlivost detekce v UV spektru, byla jeho molekula před HPLC analýzou derivována. Jako derivační činidlo byl použit 3,5-dinitrobenzoylchlorid (DNBC). Produktem derivatizace je 3,5-dinitrobenzoylderivát (DNB-derivát) transkarbamu 12 (DNB-T), který již vykazuje výraznou absorpci v UV oblasti.

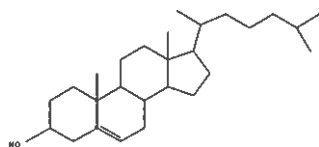
Derivatizační reakce :



Mým původním úkolem bylo analyzovat tyto předpokládané nečistoty transkarbamu 12 v topickém přípravku:

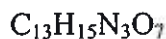
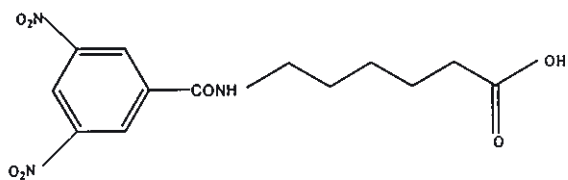
- aminohexanová kyselina $\text{H}_2\text{N}-\text{C}_5\text{H}_{10}-\text{COOH}$
- laurylalkohol $\text{C}_{12}\text{H}_{25}\text{OH}$
- cetylalkohol $\text{C}_{16}\text{H}_{33}\text{OH}$

- cholesterol

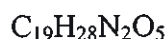
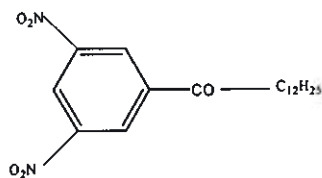


Pro umožnění analýzy těchto nečistot současně s transkarbamem 12 musí být i tyto sloučeniny derivovány 3,5-dinitrobenzoylchloridem. Pro svou analýzu jsem tedy používala tyto standardy:

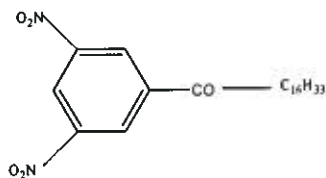
- 6-(3,5-dinitrobenzoyl)-aminohexanová kyselina (DNB-A) Mol. hm. 325,27



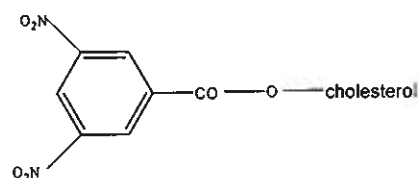
- dodecylester kyseliny 3,5-dinitrobenzoové (DNB- D) Mol. hm. 364,44



- hexadecylester kyseliny 3,5-dinitrobenzoové (DNB- H) Mol. hm. 420,54



- cholesterylester kyseliny 3,5-dinitrobenzoové (DNB-CH) Mol. hm. 580,75



5.1.2 Příprava roztoků standardů před analýzou

K 1 mg daného standardu jsem odměřila 1 ml mobilní fáze (acetonitil: voda: kys.octová 98% -80: 20: 1).

Vzorek DNB-A se rozpustil okamžitě, DNB-T a DNB-D se rozpustily do 20 minut. Problém nastal u DNB-H a DNB-CH. Tyto standardy se v mobilní fázi nerozpustily ani po 1

týdnu, proto jsem jako další rozpouštědla použila samotný acetonitril, okyselený acetonitril, 2-propanol, methanol, vodu. Ani v jednom z těchto rozpouštědel se standardy DNB-H a DNB-CH nerozpustily. Sice se dobře rozpouští v chloroformu, ten ale absorbuje záření až do 250 nm, a proto se pro analýzu s UV-detekcí při 230 nm nedá využít.

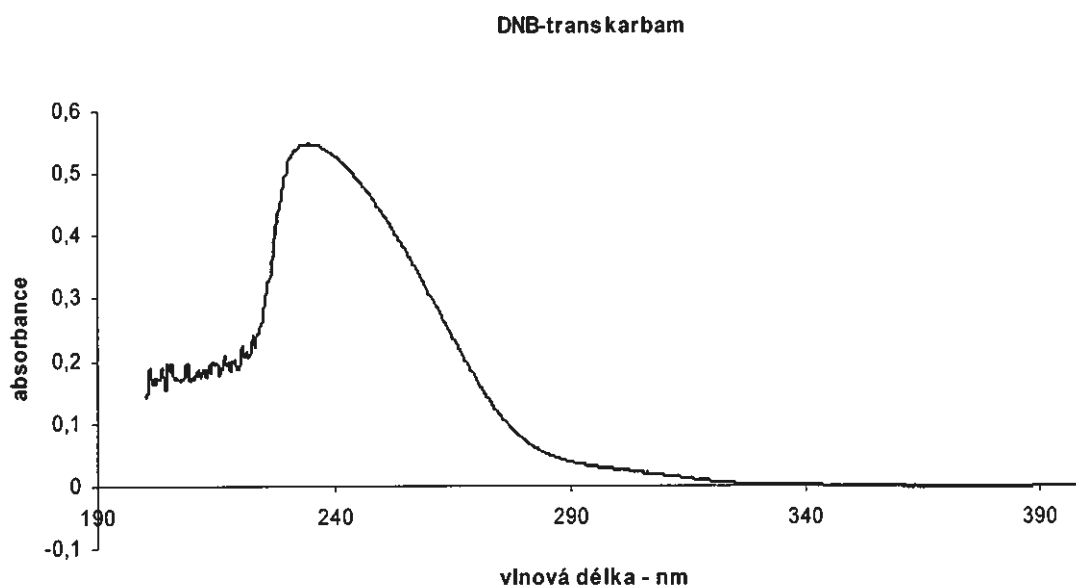
Protože jsem nenašla vhodné rozpouštědlo pro analýzu DNB-H a DNB-CH, dále se ve své rigorózní práci s těmito derivovanými předpokládanými nečistotami krémového základu nezabývám. Analýzu pokračuji pouze s derivovanou nečistotou DNB-A a DNB-D.

5.1.3 Absorpční maxima derivátů v UV oblasti

UV-detektor je při HPLC analýze naprogramován na 230 nm. Pro ověření, zda všechny DNB-deriváty absorbují záření při této vlnové délce, jsem spektrofotometricky proměřila absorbanci roztoků DNB-T, DNB-A a DNB-D v mobilní fázi. Jednotlivé záznamy spektrofotometru představuje obrázek 5,6 a 7.

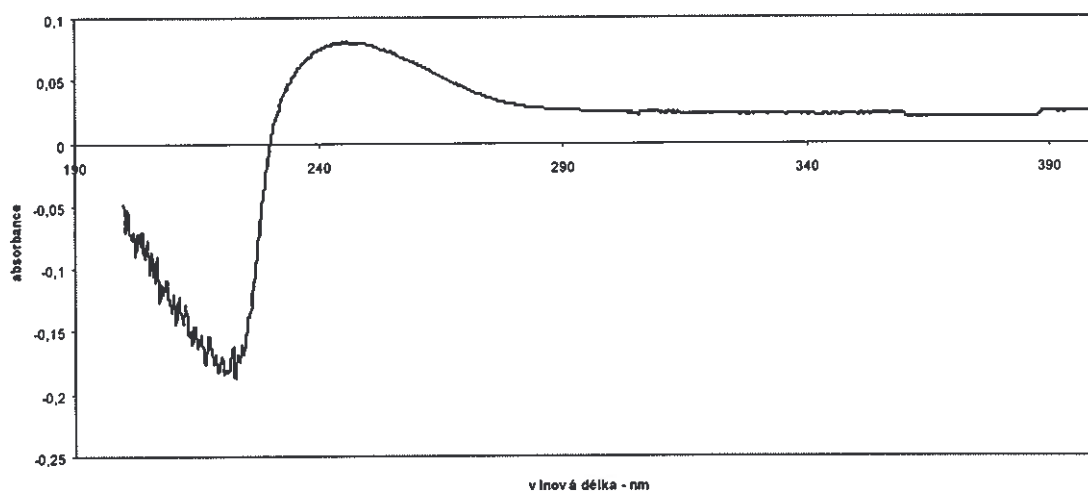
Absorpční maxima:

- DNB-T 234,4 nm
- DNB-A 245,4 nm
- DNB-D 234,8 nm



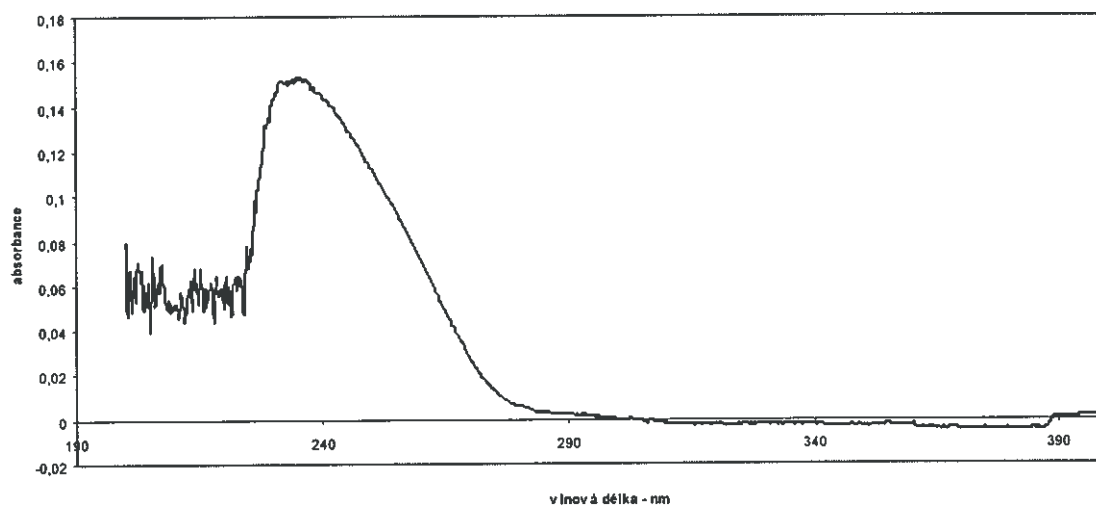
Obrázek 5: Spektrofotometrický záznam DNB-T

DNB-aminohexanová kys.



Obrázek 6: Spektrofotometrický záznam DNB-A

DNB-laurylalkohol



Obrázek 7: Spektrofotometrický záznam DNB-D

Derivovaný transkarbam 12, aminohexanová kyselina a laurylalkohol absorbují záření při 230 nm, budou tedy při této vlnové délce hodnotitelné UV detektorem.

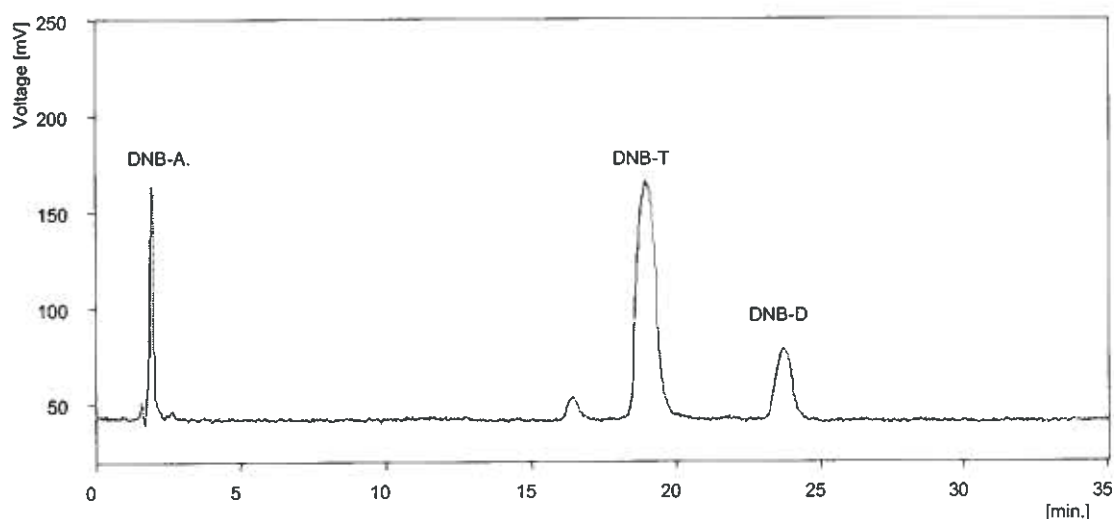
5.1.4 Nástřik standardů pro kvalitativní hodnocení

Připravené roztoky standardů o koncentraci 1mg/ml mobilní fáze jsem jednotlivě nastříkala do dávkovací smyčky o objemu 20 μ l.

Retenční časy:

- DNB-T $t_R = 19,04$ min (nečistota derivovaného transkarbamu má $t_R 16,51$ min)
- DNB-A $t_R = 1,96$ min
- DNB-D $t_R = 23,80$ min

Po nástřiku všech standardů v jednom roztoku jsou píky všech sledovaných látek hodnotitelné s vyhovujícím rozlišením. Chromatografický záznam je na obrázku 8.

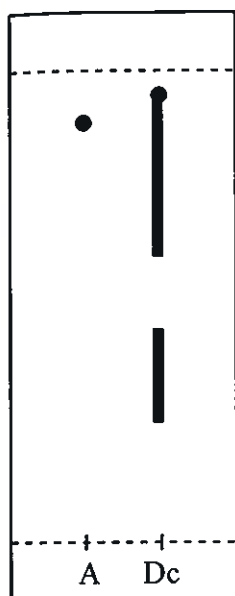


Obrázek 8: Chromatografický záznam standardů DNB-A, DNB-T a DNB-D, chrom. podm. viz kapitola 4.3.

Protože derivační činidlo (DNBC) do reakce vstupuje v nadbytku, je nutné počítat po derivatizaci vzorku také s touto látkou na chromatografickém záznamu. Rozpustila jsem 20 mg DNBC v 1ml mobilní fáze a tento roztok jsem nastříkla. Retenční čas derivačního činidla je 1,99. Z toho důvodu nelze hodnotit DNB-A ($t_R = 1,96$) za daných chromatografických podmínek. Hledáním nových chromatografických podmínek pro stanovení nečistoty DNB-A

jsem se v rámci této práce již nezabývala, zkoušela jsem ale několik vyvíjecích soustav pro oddělení DNB-A a DNBC pomocí TLC^{22,23)}. Jediná testovaná soustava, při které se tyto dvě látky oddělily je n-butanol nasycený amoniakem. Jedná se o soustavu pro dělení DNB-derivátů pomocí jednorozměrné chromatografie. Zkoušela jsem látky oddělit při obměnách složení vyvíjecí soustavy:

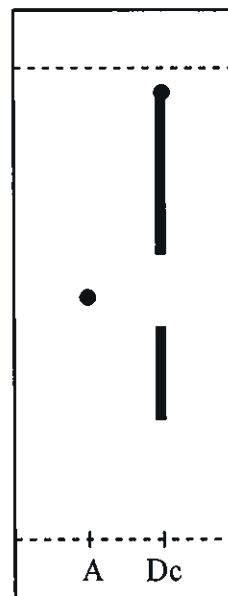
• samotný n-butanol



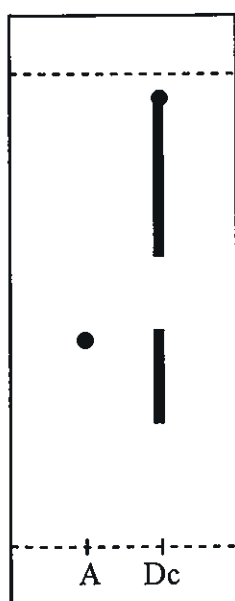
• 1% roztok



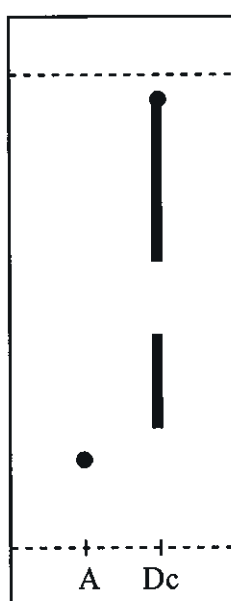
• 2% roztok



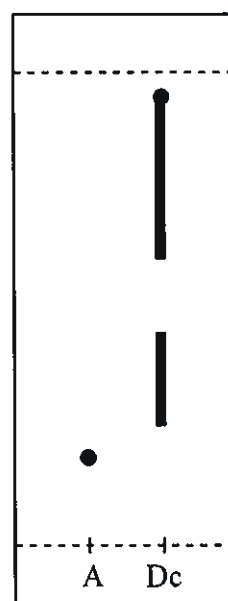
• 2,5% roztok



• 10% roztok



• 20% roztok



A...6-(3,5-dinitrobenzoyl)-aminohexanová kyselina

Dc...dinitrobenzoylchlorid

U všech variant této vyvíjecí soustavy jsou skvrny odpovídající látkám DNB-T a DNB-D až na čele. Proto se 2% roztok konc. amoniaku v butanolu, stejně jako 10 a více %-ní roztok jeví jako vhodná vyvíjecí soustava pro oddělení derivované aminohexanové kyseliny od derivačního činidla. Tento poznatek může být aplikován i na HPLC metodu při hledání vhodných chromatografických podmínek pro stanovení DNB-A.

5.2 Kvantitativní hodnocení laurylalkoholu

Pro kvantitativní hodnocení laurylalkoholu ve vzorcích byla zvolena metoda vnějšího standardu. Výsledky získané analýzou vzorků za podmínek uvedených v kapitole 4.3 jsem vyhodnotila pomocí kalibrační křivky. Celkem jsem získala tři kalibrační křivky:

- 1) kalibrací roztoků DNB-D získaných rozpuštěním standardu v derivovaném masťovém základu (= placebo I.)
- 2) kalibrací roztoků DNB-D získaných derivatizací laurylalkoholu s masťovým základem (=placebo I.)
- 3) kalibrací roztoků DNB-D získaných derivatizací laurylalkoholu s transkarbamovým masťovým základem (=placebo II.)

5.2.1 Kalibrace roztoků standardu v derivovaném masťovém základu

Příprava roztoků:

Základní roztok DNB-D:

1 mg standardu DNB-D jsem rozpustila v 1 ml mobilní fáze.

Roztok placebo I.:

0,1 g čistého masťového základu (placebo I.) jsem rozpustila ve 3 ml chloroformu a 0,2 ml TEA (triethylaminu). Přidala jsem 20 mg DNBC a vařila pod zpětným chladičem 30 minut. Poté jsem roztok odfoukala dusíkem, suchý produkt jsem rozpustila v 1 ml mobilní fáze a zcentrifugovala.

Kalibrační řada roztoků:

Pro sestavení kalibrační křivky jsem použila pět vzorků o koncentracích 0,1; 0,15; 0,25; 0,3 a 0,4 mg DNB-D /ml. Pro čtyři nástřiky od každé koncentrace bude stačit 200 μ l vzorku:

0,1mg/ml: 20 μ l základního roztoku DNB-D + 180 μ l roztoku placebo

0,15 mg/ml: 30 μ l základního roztoku DNB-D + 170 μ l roztoku placebo

0,25 mg/ml: 50 μ l základního roztoku DNB-D + 150 μ l roztoku placebo

0,3 mg/ml: 60 μ l základního roztoku DNB-D + 140 μ l roztoku placebo

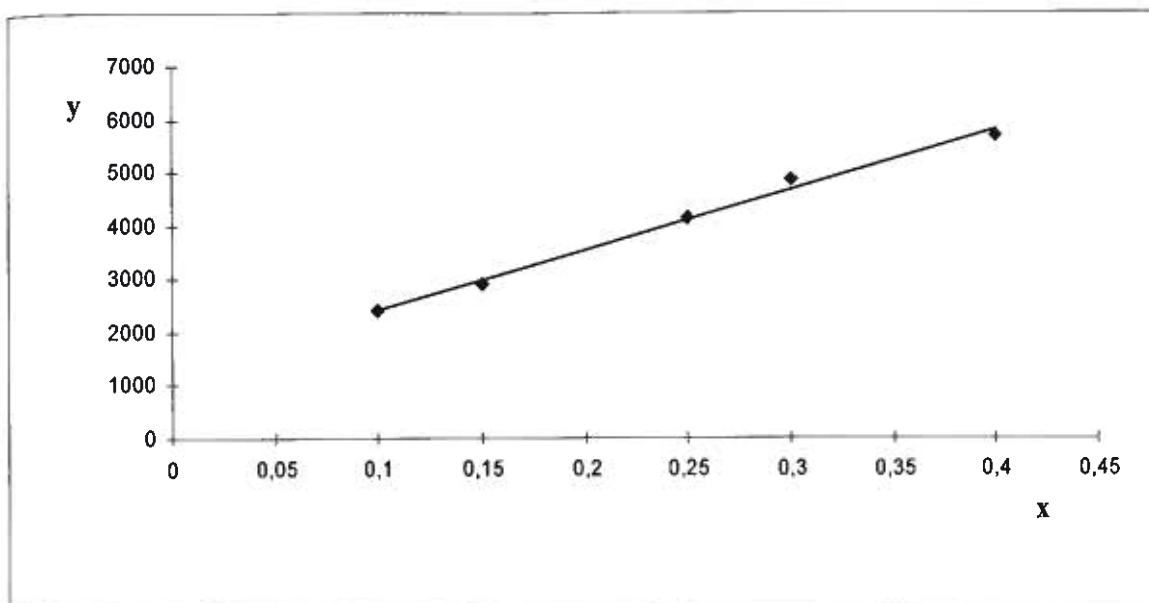
0,4 mg/ml: 80 μ l základního roztoku DNB-D + 120 μ l roztoku placebo

Kalibrační křivka I (viz. obrázek 9) byla sestavena jako graf závislosti plochy píku DNB-D na jeho koncentraci ve vzorku. Hodnoty pro sestavení kalibrační křivky I jsou uvedeny v tabulce 4.

Tabulka 4: Hodnoty pro sestavení kalibrační křivky I

c	0,1 mg/ml	0,15 mg/ml	0,25 mg/ml	0,3 mg/ml	0,4 mg/ml
1	2402,00	2907,89	4139,24	4815,24	5636,69
2	2412,31	2786,06	4081,03	4928,49	5683,77
3	2410,99	2951,43	4129,13	4675,28	5705,48
4	2424,33	2990,99	4188,05	4935,52	5777,49
\bar{a}	2412,41	2909,09	4134,36	4838,63	5700,85
s	$\pm 6,3853$	$\pm 88,7658$	$\pm 43,8857$	$\pm 122,0557$	$\pm 77,6455$

Hodnoty c odpovídají příslušným koncentracím roztoků DNB-D. Hodnoty \bar{a} jsou průměrné hodnoty ploch píků získané ze čtyř nástřiků. s je směrodatná odchylka vypočítaná pro jednotlivá stanovení.



Obrázek 9: Kalibrační křivka I

Parametry kalibrační křivky I a odhady jejich směrodatných odchylek jsou uvedeny v tabulce 5.

Tabulka 5: Parametry kalibrační křivky I

Regresní funkce : $y = kx + q$

počet: bodů $n = 5$ počet stupňů volnosti: $v = 3$

Parametry regresní přímky a odhady jejich směrodatných odchylek			
směrnice		$k = 1,130E+4$	$\pm 5,0E+2$
absolutní člen		$q = 1,29E+3$	$\pm 1,3E+2$

koeficient korelace	$R = 0,9970$
reziduální odchylka	$s_{rez} = 120$

hodnota F-statistiky	$F = 505$
Závislost y na x byla prokázána se spolehlivostí 99.9 % .	

5.2.2 Kalibrace laurylalkoholu derivovaného s mast'ovým základem I.

Výchozí navažovanou látkou je laurylalkohol, který je derivován současně s 0,1 g čistého mast'ového základu (= placebo I.) dle postupu v kapitole 4.2. Takto připravené vzorky lépe odpovídají postupu při hodnocení degradačních produktů transkarbamu 12 než přímá analýza naváženého DNB-D.

Příprava roztoků:

Pro sestavení kalibrační křivky II jsem použila čtyři vzorky o koncentracích 0,1; 0,2; 0,3; 0,4 mg laurylalkoholu /ml. Byl připraven základní roztok laurylalkoholu v chloroformu o koncentraci 1 mg/ml. Z tohoto roztoku jsem pipetovala uvedené objemy pro přípravu kalibrační řady. K 0,1 g placebo I. jsem tedy přidala:

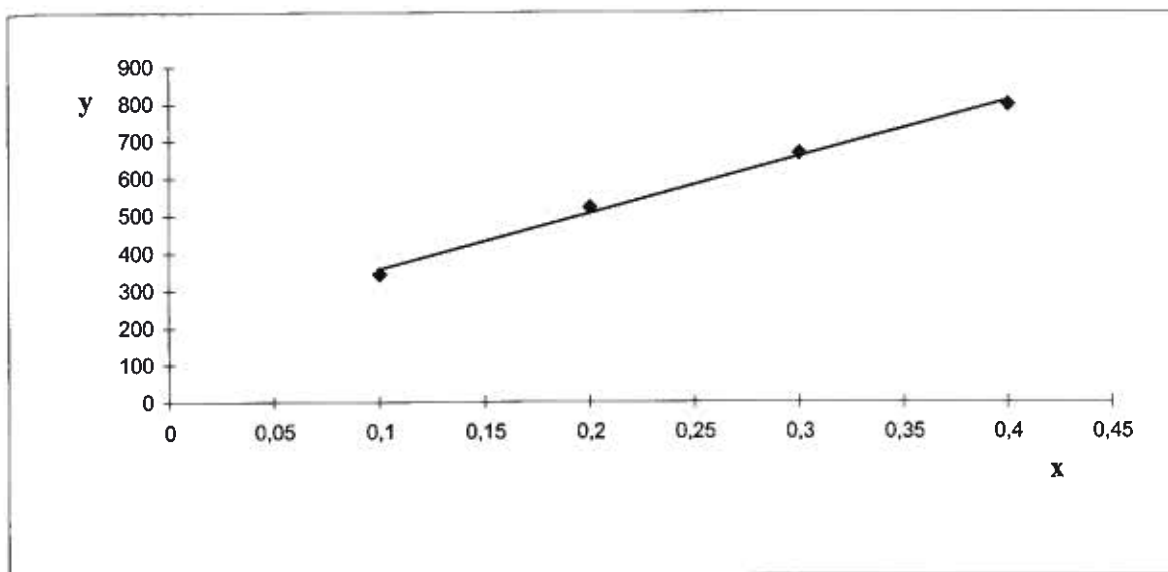
- 0,1 mg/ml: 100 μ l základního roztoku laurylalkoholu + 2,9 ml chloroformu + 0,2 ml TEA
- 0,2 mg/ml: 200 μ l základního roztoku laurylalkoholu + 2,8 ml chloroformu + 0,2 ml TEA
- 0,3 mg/ml: 300 μ l základního roztoku laurylalkoholu + 2,7 ml chloroformu + 0,2 ml TEA
- 0,4 mg/ml: 400 μ l základního roztoku laurylalkoholu + 2,6 ml chloroformu + 0,2 ml TEA

Po rozpuštění jsem do každé varné baňky přidala 20 mg DNBC a dále jsem pokračovala dle postupu uvedeného v kapitole 4.2.

Kalibrační křivka II (viz. obrázek 10) byla sestavena jako graf závislosti plochy píku DNB-D na koncentraci laurylalkoholu ve vzorku před derivatizací. Hodnoty pro sestavení kalibrační křivky II jsou uvedeny v tabulce 6.

Tabulka 6: Hodnoty pro sestavení kalibrační křivky II

c	0,1 mg/ml	0,2 mg/ml	0,3 mg/ml	0,4 mg/ml
1	348,10	516,66	670,03	796,32
2	354,52	525,40	671,54	791,96
3	335,08	522,29	655,19	801,33
4	333,34	518,85	669,00	799,44
\bar{a}	342,76	520,80	666,44	797,26
s	$\pm 10,2393$	$\pm 3,8437$	$\pm 7,5722$	$\pm 4,0943$



Obrázek 10: Kalibrační křivka II

Parametry kalibrační křivky II a odhady jejich směrodatných odchylek jsou uvedeny v tabulce 7.

Tabulka 7: Parametry kalibrační křivky II

Regresní funkce : $y = kx + q$	
počet: bodů $n =$	4 počet stupňů volnosti: $v = 2$
Parametry regresní přímky a odhady jejich směrodatných odchylek	
směrnice	$k = 1509 \pm 76$
absolutní člen	$q = 205 \pm 21$
koeficient korelace	$R = 0,9975$
reziduální odchylka	$s_{rez} = 16,9$
hodnota F-statistiky	$F = 398$
Závislost y na x byla prokázána se spolehlivostí 99 % .	

Pro ověření kalibrační křivky II jsem použila dva modelové vzorky, které jsem sama připravila. K 0,1 g placebo I jsem přidala:
 300 μ l základního roztoku laurylalkoholu + 1mg transkarbamu 12 + 2,7 ml chloroformu
 + 0,2 ml TEA

Po rozpuštění jsem přidala 20 mg DNBC a vzorek jsem upravila dle postupu uvedeného v kapitole 4.2. Oba vzorky tedy obsahují v 1 ml 0,3 mg laurylalkoholu a 1 mg transkarbamu.

Vzorky jsem analyzovala stejným způsobem jako v případě kalibrační křivky. Získala jsem hodnoty ploch pík DNB-D z pěti nástřiků. Jejich průměrné hodnoty jsem dosadila do regresní funkce a vypočítala koncentraci jednotlivých vzorků. Hodnoty získané při analýze jsou uvedeny v tabulce 8.

Tabulka 8: Hodnocení modelových vzorků

vzorek	1	2
1	654,40	666,24
2	660,33	665,24
3	659,22	664,70
4	675,02	665,24
5	675,98	667,55
\bar{a}	664,99	665,79
s	$\pm 9,8557$	$\pm 1,1284$

Hodnoty ploch pík \bar{a} jsem dosadila do regresní funkce:

$$x = \frac{y - 205}{1509}$$

a získala jsem koncentraci vzorků.

Ve vzorku 1 (o koncentraci laurylalkoholu 0,3 mg/ml) bylo zjištěno 0,3048 mg laurylalkoholu v ml, což je 101,6 %.

Ve vzorku 2 (o koncentraci laurylalkoholu 0,3 mg/ml) bylo zjištěno 0,3054 mg laurylalkoholu v ml, což je 101,8 %.

5.2.3 Kalibrace laurylalkoholu derivovaného s mast'ovým základem II.

V poslední kalibrační řadě jsem připravila vzorky z transkarbamového mast'ového základu (= placebo II.), vyrobeného dle technologického předpisu. Mast'ový základ obsahuje 1% transkarbamu 12. Tímto krokem jsem chtěla ověřit celý analytický postup, včetně derivatizace transkarbamu 12.

Pro sestavení kalibrační křivky III jsem použila čtyři vzorky o koncentracích 0,1; 0,2; 0,3 a 0,4 mg laurylalkoholu/ml. Roztoky jsem připravila stejným postupem jako vzorky pro kalibrační přímkou II, pouze místo 0,1 g placeba I. jsem navažovala stejné množství placeba II.

Kalibrační křivka III (viz. obrázek 11) byla sestavena jako graf závislosti plochy píku DNB-D na koncentraci laurylalkoholu ve vzorku před derivatizací. Hodnoty pro sestavení kalibrační křivky III jsou uvedeny v tabulce 9.

Tabulka 9: Hodnoty pro sestavení kalibrační křivky III

c	0,1 mg/ml	0,2 mg/ml	0,3 mg/ml	0,4 mg/ml
1	344,14	520,83	667,28	797,73
2	345,18	517,07	670,69	803,89
3	353,77	519,35	668,76	799,96
4	350,52	520,90	671,58	801,05
\bar{a}	348,40	519,54	669,58	800,66
s	$\pm 4,5405$	$\pm 1,7936$	$\pm 2,2998$	$\pm 2,5599$

Parametry kalibrační křivky III a odhady jejich směrodatných odchylek jsou uvedeny v tabulce 10.

Tabulka 10: Parametry kalibrační křivky III

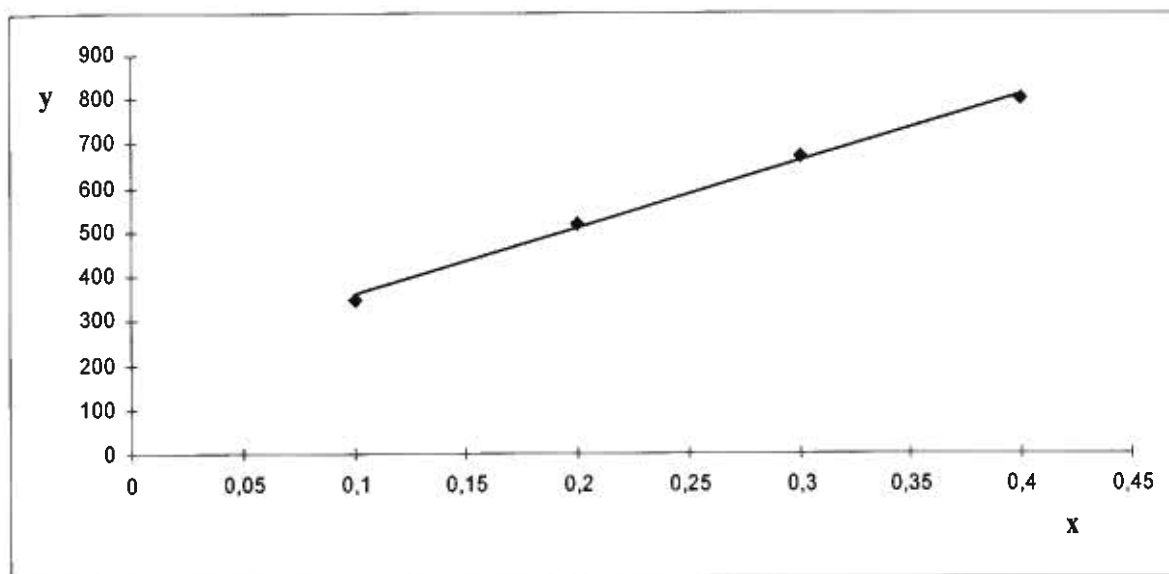
Regresní funkce : $y = kx + q$

počet: bodů n = 4	počet stupňů volnosti: v = 2
-------------------	------------------------------

Parametry regresní přímky a odhady jejich směrodatných odchylek			
směrnice		k = 1507	± 63
absolutní člen		q = 208	± 17

koeficient korelace	$R = 0,9982$
reziduální odchylka	$s_{rez} = 14,2$

hodnota F-statistiky	$F = 566$
Závislost y na x byla prokázána se spolehlivostí 99 % .	



Obrázek 11: Kalibrační křivka III

Porovnáním kalibrační křivky II a III zjistíme, že plochy píků DNB-D jsou téměř shodné:

c	kalibrační přímka II	kalibrační přímka III
0,1 mg/ml	342,76	348,40
0,2 mg/ml	520,80	519,54
0,3 mg/ml	666,44	669,58
0,4 mg/ml	797,26	800,66

Oproti tomu při přímém navažování standardu DNB-D (kalibrační křivka I) jsou plochy píků výrazně vyšší.

c		r	s
0,1 mg/ml	2412,41	7,04	6,92
0,15 mg/ml	2909,09	6,74	6,70
0,25 mg/ml	4134,36	7,10	7,07
0,3 mg/ml	4838,63	7,26	7,23
0,4 mg/ml	5700,85	7,15	7,12

Písmeno r označuje, kolikrát jsou plochy standardu větší než plochy dané koncentrace u kalibrační křivky II, písmeno s srovnává kalibrační křivky I a III.

Plochy píků DNB-D přímo navažovaného jsou proti plochám kalibrační křivky II průměrně 7,06-krát větší, proti plochám u kalibrační křivky III průměrně 7,01-krát větší. Přesto derivatizace laurylalkoholu probíhá kvantitativně, protože i při dvojnásobném množství DNBC (40 mg ve vzorku) se plochy píků nemění.

5.3 Validace chromatografické metody

Teorii k validaci analytických metod jsem podrobně rozvedla v kapitole 2.2.4 své rigorózní práce. Linearitou metody jsem se zabývala v kapitole 5.2, kde lze najít mimo kalibračních křivek také parametry regresních přímek včetně korelačních koeficientů.

5.3.1 Správnost metody

Pro hodnocení správnosti metody jsem připravila šest vzorků o stejné koncentraci laurylalkoholu 0,3 mg/ml. K 0,1 g placebo II jsem tedy do baňky odpipetovala 60 μ l chloroformového roztoku laurylalkoholu o koncentraci 5 mg/ml. Přidala jsem 3 ml chloroformu, 0,2 ml TEA a 20 mg DNBC. Dále jsem pokračovala dle postupu uvedeného v kapitole 4.2. Takto připravené vzorky jsem analyzovala za chromatografických podmínek daných v kapitole 4.3, každý roztok jsem nastříkovala čtyřikrát. Výsledky odečtené z chromatogramů uvádím v tabulce 11.

Tabulka 11: Plochy píků DNB-D pro hodnocení správnosti metody

vzorek	1.	2.	3.	4.	5.	6.
1	673,47	678,35	667,70	673,10	666,65	674,24
2	674,31	672,39	669,32	682,98	664,96	676,72
3	666,05	675,22	671,98	674,19	667,88	667,75
4	667,91	675,03	671,89	680,81	675,24	664,83
\bar{a}	670,44	675,25	670,22	677,77	668,68	670,89
s	$\pm 4,0756$	$\pm 2,4385$	$\pm 2,0854$	$\pm 4,8652$	$\pm 4,5326$	$\pm 5,5316$
R_s	0,6079 %	0,3611 %	0,3112 %	0,7178 %	0,6778 %	0,8245 %

\bar{a} je průměrná plocha píku DNB-D, s je směrodatná odchylka, R_s odpovídá relativní směrodatné odchylce v % ; všechny hodnoty jsou vypočítány dle vzorců v kapitole 2.2.4.

Správnost metody jsem hodnotila jako těsnost shody mezi výsledkem analýzy a známou koncentrací látky ve vzorku.

Z regresní funkce kalibrační křivky III [$y = 1507x + 208$] jsem pro jednotlivé vzorky odečetla koncentraci odpovídající průměrné ploše píku DNB-D. Ze zjištěné koncentrace jsem pak přímo úměrou zjistila výtěžnost R_i v %.

vzorek	1.	2.	3.	4.	5.	6.
c [mg/ml]	0,3069	0,3101	0,3067	0,3117	0,3057	0,3072
R_i [%]	102,30	103,37	102,23	103,90	101,90	102,40

5.3.2 Přesnost metody

Pro hodnocení přesnosti metody bych správně měla připravit vlastní krém tak, že bych k placebo odvážíla dané množství laurylalkoholu, zhomogenizovala a odvážíla šestkrát 0,1g. Jelikož laurylalkohol při laboratorní teplotě taje, navažování by nebylo přesné a ani homogenizování přípravku by nebylo dokonalé. Proto jsem při hodnocení přesnosti pracovala s výsledky analýzy vzorků připravených pro správnost. Průměrné plochy píků DNB-D, směrodatné odchylky a relativní směrodatné odchylky jsou tedy stejné.

Dále jsem určovala interval spolehlivosti $L_{1,2}$, a to podle vzorce:

$$L_{1,2} = \bar{a} \pm k_n \cdot R$$

Pomocí směrodatné odchylky s_σ (viz. kapitola 2.2.4) jsem vypočítala kritické hodnoty T_{\max} a T_{\min} . Zjistila jsem, že pro hladinu významnosti 0,05 není žádná naměřená hodnota odlehlá, protože není větší než číslo 1,689. Vypočítané hodnoty uvádím v tabulce 12.

Tabulka 12: Zjištěné hodnoty $L_{1,2}$, T_{\max} a T_{\min} pro jednotlivé vzorky

vzorek	1.	2.	3.	4.	5.	6.
$L_{1,2}$	{662,84 -678,03}	{669,72 -680,73}	{666,28 -674,16}	{668,68 -686,86}	{659,22 -678,14}	{659,95 -681,83}
T_{\min}	1,2438	1,3543	1,3953	1,1084	0,9477	1,2650
T_{\max}	1,0965	1,4679	0,9745	1,2365	1,6712	1,2170

5.3.3 Robustnost metody

Analýzu jsem prováděla pouze s jedním vzorkem o koncentraci laurylalkoholu 0,3 mg/ml. Nejprve jsem vzorek analyzovala za chromatografických podmínek daných v kapitole 4.3 (průtok mobilní fáze byl tedy 0,5 ml/min., složení mobilní fáze bylo acetonitril: voda-80:20, 100ml mobilní fáze jsem okyselila 1 ml kyseliny octové konc., což odpovídá pH 3,27) - (vz.1). Provedla jsem čtyři nástřiky.

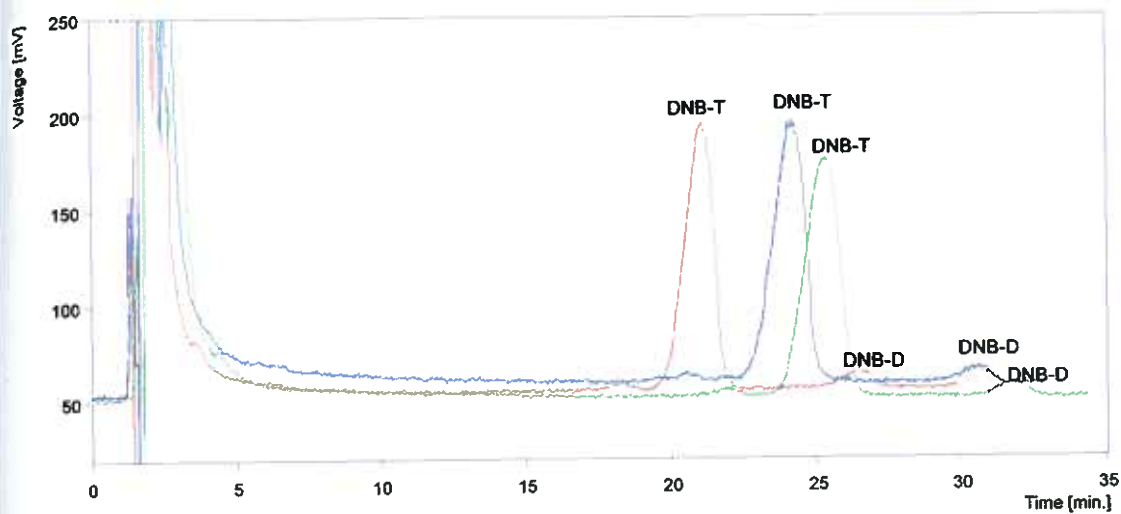
Poté jsem pracovní podmínky změnila tak, aby představovaly reálně možné odchylky dolů a nahoru od optimálních hodnot. Změna se týkala průtoku mobilní fáze, složení mobilní fáze a její kyselosti. Vzorek jsem tedy analyzovala při těchto podmínkách:

- průtok mobilní fáze 0,45 ml/min (vz.2)
- průtok mobilní fáze 0,55 ml/min (vz.3)
- složení mobilní fáze acetonitril:voda – 75:25 (vz.4)
- složení mobilní fáze acetonitril:voda – 85:15 (vz.5)
- kyselost mobilní fáze- na 100ml m.f. 0,8 ml kyseliny octové konc., pH = 3,32 (vz.6)
- kyselost mobilní fáze- na 100ml m.f. 1,2 ml kyseliny octové konc., pH = 3,22 (vz.7)

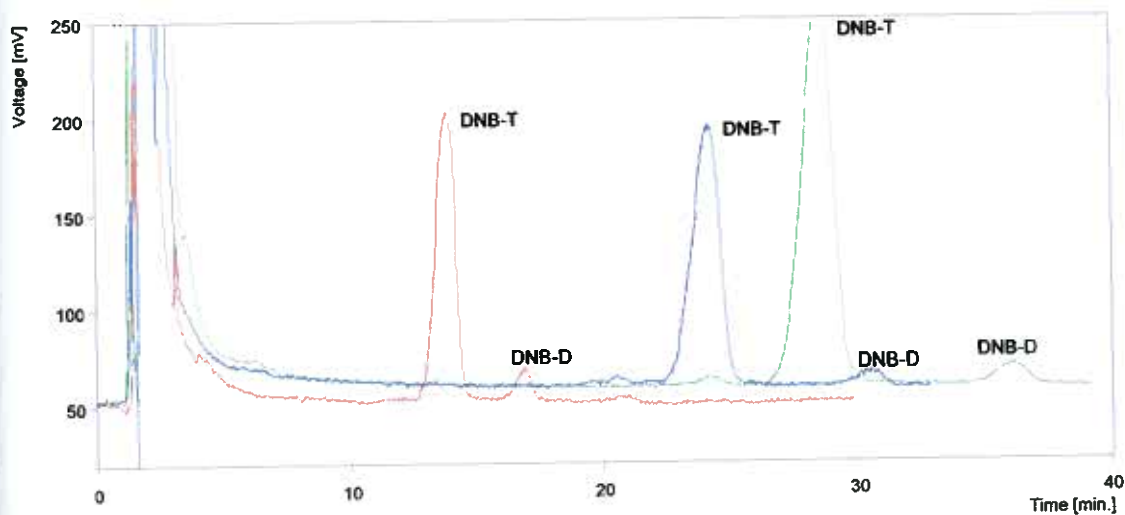
Odečtené výsledky uvádím v tabulce 13, chromatografické záznamy viz. obrázek 12, 13 a 14.

Tabulka 13: Plochy píků a retenční časy DNB-D při změně pracovních podmínek

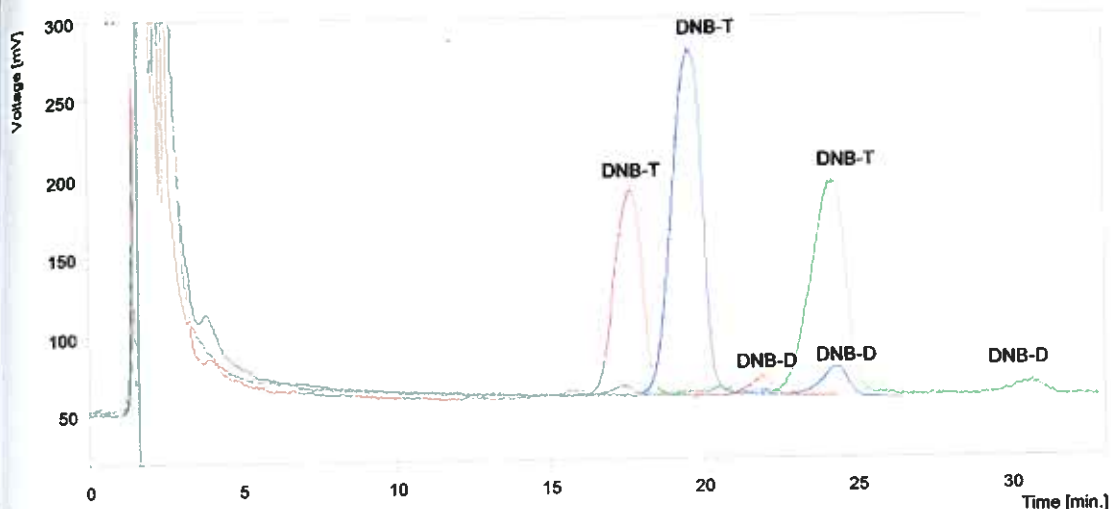
vzorek	1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.
1	675,22	678,96	669,08	1068,95	675,77	1012,73	673,40
2	678,35	677,52	669,07	1065,57	677,42	1011,01	667,71
3	672,39	677,09	672,29	1075,93	684,91	1009,93	672,01
4	675,03	679,26	675,35	1060,25	677,06	1016,24	674,75
\bar{a}	675,25	678,21	671,45	1067,68	678,79	1012,48	671,97
t_R DNB-T	24,33	25,38	21,06	28,76	13,95	19,55	17,90
t_R DNB-D	30,77	31,81	26,34	36,30	16,94	24,34	22,21



Obrázek 12: Měněn je průtok mobilní fáze: vz.1-modrý, vz.2-zelený, vz.3-červený



Obrázek 13: Měněno je složení mobilní fáze: vz.1-modrý, vz.4-zelený, vz.5-červený



Obrázek 14: Mění se kyselost mobilní fáze: vz.1-zelený, vz.6-modrý, vz.7-červený

Se změnou všech podmínek se zároveň mění retenční časy DNB-T a DNB-D. Plochy píků DNB-D odpovídají plochám měřeným za klasických podmínek v těchto případech:

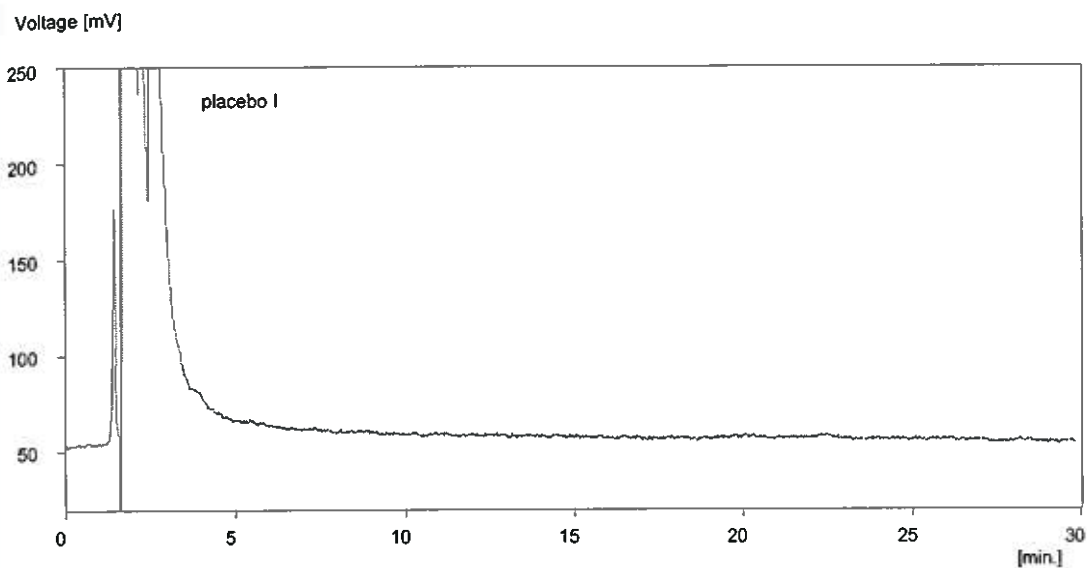
- změna průtoku na 0,45 ml/min. i 0,55 ml/min.
- změna poměru acetonitril:voda u mobilní fáze na 85:15
- okyselení 100ml mobilní fáze 1,2 ml kyseliny octové konc. (tedy na pH 3,22)

Při změně poměru acetonitril:voda v mobilní fázi na 75:25 a při okyselení 100 ml mobilní fáze 0,8 ml kys.octové konc. (na pH 3,32) se plochy píků DNB-D o poznání zvýšily (asi o třetinu).

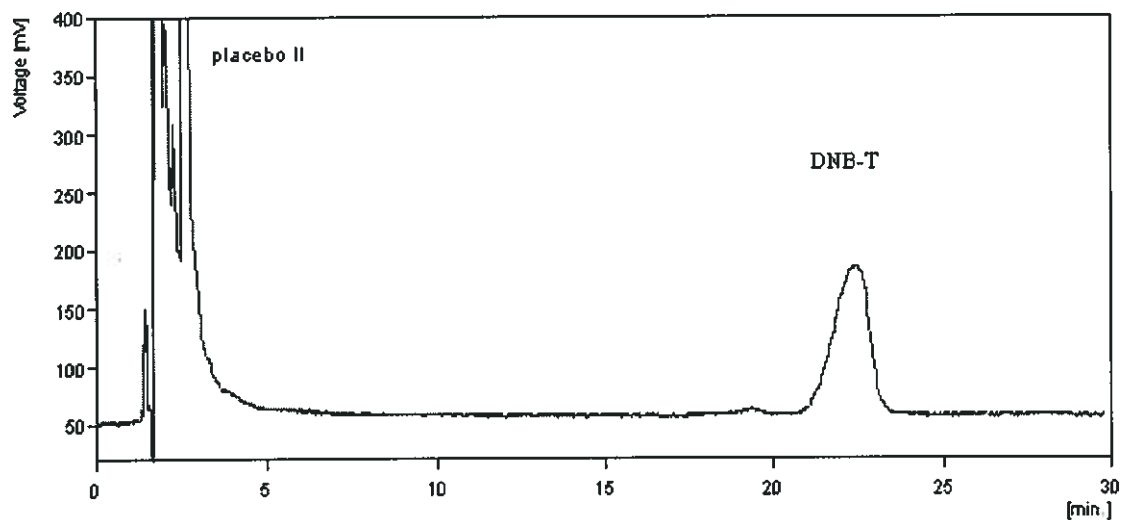
5.3.4 Selektivita metody

Abych dokázala, že metoda je selektivní, připravila jsem roztok derivovaného placebo I a II (postup viz. kapitola 4.2, pouze bez přídavku chloroformového roztoku laurylalkoholu). Porovnávala jsem tedy chromatogram placebo I, což je samotný krém konzervovaný parabeny (viz. obrázek 15) a placebo II, což je transkarbamový krém konzervovaný parabeny (viz. obrázek 16). Dále uvádím chromatogram vzorku připraveného pro sestavení kalibrační křivky

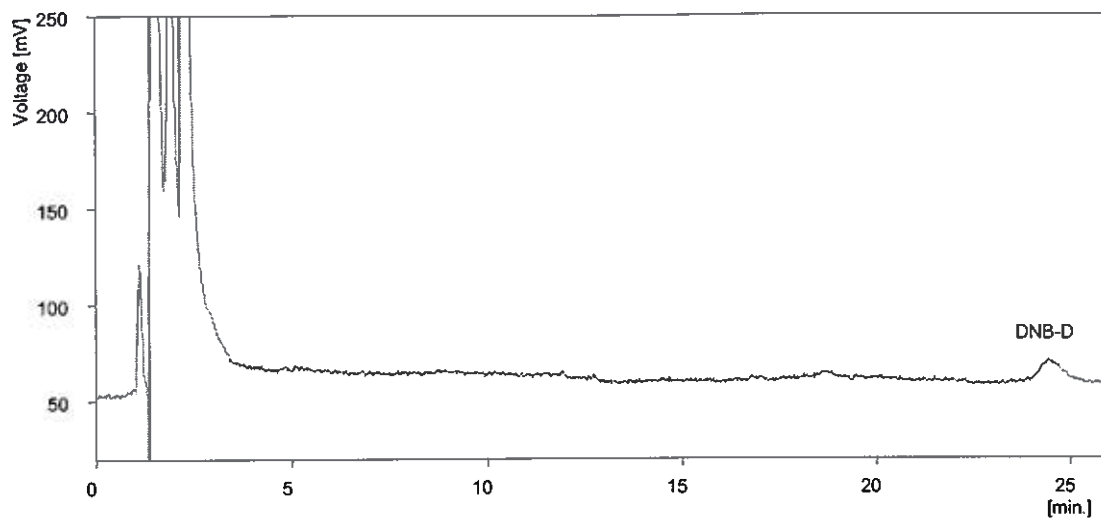
II (zde jsem derivovala placebo I s laurylalkoholem)-(viz. obrázek 17) a chromatogram vzorku připraveného pro sestavení kalibrační křivky III (kde jsem derivovala placebo II s laurylalkoholem)-(viz. obrázek 18).



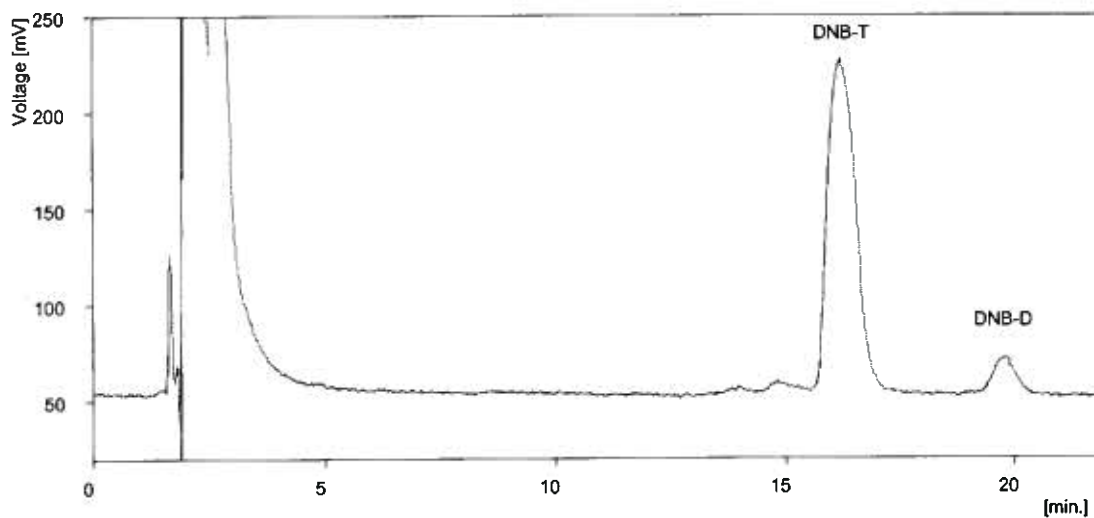
Obrázek 15: Derivované placebo I, chrom. podm. viz kapitola 4.3.



Obrázek 16: Derivované placebo II, chrom. podm. viz kapitola 4.3.



Obrázek 17: Derivovaný laurylalkohol s placebem I, chrom. podm. viz kapitola 4.3.



Obrázek 18: Derivovaný laurylalkohol s placebem II, chrom. podm. viz kapitola 4.3.

Metoda je dostatečně selektivní pro kvalitativní i kvantitativní hodnocení topických přípravků obsahujících transkarbam 12 a jeho předpokládanou nečistotu laurylalkohol.

5.3.5 Detekční a kvantitativní limit

Pro výpočet LOD a LOQ jsem použila vzorce zobrazené v kapitole 2.2.4. U chromatogramu nastříknutého placeba jsem v okolí $t_R = 27$ min proložila středem šumu přímkou a odečetla kladnou a zápornou amplitudu šumu.

$$r^+ = 48,578 - 47,359 = 1,219$$

$$r^- = 46,345 - 47,359 = -1,014$$

$$S_n = \frac{1,219 + 1,014}{5} = 0,4466$$

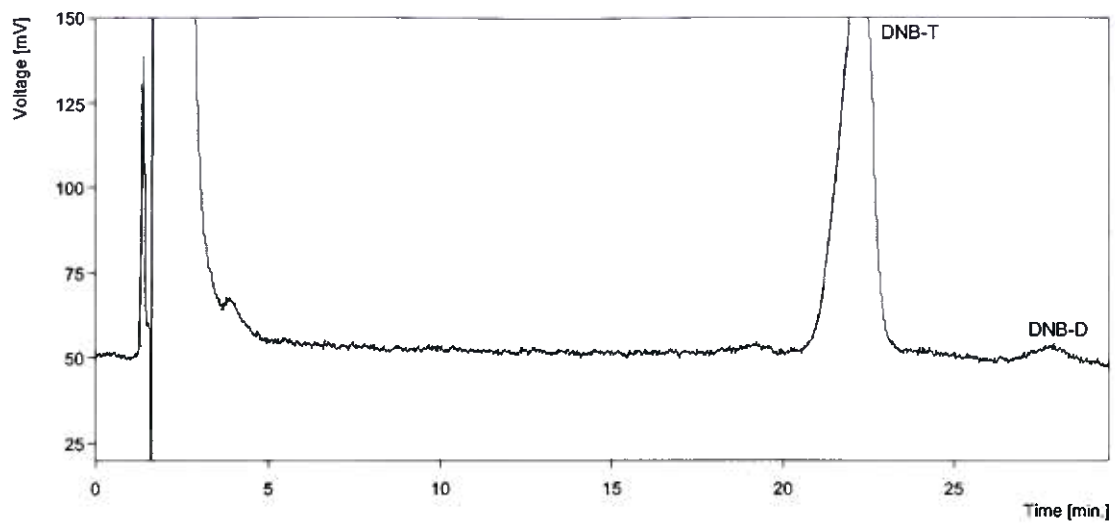
Z chromatogramu vzorku o koncentraci laurylalkoholu 0,1 mg/ml jsem odečetla plochu píku ($a = 345,1827$) a výšku píku ($h = 5,910$). Dosazením do vzorců získám :

$$K = \frac{345,1827}{5,910} = 58,4065$$

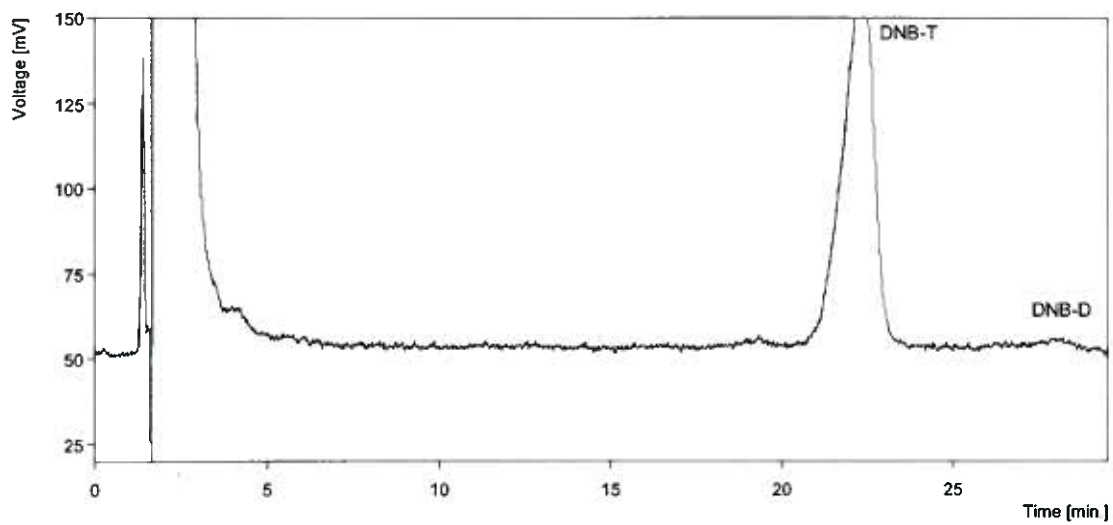
$$b_1 = \frac{345,1827}{0,1} = 3451,827$$

$$\text{LOD} = \frac{3 \cdot 0,4466 \cdot 58,4065}{3451,827} = \underline{0,023 \text{ mg/ml}} \quad \text{LOQ} = \frac{10 \cdot 0,4466 \cdot 58,4065}{3451,827} = \underline{0,076 \text{ mg/ml}}$$

K ověření výpočtu hodnoty LOQ jsem připravila vzorky o koncentraci laurylalkoholu 75 $\mu\text{g/ml}$ (viz. obrázek 19) a 50 $\mu\text{g/ml}$ (viz. obrázek 20). Z chromatografického záznamu jsem zjistila, že vyšší koncentrace (0,075 mg/ml) je ještě kvantifikovatelná ($a = 319,69$), koncentraci 0,05 mg/ml lze hodnotit již velmi obtížně.



Obrázek 19: Koncentrace laurylalkoholu 0,075 mg/ml, chrom. podm. viz kapitola 4.3.



Obrázek 20: Koncentrace laurylalkoholu 0,05 mg/ml, chrom. podm. viz kapitola 4.3.

6. ZÁVĚR

Ve své rigorózní práci jsem v topickém přípravku hodnotila nečistoty transkarbamu 12, což je akcelerant transdermální penetrace. K tomu účelu jsem využila vysokoúčinnou kapalinovou chromatografii. Vzorky jsem před analýzou derivovala dinitrobenzoylchloridem pro usnadnění UV-detekce transkarbamu 12. Protože se pík derivované aminohexanové kyseliny překrývá s píkem derivačního činidla, které je ve vzorku v nadbytku, bude nutné pro tuto nečistotu vypracovat jinou metodiku HPLC hodnocení. Ve své rigorózní práci jsem ji oddělila od derivačního činidla pomocí TLC.

Dále jsem hodnotila dodecylester kyseliny 3,5-dinitrobenzoové, což je derivovaný laurylalkohol. K měření jsem používala kolonu Separon SGX C₁₈ (150 × 3 mm I.D., 5 μm). Mobilní fáze měla složení acetonitril:voda:kyselina octová 98% - 80:20:1. Průtok mobilní fáze byl 0,5 ml/min., dávkované množství vzorku 20 μl. Detekce probíhala v UV oblasti při vlnové délce 230 nm. Za těchto podmínek jsem pro DNB-D sestavila kalibrační křivku. Pro kvantifikaci jsem použila metodu vnějšího standardu.

Metodu hodnocení derivovaného laurylalkoholu jsem validovala ověřením přesnosti, správnosti, robustnosti a selektivity. Vypočítala jsem detekční a kvantitativní limit pro hodnocení laurylalkoholu v léčivých přípravcích.

7. LITERATURA

- 1) Pošelužná, M.: Analytické hodnocení léčiv kapalinovou chromatografií I, Diplomová práce, FaF UK, HK, 2003
- 2) Churáček J., Jandera P.: Úvod do vysokoúčinné kapalinové kolonové chromatografie, SNTL, Praha 1984
- 3) Karlíček R.: Analytická chemie pro farmaceuty, Karolinum, Praha 1997
- 4) Klimeš J. a kol.: Kontrola léčiv I., Karolinum, Praha 2002
- 5) Mikeš O. a kol.: Laboratorní chromatografické metody, SNTL, Praha 1980
- 6) Churáček, J.; Jandera, P.: Nové trendy v teorii a instrumentaci vybraných analytických metod, Academia, Praha 1993
- 7) Český lékopis 2002 (ČL 2002), Grada, Praha 2002
- 8) www.sweb.cz/hplc/index.html, leden 2005
- 9) Klimeš J.: Základy kontroly chemických léčiv I, SNP, Praha 1990
- 10) Klimeš J. a kol.: Kontrola léčiv II, Karolinum, Praha 2004
- 11) Holzbecher Z.; Churáček J. a kol.: Analytická chemie, SNTL ALFA, Praha 1987
- 12) Pacáková V., Štulík K.: Vysokoúčinná kapalinová chromatografie, Státní pedagogické nakladatelství, Praha 1986
- 13) Štulík, K; Pacáková, V.: Elektroanalytická měření v proudících kapalinách, SNTL, Praha 1989
- 14) Holík M.: Validace analytických metod, Přírodovědecká fakulta Masarykovy univerzity, Brno 1995
- 15) www.zeus.cz/labor/bulletin98/8_validace.htm, listopad 2003
- 16) Eckschlanger K., Horsák I., Kodejš Z.: Vyhodnocování analytických výsledků a metod, SNTL, Praha 1980
- 17) www.sweb.cz/hplc/Tip/derivatizace.htm, leden 2005
- 18) Chalabala M. a kol.: Technologie léků, Galenika, Galen 1997
- 19) www.mzcr.cz/data/c764, červen 2004
- 20) http://chemie.upol.cz/skripta/zfcm/chrom/chrom_teorie.htm, březen 2005
- 21) Hrabálek A.; Doležal P.; Farsa O.; Krebs A.; Kroutil A.; Roman M.; Škubalová Z.: ω -amino acids derivatives, processes of their preparation and their use, US patent 6, 187, 983, 2001
- 22) Gasparič J.; Churáček J.: Papírová a tenkovrstvá chromatografie organických sloučenin (kap. 3.2.1), SNTL, Praha 1981

23) Šaršúnová M.; Schwarz V.; Michalec Č. a kol: Chromatografia na tenkých vrstvách vo farmácii a klinickej biochemii (kap. 6.2, str. 375), Osveta, Martin 1977