

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

KATEDRA ANALYTICKÉ CHEMIE

Přehled procesů, používaných při izolaci vybraných
léčivých látek z léčivých přípravků

Bakalářská práce

Vedoucí bakalářské práce: PharmDr. Ludmila Matysová

Vedoucí katedry: Doc. RNDr. Petr Solich, CSc.

Hradec Králové 2006

Petra Žáková

Děkuji PharmDr. Ludmile Matysové za její odborné vedení, cenné rady a pomoc při vypracování této bakalářské práce.

Obsah

| | |
|--|----|
| 1 ÚVOD | 5 |
| 2 CÍL PRÁCE | 7 |
| 3 SEPARAČNÍ METODY..... | 9 |
| 3.1 Úvod | 10 |
| 3.1.1 Separace | 10 |
| 3.1.2 Dělení separačních metod ^[2] | 10 |
| 3.2 Termodynamika a účinnost separace | 11 |
| 3.2.1 Distribuční konstanta K_D | 11 |
| 3.3 Chromatografické metody | 12 |
| 3.3.1 Chromatografie | 12 |
| 3.3.2 Základní pojmy a rozdělení chromatografických metod ^[2] | 12 |
| 3.3.3 Princip chromatografické separace ^[1] | 13 |
| 3.4 HPLC | 14 |
| 3.4.1 Princip separace látek ^[1] | 14 |
| 3.4.2 Kapalinový chromatograf ^[4] | 14 |
| 3.5 Extrakce | 16 |
| 3.5.1 Princip extrakce..... | 16 |
| 3.5.2 Cíl extrakce | 16 |
| 3.5.3 Klasifikace extrakce | 16 |
| 3.5.4 Proces extrakce | 17 |
| 3.5.5 Vytvoření extrahovatelné formy sledované látky | 17 |
| 4 CHLORHEXIDINI DIGLUCONATIS SOLUTIO..... | 19 |
| 4.1 Účinná látka | 20 |
| 4.1.1 Název ^[6] | 20 |
| 4.1.2 Vzorec a molekulová hmotnost ^[6] | 20 |
| 4.1.3 Charakteristika ^[6] | 20 |
| 4.1.4 Vlastnosti ^[6] | 21 |
| 4.1.5 Farmakodynamické vlastnosti ^[8] | 21 |
| 4.1.6 Farmakokinetické vlastnosti ^[8] | 21 |
| 4.1.7 Inkompatibility ^[8] | 21 |
| 4.2. Metody separace Chlorhexidinu diglukonátu z léčivého přípravku Amastol Neo (mast) | 21 |
| 4.2.1 Lékopisná definice masti ^[6] | 21 |
| 4.2.2.1 Lékopisné stanovení ^[6] | 22 |
| 4.2.2.2 Stanovení pomocí HPLC | 22 |
| 4.3 Souhrn rešerše | 25 |

| | |
|--|-----------|
| 5 DICLOFENACUM NATRICUM | 26 |
| 5.1 Účinná látka | 27 |
| 5.1.1 Název ^[6] | 27 |
| 5.1.2 Vzorec a molekulová hmotnost ^[6] | 27 |
| 5.1.3 Charakteristika ^[6] | 27 |
| 5.1.4 Vlastnosti ^[6] | 28 |
| 5.1.5 Farmakodynamické vlastnosti ^[10] | 28 |
| 5.1.6 Farmakokinetické vlastnosti ^[10] | 28 |
| 5.1.7 Inkompatibility ^[10] | 28 |
| 5.2. Metody stanovení diklofenaku sodného z přípravku Veral supp. (čípky) | 29 |
| 5.2.1 Lékopisná definice čípků ^[6] | 29 |
| 5.2.2 Metody stanovení diklofenaku sodného | 29 |
| 5.2.2.1 Lékopisné stanovení ^[6] | 29 |
| 5.2.2.2 Stanovení pomocí HPLC | 29 |
| 5.3 Souhrn rešerše | 34 |
| 6 ZÁVĚR | 35 |
| 7 LITERATURA A PŘEHLED ZKRATEK | 37 |
| 7.1 Literatura | 38 |
| 7.2 Přehled zkratk | 39 |

1 Úvod

Chlorhexidin je biguanidové antiseptikum s baktericidními a bakteriostatickými účinky na široké spektrum grampozitivních a gramnegativních bakterií. Inhibuje růst mykobakterií. Proti sporám chlorhexidin za pokojové teploty nepůsobí. Chlorhexidin působí i proti některým virům a plísním. Používá se v mnoha lékových formách jako stomatologikum, antiseptikum a dezinficiens. V současné době je hojně využíván převážně ve formě ústní vody k léčba a prevenci zánětu dásní.¹

Amastol Neo je mast, která se využívá ve veterinárním lékařství k léčbě zánětů, svědění, otlaků a zapařenin kůže.

Diklofenak sodný je nesteroidní látka s výraznými protirevmatickými, protizánětlivými, analgetickými a antipyretickými vlastnostmi. Je to hojně používaná farmaceutická substance. Používá se v mnoha lékových formách jako např. v mastech, gelech, čípkách, injekcích, tabletách a kapslích.

Přípravek Veral supp. se užívá při zánětlivém a degenerativním onemocnění kloubů a páteře, mimokloubním revmatismu, dně a při bolestivých stavech zánětlivého revmatického původu.

¹ Použité zdroje: [21]

2 Cíl práce

Cílem této bakalářské práce bylo nalézt a sepsat metody separace Chlorhexidinu diglukonátu z léčivého přípravku Amastol Neo a Diklofenaku sodného z přípravku Veral supp a vypracovat přehled výsledků řešení .

3 Separční metody

3.1 Úvod ²

3.1.1 Separace

Stanovení jedné složky ve složitějším vzorku obvykle není možné provést přímo po převedení vzorku do roztoku. Většinou je nutné před vlastní analýzou oddělit stanovovanou složku od ostatních nebo oddělit složky, které stanovení ruší. K tomuto účelu se používá separace, kterou můžeme definovat jako operaci, při které se vzorek dělí alespoň na dva podíly odlišného složení. Separací metody obecně slouží k izolaci chemických individuů ze směsi buďto přírodních látek nebo produktů syntéz. Z užšího analytického hlediska je separace jedna obvykle první a velmi významná fáze analýzy, na které závisí přesnost a spolehlivost výsledku celé analýzy.^[1]

Separace využívá různých fyzikálních, fyzikálně chemických a chemických vlastností složek vzorku k tomu, aby byl vzorek rozdělen alespoň na dva podíly odlišného složení. Lze ji charakterizovat selektivitou, rozsahem použitelnosti a frakcionační kapacitou.^[2]

3.1.2 Dělení separačních metod ^[2]

Separacích metod je značné množství, ale ty nejdůležitější lze zařadit do dvou velkých skupin:

- 1) Metody založené na rozdílech v rovnovážné distribuci složek mezi dvě fáze
- 2) Metody založené na rozdílech v rychlosti pohybu složek
 - a) separace membránové
 - b) separace polem

² V kapitole 3.1 byly použity tyto zdroje: [1], [2]

Tabulka č. 1: Dělení separačních metod

| | |
|--|---|
| 1) Metody založené na rozdílech v rovnovážné distribuci složek mezi dvě fáze | |
| Fázová rovnováha | Příklady separačních metod |
| Plyn-kapalina | Destilace, plynová chromatografie (GLC) |
| Plyn-pevná látka | Sublimace, plynová chromatografie (GLC) |
| Kapalina-kapalina | Extrakce, kapalinová chromatografie (HPLC) |
| Kapalina-pevná látka | Frakční krystalizace, kapalinová chromatografie, molekulová síta, extrakce na pevnou fázi |
| 2) Metody založené na rozdílech v rychlosti pohybu složek | |
| Separace membránové | Ultrafiltrace, dialýza |
| Separace polem | Elektroforéza, ultracentrifugace |

3.2 Termodynamika a účinnost separace³

3.2.1 Distribuční konstanta K_D

Většina separačních metod používaných v analytické chemii je založena na rovnovážné distribuci složek vzorku mezi dvě fáze. Po dosažení rovnováhy může být distribuce složky A vyjádřena distribuční konstantou K_D , což je poměr celkových koncentrací ve dvou daných fázích např. fázi 1 a 2:

$$K_{D(A)} = \frac{(c_A)_1}{(c_A)_2}$$

³ V kapitole 3.2 byly použity tyto zdroje: [2]

Pokud složka A existuje v obou fázích v jediné formě, např. molekulární, lze vyjádřit vztah pro K_D pomocí rovnovážných látkových koncentrací:

$$K_{D(A)} = \frac{[A]_1}{[A]_2} = \frac{(n_A)_1 \cdot V_2}{(n_A)_2 \cdot V_1}$$

kde $[A]_1$ a $[A]_2$ jsou rovnovážné látkové koncentrace ve fázích 1 a 2, V_1 a V_2 jsou objemy fází, $(n_A)_1$ a $(n_A)_2$ jsou látková množství.

V chromatografii se v čitateli uvádí fáze stacionární, v extrakci je v čitateli fáze organická.

3.3 Chromatografické metody ⁴

3.3.1 Chromatografie

Chromatografie je jedna z nejvýznamnějších analytických separačních metod. Umožňuje dělení, identifikaci a stanovení velkého počtu organických i anorganických látek.^[3] Využívá dělení látek mezi dvěma fázemi, z nichž jedna je mobilní a druhá stacionární.^[2]

3.3.2 Základní pojmy a rozdělení chromatografických metod ^[2]

Mobilní fáze = pohyblivá (plyn nebo kapalina)

Stacionární fáze = nepohyblivá může nabývat nejrůznějších forem. Někdy to jsou částičky pevné hmoty, jindy je to tenká vrstvička kapaliny nanesená na pevných částicích, nebo to může být tenký film kapaliny na vnitřní stěně kapiláry.

Sorbent = jakákoliv forma fáze stacionární. Je to náplň kolony, přes kterou postupuje fáze mobilní.

Vzorek = směs látek, která má být dělena

Chromatograf = přístroj na němž se separace provádí

Chromatogram = záznam chromatografické separace

⁴ V kapitole 3.3 byly použity tyto zdroje: [1], [2], [3]

V současné době se používá mnoho typů chromatografických metod, které se liší z hlediska povahy: ^[1]

- separačního děje (chromatografie adsorpční, rozdělovací, iontovýměnná, na molekulových sítích)
- použité techniky (chromatografie sloupcová, papírová, na tenké vrstvě)
- způsobu vyvíjení (chromatografie eluční, vytěšňovací, frontální analýza)
- skupenství pohyblivé a nepohyblivé fáze (chromatografie kapalina-tuhá látka, kapalina-kapalina, plyn-kapalina, plyn-tuhá látka).

3.3.3 *Princip chromatografické separace* ^[1]

Při všech chromatografických metodách se mnohonásobně ustavuje rovnováha součástí analyzované směsi mezi dvěma vzájemně nemísitelnými fázemi. Stacionární fáze má schopnost různou měrou zadržovat jednotlivé součásti analyzované směsi. Mobilní fáze vymývá (eluuje) jednotlivé součásti směsi z nepohyblivé fáze a odnáší je ve směru toku různou rychlostí, čímž dojde k jejich oddělení.

Hybnou silou v chromatografickém systému je tok mobilní fáze, která unáší ionty nebo molekuly. Vlastní dělení látek v systému však závisí na brzdící síle (retenci), která působí selektivně: některá látka je bržděna více, jiná méně. Při chromatografickém procesu se ustavuje dynamická rovnováha mezi vratnou sorpcí na stacionární fázi a desorpcí do mobilní fáze. Rychlost postupu látky závisí na sorpční rovnováze, tj. čím pevněji se látka sorbuje na stacionární fázi, tím pomaleji v chromatografickém systému postupuje.

3.4 HPLC⁵

HPLC je vysoce instrumentálně pokročilá technika kapalinové chromatografie. Vysoké účinnosti separačního procesu je dosaženo použitím kolon plněných stacionární fází o malé a dobře definované velikosti částic. Pro dosažení dostatečného průtoku mobilní fáze je potřeba aplikovat tlak jednotek až desítek MPa.^[4]

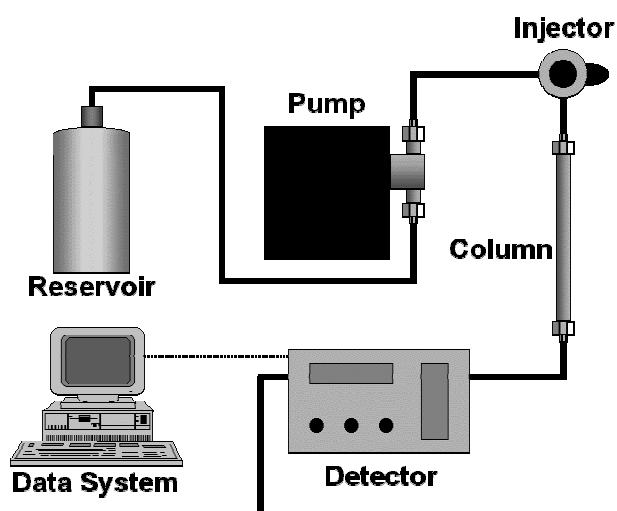
3.4.1 Princip separace látek^[1]

Dělení látek nastává mezi stacionární fází naplněnou v koloně a mobilní fází procházející kolonou za vysokého tlaku. Protože k dělení látek lze přitom využít všech vratných dvoufázových separačních mechanismů (adsorpce, rozdělování, iontová výměna), je možné nalézt selektivní a účinný chromatografický systém k dělení směsi prakticky všech organických látek rozpustných ve vodě, zředěných kyselinách nebo organických rozpouštědlech.

3.4.2 Kapalinový chromatograf^[4]

Základní součásti kapalinového chromatografu : zásobníky mobilní fáze, vysokotlaké čerpadlo, dávkovací zařízení, kolona, detektor a zapisovací zařízení, počítač.

Obrázek č. 1: Schéma kapalinového chromatografu^[5]



⁵ V kapitole 3.4 byly použity tyto zdroje: [1], [4], [5]

Chromatografické kolony

- účinnost kolony závisí na použité stacionární fázi, na délce kolony a na jejím tvaru, na materiálu kolony, na úpravě vnitřního povrchu kolony a na množství spojovacích částí
- chromatografické kolony se zhotovují z nerezové oceli nebo ze skla
- nejvýhodnější jsou kovové kolony, jejichž vnitřní povrch je potažen vrstvou skla
- v současnosti se obvykle používají kolony o délce 10 až 30 cm
- průměr analytických kolon bývá v řádu jednotek milimetrů
- kolony lze plnit stacionární fází přímo v laboratoři, nebo je možné je koupit od výrobců
- v současnosti se jako velice nadějně jeví použití kapilárních kolon, jejichž průměr je srovnatelný s velikostí částic náplně

Detektory v HPLC

- detektory v HPLC jsou obecně složitější a rozmanitější než detektory v GC
- detektor musí být kompatibilní s viskózními systémy s malými difúzními koeficienty
- detektor musí poskytovat odezvu dostatečně rychle
- detektor může být univerzální nebo selektivní
- univerzální detektor reaguje na vlastnosti systému jako celku (refraktometrický)
- selektivní detektor reaguje na určitou selektivní vlastnost analytu (fluorescenční)
- detektor může být destruktivní (AAS, AES) nebo nedestruktivní (UV/VIS)
- detektory lze vhodně kombinovat (vícenásobná detekce)

3.5 Extrakce⁶

3.5.1 Princip extrakce

Jedná se o separační (dělicí) proces, při kterém jsou v kontaktu dvě vzájemně nemísitelné fáze. Látky (analyty) se rozdělují mezi tyto fáze na základě různé rozpustnosti (rozdílných rozdělovacích koeficientů) v použitých rozpouštědlech. Čím větší je rozdíl mezi rozdělovacími koeficienty látek, tím dokonalejší je jejich oddělení.

3.5.2 Cíl extrakce

Cílem extrakce je selektivní až specifické oddělení analytu od ostatních složek nebo naopak oddělení rušících látek od analytu.

3.5.3 Klasifikace extrakce

a) podle zúčastněných fází

1. plyn - kapalina (GLE, gas - liquid extraction) - extrakce těkavých látek plynem z kapaliny. Používá se v plynové chromatografii pro nakoncentrování těkavých složek vzorku.
2. kapalina - kapalina (LLE, liquid - liquid extraction) - z analytického hlediska nejdůležitější, dnes již rychle vytlačována extrakcemi tuhou fází (SPE, solid - phase extraction)
3. tuhá fáze - kapalina (SLE, solid - liquid extraction, selektivní rozpouštění, loužení) používá se velmi často v biologii, biochemii, organické a anorganické chemii. Získávají se takto např. alkaloidy, hormony a barviva. Tuhé organické materiály se za tepla extrahují organickými rozpouštědly, z tavenin se horkou vodou extrahují rozpustné anorganické soli.

b) podle způsobu provedení

1. jednostupňová - dochází k ustavení jedné rovnováhy mezi fázemi. Nejběžnějším případem je roztřepání v dělicí nálevce.

⁶ V kapitole 3.5 byly použity tyto zdroje: [20]

2. mnohostupňová - proces ustavení rovnováhy se mnohokrát opakuje v oddělených krocích. Příkladem je několikanásobné roztřepávání v dělicí nálevce nebo extrakce v zařízení podle Craiga.

3. kontinuální – fáze jsou při protiproudém pohybu v neustálém styku. Příkladem je extrakce v Soxhletově extraktoru či extraktorech na extrakci kapaliny kapalinou.

c) podle charakteru extrahovaných látek

1. extrakce organických látek
2. extrakce kovových chelátů
3. extrakce iontových asociátů

3.5.4 Proces extrakce

Proces extrakce lze rozdělit do třech po sobě jdoucích kroků:

1. vytvoření extrahovatelné formy sledované látky - úprava vzorku
2. ustavení rozdělovací rovnováhy - vlastní extrakce
3. případná izolace stanovované látky z organické fáze – reextrakce, odpaření rozpouštědla

3.5.5 Vytvoření extrahovatelné formy sledované látky

Organické látky: lze je přímo extrahovat do vhodně zvoleného organického rozpouštědla. Polarita rozpouštědla musí přibližně odpovídat polaritě extrahované látky. Nepolární organické látky extrahujeme nepolárními rozpouštědly (s vodou málo mísitelná). Vhodné rozpouštědlo pro extrakci polárních organických látek je často mísitelné s vodou (mísitelnost roste s rostoucí polaritou rozpouštědla), což ztěžuje proces extrakce. Organickou polární látku je tedy nutno převést do lépe extrahovatelné formy. K tomu lze využít:

- a) vedlejší asociační reakce (dimerizace, polymerace) a disociační děje - ovlivněny vlastnostmi vodné fáze jako pH, iontová síla, teplota
- b) chemické reakce

Anorganické látky: ionty nepřecházejí do nepochárních rozpouštědel, a proto je nutné je převést chemickou reakcí na nepochární látky - nepochární komplexy. Komplexy vznikají reakcí s vhodným chelatačním činidlem, jsou cyklického tvaru a velmi stabilní. Stabilita chelátů roste s rostoucím počtem kruhů ve struktuře (nejstálejší pěti- a šestičlenné kruhy).

Vzniklý komplex (chelát) může být:

- a) nenabitý - přímá extrakce do organické fáze
- b) nabitý - asociace s opačně nabitým iontem pomocí elektrostatické interakce, vzniká relativně stálý nenabitý komplex - iontový asociát, který lze extrahovat polárnějšími organickými rozpouštědly.

4 Chlorhexidini digluconatis solutio

4.1 Účinná látka ⁷

4.1.1 Název ^[6]

Latinský název ČL 2002: Chlorhexidini digluconatis solutio

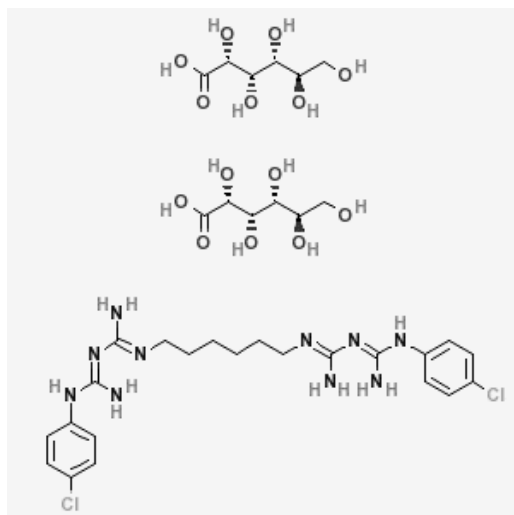
Anglický název Ph. Eur. 4: Chlorhexidine digluconate solution

Český název ČL 2002: Chlorhexidin diglukonát roztok, (Roztok chlorhexidinium diglukonatu)

4.1.2 Vzorec a molekulová hmotnost ^[6]

Sumární vzorec: $C_{34}H_{54}Cl_2N_{10}O_{14}$

Strukturní vzorec ^[7]:



Molekulová hmotnost: $M_r = 897,77$

4.1.3 Charakteristika ^[6]

Je to vodný roztok, který obsahuje 190 g/l až 210 g/l 1,1'-(hexan-1,6-diyl)bis[5-(4-chlorfenyl)biguanid]-di-D-glukonátu.

⁷ V kapitole 4.1. byly použity tyto zdroje: [6], [7], [8]

4.1.4 Vlastnosti ^[6]

Téměř bezbarvá nebo slabě nažloutlá tekutina. Je mísitelný s vodou, dobře rozpustný v acetonu a v lihu 96%.

4.1.5 Farmakodynamické vlastnosti ^[8]

Chlorhexidin působí proti široké škále gramnegativních a grampozitivních vegetativních bakterií, kvasinkám, dermatofytickým plísním a lipofilním virům.

4.1.6 Farmakokinetické vlastnosti ^[8]

Vzhledem k povaze kationtu se chlorhexidin pevně váže ke kůži, sliznici a tkáním a je tak velmi málo absorbován.

4.1.7 Inkompatibility ^[8]

Chlorhexidin je inkompatibilní s látkami aniontové povahy. Chlornanové bělicí prostředky mohou způsobit hnědé zbarvení látek, které byly před tím ve styku s přípravky obsahujícími chlorhexidin.

4.2. Metody separace Chlorhexidinu

diglukonátu z léčivého přípravku Amastol Neo (mast)

4.2.1 Lékopisná definice masti ^[6]

Unguenta (Masti)

Jsou tvořeny jednofázovým základem, v němž mohou být dispergovány tuhé nebo kapalné látky.

Hydrofobní masti

Hydrofobní (lipofilní) masti mohou absorbovat pouze malé množství vody. Typické použité základy jsou tvrdý, tekutý nebo lehký tekutý parafin, rostlinné oleje, živočišné tuky, syntetické acylglyceroly, vosky a tekuté polyalkylsiloxany.

Masti emulgující vodu

Vodu emulgující masti mohou absorbovat větší množství vody. Jejich základem jsou takové hydrofobní masti, v nichž jsou přítomny emulgátory typu voda v oleji (*v/o*), jako jsou alkoholy tuku z ovčí vlny, estery sorbitanu, monoacylglyceroly a mastné alkoholy nebo emulgátory typu olej ve vodě (*o/v*), jako jsou sulfatované mastné alkoholy, polysorbáty, ethery cetostearamakrogolu nebo estery mastných kyselin s makrogoly. Jejich základy jsou přítomny v hydrofobních mastech.

Hydrofilní masti

Hydrofilní masti jsou přípravky se základem mísitelným s vodou. Základ je obvykle tvořen směsí tekutých a tuhých polyethylenglykolů (makrogolů). Mohou obsahovat přiměřené množství vody.

4.2.2 Metody stanovení chlorhexidinu diglukonátu

4.2.2.1 Lékopisné stanovení ^[6]

1,000 g se přenesse do kádinky 250 ml, přidá se 50 ml *kyseliny octové ledové R* a titruje se *kyselinou chloristou 0,1 mol/l VS* za potenciometrické indikace bodu ekvivalence. Pro výpočet se použije zjištěná hodnota relativní hustoty.

1 ml *kyseliny chloristé 0,1 mol/l VS* odpovídá 22,44 mg $C_{34}H_{54}C_{12}N_{10}O_{14}$.

4.2.2.2 Stanovení pomocí HPLC

Pokud stanovujeme chlorhexidin v tabletách je nutné tablety před vlastním stanovením rozpustit ve vhodném rozpouštědle. Izolace účinné látky z masti je daleko složitější. Do chromatografické kolony je vstříkován roztok, a proto musíme vzorek upravit tak, abychom ho mohli stanovovat.

V literatuře se stanovení většinou uvádí jen pro roztoky a tablety. Následující tabulka zahrnuje nalezené možnosti v literatuře.

HPLC hodnocení chlorhexidinu diglukonátu

| Přípravek | Extrakce | Stacionární fáze | Mobilní fáze | Detekce | Průtok [ml/min] | Vnitřní standard | Retenční čas | Citace |
|-------------------|--|--|--|--------------|--------------------|---------------------|-----------------|--------|
| Oční přípravky | Tvoří se iontové páry s kyselým barvivem a následuje extrakce do organické fáze | μBondapak C ₁₈ (10 μm) (30cm x 3,9 mm I.D.) | MF I: pufr (pH 4,0), CH ₃ COOH , CH ₃ OH a heptanosulfonát sodný (92,1: 0,2: 4,8: 2,9) MF II: pufr (pH 4,0), CH ₃ COOH, CH ₃ OH a heptanosulfonát sodný (4,8: 0,4: 91,9: 2,9) | UV 254 nm | 1,8 | | 9,70 min | [11] |

| Přípravek | Extrakce | Stacionární fáze | Mobilní fáze | Detekce | Průtok [ml/min] | Vnitřní standard | Retenční čas | Cítace |
|--|---|--|---|----------------------|----------------------------|-----------------------------|-------------------------|---------------|
| Hibitane obstretric cream | 1 g masti + 25 ml MeOH (dělicí nálevka) + 25 ml isooktanu → třepeme. Oddělíme spodní MeOH vrstvu do druhé dělicí nálevky (+ 25 ml isooktanu.) MeOH vrstvu přeneseme do 100 ml odměrné baňky a doplníme objem MeOH. | Partsil (11μ silica gel) (10cm x 4 mm I.D.) | acetonitril a 0,01 M roztok kyseliny sírové ve vodě (91,5 : 8,5) | UV 254 nm | 1 | | 320 sec | [14] |
| tablety | Jen úprava vzorku: 1,25g tablet (rozdrceny) + 50 ml methanolu. | μBondapak C₁₈, (10μm) 30 cm x 3,9 mm | acetonitril, pufr (pH 5), chlorid sodný a hydrogensíran tetrabutylamonný (25:75:0,59:1,02) | UV 294 nm | 2 | | 9,50 min | [15] |

4.3 Souhrn řešení

HPLC stanovení přípravku Amastol Neo nebylo doposud popsáno v dostupné literatuře.

Ke stanovení léčivých přípravků, které obsahují chlorhexidin diglukonát jako účinnou látku, se používá metoda HPLC s UV detekcí. Nejpoužívanější stacionární fází je silikagel s navázanou reverzní fází. Nepoužívá se vnitřní standard.

5 Diclofenacum natricum

5.1 Účinná látka⁸

5.1.1 Název^[6]

Latinský název ČL 2002: Diclofenacum natricum

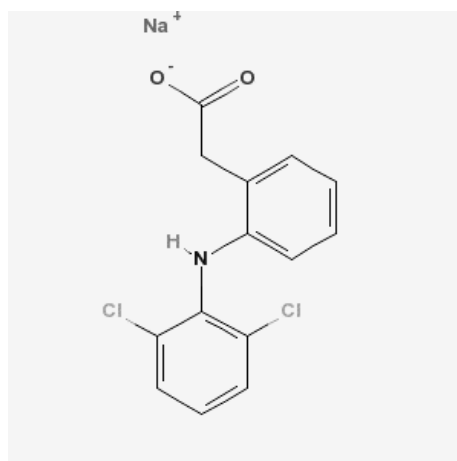
Anglický název Ph. Eur. 4: Diclofenac sodium (Sodium diclofenac)

Český název ČL 2002: Diklofenak sodná sůl (Sodná sůl diklofenaku)

5.1.2 Vzorec a molekulová hmotnost^[6]

Sumární vzorec: $C_{14}H_{10}Cl_2NNaO_2$

Strukturní vzorec^[9]:



Molekulová hmotnost: $M_r = 318,13$

5.1.3 Charakteristika^[6]

Je to natrium-{2-[(2,6-dichlorfenyl)amino]fenyl}acetát. Počítáno na vysušenou látku, obsahuje 99,0 % až 101,0 % sloučeniny $C_{14}H_{10}Cl_2NNaO_2$

⁸ V kapitole 5.1 byly použity tyto zdroje: [6], [9],[10]

5.1.4 Vlastnosti ^[6]

Bílý nebo slabě nažloutlý krystalický slabě hygroskopický prášek. Je mírně rozpustný ve vodě, snadno rozpustný v methanolu, dobře rozpustný v lihu 96%, těžce rozpustný v acetonu.

Taje při asi 280 °C, za rozkladu.

5.1.5 Farmakodynamické vlastnosti ^[10]

Diklofenak sodný je nesteroidní látka s výraznými protirevmatickými, protizánětlivými, analgetickými a antipyretickými vlastnostmi.

Experimentálně dokázaná inhibice biosyntézy prostaglandinů je významnou složkou mechanismu působení. Prostaglandiny hrají významnou úlohu při vzniku zánětu, bolesti a horečky.

Během klinických sledování se také zjistilo, že diklofenak má i výrazný analgetický vliv při stavech střední a silné intenzity bolesti nerevmatického původu.

5.1.6 Farmakokinetické vlastnosti ^[10]

Nezjistila se žádná kumulace látky při dodržení doporučeného schématu dávkování a při zachování doporučených intervalů mezi jednotlivými dávkami.

Diklofenak se váže v 99,7 % na sérové bílkoviny, zejména na albumin (99,4 %). Diklofenak proniká do synoviální tekutiny, ve které byly naměřeny nejvyšší koncentrace za 2-4 hodiny po dosažení maximálních koncentrací v plazmě.

5.1.7 Inkompatibility ^[10]

Nejsou známy žádné inkompatibility.

5.2. Metody stanovení diklofenaku sodného z přípravku Veral supp. (čípky)

5.2.1 Lékopisná definice čípku^[6]

Suppositoria (Čípky)

Jsou to tuhé jednodávkové přípravky. Tvarem, velikostí a konzistencí jsou vhodné pro podání do konečníku. Čípky obsahují jednu nebo více léčivých látek dispergovaných nebo rozpuštěných ve vhodném čípkovém základu, který je rozpustný nebo dispergovatelný ve vodě nebo taje při teplotě těla. Je-li to potřebné, mohou být přidány pomocné látky, jako jsou rozpouštědla, látky s adsorpčními vlastnostmi, povrchově aktivní látky, kluzné látky, protimikrobní látky a barviva schválená oprávněnou autoritou.

5.2.2 Metody stanovení diklofenaku sodného

5.2.2.1 Lékopisné stanovení^[6]

0,250 g se rozpustí v 30 ml *kyseliny octové bezvodé R* a titruje se *kyselinou chloristou 0,1 mol/l VS* za potenciometrické indikace bodu ekvivalence.

1 ml *kyseliny chloristé 0,1 mol/l VS* odpovídá 31,81 mg $C_{14}H_{10}C_{12}NNaO_2$.

5.2.2.2 Stanovení pomocí HPLC

Pokud stanovujeme diklofenak v tabletách je nutné tablety před vlastním stanovením rozpustit ve vhodném rozpouštědle. Stanovení účinné látky z čípků je daleko složitější. Do chromatografické kolony je vstříkován roztok, a proto musíme vzorek upravit tak, abychom ho mohli stanovovat.

Úprava vzorku ^[13]:

Tři čípky byly postupně zváženy, nasekány na malé kousíčky a přeneseny do porcelánové misky. Do misky bylo přidáno 15 ml destilované vody a směs byla zahřívána při teplotě 40-45 °C během pěti minut. Vodná vrstva se odloučila a vše se opakovalo celkem pětkrát. Vodný roztok se doplnil v odměrné baňce na 100ml. Pro analýzu se roztok ředí v poměru 1:1000.

V literatuře se stanovení většinou uvádí jen pro tablety. Následující tabulka zahrnuje nalezené možnosti v literatuře.

HPLC hodnocení diklofenaku sodného

| Přípravek | Extrakce | Stacionární fáze | Mobilní fáze | Detekce | Průtok [ml/min] | Vnitřní standard | Retenční čas | Citace |
|-----------------------------|--|---|--|----------------------|----------------------------|--|-------------------------|---------------|
| Komerční tablety | Jen úprava vzorku: 20 tbl-rozdrceno.Množství prášku odpovídající 5mg DS bylo rozpuštěno v 5 ml MeOH. Roztok byl ředěn MF, výsledná koncentrace byla 125 mg/ml DS. | Nucleosil C18 (5µm) (250 x 4,6 mm) | Metanol-voda- octová kyselina (80:20:1) | UV 254 nm | 1 | | 11,05 | [12] |
| tablety | Jen úprava vzorku: 20 tbl-rozdrceno. Množství prášku odpovídající 20 mg DS bylo přeneseno do 100ml odměrné baňky a rozpuštěno v MeOH. | Mikrobondapa k CN (300 x 3,9 mm) | Metanol-octová kyselina (65:35) | UV 280nm | 1 | p-nitrobenz oová kyseliny | 3,70 | [16] |

| Přípravek | Extrakce | Stacionární fáze | Mobilní fáze | Detekce | Průtok [ml/min] | Vnitřní standard | Retenční čas | Citace |
|---------------------|--|---|--|--------------|--------------------|------------------------|-----------------|--------|
| Komerční tablety | Jen úprava vzorku: 20 tbl-rozdrceno. Množství prášku odpovídající 10 mg DS bylo přeneseno do 100ml odměrné baňky a rozpuštěno v MeOH. 2,5 ml tohoto roztoku (přefiltrovaného), 2ml IS a objem byl doplněn do 25 ml MeOH. | Spherisorb cyano (5 µm) (250 x 4,6 mm) | Voda- acetonitril- triethylamin (75:25:0,1) | UV 275 nm | 1 | diloxanid furoát | 5,20 min | [17] |
| Komerční tablety | Jen úprava vzorku: 20 tbl-rozdrceno. Množství prášku odpovídající 50 mg DS bylo přeneseno do 100ml odměrné baňky a rozpuštěno v roztoku MeOH a acetonitrilu (50:50). Roztok byl přefiltrován. 3 ml tohoto roztoku, 3 ml IS a objem byl doplněn do 25 ml. | C ₁₈ oktadecylsilan (5µm) (150 x 4,6 mm) | Acetonitril- metanol- -pic B-6 (25:25:50) | UV 229 nm | 1,2 | diflorason diacetát | 17,19 min | [18] |

| Přípravek | Extrakce | Stacionární fáze | Mobilní fáze | Detekce | Průtok [ml/min] | Vnitřní standard | Retenční čas | Citace |
|-------------------------------|--|--|---|----------------------|----------------------------|--------------------------------|-------------------------|---------------|
| Voltaren (tablety) | 10 tbl-rozdrceno. Množství prášku odpovídající 25 mg DS bylo přeneseno do 100ml odměrné baňky a rozpuštěno v MeOH.Roztok byl přefiltrován. 100 µl filtrátu a 100 µl IS bylo odměřeno a objem byl doplněn na 1ml mobilní fázi. | Daisopak ODS (250 x 4,6 mm) | Acetonitril- octový pufr- metanol (35:40:25) | UV 274 nm | 1 | Kyselina mefenamová | 18 min | [19] |

5.3 Souhrn řešerše

HPLC stanovení přípravku Veral supp. nebylo doposud popsáno v dostupné literatuře.

Ke stanovení léčivých přípravků, které obsahují diklofenak sodný jako účinnou látku, se používá metoda HPLC s UV detekcí. Nejpoužívanější stacionární fází je silikagel s velikostí částic 5 μm . Nejpoužívanější mobilní fází je směs methanolu a octové kyseliny.

Byla nalezena metoda úpravy čípků, která lze použít před vlastním stanovením. Tři čípky byly postupně zváženy, nasekány na malé kousíčky a přeneseny do porcelánové misky. Do misky bylo přidáno 15 ml destilované vody a směs byla zahřívána při teplotě 40-45 °C během pěti minut. Vodná vrstva se odloučila a vše se opakovalo celkem pětkrát. Vodný roztok se doplnil v odměrné baňce na 100 ml. Pro analýzu se roztok ředí v poměru 1:1000.

6 Závěr

Byla provedena rešerše na stanovení obsahu chlorhexidinu diglukonátu a diklofenaku sodného metodou HPLC v topických přípravcích.

Pro stanovení látek v masti a čípkách je vhodnou metodou HPLC. Její velkou výhodou je možnost současného stanovení několika látek najednou, selektivita, nízký detekční limit a rychlost měření.

Před vlastním stanovením se musí vzorek upravit. Nejčastěji se používá pro úpravu extrakce do kapalné fáze.

7 Literatura a přehled zkratk

7.1 Literatura

- [1] Karlíček R., a kol.: Analytická chemie pro farmaceuty, Praha, Karolinum 2001
- [2] Doc.ing. Milan Popl, DrSc., ing. Jaroslav Kubát, CSc., Separace látek, Praha 1986, SNTL-Nakladatelství technické literatury
- [3] Prof. Ing. Karel Drbal, CSc., Doc. Ing. Martin Křížek, CSc., Analytická chemie, 1999, Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
- [4] http://www.bf.jcu.cz/tix/sima/analyticka_chemie/separ_met_I.htm - 12/2005
- [5] <http://www.lcresources.com/> - 12/2005
- [6] ČESKÝ LÉKOPIS 2002 (ČL 2002), Grada Publishing a.s., Praha, 2002
- [7] <http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/summary/summary.cgi?cid=29089> - 1/2006
- [8] http://www.sukl.cz/_download/spc/SPC8009.doc - 1/2006
- [9] <http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/summary/summary.cgi?cid=27194> - 1/2006
- [10] http://www.sukl.cz/_download/spc/SPC66194.doc - 1/2006
- [11] A. Richard, M. Elbaz and G. Andermann, J. Chromatography A, 298 (1984) 356
- [12] Rau,-HL; Aroor,-AR; Rao,-PG, Indian Drugs 28(6) (1991) 285
- [13] M.Soledad García, M. Isabel Albero, Concepción Sánchez-Pedreno, José Molina, J. Pharm. Biomed. Anal. 17(1998) 267
- [14] F. Bailey, P. N. Brittain and B. F. Williamson, J. Chromatography A, 109 (1975) 305
- [15] Michel Bauer, Claude Degude and Liliane Mailhe, J. Chromatography A, 315 (1984) 457
- [16] Ramesh T. Sane, Rajan S. Samant and Vinay G. Nayak, Drug-Dev-Ind-Pharm. 13(7), 1307-1314 (1987)
- [17] Jyoti L. Chawla and Renu A. Sodhi, Indian Drugs 33(4) (1996) 171
- [18] Terasa Kubala, Baldev Gambhir and S. Ian Borst, Drug-Dev-Ind-Pharm., 19(7) (1993) 749
- [19] Yen Sun, Kumiko Takaba, Hideaki Kido, Mihoko N. Nakashima and Kenichiro Nakashima, J. Pharm. Biomed. Anal., 30(2003) 1611
- [20] <http://www.natur.cuni.cz/~pcoufal/extrakce.pdf> - 3/2006
- [21] <http://www.profimed.cz/cs/odborne-informace/chlorhexidine> - 3/2006

7.2 Přehled zkratk

HPLC – vysokoúčinná kapalinová chromatografie

I.D. - inner diameter-vnitřní průměr

TFA - trifluoroctová kyselina

CH - chlorhexidin

PCA - p-chloranilin

MFA - mefenamic acid, kyselina mefenamová

MeOH – methanol

DS - diklofenak sodný

Tbl – tableta

MF – mobilní fáze

IS – vnitřní standard

UV – ultrafialová oblast spektra záření

Pic B-6 – sodná sůl hexansulfonové kyseliny

ČL – Český lékopis

Ph. Eur. – Evropský lékopis