

SOUHRN

Magnesium a kalcium hrají esenciální roli v existenci živých organismů. Magnesium, se účastní kolem 300 základních enzymatických reakcí, je důležité pro energetický metabolismus, zastává klíčovou roli v neurotransmisí, při imunitních funkcích a regulaci neuromuskulární aktivity srdce. Kalcium kromě strukturální, elektrofyziologické a intracelulárně regulační funkce je také kofaktorem extracelulárních enzymů a regulačních proteinů. Rovnováha těchto minerálů v těle naplňuje důležitou podmínku potřebnou k udržení zdraví. Jejich nedostatek nebo naopak nadbytek v organismu je spojen s řadou vážných syndromů a onemocnění. Aluminium neplní žádnou fyziologickou funkci, důležité je z hlediska jeho toxikologie. Magnesium, kalcium a aluminium jsou využívány samostatně nebo v kombinaci ve formě různých solí, oxidů, hydroxidů nebo komplexů při výrobě mnoha farmaceutických přípravků nebo potravinových doplňků.

Český lékopis 2005 používá ke stanovení magnesia, kalcia a alumina chelatometrickou titraci edetanem disodným (přímou nebo zpětnou). Další metody užívané k detekci magnesia, kalcia nebo alumina jsou například ASS, ET-AAS, SIA s UV-VIS detekcí, multikomponentní FIA s detekcí diodovým polem, FIA za iontově selektivní elektrodové detekce, iontově selektivní elektrody, iontová chromatografie s piezoelektrickou detekcí, ICP-AES nebo MS, kapilární isotachoforéza a jiné elektrogravimetrické, coulometrické, polarografické, voltmetrické nebo termogravimetrické metody. Používané metody bývají často spojeny s řadou nevýhod. Vzorokly kovových kationů je například nutné před stanovením náročně a zdouhavě upravovat nebo metoda vyžaduje drahé vybavení, proto bylo jedním z cílů této práce vyvinout a validovat jednoduchou a rychlou přímou metodu bez vysokých nároků na vybavení.

Metoda je založena na spojení iontově výměnné HPLC s ELSD (Evaporative Light Scattering Detector). ELS detektor je quasi-univerzální detektor, který v současné době nachází stále širší uplatnění, a to především u analytů, které nemají ve své molekule chromoforové skupiny a nemohou být tudíž bez derivatizace detekovány spektrofotometricky. Oproti ostatním univerzálním detektorům, jako např. refraktometrický (RID) nebo MS, vykazuje určité přednosti: a) kompatibilita s gradientovou elucí (na rozdíl od

5 1 RID); b) podstatně lepší detektabilitu ve srovnání s RID (běžný limit detekce se pohybuje v nanogramových množstvích, v závislosti na těkavosti a molekulové hmotnosti); c) nízké náklady a snadná obsluha (na rozdíl od hmotnostního spektrometru). Nicméně ELSD vykazuje také určité nevýhody. Tou hlavní je požadavek na těkavost mobilní fáze. Nesmí být použity netěkavé reagenty, pufrý ani jiné složky mobilní fáze. Výběr vhodných kyselin a bází se tím značně omezuje; mezi často používané patří kyselina octová, mravenčí, triflouroctová, pentaflouropropionová a heptaflouromáselná a jejich amonné soli v nízkých koncentracích (<0,1 M). ELSD je destruktivní detektor, proto musí být poslední v řadě, pokud je použit v sérii s jinými detektory. Vykazuje také nedostatečnou detektabilitu pro analýzu např. nečistot a reziduí, které se vyskytují v množstvích ng ml⁻¹ (LOQ je obvykle vyšší než 0,1 μg ml⁻¹). Tyto vzorky je obvykle třeba upravit prekoncentrací, což bývá obtížné, neboť není možné použít netěkavé reagenty. Základní princip detektoru sestává ze tří následných kroků: a) nebulizace chromatografického eluentu; b) vypaření mobilní fáze a c) detekce netěkavých částic na základě rozptylu světla.

Pro separaci byla použita kationově výměnná analytická kolona IONPAC® CS – 14 od firmy DIONEX® s karboxylovými funkčními skupinami.

Dobré rozlišení píků hořčíku a vápníku bylo kritickou podmínkou při hledání optimálního složení mobilní fáze. Nejlépe se osvědčila vodná mobilní fáze s TFA v koncentraci 0,085 % (v/v). Vyzkoušena byla také kombinace TFA/NFPA, ale rozdíly v retenčních časech a rozlišení byly minimální (Table 4.1). Předmětem výzkumu byly i organické aniony, proto proběhlo testování separační schopnosti metody v případě

organických kyselin (Table 4.2, Table 4.3). Používaná analytická kolona je primárně určena k analýze jednomocných a dvojmocných kationů, přesto se podařilo užitím lineárního gradientu stanovit hliník. Program lineárního gradientu začínal s koncentrací 0,096% (v/v) TFA ve vodné mobilní fázi a mezi 6. – 7. minutou od nástřiku se koncentrace plynule změnila na 0,640% (v/v) TFA. V jednom měření je takto možné stanovit hořčík, vápník i hliník (Table 4.4, Table 4.5).

Vyvinuté metody se podařilo úspěšně validovat pro užití v analýze léčivých přípravků. Přípravky obsahující hořčík a/nebo vápník (Milk of Magnesia®, Tums®) byly analyzovány metodou isokratickou, k analýze léčivých přípravků obsahujících hliník

5 2

(Aludrox®) byla použita lineárně gradientová metoda. Pro obě metody byly určeny validační parametry rozlišení a asymetrie (Table 4.6, Table 4.7), linearita a rozsah (Table 4.8), přesnost z hlediska opakovatelnosti (Table 4.9) a reprodukovatelnosti (Table 4.10), limity detekce a kvantifikace (Table 4.11).

Validované metody byly použity k analýze tří léčivých přípravků registrovaných v Řecku. Jednalo se o suspenzi Milk of Magnesia®, účinná látka: hydroxid hořečnatý 425 mg v 5 ml suspenze; žvýkáci tablety Tums®, účinné látky: uhličitán vápenatý 600 mg a uhličitán hořečnatý 125 mg v 1 tabletě; žvýkáci tablety Aludrox®, účinné látky: hydroxid hlinitý 233 mg a hydroxid hořečnatý 83 mg v 1 tabletě (viz 3.3.4 Pharmaceutical Formulations). Při analýze se porovnávaly naměřené koncentrace iontů v přípravku s údajem od výrobce. Podle požadavků řeckých norem pro registrované léčivé přípravky musí být údaje ve shodě v rozmezí 95 - 105% obsahu. Tři vzorky z každého léčivých přípravků ve třech různých koncentracích byly změřeny většinou ve třech replikacích. Obsahovému kritériu odpovídaly všechny kovové kationy (Table 4.12 a Table 4.17) s výjimkou hořčíku u přípravku Aludrox® (Table 4.22). Důvod nižšího naměřeného obsahu v léčivém přípravku se nepodařilo zjistit. Poté co byla vyloučena adsorpce komplexů hořečnatých kationů s TFA na lipofilní excipienty léčivého přípravku změnou úpravy vzorku a použitím vnitřního standardu vápníku, je možné uvažovat o nepřesnosti v udání složení ze strany výrobce. Případně by bylo nutné pokusit se stanovit hořečnaté kationy jinou metodou a porovnat zjištěné výsledky. Dalším předmětem analýzy bylo měření pěti vzorků s přídatkem standardu příslušného kationu. Stanovení proběhlo většinou ve třech replikacích a opět vyhovovaly všechny vzorky kromě hořčíku u přípravku Aludrox® (Table 4.13, Table 4.18 a Table 4.23). Z naměřených údajů (Table 4.14, Table 4.19) byla pomocí t-testu hodnocena významnost odchylky u parametru a od nulové hodnoty pro závislost koncentrace vzorku na obrácené hodnotě jeho zředění (Table 4.15, Table 4.20) a významnost odchylky u parametru b od nulové hodnoty pro závislost koncentrace formulace na obrácené hodnotě jeho zředění (Table 4.16, Table 4.21). Všechny hodnoty byly menší než 4,303; což je maximální hodnota předepsaná pro tři měření zajišťující konfidenční interval 95%.

Přestože hořčík a vápník se v léčivých přípravcích často vyskytují ve formě organických solí nebo přípravků s anorganicky vázaným kovem obsahuje navíc organický anion, nebyla dosud publikovaná žádná metoda stanovující anorganický kation i

5 3

organický anion současně. Každý z iontů bylo potřeba kvantifikovat odděleně. Tato práce poskytuje údaje pro další výzkum v oblasti, tak aby bylo možno s nenáročným vybavením stanovit v jednom nástřiku kationický i anionický komponent, metodu validovat a v další fázi ji aplikovat na farmaceutické přípravky. Presentovaná metoda dokazuje, že hořčík, vápník a hliník lze, volbou správných podmínek, spolehlivě separovat a kvantifikovat využitím iontově výměnné chromatografie, za současného výskytu anorganického anionu. Měření standardů organických kyselin (aspartát, askorbát, citrát) teoreticky dokazuje, že by ani výskyt organického anionu v přípravku neměl bránit současnému stanovení kationické i anionické složky účinné látky léčivého přípravku. Hlavní výhodou metody je rychlost, snadná úprava

vzorků, značná přesnost, dostatečná citlivost a nízké náklady na přístrojové vybavení.