

**UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ**

KATEDRA ANALYTICKÉ CHEMIE

**APLIKACE SEKVENČNÍ INJEKČNÍ
ANALÝZY VE FARMACEUTICKÉ ANALÝZE**

Disertační práce

2006

Mgr. Jana Klimundová

PODĚKOVÁNÍ

Ráda bych poděkovala svému školiteli Doc. RNDr. Petru Solichovi, CSc. za cenné rady, připomínky, jeho pomoc, inspiraci a motivaci během mého postgraduálního studia a během práce na této disertační práci.

Dále bych ráda poděkovala Mgr. Daliboru Šatínskému, Ph.D. za praktické rady a pomoc při experimentální práci, a také celému „SIA týmu“ za sdílení poznatků a spolupráci.

Poděkování patří také všem členům katedry analytické chemie za jejich ochotu a vstřícnost a za přátelské prostředí, které na této katedře vládne.

Dík patří také mé rodině a přátelům za podporu během celé doby mého studia.

Grantovým agenturám FRVŠ a UK děkuji za finanční podporu výzkumných úkolů a za možnost prezentovat výsledky své práce na zahraničních konferencích.

Jana Klimundová

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

AAS	Atomová absorpční spektrometrie
AES	Atomová emisní spektrometrie
BI	Bead injection
Caco-2	Human colorectal adenocarcinoma
CE	Kapilární elektroforéza
ČL 2005	Český lékopis 2005
DMEM	Dulbecco's modified Eagle medium
DNA	Deoxyribonukleová kyselina
DSC	Diferenční skenování kalorimetrie
DTA	Diferenční termická analýza
FBS	Fetální bovinní sérum
FDA	Food and Drug Administration
FIA	Flow injection analysis - Průtoková injekční analýza
HEPES	N-(2-hydroxyethyl)piperazin-N'-(2-etansulfonová kyselina)
HPLC	Vysokoučinná kapalinová chromatografie
ICP	Inductively Coupled Plasma (indukčně vázané plazma)
IR	Infračervená spektroskopie
KRB	Krebs-Ringer pufr
LOV	Lab-on-Valve
MS	Hmotnostní spektrometrie
OECD	Organisation for Economic Co-operation and Development
PEEK	Polyetheretherketon
PTFE	Polytetrafluorethylen
RAM	Restricted access material (materiály s omezeným přístupem)
RP-18	Reverzní fáze C 18
SIA	Sequential injection analysis - Sekvenční injekční analýza
SPE	Extrakce na pevnou fázi
TEER	Transepiteliální elektrická rezistence
TG	Termogravimetrická analýza
TMA	Termomechanická analýza
USP	United States Pharmacopoeia
UV	Ultrafialová spektrofotometrie
VIS	Spektrofotometrie ve viditelné oblasti spektra

OBSAH

1. ÚVOD.....	6
2. CÍL PRÁCE.....	7
3. TEORETICKÁ ČÁST.....	9
3.1. Průtokové neseparační analytické metody.....	10
3.1.1. Vývoj průtokových metod.....	10
3.1.2. Obecný princip průtokových metod.....	10
3.1.3. Průtoková injekční analýza (FIA).....	12
3.1.4. Sekvenční injekční analýza (SIA).....	13
3.2. Využití SIA ve farmaceutické analýze.....	17
3.2.1. Způsoby detekce využívané v SIA systémech.....	24
3.2.2. Matrice analyzované technikou SIA.....	24
3.2.3. Automatizace dlouhodobého sledování koncentrace pomocí SIA.....	25
3.2.4. Úprava vzorku pomocí SIA.....	28
3.2.5. Technika <i>Bead injection</i>	29
3.2.6. Technika <i>Lab on valve</i>	31
3.3. Polotuhé přípravky pro kožní použití.....	32
3.3.1. Hodnocení polotuhých přípravků pro kožní použití.....	34
3.4. In vitro testy a jejich hodnocení.....	35
3.4.1. Zkouška disoluce transdermálních přípravků.....	36
3.4.2. Uvolňování aktivní látky z polotuhých přípravků.....	37
3.4.3. Matematické vyjádření permeace.....	42
3.4.4. Provedení in vitro permeačních testů.....	44
3.5. Monolitické kolony.....	47
4. KOMENTÁŘ K PUBLIKOVANÝM PRACEM.....	50
4.1. Aplikace sekvenční injekční techniky ve farmaceutické analýze.....	51
4.2. Automatizace sledování uvolňování kyseliny salicylové z polotuhého přípravku pomocí SIA metody.....	52
4.3. Automatizované měření uvolňování dvou aktivních látek z polotuhého přípravku pomocí sekvenční injekční chromatografie ve spojení s Franzovou celou.....	55
4.4. Automatizace simultánních testů uvolňování aktivní látky z polotuhých přípravků technikou SIA.....	58

4.5. Automatizované měření disoluce a permeace propranolol hydrochloridu z tablet pomocí sekvenční injekční analýzy	60
5. PŘÍLOHY	71
5.1. Příloha I. – Solich P., Polásek M., Klimundová J., Růžička J.: Trends in Analytical Chemistry 23 (2004) 116-126.....	72
5.2. Příloha II. – Klimundová J., Sklenářová H., Solich P.: Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 37 (2005) 893-898	84
5.3. Příloha III. – Klimundová J., Šatínský D., Sklenářová H., Solich P.: Talanta, přijato do tisku.....	91
5.4. Příloha IV. – Klimundová J., Mervartová K., Sklenářová H., Solich P.: Analytica Chimica Acta, přijato do tisku	98
5.5. Příloha V. Přehled publikovaných prací	113
6. SHRNU TÍ	116
7. ZÁVĚR	119
8. SUMMARY IN ENGLISH	121
9. SEZNAM LITERATURY	124

1. ÚVOD

Analytický proces se sestává z řady kroků, jejichž postupné provedení se pak odráží na přesnosti, správnosti, selektivitě, citlivosti, reprodukovatelnosti a rychlosti celé analýzy. Do těchto kroků můžeme zahrnout úpravu vzorku, dávkování vzorku, chemickou reakci/chemické reakce nutné pro získání vhodného detekovatelného produktu, vlastní měření, sběr dat, jejich zpracování a vyhodnocení.

Ve farmaceutické analýze jsou nejvyužívanější instrumentální metody průtokové separační metody jako je kapalinová chromatografie (HPLC), plynová chromatografie (GC) či kapilární elektroforéza (CE). Využívají se však i metody, které jsou založené na specifické či selektivní reakci s činidly, u kterých je detekce spektrofotometrická, fluorescenční nebo elektrochemická. Automatizace a miniaturizace těchto analýz tak, aby metoda byla rychlá a efektivní je důležitým úkolem pro analytika moderní doby. Jednou z možností takové automatizace a miniaturizace jsou průtokové neseparační metody jako je průtoková injekční analýza (Flow Injection Analysis – FIA) a její nástupce sekvenční injekční analýza (Sequential Injection Analysis – SIA). K výhodám těchto metod patří mimo jiné možnost automatizace měření a jeho univerzálnost, snadná upravitelnost pro širokou paletu analýz bez nutnosti manuální rekonfigurace systému, možnost zapojit celou škálu detektorů.

Průtokové neseparační metody mají řadu dalších výhodných vlastností jako je například velká frekvence dávkování vzorku, možnosti on-line úpravy či zakoncentrování vzorku, řízení celé analýzy počítačem dle kroků definovaných programem, automatický sběr dat a možnost automatického kvantitativního vyhodnocení dle naměřené kalibrační křivky, která může být součástí analýzy. Protože analýza je prováděna dle softwarových pokynů stejnými kroky jak pro standard tak pro vzorek je eliminována možnost vnesení chyby lidským faktorem. Pokud bereme v úvahu náklady na analýzu, pak spotřebou činidel, pořizovacími a udržovacími náklady se průtokové neseparační metody řadí mezi metody s nižší ekonomickou náročností.

2. CÍL PRÁCE

Cílem této práce bylo navázat na předchozí výzkum v oblasti neseparačních průtokových metod na katedře analytické chemie FaF UK v Hradci Králové, které započaly v 80. letech konstrukcí jednoduchých průtokových FIA systémů, postupně modifikovaných s narůstající náročností prováděných analýz. Po objevení nové průtokové metody Sekvenční injekční analýzy (SIA) na University of Washington, USA počátkem devadesátých let minulého století byl díky spolupráci s autorem metody prof. Růžičkou rozvinut výzkum této moderní techniky na katedře analytické chemie. Nejprve byl sestaven originální SIA analyzátor s vlastním řídicím programem. Později byly na katedru pořízeny komerčně dostupné SIA systémy. Výzkum se soustředil na využití SIA techniky pro automatizované stanovení farmaceuticky významných látek v léčivých přípravcích a srovnání získaných výsledků s výsledky lékopisných metod.

Pomocí SIA analyzátoru bylo možno sledovat průběh chemiluminiscenčních reakcí a využít je při stanovení; provádět úpravy vzorků se složitou maticí díky zapojení kolonek se sorbenty pro extrakci na tuhou fázi; použít sorbent na bázi „materiálů s omezeným přístupem“ (RAM) pro přímý nástřik vzorků s vysokomolekulární maticí; zapojit monolitické separační kolony pro jednoduché separace; využít techniku Lab-on-Valve a novou techniku mikroSIA. Dále byl SIA systém využit pro monitorování koncentrace aktivní látky v disolučním médiu při automatizaci dlouhodobých disolučních testů.

Předmětem mé disertační práce bylo rozvinout další možnosti využití SIA metody ve farmaceutické analýze, a to především v oblasti monitorování dlouhodobých procesů.

Hlavní část disertační práce je zaměřena na automatizované sledování uvolňování účinné látky z krémů, gelů a mastí. Byla studována problematika zapojení Franzovy difúzní cely (aparatura k testování uvolňování léčivé látky z polotuhých přípravků a k provádění permeačních studií) do SIA systému. Dále bylo záměrem této práce rozšíření plně automatizovaného systému tak, aby bylo možno získat více profilů uvolňování současně během jedné analýzy. SIA systém byl spojen s aparaturou, která obsahovala tři termostátované Franzovy

cely. Byla propracována technika nanášení a odebírání vzorků, optimalizován řídicí program.

Dalším směrem výzkumu bylo zapojení krátké monolitické kolony do systému sekvenčního injekčního analyzátoru a spojení tohoto systému s Franzovou difúzní celou, což rozšířilo analytický potenciál SIA metody. Toto spojení umožňuje jednoduchou separaci aktivních látek a také monitorování jejich souběžného postupného uvolňování z přípravku.

Ve spolupráci s německým pracovištěm Biofarmacie a farmaceutické technologie Saarlandské University bylo principu SIA využito v unikátní aparatuře, která sledovala současně jak disoluci aktivní látky z tablety, tak její permeaci přes buněčnou kulturu Caco-2 buněk. Zde bylo využito flexibility SIA systému a možnosti automatizace při odběru ze tří míst disolučně/permeačního aparátu. Všemi těmito aplikacemi byly nastíněny nové směry na poli uplatnění sekvenční injekční analýzy.

3. *TEORETICKÁ ČÁST*

3.1. PRŮTOKOVÉ NESEPARAČNÍ ANALYTICKÉ METODY

3.1.1. Vývoj průtokových metod

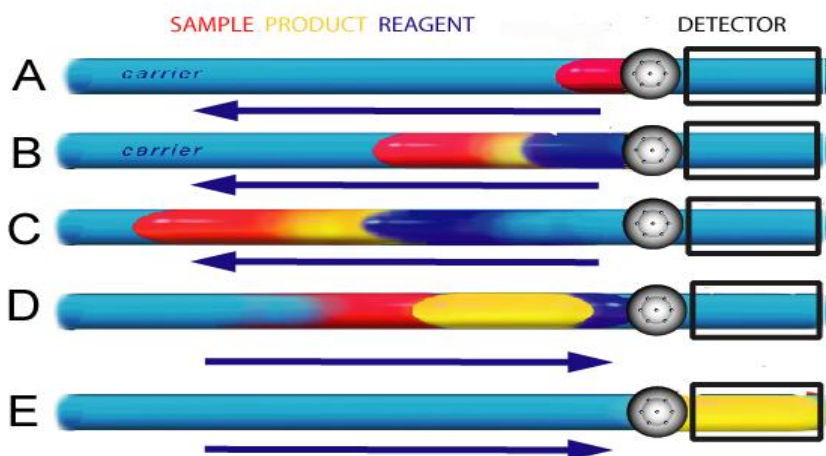
Na počátku automatizace analýz byla věnována pozornost automatickým analyzátorům, kde každý vzorek byl zpracováván odděleně v určité nádobce, ve které probíhaly všechny analytické procesy. Po dosažení chemické rovnováhy byl vzorek umístěn do detektoru, aby bylo provedeno měření. Tyto diskrétní analyzátory byly postupně nahrazovány automatizovanými kontinuálními průtokovými metodami. Průtokové metody otevřely nové možnosti v oblasti automatizace analýzy díky jednoduchým principům, bylo možno analyzovat velké množství vzorků v krátkém čase a bez velkého nároku na obsluhu a na lidský potenciál vůbec. Tyto metody našly proto široké uplatnění v řadě oborů (například monitorování životního prostředí, farmaceutická analýza a jiné). K rozvoji také přispěla další výhoda – velmi malý objemu vzorku potřebný k analýze v porovnání s klasickými analytickými metodami.

Prvním průtokovou metodou byla segmentová průtoková analýza (SFA). Tyto analyzátory byly založeny na přesném injikování vzorku do vzduchem segmentovaného proudu kapaliny. Jednotlivé vzorky byly odděleny malými vzduchovými bublinami, aby nedocházelo k rozmývání a vzájemnému mísení vzorků. Tato metoda měla ale řadu nedostatků vyplývajících právě z přítomnosti bublin vzduchu v systému. Proto byly analyzátory se segmentovaným tokem nahrazeny současnými kontinuálními nesegmentovanými metodami jako je například průtoková injekční analýza. [1]

3.1.2. Obecný princip průtokových metod

Průtokové metody jsou kinetické metody analýzy založené na kombinaci injikování přesného objemu roztoku vzorku, kontrolované disperzi a přesném dodržování konstantních experimentálních podmínek, což zaručuje vysokou reprodukovatelnost výsledků, i když je mísení vzorku a činidla neúplné, chemická reakce nedosahuje rovnováhy a získaný signál je nestacionární [2]-[6]

Během pohybu nadávkované zóny vzorku v nesegmentovaném nosném proudu dochází k disperzi analyzovaného roztoku do čidla s následnou chemickou reakcí za vzniku detekovatelného produktu. Produkt je transportován do detektoru zaznamenávajícího požadovaný fyzikální parametr, jak je schématicky znázorněno na Obr. 1. Odezva detektoru se pak plynule mění v důsledku koncentračního gradientu reakčního produktu při průchodu analyzovaného vzorku průtokovou celou. Tvar získaného signálu ve formě píku je založen na koncentračním gradientu, který se vytváří na základě disperze vzorku a nosného proudu. Výška a plocha píku jsou úměrné koncentraci analytu. Vyhodnocení se pak provádí na základě srovnávání ploch či výšek píků standardu a stanovovaného vzorku [4][5].



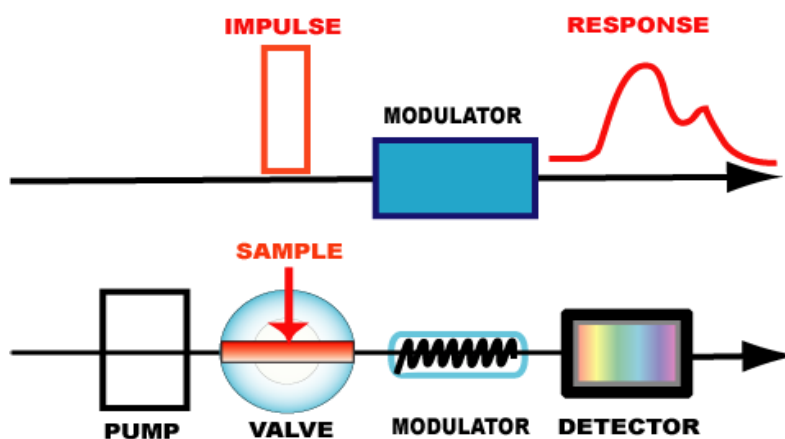
Obr. 1 Schéma procesů v SIA (tady by měl být obrázek FIA !!!, o SIA se mluví až dále....)

Pro průtokové metody může být využita jakákoliv dostatečně citlivá chemická reakce, jejíž produkt je detekovatelný instrumentálními analytickými metodami. Detekce užívané v průtokových metodách jsou nejčastěji spektrofotometrické, další široce používanou detekční technikou je luminiscence. Z elektrochemických metod jsou to amperometrie a potenciometrie. Pro tento účel jsou mimo jiné vyráběny speciální selektivní elektrody. Je také známo spojení metod AAS, ICP-MS a ICP-AES s průtokovými systémy [4][5].

3.1.3. Průtoková injekční analýza (FIA)

Při nejjednodušším způsobu provedení průtokové injekční analýzy se systém skládá z peristaltické pumpy, dávkovacího ventilu a detektoru, vše je spojeno hadičkami o malém průměru (0,5 - 0,8 mm) (obr. 2)

Tok kapaliny v hadičkách směrem do detektoru je generován nejčastěji peristaltickou pumpou. Do tohoto nosného proudu, kterým může být reakční činidlo, rozpouštědlo nebo jiné médium jako například pufr je pomocí dávkovacího ventilu injikován přesný objem vzorku (obvykle v objemu několika desítek μl , což je dáno objemem dávkovací smyčky). [4][5]



Obr. 2 Schéma průtokové injekční analýzy (FIA)

Převedení známého a popsaného způsobu manuálního stanovení dané látky na průtokovou injekční analýzu je nutno experimentálně ověřit a jednotlivé parametry ovlivňující stanovení průtokovou injekční analýzou optimalizovat. U obvyklých způsobů provádění průtokové injekční analýzy se jedná o optimalizaci objemu injikovaného vzorku, průtokových rychlostí, délky reakčních cívek, koncentrací činidel, atd.. [2][3][6]

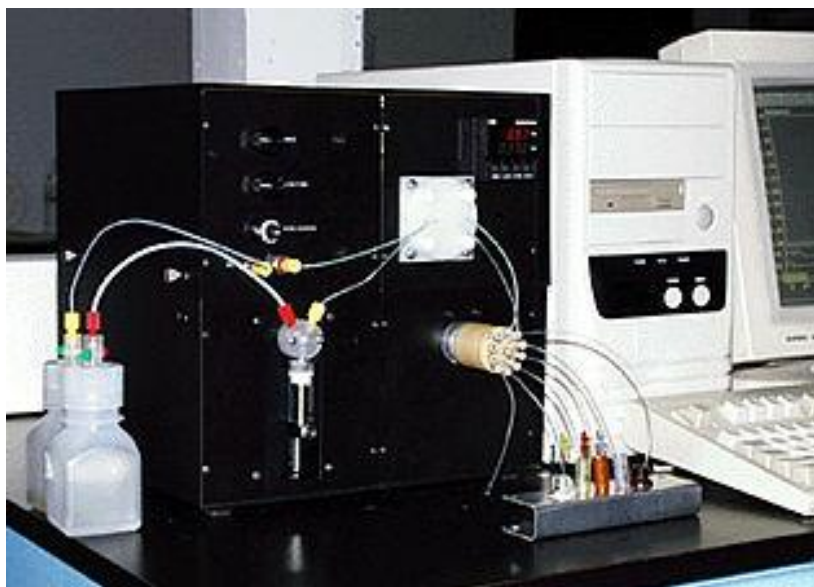
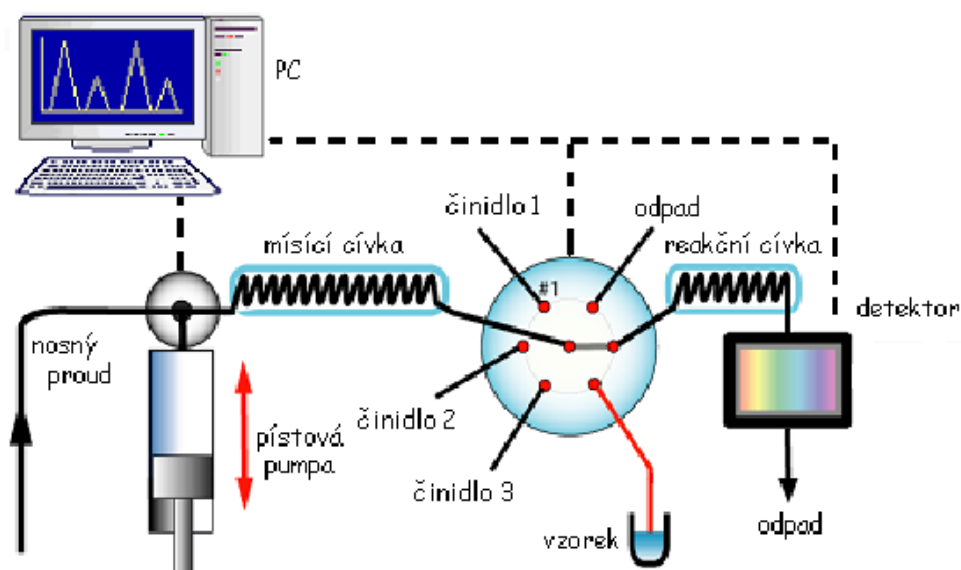
Starší průtokové systémy byly ovládány pouze manuálně, k detektoru byl zapojen zapisovač. V dnešních modernějších systémech je vše řízeno počítačem, programy jsou uzpůsobeny i ke sběru a vyhodnocování dat [5].

Průtoková injekční analýza je jednou z velmi výkonných a všestranných technik (60 - 120 analýz za hodinu). Je principiálně jednoduchá, ekonomicky nenáročná. Nicméně má i svá omezení, která vyplývají z používání elastických hadiček u peristaltické pumpy. Tyto nejsou odolné vůči silným kyselinám a bázím ani vůči organickým rozpouštědlům, jejich mechanická odolnost není tak vysoká. Je proto nutné po jejich výměně celý systém kalibrovat. [5][6]

3.1.4. Sekvenční injekční analýza (SIA) [4,5]

Sekvenční injekční analýza (SIA) byla vyvinuta v roce 1990 z principů průtokové injekční analýzy prof. J. Růžičkou a jeho týmem na University of Washington v USA [6]. Odstraněním nedostatků FIA a spojením s dalšími výhodnými vlastnostmi z ní učinilo velmi praktickou, rychlou a téměř univerzální neseparační analytickou techniku. Rozdílem mezi SIA a FIA je, že celý systém je kvůli přesnosti a synchronizaci jednotlivých kroků vždy celý řízen počítačem a směr průtoku kapaliny je umožněn střídavě oběma směry. Pohyb kapaliny je obvykle generován pístovou pumpou, jejíž motor zaručuje bezpulzní průtok nosného proudu.

Dle řídicího programu, který se skládá z příkazů pro určitou jednotku a její činnost, je pak automaticky prováděno měření. SIA přebírá základní principy průtokové injekční analýzy, a sice neseegmentovaný tok nosného proudu a princip kontrolované parciální disperze vzorku v nosném proudu.



Obr. 3 Schéma (nahore) a fotografie (dole) sekvenční injekční analýzy (SIA)

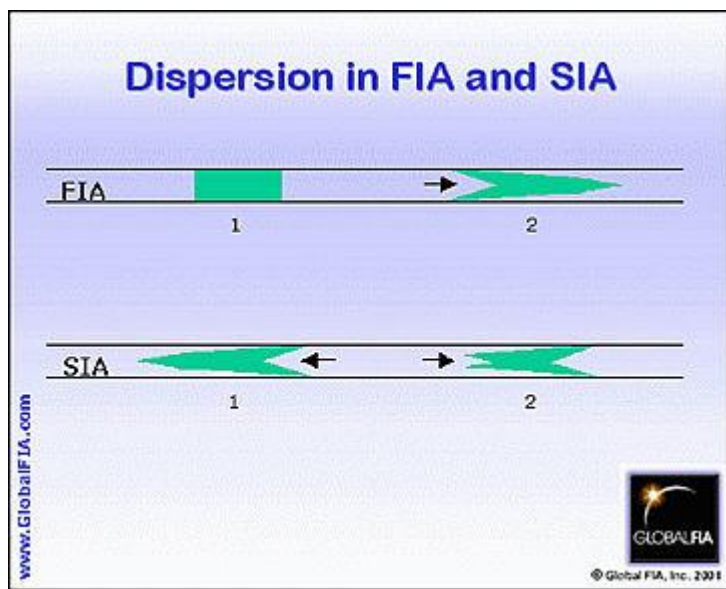
Základní součásti SIA systému jsou: pístová pumpa, selekční ventil, detektor, reakční a mísící cívka. Schéma základního uspořádání je znázorněno na Obr.3. Nosný proud se v SIA systému pohybuje nejčastěji oběma směry a lze ho s výhodou zastavit v určitém místě systému.

Pomocí pístové pumpy jsou do nosného proudu (obvykle voda) aspirovány malé, přesně definované objemy vzorku a činidel. Analytická činidla přeměňují analyt na detekovatelný produkt a ten je pak transportován do detektoru, který zaznamenává požadovaný fyzikální parametr. Požadavky na

pumpu v SIA systému jsou přesnost, reprodukovatelnost a obousměrný bezpulzní tok. Pro dosažení požadovaných parametrů je nezbytné řízení pumpy počítačem.

Aspirace do mísící cívky probíhá přes selekční ventil o určitém počtu vstupů. Jsou dostupné selekční ventily s 6 až 28 polohami, ale obvykle nejpožívanější jsou v rozmezí 6-10 poloh. Ventil musí zaručovat snadný přístup k jednotlivým vstupům. Malý mrtvý objem a nulové mísení kapaliny mezi jednotlivými vstupy jsou základními požadavky na selekční ventil.

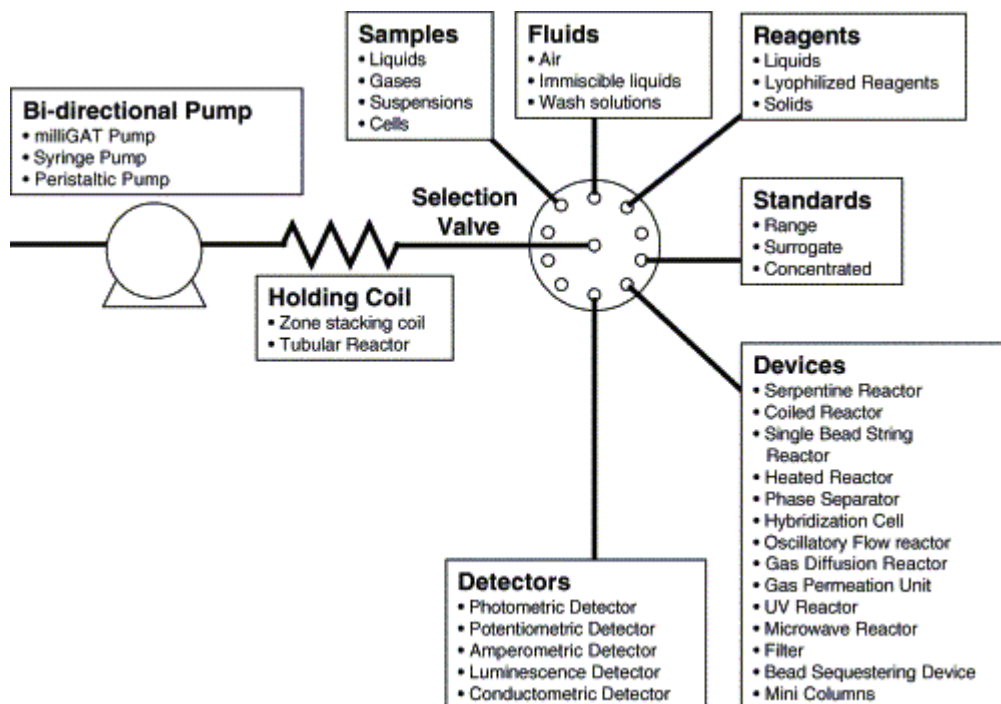
Základní rozdíl mezi průtokovou a sekvenční injekční analýzou je směr pohybu nosného proudu. Disperze zóny vzorku je pak rozdílná, jak je znázorněno na Obr. 4



Obr. 4 Schéma disperse vzorku v průtokových systémech

Do průtokového systému mohou být zakomponovány prvky, které umožňují takové analytické operace, aby se vzorek přeměnil do stavu vhodného k detekci a kvantifikaci (např. ředění příliš koncentrovaných vzorků, zakoncentrování vzorků obsahujících stopové množství analytu, redukce, modifikace matrice, dialýza, plynová difúze, extrakce, reakce s imobilizovanými enzymy).

Na obr. 5 jsou schématicky znázorněny procesy v SIA systému.



Obr. 5 Schéma procesů v SIA systému

Obecně lze říci, že průtokové metody jsou velmi výkonné a všestranné techniky sloužící především k automatizaci chemických analýz. Jsou principiálně jednoduché, přitom jsou obecně přesnější a spolehlivější než manuální provedení analýz, spotřeba činidel je výrazně nižší. Vyloučením odměřování činidel a doplňování objemů, tedy i subjektivního faktoru, je dosahována vysoká reprodukovatelnost výsledků.

3.2. VYUŽITÍ SIA VE FARMACEUTICKÉ ANALÝZE

Použití průtokových neseparačních metod a SIA zejména není ve farmaceutické analýze tak rozšířeno jako je tomu například při monitorování životního prostředí. V oblasti farmacie jednoznačně převládají validované techniky separační. Avšak nové požadavky na jednoduchost, přesnost, automatizaci, rychlost analýzy a potřebu stanovovat nízké koncentrace látek vedou k zavádění nových průtokových metod. Ve FIA, protože je technikou starší, můžeme nalézt více prací zabývajících se analýzou farmaceuticky významných látek, ale ani počet SIA prací na tomto poli není zanedbatelný. Přehled prací publikovaných od vzniku SIA techniky až po současnost na poli farmaceutické analýzy je uveden v tabulce 1.

SIA techniku ve spojení s rozmanitými typy detekce lze využít ve farmaceutické analýze jednak ke stanovení obsahu léčivé látky v příslušném přípravku a dále také při dlouhodobém kontinuálním monitorování koncentrace dané látky uvolněné do určitého prostředí.

<i>Analyzovaná látka</i>	<i>Matrice</i>	<i>Způsob detekce</i>	<i>Linearita</i>	<i>Detekční limit</i>	<i>Poč. vzorků (h^{-1})</i>	<i>Ref</i>
Ambroxol HCl	Tablety; kapsle	Sekvenční injekční chromatografie (SIC) s monolitickou kolonou s reverzní fází; UV detekce při 213 nm	2–100 mg/l	0,5 mg/l	7	[8]
Doxycyklin			2–100 mg/l	2,0 mg/l		
Amoxicilin	Tablety	Diode-array spektrofotometrický detektor a „multivariate curve resolution with alternating least squares (MCR–ALS)“	10-60 mg/l	0,06 mg/l	25	[9]
Bizmut	Tablety	Komplexační reakce Bi (III) s methylthymolovou modří; detekce spektrofotometricky při 548 nm	0,0–75,0 mg/l	0,250 mg/l	72	[10]
Bor	Oční emulze	Komplexační reakce mezi kyselinou boritou a D-sorbitolem, následně acidobazická reakce s metyloranží, spektrofotometrická detekce při 520 nm	0,06 – 12 mg/l	0,06 mg/l	30	[11]
Bor	Oční roztok	Komplexační reakce kyseliny borité s kyselinou chromotropovou pro zvýšení fluorescence (λ_{ex} =313 nm, λ_{em} =360 nm)	8–350 μ g/l	3 μ g/l	55	[12]
Bromazepam	Tablety	Komplexační reakce reaction of bromazepam with iron(II) in hydrochloric acid, detekce spektrofotometricky at 585 nm	5×10^{-4} - 1.5×10^{-3} mol/l	-	-	[13]
Bromazepam	Tablety	Komplexační reakce with iron(II), spektrofotometrická detekce at 585 nm; chemometric optimization	300-1000 mg/l	-	-	[14]
Ciprofloxacín	Tablety; infúze	Komplexační reakce reaction with iron(III), detekce spektrofotometricky při 447 nm	50-500 mg/l	-	-	[15]
Norfloxacin	Tablety	430 nm	50-400 mg/l			
Diklofenak sodný	Gel	Chromolith® Flash RP-18, 25mm × 4.6mm (Merck, Germany) kolona v SIA systému, mobilní fáze acetonitril:voda (40:70 (v/v)) + 0.05% triethylamin, pH 2.5, průtokový gradient 8–20 l s ⁻¹ , detekce spektrofotometricky při 256 a 275 nm	0,5–200 mg/l	0,25 mg/l	7	[16]
Metylparaben			1,5–200 mg/l	0,5 mg/l		
Propylparaben			1,5–200 mg/l	0,5 mg/l		

Fenoterol HBr	Sirup	Reakce fenoterol hydrobromidu s 4-aminoantipyrinem and hexakynoželeznatanem draselným; absorbance barevného produktu monitorována při 505 nm	0,5–40 mg/l	0,1 mg/l	60	[17]
Fenylefrin HCl	Oční kapky; nosní kapky	Kondenzační reakce analytu s 4-aminoantipyrinem v přítomnosti železitanu draselného, detekce spektrofotometricky při 503 nm	0,5–17,5 mg/l	0,09 mg/l	60	[18]
Furosemid	Lidské sérum	Kolonka z materiálu s omezeným přístupem (RAM) zakomponovaná v SIA systému, fluorescenční detekce	10–80 mg/l	3 mg/l	3	[19]
Hořčík	Tablety	Reakce mezi o-cresolphthalein komplexonem a Mg(II) v alkalickém prostředí, detekce spektrofotometricky při 570 nm	0–20 mg/l	0,24 mg/l	20	[20]
Indometacin	Tablety;kapsle; kapsle s prodl. uvolňováním	Fluorimetrická detekce při $\lambda_{ex} = 278$ nm a $\lambda_{em} = 358$ nm	$1,6 \times 10^{-8} - 10^{-5}$ mol/l	$1,6 \times 10^{-8}$ mol/l	30	[21]
Jod	Farmaceutický přípr.	Reakce mezi Ce^{4+} a As^{3+} katalyzovaná jodidem, spektrofotometrická detekce při 410 nm	0,002-0,5 mg/l	1,5 μ g/l	15	[22]
Jod	Tablety	Katalytický efekt jodidu na reakci 4,4'-methylenebis(N,N-dimethylaniline) s chloraminem-T v kyselém prostředí; spektrofotometrická detekce při 600 nm	0,1–6,0 μ g/l	0,05 μ g/l	80	[23]
Kyselina askorbová (vitamin C)	Kapsle; tablety; šumivé tablety	Oxidativní reakce- Fe^{3+} jako oxidant; 1,10-fenantrolin jako indikátor; detekce spektrofotometrická při 510 nm	20-300 mg/l	-	-	[24]
Kyselina askorbová	Farmaceutické přípr.	Oxidace vitamínu C pomocí Ce^{4+} ; spektrofotometrická detekce při 410 nm	30-200 mg/l	-	-	[25]
Kyselina askorbová	Tablety; roztoky	Měření absorbance redoxního indikátoru ferroinu ukotveného v membráně (redoxní optický senzor-optroda)	$2,5 \cdot 10^{-3}$ - $1,10^{-1}$ mol/l	-	17	[26] [27]
Kyselina askorbová	Tablety	Redoxní reakce mezi kyselinou askorbovou a manganistanem draselným v kyselém prostředí; spektrofotometrická detekce při 525 nm	0-1200 mg/l	-	60	[28]
Kyselina askorbová	Tablety	Rozpustný manganičitan a manganistan draselný v kyselém prostředí, chemiluminescenční detekce; srovnání s FIA	$5,10^{-8}$ – $5,10^{-5}$ M	$5,10^{-9}$ M		[29]
Kyselina alendronová	Tablety	Spektrofotometrické stanovení založené na reakci s $Cu(II)$ ionty v kyselém prostředí, tvorba derivátu absorbujícího v UV oblasti ($\lambda_{max} = 240$ nm)	1,0–60,0 mg/l	0,3 mg/l	60	[30]

		Spectrofluorimetrická metoda založená na reakci kys. Alendronové s o-phthalaldehydem za přítomnosti 2-merkptoethanolu v bazickém médiu ($\lambda_{ex} = 340 \text{ nm}/\lambda_{em} = 455 \text{ nm}$)	0,13–10,0 mg/l	0,04 mg/l	30	
Kys. acetylsalicylová	Tablety	Sekvenční injekční chromatografie (SIC), monolitická kolona RP-18, mobilní fáze acetonitril-fosfátový pufr (0.01 M) (10: 90, v/v) pH 4.05, rychlost průtoku 0.6 ml/min, UV detekce při 210 a 230 nm	-	0,3-0,8 µg/ ml	10	[31]
Paracetamol						
Kofein						
Kyselina salicylová	Topický farmaceutický přípr. (pasta)	Sekvenční injekční chromatografie (SIC), monolitická chromatografická kolona RP-18, mobilní fáze acetonitril–voda (35/60 (v/v)), pH 2,5; UV detekce při 240 nm	0,17–43,2 mg/l	0,04 mg/l	8	[32]
Methylsalicylát			0,24–60,2 mg/l	0,15 mg/l		
Metoklopramid	Tablety; injekce	Reakce metoklopramidu nebo tetrakain hydrochloridu dichromanem draselným za přítomnosti šřavelanu sodného v roztoku kyseliny sírové, spektrofotometrická detekce při 495 nm (metoklopramid) nebo 572 nm (tetrakain)	13–130 µg/l	9,4 µg/l	40	[33]
Tetrakain HCl	Prášek		25–300 µg/l	18,0 µg/l		
Morfin	Nevodné prostředí	Chemiluminiscenční reakce morfinu s manganistanem draselným v kyselém prostředí za přítomnosti polyfosfátu sodného	0,01-0,1% m/v morfinu	0,00003 %	120	[34]
Morfin	Vodné prostředí	Chemiluminiscenční reakce morfinu s manganistanem draselným v kyselém prostředí za přítomnosti hexametafosfátu sodného	$2,5 \times 10^{-6}$ - $3,0 \times 10^{-5}$ mol/l	10-8 mol/l	-	[35]
Oxprenolol	Tablety	Oxidace oxoprenololu Ce (IV); spektrofotometrická detekce při 480 nm	50-400 mg/l	-		[36]
Paracetamol	Tablety; prášek; složené přípravky	Oxidace paracetamolu hexakvanoželezitanem a reakce s fenolem za přítomnosti amoniaku, detekce spektrofotometricky při 630 nm	0-60 mg/l	0,2 mg/l	27	[37]
Penicilamin	Tablety	Vytvoření komplexu při reakci PA s Fe(III), detekce při 600 nm	25–300 ppm	25 ppm	50	[38]
Piroxikam	Tablety; kapsle	Zesílení luminiscence europia (Eu ³⁺) komplexací s piroxikamem; Fluorimetrická detekce ($\lambda_{ex}=358 \text{ nm}$ a $\lambda_{em}=615 \text{ nm}$)	100–1000 ppb	23,0 ppb	60	[39]
Prokain HCl	Injekce	Oxidace látky manganistanem draselným, chemiluminiscenční detekce	0,5-50 mg/l	0,3 mg/l	120	[40]

Benzokain	Babydent STADA roztok		0,5-25 mg/l	0,3 mg/l		
Tetrakain HCl			0,2-25 mg/l	0,1 mg/l		
Promethazin	Tablety; sirup; elixír	Komplexační reakce promethazin hydrochloridu s Pd(II); detekce spektrofotometricky při 540 nm	50-400 mg/l	-	-	[41]
Promethazin HCl	Tablety	Chemiluminiscence	$1,558 \times 10^{-4}$ - $1,870 \times 10^{-3}$ mol/l	-	-	[42]
Pyrrolizidinové alkaloidy		Chemiluminiscence po reakci s činidlem imobilizovaným na silikagelu (4-[4-(dichloromethylsilyl)-butyl]-4'-methyl-2,2'-bipyridine)bis(2,2'-bipyridyl)ruthenium(II) a manganistan draselný	-	5×10^{-10} M	-	[43]
Teofylin	Roztok theofylinu a kofeinu	Mikrokolonka s anionaktivní náplní, naadsorbovaný theofylin eluován HCl, detekce při 274 nm	0,022-0,28 mmol/l	-	-	[44]
Trimeprazin	Farmaceutické přípravky	Komplexační reakce s Pd(II), detekce spektrofotometricky při 515 nm	50-400 mg/l	-	60	[45]
Perfenazin		560 nm	50-500 mg/l	-		
Sulfacetamid	Oční kapky	Oxidace látky manganistanem v kyselém prostředí; Chemiluminiscenční detekce	0,012-1,20 mmol/l	0,012 mmol/l	120	[46]
Sulfafurazol	Tablety		0,009-0,88 mmol/l	0,009 mmol/l		
Sulfanilamid			0,015-1,50 mmol/l	0,013 mmol/l		
Sulfathiazol			0,009-0,92 mmol/l	0,009 mmol/l		
Sulfadimidin			0,035-0,87 mmol/l	0,030 mmol/l		
Sulfamethoxy pyridazin			0,019-0,95 mmol/l	0,015 mmol/l		
Triamcinolon acetát	Krém	Sekvenční injekční chromatografie (SIC), monolitická kolona RP-18 s předkolonkou, mobilní fáze acetonitril-metnol-voda (35:5:65, v/v/v) + 0,05% nonylaminu, pH 2,5; UV detekce při 243 nm	2-100 mg/l	0,5 mg/l	10	[47]
Propylparaben			2-60 mg/l	0,25 mg/l		
Methylparaben			1-40 mg/l	0,25 mg/l		
Trimethoprim	Tablety	Oxidace trimetoprimu KMnO ₄ , chemiluminiscenční detekce	20-100 mg/l	0,1 mg/l	30	[48]

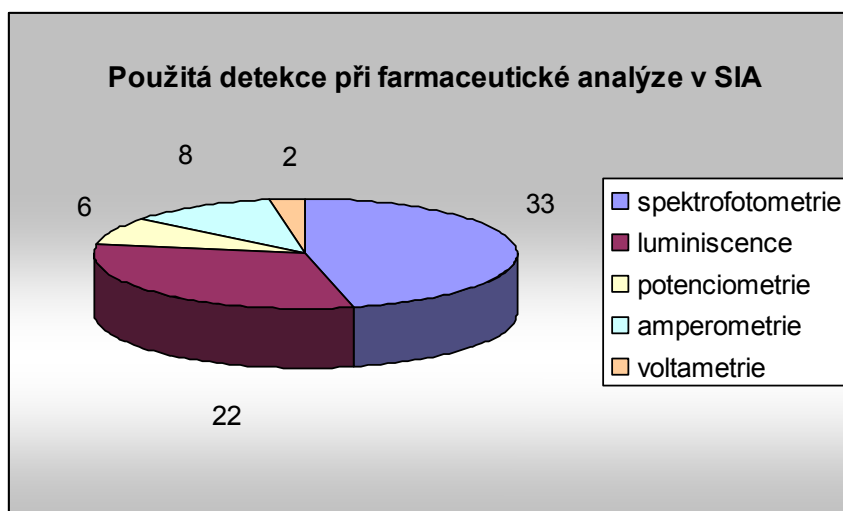
Vápník	Šumivé tablety	Komplexační reakce reaction with cresolphtalein complexone; detekce spektrofotometricky at 578 nm	0-20 mg/l	0,05 mg/l	43	[49]
Zinek	Farmaceutické přípr.	Reakce s xylenovou oranží, spektrofotometrická detekce při 568 nm	10 -60 mg/l	0,42 mg/l	30	[50]
Železo (II)	Antianemický přípr.	Vytvoření komplexu mezi Fe(II) a 2,2-bipyridyl při pH4,5; detekce spektrofotometricky při 523 nm	5,0-40,0 mg/l	0,97 mg/l	100	[51]
Železo(II)	Tablety	Reakce mezi 1,10-fenanthrolinem a Fe (II); spektrofotometrická detekce při 512 nm	0,25-5,0 mg/l	18 µg/l	40	[52]
Železo (III)	Kapsle; tablety	Komplexace s tironem; detekce spektrofotometricky při 667 nm; dialýza	100-1000 mg/l	45 mg/l	8	[53]
Azidothymidin	Kapsle	Amperometrický immunosenzor, grafitová pasta s anti-azidothymidinem	80-2000 nmol/l	10 nmol/l		[54]
Diklofenak	Tablety; injekce;čípky	Potenciometrická detekce, iontově-selektivní elektroda	5,10-6-1,10-2 mol/l	2,10-6 mol/l	33	[55]
S-enalapril	Surový materiál; farmaceutické přípr.	Amperometrické biosenzory vyrobené imobilizací oxidáz L-aminokyselin v uhlíkové pastě	0,08–1,50 µmol/l	4,33 nmol/l	75	[56]
S-ramipril			0,12–0,60 µmol/l	0,01 µmol/l		
S-pentopril			0,2–6,0 µmol/l	0,1 µmol/l		
Hyaluronan	Lidské a bovinní sérum	Bead-injection imunoanalýza; vazebné proteiny ukotvené na mikročástice, na nich kompetice imobilizovaného hyaluronanu a volného hyaluronanu ze zkoumaného roztoku, amperometrická detekce	1–5000 ng/ml	1 ng/ml	12	[57]
Chloridy	Farmaceutické roztoky	Potenciometrická iontově-selektivní membrána s indium(III) oktaetyl-porfirinem	1,00×10 ⁻⁵ až 1,00×10 ⁻² mol l ⁻¹		60	[58]
		Optická polymerní membrána potažená indiem(III) oktaetyl-porfyrinem, detekce při 530 nm	1,00×10 ⁻³ - 1,00 mol l ⁻¹		14	
S-kaptopril		Amperometrický biosenzor, na principu oxidázy L-amino kyselin; testování čistoty enantiomeru	0,05-1,50 µmol/l	16 nmol/l	80	[59]
S-kaptopril	Monitorování procesu syntézy	Maltodextrinová enantioselektivní membránová elektroda, potenciometrická detekce	10 ⁻⁶ -10 ⁻³ mol/l	4,4×10 ⁻⁷ mol/l	38	[60]
R-kaptopril		Amperometrický biosenzor	10 ⁻⁷ -10 ⁻⁶ mol/l			

Kaptopril	Tablety	Potenciometrická titrace roztokem Ag(I)	Lineární do 1,4x10 ⁻³ mol/l	-	-	[61]
Klavulanát draselný	Tablety	Simultánní potenciometrická detekce anionu klavulanátu a kationu draslíku	2 x 10 ⁻³ - 1x10 ⁻¹ mol/l	-	53	[62]
Penicilin G	Tablety	Iontově-selektivní elektrody citlivé na penicilin-G	2x10 ⁻⁴ -1x10 ⁻² mol/l		25	[63]
S-perindopril		Amperometrické biosenzory na principu oxidáz L- a D- aminokyselin	60-800 nmol/l	40 nmol/l	30	[64]
R-perindopril			60-900 nmol/l	40 nmol/l		
Riboflavin	Tablety	Rozpouštěcí voltametrie; stanovení a fotodegradační studie	0,0-0,8 μmol/l	0,07 μmol/l	-	[65]
L-tyroxin	On-line kontrola procesu syntézy; tablety;injekce	Amperometrické immunosenzory, amperometrické biosenzory	10 and 780 ng/ml	8,52 ng l ⁻¹	20	[66]
D-tyroxin			50 and 500 nmol/l	20 nmol l ⁻¹		
L-triiodtyronin			15 and 380 ng/ml	12 ng ml ⁻¹		
Vitamín B6	Multivitaminové přípravky	Tubular pyridoxin sensitive electrode, potenciometrická detekce	1,0x10 ⁻⁵ -5,0x10 ⁻⁴ mol/l	-	-	[67]

Tab. 1 Shrnutí využití SIA pro stanovení obsahu farmaceuticky významných látek

3.2.1. Způsoby detekce využívané v SIA systémech

Detekce je v SIA systému volena dle použitého stanovovaného analytu. Lze konstatovat, že pro SIA metodu je možno použít většinu běžně využívaných detekčních technik. Ve farmaceutické analýze je výčet dosud použitých technik užší. Zastoupení jednotlivých detekčních technik v SIA farmaceutické analýze znázorňuje graf na obr. 7. Jak vyplývá z grafu, převládají optické způsoby detekce.



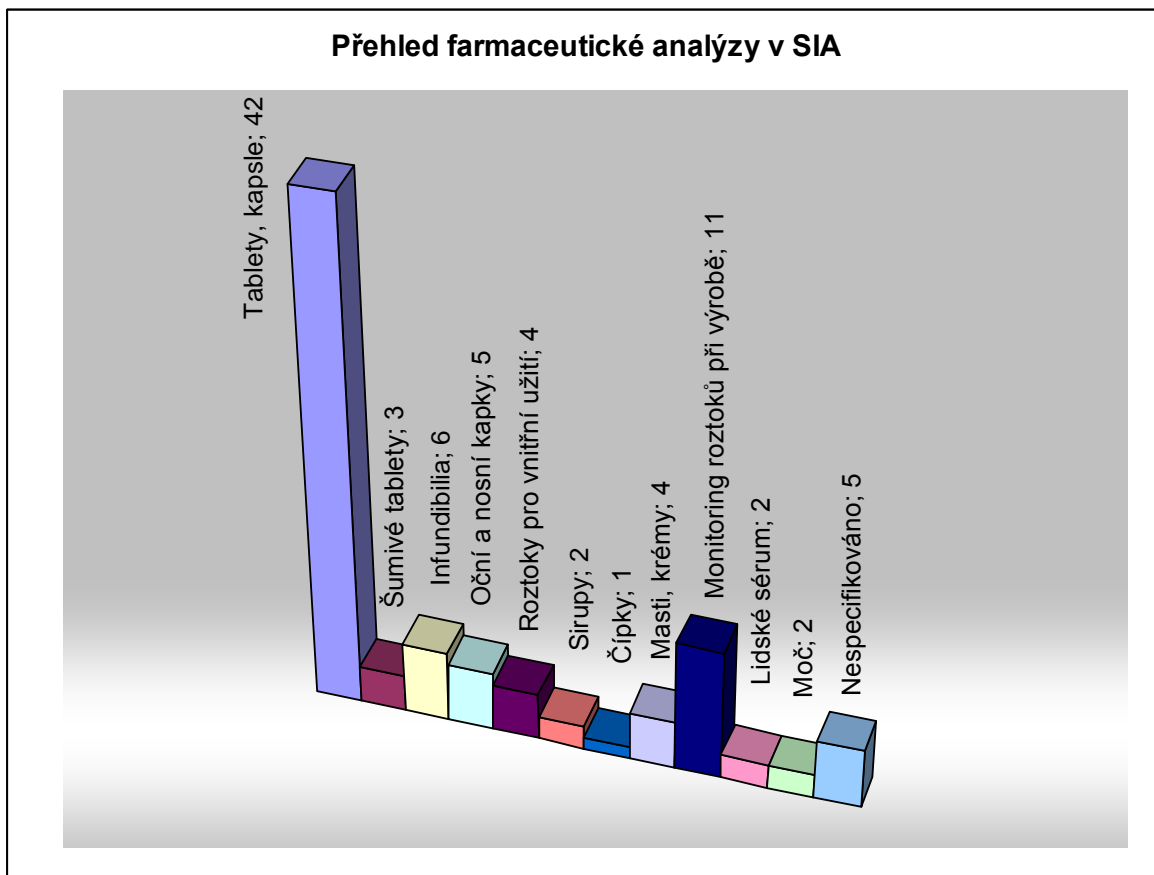
Obr. 6 Zastoupení detekčních technik podle počtu publikovaných prací

3.2.2. Matrice analyzované technikou SIA

Matrice ve farmaceutické analýze jsou různé – od pevných forem (tablety, kapsle), přes polotuhé (krémy, masti, gely, pasty), po tekuté (roztoky, emulze, suspenze). V přípravku vedle aktivní látky je přítomna řada dalších pomocných látek (plnidla, rozvolňovala, emulgátory, konzervancia a další). V řadě případů pomocné látky neinterferují s analýzou aktivní látky a nebo mohou být snadno odstraněny. Výhodou je, že složení přípravku je skoro vždy známo.

Biologická matrice je složitější. I přes to, že do SIA systému lze zapojit různé prvky pro úpravu vzorku a odstranění matrice, není analýza biologického

materiálu pomocí SIA systému běžnou záležitostí. Použití SIA k analýze biologických materiálů tvoří menšinový podíl ve farmaceutické analýze, jak lze vyčíst z grafu na Obr. 7. Většinový podíl zaujímá analýza tablet a kapslí a dále je s výhodou využíváno automatizovaného sledování koncentrací látek v roztoku při biotechnologické výrobě.



Obr. 7 Matrice analyzované technikou SIA - podle počtu publikovaných prací

3.2.3. Automatizace dlouhodobého sledování koncentrace pomocí SIA

Při dlouhodobém monitorování je použití SIA obzvláště výhodné, protože sledování koncentrace probíhá on-line a zcela automaticky bez nutnosti zásahu analytika. Vzorky mohou být automatizovaně upravovány před vlastním měřením, což podstatně zrychluje analýzu a umožňuje automatizovat manuálně i časově náročné procesy.

Takovými dlouhodobými studii jsou například *disoluční studie*, při kterých je sledováno množství uvolněné aktivní látky z farmaceutického přípravku v závislosti na čase. Selekční ventil může sloužit jako menší autosampler, takže je možno měřit vzorky odebírané postupně z několika disolučních aparatur. První zmínka o využití SIA v této oblasti je od Liu a Fanga [68] kdy byly monitorovány disoluční studie ibuprofenu v tabletách, kapslích s prodlouženým uvolňováním a matrixových tabletách s řízeným uvolňováním. Další uplatnění SIA v této oblasti je shrnuto v tabulce 2.

SIA je také využívána při kontrole *biotechnologické výroby*. Zde se monitoruje ať už substrát pro buněčné kultury nebo jejich produkty. Nejčastější je sledování koncentrace glukózy a penicilinu [80] - [83] (tab. 2).

SIA technika byla využita i při *farmakokinetických studiích*, kdy Paseková a Pávek [69] sledovali transport modelové látky Rhodaminu 123 přes lidskou placentu. Pomocí SIA techniky monitorovali aktuální koncentrace jak v maternálním, tak ve fetálním kompartmentu. K detekci bylo použito fluorescence. Při stanovení byl studován vliv různých podmínek - inhibice syntézy ATP, přidavky různých inhibitorů P-glykoproteinu (transportér).

Aspirin	Disoluce vícekomponentních aspirinových tablet	Absorpční spektra (220-310 nm); souběžná disoluce tří látek z jedné tablety	44-220 mg/l	-	45	[70]
Phenacetin			30-150 mg/l			
Caffeine			10-50 mg/l			
Ergotamin tartrate	Tablet	Fluorimetrické stanovení ($\lambda_{ex}=236$ nm; $\lambda_{em}\geq 390$ nm)	0,03-0,61 mg/l	0,01 mg/l	120	[71]
Ibuprofen	Disoluce normálních tablet	Detekce spektrofotometricky při 222 nm	1 mg/l-0,12 g/l	1 mg/l	42	[68]
	Disoluce kapslí s prodlouženým uvolňováním; matrixové tablety s řízeným uvolňováním		2 mg/l-0,35 g/l	2 mg/l	42	
Indometacin	Uvolňování z gelů a krémů	Fluorimetrická detekce při $\lambda_{ex} = 330$ nm; $\lambda_{em} = 385$ nm	0,05–10 mg/l	0,04 mg/l	120	[72]

Kyselina acetyl-salicylová	Disoluce tablet:normální, složené, šumivé, s prodl. uvolňováním	Hydrolyza na salicylát a jeho potenciometrické stanovení pomocí tabulární selektivní elektrody	0,05-10 mmol/l	0,05 mmol/l	6	[73]
					20	
Kyselina aminokapronová	Disoluce tablet	Derivatizační reakce s o-phthalaldehyde a N-acetylcysteine, fluorimetrická detekce ($\lambda_{ex} = 350 \text{ nm}$; $\lambda_{em} = 450 \text{ nm}$)	$2,5 \times 10^{-7}$ - $6 \times 10^{-5} \text{ mol/l}$	$2,5 \cdot 10^{-7} \text{ mol/l}$	40	[74]
Kyselina salicylová	Uvolňování z masti	Fluorimetrická detekce ($\lambda_{ex}=297 \text{ nm}$, $\lambda_{em} = 405 \text{ nm}$)	0,05–10 mg/l	0,01 mg/l	120	[75]
Naproxen	Disoluce tablet	Komplexační reakce naproxenu s β -cyclodextrin, fluorimetrické stanovení ($\lambda_{ex} = 280 \text{ nm}$, $\lambda_{em} = 356 \text{ nm}$)	$1,9 \cdot 10^{-7}$ - 10^{-5} mol/l	$1,9 \cdot 10^{-7} \text{ mol/l}$	70	[76]
Prazosin	Disoluce tablet	Fluorimetrická detekce při $\lambda_{ex}=244 \text{ nm}$ ($\lambda_{em} \geq 389 \text{ nm}$)	0,02–2,43mg/l	0,007 mg/l	70	[77]
Rutin	Disoluce složených tablet	Souběžné stanovení rutinu a kys. askorbové; retence rutinu na SPE mikrokolonce, kyselina askorbová eluována bez záchytu na pevné fázi; UV detekce při 262 nm	2–20 mg/l	1,5 mg/l	26	[78]
Kyselina askorbová			10–100 mg/l	1 mg/l		

L-cystein	On-line monitorování biologických procesů	Redoxní reakce L-cysteinu s Fe (III) za přítomnosti 1,10-fenantrolinu	0,005 -1 mM	0,005 mM	15	[79]
Glukóza	Kultury Penicillium chrysogenum	Enzymatická reakce s glukooxidázou – tvorba H ₂ O ₂ , který je detekován chemiluminiscenčně pomocí luminolu	0,01-7,0 g/l	-	[80]	
Penicillin		Tvorba kyseliny penicilové penicilinázou, kyselina je detekována chemiluminiscenčně dekolonizační metodou	0,1-1,8 g/l	-		
Glukóza	Fermentační proces	Nylonový tabulární reaktor s imobilizovanou glukooxidázou; detekce H ₂ O ₂ pomocí luminolu chemiluminiscenčně	30-600 μM	15 μM	54	[81]
Glukóza	Kultivace penicilin (také kyselina mléčná)	Enzymatická reakce s glukooxidázou- tvorba H ₂ O ₂ , který je detekován chemiluminiscenčně za pomocí luminolu	5-100 mg/l	5 mg/l	20	[82]

Pecillin		Tvorba kyseliny penicilové penicilinázou, za její přítomnosti vzniká chemiluminiscence během reakce jódu s luminolem	10mg/l-1,5g/l	10 mg/l		
Glukóza		Jet-ring cela s obnovovatelými nosiči pro amperometrickou detekci	0,1mM-5mM	0,1mM		[83]
Glukóza	Kultivace kvasnic (také celková biomasa)	Stanovení glukózy Trinderovou reakcí, měření absorbance	0-1200 mg/l		7	[84]
L-karnitin	Čistota enantiomerů během syntézy; kapsle	Fyzikáln a chemická imobilizace L-aminooxidázy a křenové peroxidázy; amperometrický biosenzor	fmol/l nebo pmol/l dle typu biosenzoru	2 fmol/l	34	[85]
D-karnitin		D-aminooxidázy a křenové peroxidázy; amperometrický biosenzor				
L-metotrexat	Monitoring procesu syntézy; tablety; injekce	Amperometrické biosenzory založené na oxidáze L (D)-aminokyselin a/nebo L-glutamát oxidáze a křenové peroxidáze pro L formu (pro D formu)	fmol/l nebo pmol/l dle typu biosenzoru	0,6 pmol/l	34	[86]
D-metotrexat				1 pmol/l		

Tab. 2 Přehled farmaceuticky významných látek monitorovaných pomocí SIA systému při dlouhodobých procesech

3.2.4. Úprava vzorku pomocí SIA

Úprava vzorku je důležitým krokem v analytickém procesu. Před vlastní analýzou je většinou nutné ze vzorku odstarnit interferující matici a často též zakoncentrovat analyt. Příprava vzorku představuje časově nejnáročnější část celé analýzy a je zdrojem nepřesností a chyb. Průtokové systémy umožňují on-line zapojení prvků pro automatizovanou úpravu vzorku. Výhodou je pak menší spotřeba vzorku a reakčních činidel, časová případně i instrumentální úspora a snížení rizika vnesení chyby do celého procesu analýzy. Sekvenční injekční analýza ve spojení s jednotkami pro úpravu vzorků umožňuje racionalizovat a automatizovat složité postupy při analýze velkých sérií vzorků, a tak podstatným způsobem zvyšovat produktivitu zejména rutinních stanovení.

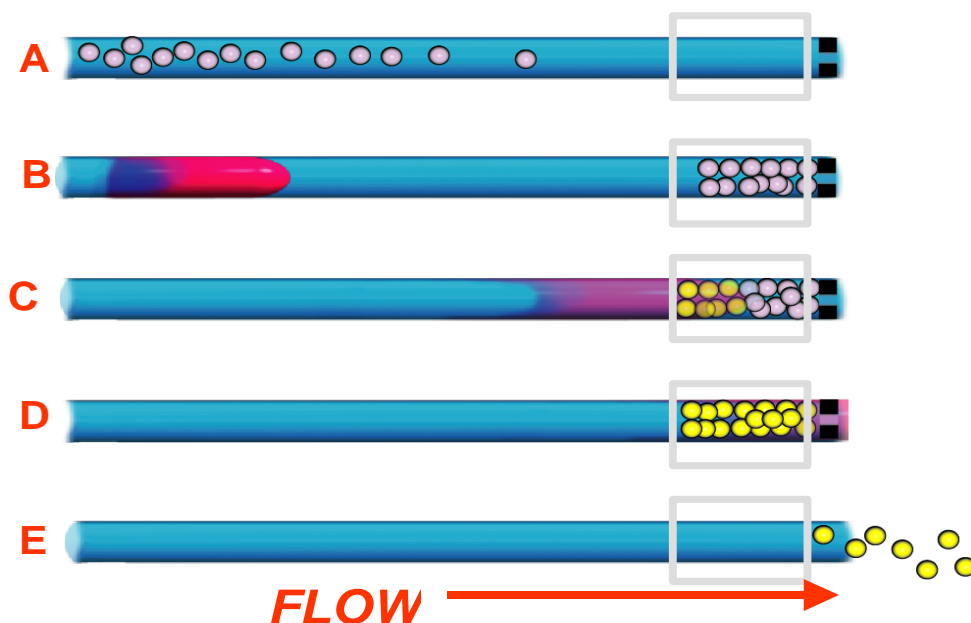
Některé příklady úpravy vzorku zakomponované do SIA systému a využití při farmaceutické analýze: dialýza (analýza trojmocného železa v antianemických přípravcích [53]), extrakce na tuhých fázích (SPE) (mikrokolonka s anionaktivní náplní při stanovení teofylinu v roztoku s kofeinem [44], mikrokolonka plněná částicemi s modifikovaným povrchem C-18 pro souběžné stanovení rutinu a kyseliny askorbové [78]), materiály s omezeným přístupem (RAM) (stanovení furosemidu v lidském séru [19]).

Také je známo spojení SIA s jinými technikami (spojení SIA a kapilární elektroforózy nebo hmotnostní spektrofotometrie s ionizací elektrosprejem [4]), kdy SIA slouží jako automatizované zařízení pro úpravu vzorků a následná technika pak k detekci, případně další separaci látek. Ve spojení s HPLC bylo využito SIA a SPE kolonky s tzv. *molecular imprinted polymers* pro selektivní zachycení kofeinu při jeho stanovení v moči. Následná HPLC technika byla vybavená C18 separační kolonou a UV detekcí [87]. Při analýze gama aminomáselné kyseliny v lidských biologických tekutinách Zacharis a kol. [88] využili předkolumnové derivatizace analytu s *o*-ftaldialdehydem před analýzou pomocí kapalinové chromatografie (HPLC). K automatizaci derivatizace posloužila právě SIA technika. Dalším zajímavým spojením bylo například propojení principů FIA a SIA při analýze glukózy [89].

3.2.5. Technika *Bead injection*

Jedním z relativně nových způsobů úpravy vzorku je tzv. „*bead injection*“. Při *bead injection* technice dochází k interakci molekul, z nichž jedna je ukotvena na nosiči tvaru malých kuliček (obvykle skleněné, polystyrenové nebo akrylamidové). Tyto mikročástice jsou zachyceny v průtokové cele (tzv. *jet ring cela*) (Obr. 8 A), následuje proud vzorku (Obr. 8 B). Během průtoku vzorku stanovovaná látka reaguje s funkčními skupinami na povrchu mikročástic (Obr. 8 C). Navázaná látka je detekována přímo např. spektrofotometricky nebo až po reakci s vhodným barevným nebo fluorescenčním činidlem. Detekční technika může být použita i kterákoliv jiná běžně používaná v průtokových systémech. (Obr. 8 D) Po ukončení měření jsou mikročástice odstraněny obrácením toku

nosného proudu nebo zvětšením štěrbinu mezi pohyblivým tělem cely a detektorem (Obr. 8 E).



Obr. 8 Schéma principu „Bead injection“

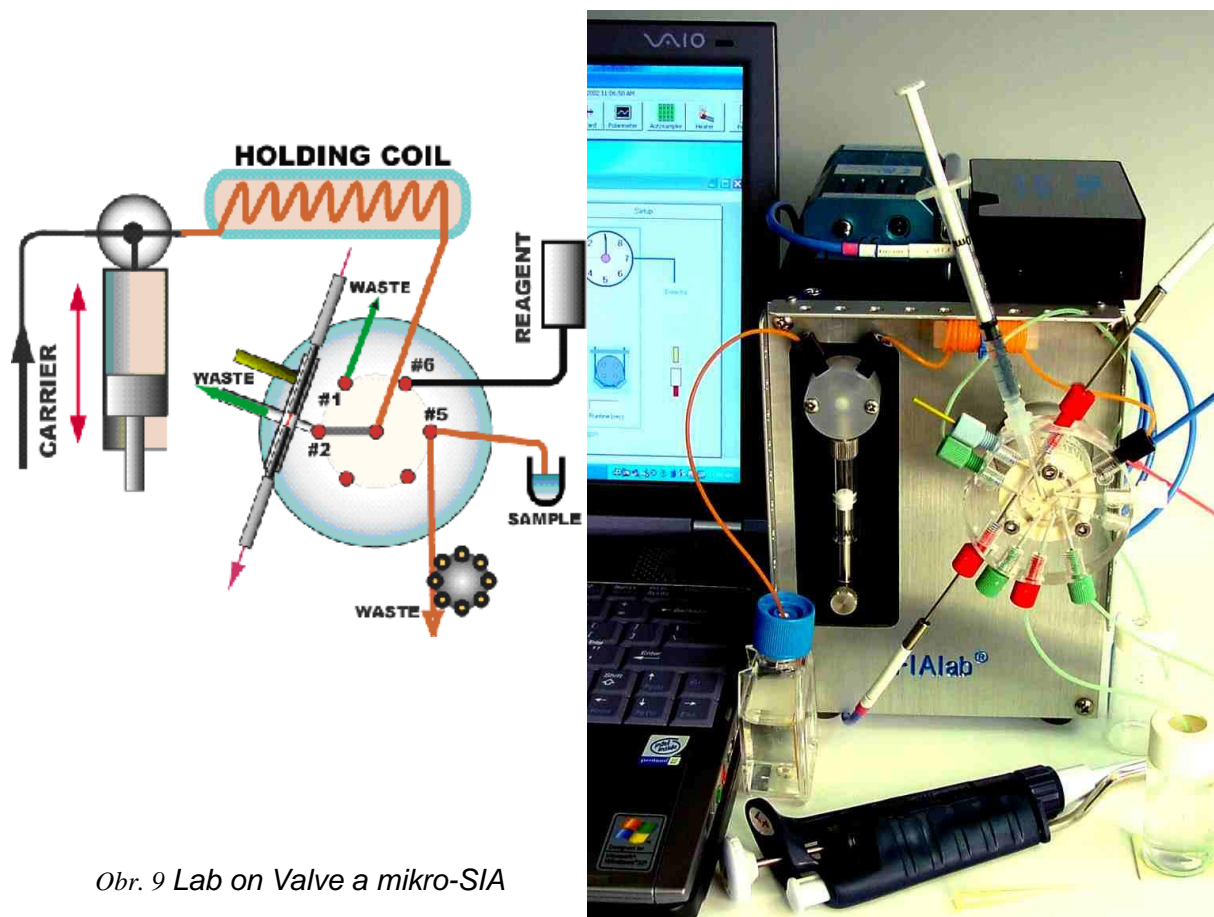
Na povrch kuliček mohou být ukotveny specifické protilátky nebo enzymy či jiné molekuly. Tato technika je velmi citlivá, protože díky akumulaci analytu ze vzorku na povrchu mikročastic dochází k jeho zakoncentrování. Rušivý vliv matrice je odstraněn tím, že ta se na částicích nezachytí. U imunologických testů nedochází k disperzi a ředění během inkubace [4]. U extrakčních kolonek je problémem jejich obnova, kdy je potřeba uplatnit zkušenost analytika a určité množství různých elučních činidel. U *bead injection* jsou kuličky jednoduše odstraněny a aktivní povrch je s novou dávkou mikročastic obnoven [90].

Systém „*bead injection*“ byl využit například ke stanovení thiaminu ve farmaceutických přípravcích [91]. Dále také při stanovení koncentrace hyaluronanu v lidském a bovinním séru, kdy bylo využito kompetice mezi hyaluranem imobilizovaným na mikročasticích a volným hyaluranem v séru při vazbě na určité přesně definované množství vazebného proteinu. Detekce byla provedena amperometricky [57]. Další uplatnění ve farmacii našla technika *bead injection* při stanovení vitelogeninu. Byly použity magnetické

mikročástice a k usměrnění jejich pohybu samarium-kobaltový magnet. Na částicích byla ukotvená protilátka anti-vitalogenin, na ní se sendvičově navazoval vitelogenin ze vzorku a následně protilátka anti-vitalogenin značená křenovou peroxidázou. Tato peroxidáza při reakci s peroxidem vodíku za přítomnosti luminolu vykazovala chemiluminiscenci úměrnou koncentraci analytu ve vzorku [92].

3.2.6. Technika *Lab on valve*

Další novinkou ve vývoji průtokových metod, která postupně nalézá uplatnění na analytickém poli včetně farmaceutické analýzy, je tzv. „*lab on valve*“ a mikroSIA. *Lab on valve* - v překladu můžeme říci „laboratoř umístěná na ventilu“. Tato modifikace SIA systému umožňuje zmenšení průtokových částí systému pomocí plastového bloku ukotveného na selekční ventil. Součástí bloku je i průtoková cela, která má 0,5 mm v průměru. Díky velkému poměru objemu ku ploše nedochází k ucpání kanálků, které hrozí zvláště při používání vzorků se složitější matricí. Také je zde zmenšeno riziko ulpívání analytu na stěnách. Malé rozměry umožňují pracovat s mikrolitrovými objemy vzorku a činidel, což znamená nejen zmenšení množství potřebných činidel a vzorku pro analýzu, ale také možnost zmenšení vlastního přístroje. Není pak nutné používat obvykle používané 5-ti či 10-ti mililitrové pístové pumpy. Celý systém ve složení pumpa, ventil, detektor může být umístěn v jedné ne příliš velké přenosné skříňce (Obr. 9). V takto uspořádaném systému může být využito i analýzy pomocí *bead injection*.



Obr. 9 Lab on Valve a mikro-SIA

Mikro-SIA a *Lab-on-Valve* (LOV) formát byl použit například při analýze DNA. Její stanovení bylo založeno na spektrofotometrické detekci, kdy byl měřen úbytek absorbance při odbarvování krystalové violeti. K odbarvení docházelo při optimalizovaném pH v průtokové cele LOV za přítomnosti λ -DNA/*HindIII* (?? – je to OK ?) a analytu [93].

3.3. POLOTUHÉ PŘÍPRAVKY PRO KOŽNÍ POUŽITÍ

Jsou to polotuhé přípravky určené k místnímu účinku, k transdermálnímu přenosu léčivých látek nebo mají změkčovací, popř. ochranný účinek. Mají homogenní vzhled.

Polotuhé přípravky pro kožní použití jsou tvořeny jednoduchým nebo složeným základem, v němž je zpravidla rozpuštěna nebo dispergována jedna nebo více léčivých látek. Složením základu lze ovlivňovat účinnost přípravku.

Základy mohou obsahovat přírodní nebo syntetické látky; mohou to být jednofázové nebo vícefázové systémy. Podle povahy základu mají přípravky hydrofilní nebo hydrofobní (lipofilní) vlastnosti; mohou obsahovat vhodné pomocné látky, jako jsou protimikrobní látky, antioxidanty, stabilizátory, emulgátory, látky zvyšující viskozitu a urychlovače penetrace.

Rozlišuje se několik druhů polotuhých přípravků k použití na kůži: masti, krémy, gely, pasty, kataplazmata, náplasti s léčivy.

Masti, krémy a gely obecně vykazují podle své struktury viskoelastické vlastnosti a jsou neneutronovského charakteru, tj. plastického, pseudoplastického nebo tixotropního typu toku při vysoké stříhové rychlosti (vysokém smykovém namáhání). Pasty často vykazují roztažnost [94].

Masti jsou disperze tuhých nebo kapalných léčiv v jednoduchých základech.

Hydrofobní masti obsahují jako základ tvrdý a měkký parafín, rostlinné oleje, živočišné tuky, syntetické triacylglyceroly, vosky a kapalně polyalkylsiloxany. Mohou obsahovat malá množství vody.

Hydrofilní masti mají jako základ látky mísitelné s vodou, zpravidla jde o směsi kapalných a tuhých makrogolů (polyetylen glykolů). Obsahují určité množství vody.

Krémy jsou vícefázové systémy složené z vodné a lipofilní fáze.

Hydrofobní krémy mají kontinuální fázi lipofilní. Obsahují emulgátory v/o jako vosk z ovčí vlny, estery sorbitanu s vyššími alifatickými kyselinami a monoacylglyceroly.

Hydrofilní krémy mají kontinuální fázi vodnou. Obsahují emulgátory o/v jako draselná nebo triethanolová mýdla, sulfonované mastné alkoholy, polysorbáty nebo komplexní emulgátory, kombinace emulgátorů o/v a v/o, cyklodimetikonové deriváty.

Gely se skládají z kapalin a tělotvorných látek.

Hydrofobní gely se skládají obvykle z tekutého parafínu a polyetyleny nebo olejů a koloidního oxidu křemičitého nebo zinečnatých a hlinitých mýdel.

Hydrofilní gely obsahují vodu, glycerol nebo propylenglykol a mohou do jisté míry obsahovat i ethanol, celulóзовé deriváty, karboxyvinyllové polymery a křemičitany hořečnato-hlinité.

Pasty jsou polotuhé přípravky s vysokým obsahem tuhé fáze jemně dispergované v základu vhodného typu.

Kataplazmata jsou tvořena hydrofilním základem zadržujícím teplo, ve kterém jsou dispergovány pevné nebo tekuté léčivé látky. Obvykle se roztírají v silné vrstvě na vhodnou tkaninu a před aplikací se zahřívají.

Náplasti s léčivy jsou pružné přípravky obsahující jednu nebo více léčivých látek. Jsou určeny k aplikaci na kůži. Zajišťují udržení léčivé látky (látek) v těsném kontaktu s kůží tak, že může být pomalu vstřebávána nebo může mít ochranný nebo keratolytický charakter. Náplasti s léčivy jsou tvořeny přilnavým základem, který může být zbarven a může obsahovat jednu nebo více léčivých látek, rozetřeným ve stejnoměrné vrstvě na vhodném přírodním nebo syntetickém nosiči. [94][95]

3.3.1. Hodnocení polotuhých přípravků pro kožní použití

Český lékopis ČL 2005 [94] ve stati **Výroba** zmiňuje o účinnosti protimikrobních konzervačních látek, mikrobiologické jakosti. Dále je uvedeno, že u polotuhých přípravků pro kožní použití, které obsahují dispergované částice, je třeba vhodnými opatřeními zajistit definované rheologické vlastnosti. Kde je to vhodné, provedou se následující zkoušky, např. penetrometrické měření konzistence, viskozity (zjevné viskozity) a vhodné zkoušky k prokázání očekávaného uvolňování léčivé látky.

Ve stati nazvané **Zkoušení** jsou uvedeny odstavce: *-Využitelná hmotnost nebo objem*. Polotuhé přípravky pro kožní použití dodané v jednodávkovém obalu vyhovují zkoušce *-Sterilita*. Je-li přípravek sterilní, vyhovuje zkoušce na sterilitu.

Ve stati **Emplastra medicata** (Náplasti s léčivý) je uvedena část **Zkoušení**: -*Disoluce* K prokázání vhodného uvolňování léčivé látky se použijí vhodné zkoušky, např. popsané ve stati „Zkouška disoluce transdermálních náplastí“.

V jednotlivých článcích v kapitole **Léčivé přípravky** jsou uvedeny tyto zkoušky: *Zkoušky totožnosti; Stanovení obsahu; Zkoušky na čistotu; Zkoušky lékové formy*

Chalabala [95] uvádí toto: Kromě chemických zkoušek zaměřených na léčivo a složení pomocných látek existuje množství fyzikálních a fyzikálně-chemických zkoušek, které se hodí na posouzení jakosti této skupiny léků. Bohužel jejich informační hodnota není vysoká, protože chybějí úplné a dokonalé znalosti o těchto koloidních systémech a zejména o složení a struktuře jednotlivých fází.

U mnohých metod, např. reologických a termoanalytických se při zkoušce hluboce zasahuje do struktury vzorku, takže závěry o jejím původním stavu jsou jen přibližné.

Jakostní ukazatele týkající se tukových a olejových základů jsou číslo hydroxylové, zmýdelnění, kyselosti, jódové a určuje se i nezmýdelnitelný podíl. Ve vztahu k obsahu vody se stanovuje schopnost přijmou vodu, schopnost vázat vodu a dokazuje se emulzní typ. Disperzita léčiva se posuzuje mikroskopicky, v polarizovaném světle, elektronovým mikroskopem. Uplatňují se i termoanalytické postupy, a to stanovení teploty tání a tuhnutí a DTA, DSC, TG, TMA. Konzistence se vyjadřuje na základě penetrometrického stanovení, tokové vlastnosti (viskoelastická) se posuzují rotačním viskozimetrem.

3.4. IN VITRO TESTY A JEJICH HODNOCENÍ

U kontroly kvality výroby jsou využívány zástupné *in vitro* testy, které zajišťují zachování jakosti a kvality produktu v čase a při výrobních změnách. Jako zkoušku zachování kvality je možno využít různé fyzikální a chemické testy, ale novější postupy využívají *in vitro* testu sledování rychlosti uvolňování

účinné látky z daného polotuhého přípravku. Rychlost uvolňování léčivé látky *in vitro* podává totiž komplexnější informaci o přípravku. Odráží souhrnné působení několika fyzikálních a chemických parametrů jako je rozpustnost a velikost částic účinné látky, reologické vlastnosti lékové formy. [96]

Tyto testy jsou prováděny na syntetických membránách. Cílem je nalézt rychlost uvolňování léčivé látky přes membránu v daném čase. Proces je obdobný disolučním testům pevných lékových forem. Disoluční studie pevných lékových forem již jsou využívány pro kontrolu kvality mezi jednotlivými šaržemi, tato zkouška je zahrnuta i v lékopisných monografiích [94][98][99]. Lékopisy také zahrnují zkoušku disoluce transdermálních přípravků pro náplasti. Pro ostatní polotuhé přípravky obdobná lékopisná metoda neexistuje.

Ve většině případů je rychlost uvolňování *in vitro* významným testem pro posouzení shodnosti produktu před a po změně ve výrobním procesu či změnách pomocných látek použitých při výrobě [96]. Dále se tento parametr dá rovněž využít při vývoji nové lékové formy, při její formulaci, kdy můžeme zjistit vliv různých pomocných látek a výrobního postupu na rychlost uvolňování léčiva.

3.4.1. Zkouška disoluce transdermálních přípravků

V ČL 2005 je popsána „Zkouška disoluce transdermálních přípravků“. Zkouškou se stanovuje rychlost disoluce léčivých látek z transdermálních náplastí. Používá se disoluční přístroj s míchadlem stejný jako ve zkoušce disoluce pro pevné perorální lékové formy. Tento přístroj se skládá z válcovité nádoby s kulatým dnem z borosilikátového skla nebo jiného inertního průhledného materiálu o objemu 1000 ml; nádoba má víko k zamezení odpařování; ve víku je středový otvor pro hnací hřídel, otvor pro teploměr a otvor pro odběr a přidávání disoluční kapaliny. Dále z míchadla sestávajícího z hnací hřídele a dvou lopatek na jejím spodním konci; lopatky míchadla jsou umístěny na hřídeli tak, že spodní okraj lopatek prochází přesně spodním koncem hřídele; hnací hřídel musí být vystředěna; horní konec hřídele je připojen k motorové jednotce s regulací otáček. Další součástí je vodní lázeň

zaručující během celé zkoušky požadovanou teplotu disoluční tekutiny. Pro transdermální přípravky je popsána disková metoda nebo metoda s extrakční celou. Disk/extrakční cela mají obdobnou funkci a sice přidržovat zkoušený přípravek u dna nádoby tak, aby mezi diskem/extrakční celou a dnem nádoby byl minimální mrtvý prostor, udržovat náplast rovnou, s povrchem uvolňování orientovaným nahoru a rovnoběžně se spodní hranou listu míchadla. Při zkoušce je mezi listem míchadla a povrchem disku vzdálenost (25 ± 2) mm. Teplota se udržuje na $(32 \pm 0,5)^\circ\text{C}$. Nádoba se při zkoušce zakryje, aby se omezilo vypařování. Další možností je nahrazení listu míchadla a hřídele válcem z nerezové oceli. Na začátku každé zkoušky se náplast umístí na válec. Dále je postup u všech měření shodný. Předepsaný objem disoluční kapaliny se umístí do nádoby a vytemperuje na předepsanou teplotu, na dno nádoby se vloží disk/extrakční cela s testovaným přípravkem. Míchadlo se uvede ihned do pohybu. Další možností je nahrazení listu míchadla a hřídele válcem z nerezové oceli. Na začátku každé zkoušky se náplast umístí na válec.

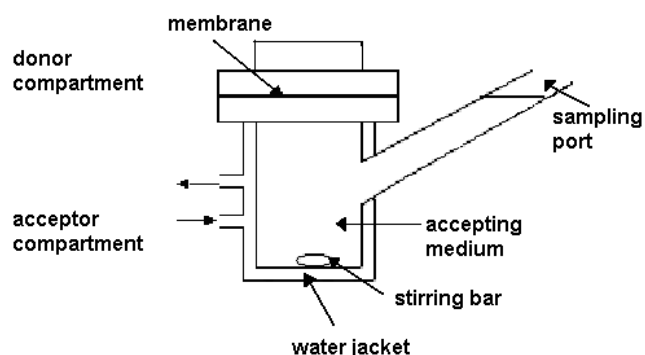
V určitých časových intervalech se odebírá vzorek roztoku z místa mezi hladinou disolučního média a horní části listu míchadla ve vzdálenosti větší než 1 cm od stěny nádoby. Stanoví se obsah v odebraných vzorcích, je-li nutné s korekcí na změnu objemu. zkouška se opakuje s dalšími náplastmi. Přípravek vyhovuje, jestliže množství léčivé látky (látek) uvolněné z náplasti v určeném časem, vyjádřené jako množství na jednotku plochy povrchu náplasti za jednotku času, je v požadovaném rozmezí. [94]

3.4.2. Uvolňování aktivní látky z polotuhých přípravků

Difúzní cela

Pro testování uvolňování aktivní látky z polotuhých přípravků existují různé typy difúzních cel a sice cely statické (Franzova) nebo průtokové (Bronaughova). V principu se jedná o nádobku sestávající z donorové části a akceptorové části, mezi nimi je umístěna membrána. Pokud zařízení obsahuje více cel, pak každá má stejnou plochu mezi akceptorovou a donorovou částí, obvykle v rozmezí od $0,3$ do 5 cm^2 . Tvar cely by měla zajišťovat dobré ukotvení

membrány. U statických cel by měl umožňovat míchání akceptorového média, snadné odebrání vzorků a termostatování. Cela musí být vyrobena z inertního materiálu, jako je sklo nebo PTFE, aby byly minimalizovány interakce s testovanou látkou. Jestliže je při experimentu vyžadována okluze či odstranění testovaného přípravku, měl by to tvar donorové části umožňovat.



Obr. 10 Příklad Franzovy difúzní cely

Akceptorové médium

Akceptorové médium by mělo být podobné fyziologickým podmínkám lidského těla, ale klíčovým parametrem je rozpustnost testované látky. Pro látky ve vodě rozpustné jsou používány pufrы o pH 7,4. Pro lipofilní látky různě koncentrované alkoholické roztoky (např. ethanol:voda 1:1), případně jiné vodné roztoky s obsahem organické složky (6% polyetylen glykol 20 oleyl ether; octoxynol-9; Poloxamer 188; PEG 400; albumín bovinního séra (3% v pufru); methanol nebo isopropyl myristát) [97], [100]

Rozpustnost látky v akceptorovém médiu nesmí být limitujícím faktorem pro difúzi. U statických systémů je důležité zajistit, aby maximální koncentrace během experimentu nepřesáhla desetinu koncentrace nasyceného roztoku. Tímto je zajištěno, že zpětná difúze není významná. Objem akceptorového média je doporučován v rozmezí 2-20 ml [96]. Prakticky je dobré použít takové složení média, které umožňuje uvolnění dostatečného množství aktivní látky

v rozumném časovém intervalu tak, aby byla zajištěna přesná a správná analýza [101].

Membrány

Pro fyzické oddělení akceptorové a donorové části cely jsou používány syntetické membrány. Membrána, která drží testovaný přípravek, nesmí být omezujícím faktorem pro difúzi. Musí dovolovat účinné látky volnou difúzi, jako by látka byla uvolňována přímo z daného přípravku. Její velikost musí odpovídat designu difúzní cely.

Běžně používané, komerčně dostupné membrány jsou: polysulfonová, membrána z esterů celulosy (acetát/nitrát), teflonová, polykarbonátová, polyvinylfluoridová –hydrofilní; silikonová - tato membrána je hydrofobní, prostupují pouze silně hydrofobní látky; a další membrány. Velikost pórů je různorodá dle nabídky jednotlivých výrobců (nejvíce používané velikosti pórů jsou v rozmezí 0,2 - 0,44 μm). [96][101]

Provedení testu

Před zahájením experimentu je doporučováno nasáknutí membrány v akceptorovém médiu. Testovaný přípravek je rovnoměrně umístěn na horní stranu membrány do otevřené donorové části cely. Z druhé strany je membrána v kontaktu s akceptorovým médiem, které je umístěno v akceptorové části nádoby. Pro dodržení infinitního dávkování tj. pro zajištění zachování nutného dostatečného rezervoáru léčiva během celého experimentu existují tato doporučení pro množství nanášeného přípravku: FDA [96] nejméně 1,7 mg/mm^2 ; Wagner [102] a OECD [97] 10 mg/cm^2 či Thakker [101] uvádí takové množství, aby se během experimentu z přípravku uvolnilo maximálně 30% celkového množství aktivní látky. V akceptorové části musí být zajištěno míchání média, pomocí míchadel různého typu. Jelikož difúze je závislá na teplotě, je doporučováno udržování konstantní teploty $32\pm 1^\circ\text{C}$. Tato odpovídá přibližné teplotě těla. Stálá teplota je zajišťována vodní lázní nebo pomocí vodního pláště, případně vyhřívaným blokem. Stálost teploty by mělo být kontrolováno teploměrem.

Po započetí pokusu je z akceptorové části v určitých časových intervalech odebíráno vzorky akceptorového média. Doba sledování uvolňování aktivní látky je doporučována 6 hodin, v tomto intervalu by mělo být odebráno nejméně 5 vzorků (např. 30 min, 1, 2, 4 a 6 hod). Po odběru vzorku je objem akceptorové fáze doplněn stejným množstvím nového akceptorového média tak, aby jeho objem byl stále stejný a aby membrána byla celou plochou v kontaktu s médiem. Odběr vzorku a doplnění média se nejčastěji provádí manuálně. V odebraných vzorcích akceptorového média se následně měří koncentrace uvolněné aktivní látky vhodnou specifickou a selektivní analytickou technikou (nejčastěji HPLC). [96]

Výpočty

Protože je akceptorové médium odebíráno a doplňováno, v důsledku toho není naměřená koncentrace přesná. Z tzv. nekorigované koncentrace můžeme vypočítat korigovanou (správnou) $C_{n, \text{korig}}$ následujícím způsobem:

$$C_{n, \text{korig}} = C_{n, \text{naměřená}} + V_{\text{vz}} / V_{\text{FDC, akceptor}} \sum C_{n-1, \text{naměřená}}$$

V_{vz} – objem odebraného vzorku; $V_{\text{FDC, akceptor}}$ - objem média v akceptorové části Franzovy difúzní cely; $C_{n, \text{naměřená}}$ – naměřené koncentrace

Množství uvolněné látky v daném čase vztažené na jednotku plochy (Q_n) pak vypočteme následujícím způsobem:

$$Q_n = C_{n, \text{korig}} \times V_{\text{FDC, akceptor}} / A$$

$V_{\text{FDC, akceptor}}$ – objem média v akceptorové části Franzovy difúzní cely; A – plocha membrány, přes kterou uvolňovaná látka prochází

Následně je pak sestrojen graf závislosti uvolněného množství látky Q_n na odmocnině času \sqrt{t} . Dle Higuchiho [103] je tato závislost lineární. Toto platí jak pro látky v přípravku rozpuštěné (I), tak pro látky suspenzované (II):

$$(I) \quad Q = A \cdot 2c_o \sqrt{\frac{Dt}{\pi}}$$

$$(II) \quad Q = A \sqrt{[D \cdot t \cdot c_s (2c_o - c_s)]}$$

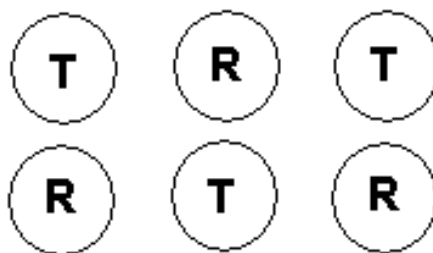
Q – uvolněné množství za čas t ; A - plocha difúze; D - difúzní koeficient;
 t - čas; c_s – koncentrace při nasycení; c_o – koncentrace látky v přípravku v čase
 $t = 0$

Směrnice získané přímkou je rychlost uvolňování aktivní látky z přípravku - specifikum daného přípravku, šarže.

Porovnávání dvou šarží

Pro získání linearizovaného profilu uvolňování, a tedy i zjištění rychlosti uvolňování, je doporučeno provést šest měření a vyhodnotit jejich průměr [96].

Při porovnávání dvou šarží (testovaná a referenční) je při použití zařízení, které má šest cel FDA doporučeno nanášení testovaných přípravků následujícím způsobem:



Obr. 11 Způsob umístění dvou šarží při testování rychlosti uvolňování z polotuhých přípravků, T – testovaná šarže, R – porovnávaná šarže

Obě zkoumané šarže jsou analyzovány během jednoho měřicího cyklu. Jsou tedy obě měřeny za stejných podmínek a při porovnávání pak nehrají roli rozdíly mezi jednotlivými pokusy. Pokud by byla jednotlivá měření zatížena chybou, bude jí zatížena jak testovaná, tak referenční šarže a její vliv bude eliminován.

Při použití zařízení s jiným počtem cel je dobré přípravky umísťovat obdobným způsobem – měření obou šarží zapojit do jednoho cyklu. Pokud je používán aparát pouze s jednou celou, pak je vhodné měření jednotlivých šarží střídat. [96]

Statistické hodnocení

Pro *in vitro* srovnávání dvou šarží je použit dvoufázový test. Statistické hodnocení je založeno na standardním intervalu spolehlivost, na Wilcoxon rank-sum testu a Mann-Whitney U-testu.

V první fázi je změřeno 6 profilů uvolňování pro každou šarži. Získáme tak šest hodnot směrnic (hodnot rychlosti uvolňování) pro každou šarži. Měl by být vypočten 90% interval spolehlivosti pro poměr mediánu rychlosti uvolňování testované šarže k mediánu rychlosti uvolňování referenční šarže, vyjádřeno v procentech. Jestliže se v první fázi testu tento 90% interval spolehlivosti nalézá v rozmezí 75 % - 133,33 %, pak druhé fáze měření není potřeba.

Při druhé fázi je změřeno dalších 12 profilů uvolňování aktivní látky pro každou šarži. Pro všech 18 hodnot směrnic (rychlostí uvolňování) pro každou šarži, které zahrnují 12 nových hodnot a 6 hodnot z první fáze testu, je vypočten 90% interval spolehlivosti. Tento interval by se pak měl nalézat v rozmezí 75 % - 133,33 %.

Prakticky se dá počítat takto: každou naměřenou hodnotu směrnic testované šarže vydělíme každou hodnotou směrnic referenční šarže. Dostaneme 36 (6×6) poměrů směrnic. Následně tyto poměry seřadíme od nejmenší hodnoty k největší. V tomto případě hodnoty, které leží na osmém a dvacátém devátém místě jsou dolním a horním limitem, který po převedení na procenta (znásobením stem) by měl ležet v rozmezí 75 - 133,33 %. U druhé fáze kdy dostaneme 314 (18×18) poměrů směrnic jsou směrodatné hodnoty na 110. a 215. místě. Tato metoda eliminuje odlehlé body, které můžou vzniknout během měření například při vniknutí bubliny na spodní plochu membrány. [96]

3.4.3. Matematické vyjádření permeace

Permeace je jednoduchá difúze individuálních molekul, které neovlivňují kožní bariéru. Permeace látky přes kůži zahrnuje dvě fáze. První fáze, kdy se ustavuje rovnováha na obou stranách membrány se nazývá *non-steady state*. Druhá fáze je charakterizována ustálením rovnováhy a je popsatelná lineárně

(tzv. *steady-state*). Díky vytvořenému koncentračnímu gradientu mezi donorovou a akceptorovou částí proniká látka pasivní difúzí.

Množství látky prošlé přes bariéru za jednotku času v ustáleném stavu nazýváme *steady state flux* $J = dQ/dt$, kde Q je množství prošlé látky na jednotku plochy [$\mu\text{g}/\text{cm}^2$] a t čas [h]. V grafu kumulativní časové závislosti množství látky Q prošlé přes kůži je *flux* vyjádřen jako směrnice lineární části křivky viz Obr. 13.

Takzvaný *lag-time* t_{lag} je doba nebo také opoždění, které zahrnuje první kontakt látky s kůží před ustavením rovnováhy. Na grafu jej můžeme nalézt jako průsečík prodloužení lineární části grafu s osou x .

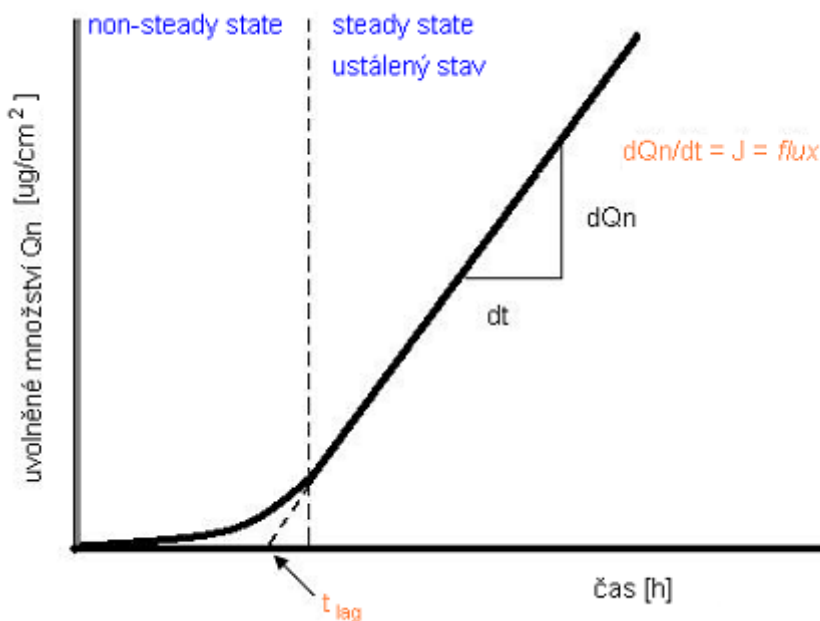
Při ustáleném stavu a při infinitním uspořádání testu můžeme vyjádřit *flux* dle Fickova zákona následovně:

$$J = (D \times C_D \times K) / h$$

D – difúzní koeficient [cm^2/h]; C_D – koncentrace látky v donorové části [$\mu\text{g}/\text{cm}^3$];
 K – rozdělovací koeficient kůže/vehikulum; h – tloušťka membrány [104][105]

Pro difúzní koeficient platí:

$$D = h^2 / 6 \cdot t_{\text{lag}}$$



Obr. 12 Schématický diagram hodnocení kožní permeace při infinitním dávkování

Schopnost látky pronikat kůží je možno také vyjadřovat pomocí koeficientu permeability K_p [cm/h]:

$$K_p = J / C_D$$

J – flux; C_D - koncentrace v donorové části

[102][104][105]

3.4.4. Provedení in vitro permeačních testů

Transdermální či dermální způsob podání se těší stále veliké oblibě u pacientů. In vivo experimenty při klinických studiích jsou a vždycky budou tzv. „zlatým standardem“ při testování klíčového parametru pro léčivo – jeho účinnosti, a také při hodnocení bioekvivalence při vývoji generických léčiv. Ovšem tyto zkoušky (testy) jsou finančně i časově náročné, proto se hledají vhodné alternativy - *in vitro* testy. Využití těchto zástupných testů je ovšem stále otevřenou problematikou a to jak metodicky tak legislativně.

Nejen u farmaceutických přípravků, ale také u kosmetických přípravků a pesticidů by měl z bezpečnostních důvodů být známy vlastnosti aktivní látky, mezi něž patří i jejich průnik přes kůži. Dále také jejich toxikologické působení na lidskou kůži a to i u chemikálií, které k použití na kůži nejsou určeny. V některých případech z etických důvodů tyto studie nemohou být prováděny *in vivo* na lidských jedincích. Proto se i zde hledají alternativní způsoby pro získání těchto informací, metody *in vitro/ex vivo* jako jsou např. permeace a penetrace, dráždivost a korozivita. [102][97]

Výhody těchto *in vitro* testů můžeme shrnout následujícím způsobem [102]:

- Podmínky studie mohou být lépe kontrolovány
- Obvykle je jejich provedení jednodušší a méně nákladnější
- Mohou být použity radioaktivně značené látky, stejně tak jako vysoce toxické látky
- Může být provedeno více měření současně během jednoho pokusu

- Snadněji je umožněno zkoumání zvláštních parametrů (jako např. uvolňování aktivní látky z mastového základu o různém složení, vlivy teploty, vlhkosti, předchozích úprav kůže)
- Množství proniknuté látky může být měřeno přímo v kůži nebo v akceptorovém roztoku, který je v přímém kontaktu s kůží, nedochází k naředění v tělních tekutinách nebo orgánech

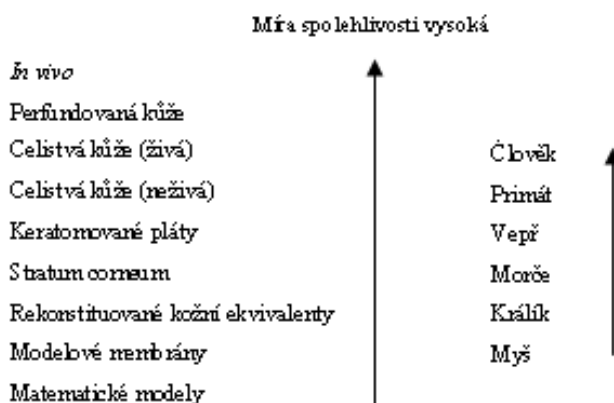
Ovšem *in vitro* testy mají i jisté nevýhody, které musí být brány v potaz při provádění těchto pokusů [102]:

- Akceptorové médium může ovlivňovat průchod látky přes kůži nebo vlastnosti kožního štěpu
- Absence krevního toku může vést ke změnám bariérových vlastností různých kožních vrstev
- Vzorky kůže mají omezenou dobu použitelnosti
- *In vivo* podmínky nemohou být nikdy zcela napodobeny *in vitro*

Princip *In vitro* permeační metody je následující:

Testovaný přípravek je nanesen na povrch kůže, která je umístěná v difúzní cele. Kůže je před nanesením temperována v akceptorovém médiu po dobu 10-30 minut. Akceptorové médium je v kontaktu s celou plochou kůže od nanesení přípravku až po skončení odebírání akceptorového média. Akceptorové médium musí mít odpovídající polaritu, aby zajistilo dostatečnou rozpustnost testované látky. Testovaný přípravek zůstává na kůži po určitou dobu podle reálné doby aplikace přípravku *in vivo*. V určitých časových intervalech je akceptorové médium odebíráno pro analýzu aktivní látky a jejích metabolitů, aby mohla být změřena množství (a také rychlost) látky proniknuté přes kůži. Je doporučována doba odběru 24 hodin. Nicméně u přípravků s delší lag-fází tato doba může být i prodloužena. Za tuto dobu je doporučováno 6-12 odběrů akceptorové fáze. Při finitním způsobu dávkování (množství přípravku méně než 10 mg/cm²) je nutná i analýza nevstřebaného množství, kožního preparátu a akceptorového roztoku, aby se zjistila výtěžnost, která má být v rozmezí 100±10%.

In vitro testy nejsou prováděny pouze s lidskou kůží, která je nevhodnější, ale také s kůží zvířecí nebo s rekonstituovanými kožními náhradami nebo umělými modelovými membránami. Komisí European Commission on Validation of Alternative Methods byla v roce 1996 ustanovena následující hierarchie pro měření perkutánní absorpce -viz Obr. 13.



Obr. 13 Hierarchie kožních typů pro měření perkutánní absorpce dle Howes et al., 1996

OECD dokument doporučuje používání rekonstituovaných kožních náhrad pouze v případě, že permeační data referenčních látek (kofein, kyselina benzoová, testosteron) se shodují s údaji v literatuře. Znamé jsou například EpiDerm™, EpiSkin® (L'Oréal, France), SkinEthic® (SkinEthic, France), AST-2000, EST-2000 (Advanced CellSystems, Germany), Phenion® Full Thickness Skin Model (Phenion, Germany).

Ze zvířecích kůží je jako náhrada pro absorpční studie doporučována prasečí kůže, která je lidské podobná jak v morfologii, tak v permeačních vlastnostech. Kůže lidská se používá z abdominální nebo hrudní části. Při použití prasečí kůže se bere bok či ucho zvířete, další možností je hřbet nebo noha. V případě krysí kůže při toxikologických testech korozivní a dráždivosti se odebírá břišní nebo zádová část, což odpovídá aplikaci při *in vivo* testech.

K *in vitro* testům může být použita samostatná epidermis, kterou je možno získat tepelnou, chemickou nebo enzymatickou separací. Další možností je dermatizovaný kožní štěp (obvykle o tloušťce 200-400µm) či kůže

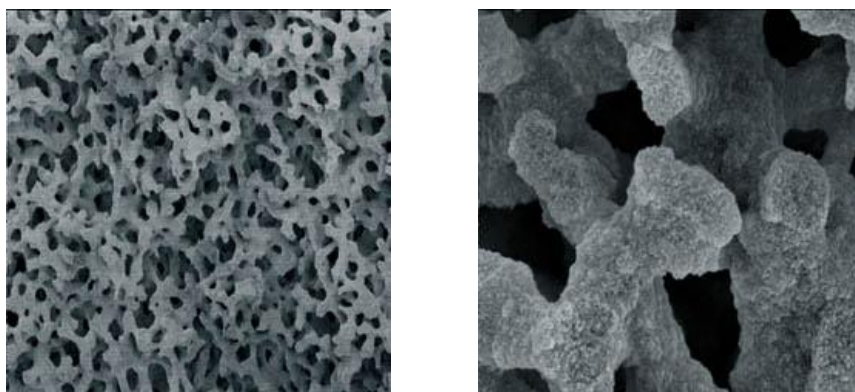
o plné tloušťce. Kůže o nadměrné tloušťce (cca > 1mm) by měly být využívány pouze při studiích výskytu dané látky v jednotlivých vrstvách. [97]

3.5. MONOLITICKÉ KOLONY

Do nedávné doby byla SIA technika začleňována mezi techniky neseparační. Analýza více látek během jednoho měření byla značně omezená, založená převážně na specifických/selektivních reakcích. Ve farmaceutické analýze, kdy je třeba analyzovat látky podobného charakteru, či degradační produkty nebo metabolity, které se liší v chemické struktuře pouze nepatrně jsou mnohdy dosud používané postupy nedostatečné.

S vývojem nových monolitických kolon se tento pohled změnil a i SIA může být zařazena mezi techniky separační. První propojení techniky SIA a monolitické kolony bylo provedeno na pracovišti katedry analytické chemie FaF UK v roce 2003 [16]. Technika, kdy je monolitická kolona do SIA systému zapojena mezi selekční ventil a detektor byla nazvaná sekvenční injekční chromatografie (SIC).

Monolitické kolony jsou separační kolony, které nemají charakter částicový, nýbrž jsou vyrobeny z monolitu silikagelu. Výroba monolitů je odlišná od klasické přípravy stacionární fáze. Vyrábí se speciální sol-gel technologií, což je postup, během kterého dochází k radikálové polymerizaci monomerů výchozího materiálu nebo k polykondenzaci tetraalkylsiloxanů v případě silikagelu. Pomocí síťovadel a porogenních rozpouštědel dochází k formulaci vysoce porézního materiálu. Takto vyrobený sorbent na bázi silikagelu obsahuje dva druhy pórů. Větší póry (obvykle 1-2 μm) se nazývají makropóry, díky nimž je odpor kolony velmi malý a umožňuje použití vyšších průtoků mobilních fází bez negativního zvýšení zpětného tlaku. Menší póry - mezopóry (obvykle 12 nm) zvětšují účinný povrch sorbentu pro separaci, a tím umožňují dosažení velmi dobré separační účinnosti takto naplněných analytických kolon.



Obr. 14 Makropóry a mezopóry monolitických kolon

Pro výrobu monolitických kolon se často používá silikagel buď čistý v normálním uspořádání a nebo modifikovaný oktadecylsilan v reverzním uspořádání. Dalšími modifikacemi jsou např. pentafluoro-fenyl-propyl-dimethyl skupina, pentafluorofenyl, 3,3,3-trifluoropropyl, n-oktamethyl, perfluorohexyl nebo aminopropyl opět v reverzním uspořádání fází [106]. Silikagel není jediným materiálem pro výrobu monolitů. Používají se různé polymery jako například polymethakryláty, akrylamidy a řada jiných.

Monolitické kolony vykazují 90% vnitřní porozitu v porovnání s 80% porozitou běžných částicových kolon [107]. Díky vysoké porozitě mohou být použity velmi vysoké průtoky s velmi nízkým zpětným tlakem. Mezi další výhody patří vynikající mechanická stabilita, daná mechanickou pevností silikagelového monolitu vůči tlakovým a teplotním vlivům v HPLC systému. Chemická odolnost odpovídá odolnosti silikagelového skeletu, tzn. použitelný rozsah pH je cca 2-7,5 [109].

V literatuře se objevují dva směry výroby a vývoje monolitních kolon – pro aplikace v kapilární elektrochromatografii a kapalinové chromatografii. V případě SIA techniky se s vývojem monolitických kolon otevřel nový směr výzkumu. Modifikace SIA je umožněna právě strukturou monolitů, jež díky své porozitě kladou při průtoku minimální odpor, a tudíž k dosažení akceptovatelného průtoku postačují i nízkotlaké pístové SIA pumpy s krokovým motorem při zachování dostatečné separační účinnosti. Při porovnání s HPLC čerpadly je pístová pumpa SIA analyzátoru schopna vyvinout tlak přibližně 2,5-3,0 MPa v závislosti na průměru použitého pístu. Písty menšího průměru

jsou schopné vyvinout větší tlak, avšak jejich nevýhodou je poměrně malý objem. Při analýze by tedy muselo docházet k jejich opakovanému plnění, což je z hlediska reprodukovatelnosti nežádoucí.

Díky úspěšnému začlenění těchto monolitických kolon do SIA systému [16][31][47] se značně rozšířil potenciál této analytické metody a její význam v praxi. Nová SIC technika je koncipována především pro jednoduché separace a stanovení dvou, tří a popř. i více složkových směsí. Díky nekontinuálnímu toku mobilní fáze a nižším nákladům na instrumentaci SIC systému v porovnání s běžnými separačními technikami (HPLC, CE) umožňuje tato technika snížit náklady na analýzu.

4. *KOMENTÁŘ K PUBLIKOVANÝM PRACEM*

4.1. APLIKACE SEKVENČNÍ INJEKČNÍ TECHNIKY VE FARMACEUTICKÉ ANALÝZE

Tato práce (viz Příloha I) měla převážně rešeršní charakter. Cílem práce bylo shrnout využití SIA ve farmaceutické analýze. Dále byly nastíněny nové směry v průtokových metodách a jejich možnost využití ve farmaceuticky významných oblastech.

Byla zpracována podrobná rešerš týkající se využití SIA ve farmaceutické analýze od jejího založení (rok 1990) do roku 2003. Práce udává přehled, který čítá v souhrnu 54 citací.

V úvodu je nastíněn cíl práce, přehled již publikovaných sdělení souhrnného charakteru týkající se SIA, a také vlastnosti sekvenční injekční analýzy. V této části je kladen důraz stejně jako u všech následujících kapitol na možnost uplatnění nových směrů jako je mikro-SIA a Lab on Valve (LOV) formát.

Dále práce rozděluje pole působení SIA na stanovení účinné látky v přípravcích a kontinuální monitorování. Při farmaceutickém stanovení jsou diskutovány nejpoužívanější typy detekce. V části kontinuálního monitorování jsou rozebírány disoluční studie, monitorování bioprosesů a farmakokinetické studie.

Poslední část se týká nových směrů průtokových metod a sice mikro-SIA s LOV, která pracuje s mikrolitrovými objemy; „bead injection“ (BI) kde analýza probíhá pomocí vhodných nosičů molekul ve formě částic; sekvenční injekční chromatografie (SIC) kde do systému je začleněná monolitická kolona. Jsou popsány principy těchto technik, diskutovány jejich výhody a možnosti využití. Na závěr je připojeno shrnutí výhod a možností SIA metody.

4.2. AUTOMATIZACE SLEDOVÁNÍ UVOLŇOVÁNÍ Kyseliny salicylové z polotuhého přípravku pomocí SIA metody

V této práci byla sestavena aparatura, ve které byla spojena difúzní cela Franzova typu se SIA systémem. Spojení SIA a Franzovy cely bylo provedeno pomocí „dávkovací smyčky“. Tato byla umístěna tak, aby spojovala Franzovu celu s určitým (daným) vstupem selekčního ventilu.

SIA systém byl použit FIAlab 3500 (FIAlab instruments, USA) složený z 5 ml pístové pumpy, selekčního ventilu, přídavné peristaltické pumpy. Pohyb kapaliny v systému byl umožněn systémem teflonových hadiček o průměru 0,5 mm. Detekce byla provedena pomocí fluorimetrického detektoru PMT-FL (FIAlab) se zdrojem UV záření D-1000-E a integračním časem 200 ms. Pro výběr emise záření byl použit emisní filtr Edmund Industrial Optics 385 nm.

Vlastní fluorescence kyseliny salicylové byla pro stanovení dostatečně citlivá. Při optimalizovaném objemu vzorku 50 μl a rychlosti průtoku 50 $\mu\text{l}\cdot\text{s}^{-1}$ byla odezva lineární v rozmezí 0,05 – 10 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ (pro šest standardů s korelačním koeficientem 0,9996).

Detekční limit byl 0,01 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ a limit kvantifikace 0,03 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. Opakovatelnost vyjádřená relativní směrodatnou odchylkou deseti analýz standardu o koncentraci 1,0 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ byla 0,52 %.

Franzova cela byla dvouplášťová nádobka o výšce 6,0 cm, šířce 3,6 cm, vnitřním průměru 2,0 cm a objemu 15,0 ml (akceptorová část). Donorová část kopírovala vnějším i vnitřním průměrem horní plochu akceptorové části. Výška hlavice donorové části byla 2,0 cm. Akceptorové médium bylo po celou dobu pokusu mícháno pomocí magnetické míchačky a míchadla příslušných malých rozměrů vloženého do akceptorové části cely.

Při vlastním provedení disolučního testu se nejprve membrána položila na akceptorovou část cely a nechala se kondicionovat při 32°C. Následně se na membránu nanas testovaný přípravek rovnoměrně ve vrstvě asi 0,5 mm (přibližná hmotnost 0,5 g) na celou aktivní plochu, přes kterou pak probíhala

difúze. Toto množství odpovídalo infinitnímu dávkování. Ve stejném čase byl spuštěn program, který pak dle jednotlivých nadefinovaných kroků řídil celý průběh měření. Manuálního zásahu již pak do konce experimentu nebylo zapotřebí, až při vyhodnocování naměřených dat. Program se skládal z následujících částí: peristaltická pumpa byla uvedena do chodu a její pohyb byl konstantní po dobu 9 minut. Poté byla zastavena a z polohy ventilu, ve kterém byla umístěna dávkovací smyčka se nasálo 50 μ l vzorku a byla naměřena velikost signálu fluorescence. Peristaltická pumpa se opět uvedla do chodu a celý cyklus se opakoval 35 krát, aby trval po dobu doporučených 6 hodin. Za tuto dobu bylo tedy naměřeno celkem 36 bodů - každých 10 minut jeden vzorek. V dalších vstupech selekčního ventilu byly připraveny roztoky standardu pro měření kalibrační křivky. Po ukončení disolučního testu byly v SIA programu uvedeny kroky pro generování kalibrační křivky - a sice oplach jednotlivých poloh selekčního ventilu kalibračními roztoky a naměření výšky signálu pro jednotlivé koncentrace. Do systému jsou zadány hodnoty koncentrací pro jednotlivé roztoky. Na základě všech naměřených údajů systém vyhodnotil kalibrační závislost a podle ní vypočetl i koncentrace vzorků odebraných v daných časových intervalech při uvolňování aktivní látky z masti.

Jako akceptorové médium byl použit fosfátový pufr o pH 7,4. Byly testovány tři membrány od firmy Millipore -dvě polykarbonátové s velikostí porů 0,2 μ m (GTTP) a 0,45 μ m (HTTP) a membrána ze směsi esterů celulózy (HAWP) s velikostí porů 0,45 μ m. Jako nejvhodnější se ukázala GTTP membrána. Měla nejkratší lag-time, uvolňování aktivní látky bylo rychlejší než v případě celulózové membrány a obdobný jako u HTTP membrány, ale její struktura umožňovala pohodlnější manipulaci.

Pomocí optimalizovaného systému bylo měřeno uvolňování kyseliny salicylové ze tří hromadně vyráběných léčivých přípravků (Belosalic, Diprosalic, Triamcinolon S), které obsahovaly 3 % kyseliny salicylové. Linearizované profily uvolňování kyseliny salicylové byly získány jako průměr šesti měření pro každý přípravek.

Z výsledků měření vyplynulo, že SIA metoda je vhodná pro sledování dlouhodobých procesů, jakými studium uvolňování aktivní látky je. Na rozdíl od

běžně užívaných metod hodnotících odebrané vzorky až po skončení studie umožňuje navrhovaná metoda on-line monitorování a získávání výsledků v reálném čase. Dávkovaný objem vzorku odebíraný z akceptorového média je v průběhu měření kontinuálně nahrazován přesně stejným objemem média, což snižuje riziko ovlivnění profilu uvolňování změnou objemu média, která se objevuje u diskrétních měření. Také zde není časový odstup mezi odběrem vzorku a jeho analýzou, který by mohl mít vliv na analýzu zvláště u méně stabilních sloučenin.

4.3. AUTOMATIZOVANÉ MĚŘENÍ UVOLŇOVÁNÍ DVOU AKTIVNÍCH LÁTEK Z POLOTUHÉHO PŘÍPRAVKU POMOCÍ SEKVENČNÍ INJEKČNÍ CHROMATOGRAFIE VE SPOJENÍ S FRANZOVOU CELOU

Tato práce navazuje na předchozí výzkum na katedře analytické chemie, kdy bylo spojení SIA a monolitické kolony testováno a následně publikováno [16][31][47]. Technika byla uvedena v odborných publikacích pod názvem sekvenční injekční chromatografie (SIC) a další možnosti její aplikace jsou stále studovány.

Monolitické kolony mají specifickou strukturu díky níž kladou minimální odpor při průchodu kapaliny. Díky této vlastnosti mohou být zapojeny i do systému s nízkotlakou pístovou pumpou s krokovým motorem.

Cílem této práce bylo sestavení systému, který by umožňoval simultánní stanovení časového profilu uvolňování dvou látek z polotuhého topického přípravku během jedné analýzy.

K analýze dvou látek bylo využito zkušeností s monolitickými kolonami na katedře. Byl zvolen topický přípravek, který obsahoval dvě účinné látky a sice lokální anestetika lidokain a prilokain. Účinné substance byly v přípravku přítomny v dostatečném množství (2,5%), takže bylo možno předpokládat, že metoda bude dostatečně citlivá i pro monitorování koncentrací v ranné fázi uvolňování.

Nejprve byly tedy nalezeny optimální podmínky pro stanovení těchto dvou účinných látek. To znamená vhodné složení mobilní fáze (poměr organické a vodné fáze, pH mobilní fáze), rychlost průtoku mobilní fáze, vhodná délka kolony.

Zde byla jistá nevýhoda komerčně dostupného SIA softwaru, protože tento není dobře uzpůsoben na vyhodnocování ploch píků od základní linie. Bylo proto počítáno s výškami píků. Dalším problémem softwarového původu je skutečnost, že během jednoho cyklu FIALab program vyhodnotí pouze jedno maximum v záznamu - při separaci a nutnosti vyhodnocování dvou či více látek

během jednoho měřicího cyklu, byl cyklus přerušen tak, aby byl systém schopen vyhodnotit maxima všech píků. Při plánované výrobě komerčně dostupného SIC systému na to bude výrobcem průtokových systémů FIALab zřejmě pamatováno a software bude zdokonalen i pro tyto nové aplikace.

Optimální mobilní fáze se skládala z acetonitrilu a fosfátového pufru v poměru 40:80 (v/v), s 0,01 % přídavkem triethylaminu, který zmenšuje chvostování bazických látek. PH mobilní fáze bylo upraveno kyselinou fosforečnou na 7,1.

Koncentrace pufru byla nejprve 0,1 M, ale pak bylo zjištěno, že separační charakteristiky zůstávají zachované i při koncentraci nižší (0,05M) a byla vybrána tato, protože při vyšší koncentraci je větší riziko zanesení hadiček či kolony vykrystalizovanými solemi, pokud promývání není dostatečné. Toto pak vede k nežádoucímu zvýšení operačního tlaku v nízkotlakém systému a může být také příčinou i celkového zastavení systému při překročení tlakové meze dvoucestného ventilu pístové pumpy či pumpy samotné.

K analýze byla použita monolitická kolona Chromolith Flash RP-18, 25mm x 4.6mm (Merck, Germany). Detekce byla spektrofotometrická v UV oblasti při 212 nm v blízkosti absorpčního maxima stanovovaných látek. Množství odebíraného vzorku bylo 10 μ l. Průtoková rychlost byla 0,6 ml.min⁻¹. Doba trvání analýzy byla o něco málo kratší než 7 minut. Rozmezí linearity bylo od 2,5 do 200 mg.l⁻¹. Byl určen limit detekce, limit kvantifikace, správnost, selektivita, přesnost, symetrie píku, rozlišení, retenční časy, opakovatelnost retenčních časů.

Metodou byl stanoven obsahu účinných látek v EMLA krému. Naměřená hodnota byla ověřena pomocí HPLC stanovení za obdobných podmínek.

Systém sekvenční injekční chromatografie byl pak rozšířen o Franzovu difúzní celu. Ta byla do systému včleněna obdobným způsobem jako v předchozí práci a sice pomocí dávkovací smyčky a peristaltické pumpy (obrXX)

Při aplikování přípravku, který má hydrofilní základ, docházelo k jeho rozpouštění v akceptorovém médiu a neúměrnému zvyšování koncentrace aktivních látek v akceptorové části. Byla zkoušena různá akceptorová média

(směsi ethanol:voda; methanol; isopropyl mirystát). Také byla testována hydrofobní membrána (celulózová nasáknutá oktanolem), ale ani tehdy se proces uvolňování léčivých látek nepodařilo úspěšně monitorovat. Velké koncentrace pomocných látek ve vzorcích akceptorového média měly za následek zanesení kolony a tedy zvýšení zpětného tlaku. Ten byl pro SIA systém nežádoucí, mnohdy i znemožňoval analýzu. Kolony se ztěžují regenerují a proto pro ukázkou toho, že spojením Franzovy cely a SIC systému lze monitorovat uvolňování dvou látek současně byla připravena modelová mast se stejným procentuálním zastoupením lokálních anestetik jako už zmiňovaný hromadně vyráběný léčivý přípravek.

Byly proměřeny profily uvolňování obou látek současně, korelační koeficient linearizovaného profilu při průměru ze šesti měření byl pro obě látky větší než 0,97.

Jako u předešlé práce má vytvořený systém všechny výhody plně automatizovaného systému (automatizovaný jak odběr vzorku, tak doplnění akceptorového média a analýza, malý objem vzorku a tedy možnost častějšího odběru vzorku, on-line zjištění dat, generování kalibrační křivky). Proti konvenčnímu HPLC systému, ve kterém je tok mobilní fáze kontinuální má SIC systém menší objem organického odpadu, nižší pořizovací a provozní náklady.

4.4. AUTOMATIZACE SIMULTÁNNÍCH TESTŮ UVOLŇOVÁNÍ AKTIVNÍ LÁTKY Z POLOTUHÝCH PŘÍPRAVKŮ TECHNIKOU SIA

V další práci bylo cílem vytvořit systém, který by umožňoval získání profilů uvolňování aktivní látky z více vzorků polotuhých přípravků během jedné analýzy. Byl vytvořen systém se třemi Franzovými difúzními celami.

Práce navazuje na předchozí experimenty týkající se sledování postupného uvolňování kyseliny salicylové z polotuhých hromadně vyráběných léčivých přípravků. Pro optimalizaci systému a optimalizaci jednotlivých kroků programu bylo použito fluorescenční stanovení kyseliny salicylové a mast Belosalic.

SIA systém byl použit obdobný jako v práci v kapitole 4.2. (Příloha II). Franzovy cely byly na rozdíl od předešlého experimentu pouze jednoplášťové. Stálá teplota po dobu měření byla udržována pomocí závěsného termostatu, který byl ukotven ve vodní lázni. Tvar vodní lázně umožňoval instalaci vícemístné míchačky pod dna cel, umístění cel, a také dostatečný ponor termostatu. Cely byly do lázně ukotveny pomocí držáku z plexiskla tak, aby byly ve vzpřímené poloze, termostatování vodou bylo postačující, ale aby nedošlo ke kontaminování akceptorového média vodou z lázně.

Pro odebírání vzorků z jednotlivých cel sloužil selekční ventil, v podstatě funguje jako autosampler. Do systému byl začleněn druhý selekční ventil, pomocí něhož byl vyřešen nedostatek vstupů pro umístění roztoků standardů kalibrační křivky (10-ti a více místný selekční ventil nebyl k dispozici). Tento druhý přídatný selekční ventil byl rovněž ovládán pomocí počítače programovými kroky. Během doby uvolňování a měření koncentrací látky v akceptorovém médiu druhý ventil nebyl aktivní, sloužil pouze jako průtoková součást systému.

Doba nanášení jednotlivých vzorků do donorové části cel byla synchronizovaná s odběrem jednotlivých vzorků - v pětiminutových intervalech, takže odběr vzorku z každé cely v systému se třemi celami byl v 15-ti

minutových intervalech. Doba pěti minut není fixní, je to hodnota, kterou lze upravit dle délky trvání analýzy a dle požadovaného počtu bodů v profilu uvolňování za daný časový úsek.

Plocha pro difúzi byla určena velikostí otvoru mezi dvěma destičkami z plexiskla, kdy na rozdíl od cel s fixním průměrem otvoru, je možno regulovat koncentraci uvolněné látky v akceptorové části cely. Regulace je snadnější při konstantním objemu akceptorové části než při ovlivnění koncentrace pomocí změn objemu akceptorové části. To by vyžadovalo mít celou sadu difúzních cel, takto postačuje mít pouze sadu destiček z plexiskla s různými průměry kruhovitých otvorů. Je důležité, aby koncentrace látky v akceptorovém médiu byla ve shodě s rozsahem linearity a kvantifikačním limitem analytické metody. Obzvláště u permeačních testů, kdy je použita místo membrány kůže a je průnik aktivní látky pomalejší, můžeme narazit na problém citlivosti metody.

Obvykle pro porovnání dvou šarží je zapotřebí nejméně šest měření pro jednu šarži daného přípravku. Jedním z přínosů tohoto systému je možnost získání více profilů uvolňování během kratší doby a tedy zrychlení analýzy. Další výhodou je, že v systému mohou být dvě šarže měřeny zároveň a tím je zaručeno zachování stejných podmínek pro obě šarže. Omezuje se tak vliv vnějších faktorů a jejich negativní působení.

Systém umožňuje zapojení i více než tří difúzních cel. Omezující je v tomto případě velikost vodní lázně a počet míst magnetické míchačky. Ze strany SIA systému jsou limitujícími faktory počet vstupů selekčního ventilu a počet kanálků přídavné peristaltické pumpy.

4.5. AUTOMATIZOVANÉ MĚŘENÍ DISOLUCE A PERMEACE PROPRANOLOL HYDROCHLORIDU Z TABLET POMOCÍ SEKVENČNÍ INJEKČNÍ ANALÝZY

Úvod

Tato práce vznikla ve spolupráci se Saarländskou univerzitou v Německu. Bylo navázáno na práci tamější katedry Biofarmacie a farmaceutické technologie. Cílem bylo automatizovat odběr a stanovení koncentrace v kombinovaném systému, který umožňoval zkoumání jak disoluce aktivní látky, tak její následnou permeaci přes Caco-2 buňky.

V posledních pár letech bylo sestaveno a představeno pár systémů pro souběžné měření disoluce a permeace přes Caco-2 buňky [110][111][112][113][114][115][116] s nadějnými výsledky. Kombinace dvou *in vitro* metod do jednoho systému nám podává ucelenější informaci a tedy lépe simuluje *in vivo* osud pevné lékové formy po podání člověku než metody, kdy jsou procesy disoluce a permeace zkoumány *in vitro* odděleně.

Obecně mohou být tyto kombinované systémy rozděleny do dvou skupin. Ginski a kol. [114] a Kataoka a kol. [115] se soustředili na uzavřený disoluční a permeační systém. Používali buďto USP systém č.2 nebo speciálně vyrobenou disoluční nádobu. Naproti tomu Miyzaki a kol. [110][111][112][113] a skupina na Saarländské univerzitě se soustředí na použití otevřeného systému pro disoluci a permeaci. Zatímco Miyzaki využívá skleněné nebo plastové nádoby různých rozměrů, saarländská skupina aplikuje disoluční systém č.4 dle USP. Simultánní sledování disoluce a permeace je časově i laboratorně náročné. Ne právě jednoduchá je jednak práce se živými buňkami, a dále také manuální odběr vzorků a následná HPLC analýza. Manuální odběr limituje množství odebraných vzorků. HPLC analýza je nejen časově náročná, ale také finančně nákladná, bereme-li v úvahu ceny rozpouštědel použitých pro mobilní fázi, spotřebované vialky a další vybavení. Navíc organické odpady nejsou právě šetrné k životnímu prostředí. V řadě analýz selektivita, kterou HPLC poskytuje není nezbytná, obzvláště pokud stanovujeme koncentraci pouze jediné látky, kterou lze snadno stanovit pomocí UV nebo fluorimetrické detekce.

V této práci bylo navrženo využití průtokové SIA metody, která je popisována jako flexibilní, robustní a dosti univerzální nástroj pro automatizovaný odběr vzorku a jeho úpravu. Zajímavými parametry byla velká frekvence odběru a možnost rychlé on-line kvantifikace dané látky. SIA se v dřívějších pracích osvědčila jak pro monitorování déletrvajících procesů (disoluční studie, liberační studie), tak pro analýzu farmaceuticky významných látek, kde její kvantifikační limity pro fluorimetrická stanovení byly srovnatelné s limity naměřenými HPLC.

Testovanou látkou pro disoluční a permeační studie byla vybrána modelová látka propranolol. Ten byl vybrán kvůli svým biofarmaceutickým vlastnostem, a sice velmi dobrou rozpustností a velkou permeabilitu [117] – v biofarmaceutickém klasifikačním systému je zařazen do třídy 1 [118]. V potaz musíme vzít i skutečnost, že pro měření disoluce a permeace se pohybujeme v širší škále koncentrací. V disoluční části je dosahováno velmi vysokých koncentrací, kdežto v permeační části jsou koncentrace prošlé látky poměrně nízké. Fluorimetrické stanovení pomocí SIA by mohlo být správnou cestou pro automatizovanou kvantifikaci uvolněného a permeovaného množství propranololu v Krebs-Ringerově pufru.

Tato práce navazovala na předešlé výzkumy v dané oblasti, kdy byl sestaven systém pro studium *in vitro* disoluce a permeace. Byl testován na tabletách o různém obsahu propranololu [116]. Odběr byl prováděn manuálně a koncentrace byly stanovovány pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC). Cílem této následné práce bylo minimalizovat čas vložený během analýzy do odběru vzorku a dále také optimalizovat celý systém, aby byl zkrácen tzv. lag-time a zmenšeny mrtvé objemy.

Materiál

Transwell® membránová vložka (velikost pórů 0,4 μm ; 1,13 cm^2 , Transwell™ typ 3460), Corning Incorp. Life Sciences (Acton, MA). Dubelcco Modified Eagle Medium (DMEM), neesenciální aminokyseliny a fetální bovinní sérum (FBS) byly koupeny u firmy GIBCO (Invitrogen Corp. Carlsbad, CA). Propranolol hydrochlorid (HCl) byl pořízen u firmy Synopharm GmbH & Co

KG (Barsbüttel, Germany), látky pro výrobu Krebs-Ringerova pufru (KRB) byly od Sigmy-Aldrich (St. Louis, MO).

Pomocné látky na výrobu tablet: Avicel PH 102 (Lehmann & Voss, Hamburg, Germany); laktóza EP typ D20 (J. A. Meggle Milchindustrie, Reitmehring, Germany); síťovaný PVP (BASF, Ludwigshafen, Germany); Aerosil 200 (Degussa, Rheinfelden, Germany) a stearan hořečnatý (Synopharm GmbH & Co KG, Barsbüttel, Germany).

Puftr pro disoluční a permeační experimenty byl KRB. Jeho složení bylo následující: 1,41 mM CaCl_2 , 3,00 mM KCl, 2,56 mM MgCl_2 , 142,03 mM NaCl, 0,44 mM K_2HPO_4 , 4,00 mM D-glukóza a 10,0 mM HEPES. PH pufru bylo upraveno pomocí NaOH na 7,4. Nosným proudem v SIA systému byla odplyněná Millipore® ultračistá voda.

Příprava tablet

Tablety s normálním uvolňováním s obsahem 10 mg propranololu HCl byly vyrobeny pomocí přímé komprese. Každá tableta obsahovala: 70 % Avicelu PH 102 a 17 % laktózy EP typ D20 - plnidla; 1 % PVP - rozvolňovalo; 1 % Aerosilu 200 a 1 % stearanu hořečnatého - klouzadla a 10 % propranololu - farmaceuticky aktivní látka. Všechny složky byly přesáty (velikost mřížky síta 315 μm), promíchány v tabulárním mixéru (TS Bachofen, Basel, Switzerland) a následně komprimovány pomocí Korsch EK 01 (Berlin, Germany) tabletovacího stroje. Výsledná tableta měla váhu 100 mg a pevnost 100 N (Erweka drtič, typ TBH 30M, Erweka, Heusenstamm, Germany). Pro stanovení obsahu bylo 10 tablet rozpuštěno ve 100,0 ml 0,1 M HCl a ultrazvukováno. Obsah účinné látky byl zjištěn pomocí HPLC metody, jak bylo uvedeno v předchozí práci [116]. Byl stanoven obsah propranololu 9.70 ± 0.23 mg v jedné tabletě.

Buněčná kultura

Caco-2 buňky, klon C2BBel, byly koupeny jako 60 pasáž od American Tissue Culture Collection (ATCC; Manassas, VA) a užity jako pasáže číslo 70-92. Caco-2 buňky byly pěstovány do ~90 % spojení a pokrytí 75 cm^2 v T-baňce s DMEM s přidavkem 10 % FBS a 1% neesenciálních aminokyselin. Kultivační

médium bylo měněno každý druhý den. Inkubační teplota byla ~ 37 °C při ~ 85 % relativní vlhkosti a obsahu CO_2 $\sim 5\%$. Po trypsinizaci byly buňky nasazeny na membránovou vložku Transwell® v hustotě 60 000 buněk/cm². Transepiteliální elektrický odpor (TEER) byl vždy proměřován a pouze jednovrstvy buněk s TEER $> 350 \Omega \cdot \text{cm}^2$ byly použity pro permeační studie. Po skončení disoluční a permeační studie byla integrita vrstvy buněk potvrzena pomocí změření jejich rezistence a optického mikroskopu.

SIA systém

SIA systém byl FIALab 3500 (FIALab instruments, WA, USA), který sestával z 2,5 ml pístové pumpy, přídatné peristaltické pumpy a osmicestného selekčního ventilu. Software byl FIALab pro Windows®, verze 5.9.192. Vzorky byly nasávány prostřednictvím autosampleru (Cetac ASX 260, NE, USA). Fluorimetrická detekce byla měřena pomocí FIALab fluorescenčního detektoru PMT-FL s integračním časem 100 msec a rychlostí skenu 2,0 Hz. Zdroj UV záření Mikropack (typ D-2000, Ostfildern, Germany) byl spojen s fluorescenčním detektorem optickými vlákny. Byl použit pouze excitační filtr ($\lambda_{\text{exc}} = 260$ nm, 10 nm plná šíře s maximem v polovině, Andover Corporation, NH, USA).

Automatizovaný systém pro souběžné měření disoluce a permeace

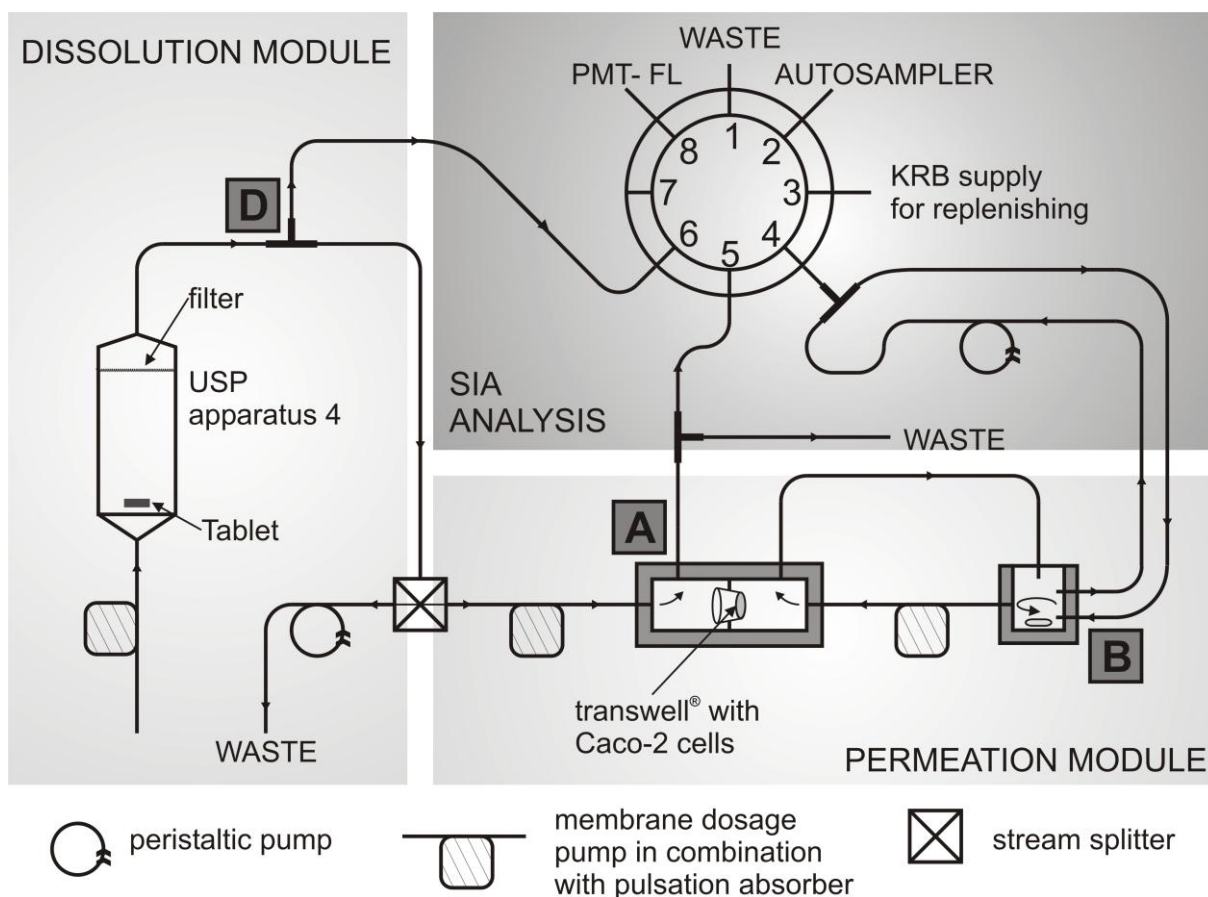
Automatizovaný systém je znázorněn na obrázku **XX**. Celá soustava může být rozdělena na tři části. Dvě z nich zahrnují disoluci a permeaci a třetí část je znázorněním SIA systému. V levé části je znázorněn disoluční modul, kterým je průtoková disoluční cela (USP systém č. 4, Sotax CE1, Sotax, Germany) a v pravé dolní části obrázku je permeační modul s průtokovou permeační celou. Oba tyto systémy jsou spojeny pomocí hadiček, ve kterých je rychlost proudu regulována rozdělovačem proudu na požadovanou hodnotu (nízká průtoková rychlost při průchodu permeačním modulem na rozdíl od vyšší rychlosti v disolučním modulu). Permeační modul může být rozdělen na dva kompartmenty – otevřený apikální a uzavřený bazolaterální. Bazolaterální nádobka obsahovala 1,0 ml KRB pufru a bylo v ní zajištěno míchání. Spojení

mezi nádobkou a selekčním ventilem zajišťovala měřící smyčka. Celkový objem bazolaterální části byl 4,9 ml. Rychlost průtoku v disolučním modulu byla $6,5 \text{ ml min}^{-1}$, v permeačním modulu $1,0 \text{ ml min}^{-1}$. Tři místa odběru vzorků jsou znázorněna na obrázku XX velkými písmeny D, A a B. Vzorky z místa D byly odebírány bezprostředně za disoluční celou a ukazovaly disoluční profil léčiva. Množství zkoumané látky v místě A, které bylo umístěno v apikální části permeačního modulu, představovalo reálnou koncentraci, která byla v kontaktu s apikální stranou buněčné vrstvy. Koncentrace v místě B dovolovala zjistit množství látky prošlé přes Caco-2 buňky do bazolaterální části (celkový objem 4,9 ml).

Spojení mezi disolučním/permeačním systémem a SIA přístrojem bylo následující. V místech odběru vzorku D a A byly použity hadičky vedoucí přímo z jednotlivých poloh selekčního ventilu SIA systému do proudu disolučního/permeačního systému, který obsahoval uvolněné množství aktivní látky. Objemy těchto spojovacích hadiček byly pro D $15 \text{ } \mu\text{l}$ a pro A $60 \text{ } \mu\text{l}$. Aby byl eliminován mrtvý objem spojovacích hadiček a měřena reálná koncentrace v disolučním/permeačním systému, byly hadičky před vlastním měřením koncentrace propláchnuty v místě D $50 \text{ } \mu\text{l}$ a v místě A $100 \text{ } \mu\text{l}$ odebraného roztoku. Odebírané objemy byly dostatečně nízké v porovnání s rychlostí průtoku v bodě D ($6,5 \text{ ml min}^{-1}$), nebylo proto vyžadováno doplnění tohoto objemu. Stejně tak tomu bylo i v případě bodu A. Bazolaterální nádobka byla rezervoárem pro uzavřený bazolaterální kompartment a byla spojená se selekčním ventilem pomocí dávkovací smyčky, ve které roztok proudil rychlostí $0,9 \text{ ml min}^{-1}$ díky přídavné peristaltické pumpě SIA systému. Mrtvý objem spojení mezi dávkovací smyčkou a selekčním ventilem byl asi $6 \text{ } \mu\text{l}$. Před nasátím reálného vzorku bylo proto nasáto $25 \text{ } \mu\text{l}$ roztoku a vylito do odpadu. Po opláchnutí bylo odebráno $50 \text{ } \mu\text{l}$ vzorku k fluorimetrické analýze a $75 \text{ } \mu\text{l}$ nového KRB pufru bylo doplněno do bazolaterální části systému.

Všechny spoje v celém systému jak disolučně/permeačním, tak v SIA byly z PTFE, aby byla minimalizována adsorpce. Vnitřní průměr hadiček v disoluční části byl $1,55 \text{ mm}$ a v permeační části $1,0 \text{ mm}$ (Upchurch, WA, USA). Hadičky SIA systému měly průměr $0,55 \text{ mm}$. Průtoková disoluční cela

byla vybavena filtry (typ GF/D, Whatman International Ltd, Maidstone, UK), aby se neodplavila nerozpuštěná aktivní látka, či jiné pomocné látky. Průtoková permeační cela byla vyrobena z polyetheretherketonu (PEEK). Bazolaterální nádobka byla míchána za pomoci magnetické míchačky (MINI 07, H+P, Oberschleißheim, Germany). Před každým experimentem byla všechna média důkladně odplyněna pomocí míchání pod sníženým tlakem. Caco-2 buňky byly před vložením do systému dvakrát omyty KRB pufrům a ponechány nejméně 30 minut v KBR pufru při teplotě 37 °C pro ustavení rovnováhy. Pak byl měřen jejich elektrický odpor a následně byla membránová vložka s buňkami vložena do průtokové permeační cely. Poté byl průtok v systému upraven na 1,0ml.min⁻¹ a buňky byly ekvilibrovány dalších 10 minut. Až pak byl započat experiment.



Obr. XX . Schématické zobrazení automatizovaného aparátu pro souběžné měření disoluce a permeace

Místa odběru vzorku jsou vyznačena velkými písmeny, **D** pro Disoluci, **A** pro Apikální a **B** pro Bazolaterální část permeačního modulu. Selekční ventil a jeho jednotlivé vstupy:

poloha 1- odpad; poloha 2 – autosampler, odebírání standardů; poloha 3 – zásoba KRB pufry pro doplnění odebraného množství z bazolaterální části; poloha 8 – fluorescenční detektor; poloha 4 – odběr vzorku v B; poloha 5 – odběr vzorku v A; poloha 6 – odběr vzorku v D

Výpočty

Kumulativní množství látky v čase v místech D a A bylo počítáno z naměřené koncentrace podle následující rovnice (1):

$$\text{Kumulativní množství} = \sum_{i=1}^{n-1} \left[\frac{c(t_{i+1}) + c(t_i)}{2} \cdot (t_{i+1} - t_i) \right] \cdot \text{průtok} \quad (1)$$

kde $c(t)$ je koncentrace [$\mu\text{g ml}^{-1}$] naměřená v čase t [min] a $c(t_{i+1})$ je koncentrace naměřená v čase t_{i+1} . **Průtok** označuje průtokovou rychlost [ml min^{-1}] v daném modulu.

Střední hodnota disolučního (**MDT**) a permeačního (**MPT**) času byla počítána podle těchto rovnic:

$$\text{Střední disoluční čas: MDT} = \frac{(T \cdot m_{\text{diss}}) - \text{AUC}_{\text{diss}}}{m_{\text{diss}}}$$

$$\text{Střední permeační čas: MPT} = \frac{(T \cdot m_{\text{perm}}) - \text{AUC}_{\text{perm}}}{m_{\text{perm}}}$$

T - doba trvání disoluce či permeace (obvykle 120 minut), m_{diss} – rozpuštěné množství po době T , m_{perm} - množství látky proniklé buňkami za dobu T , AUC_{diss} and AUC_{perm} plochy pod disoluční a permeační křivkou.

Výsledky a diskuse

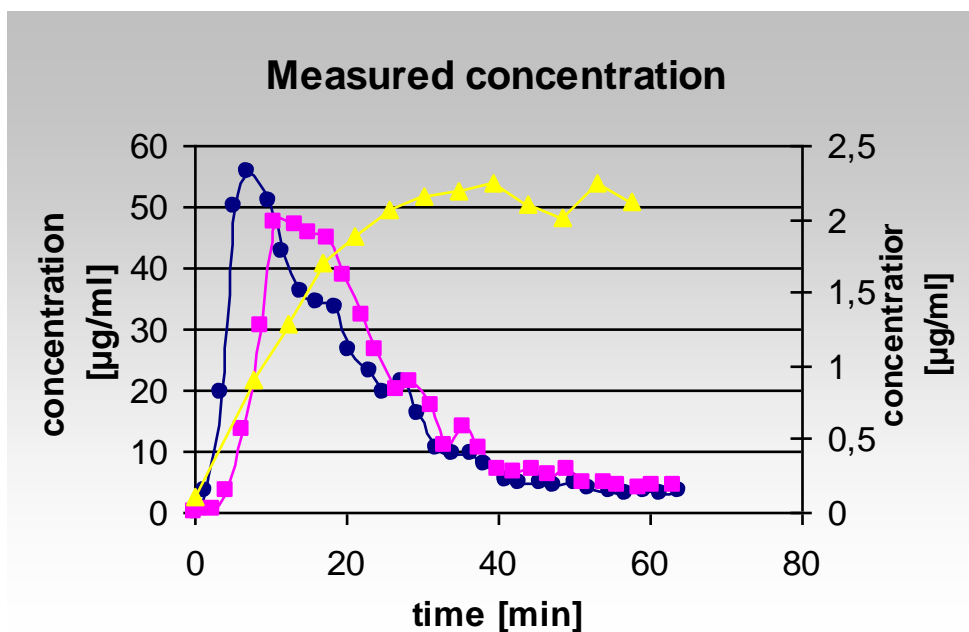
Kalibrace

Intenzita fluorescenčního signál propranololu byla dostatečná pro jeho stanovení i v prostředí KRB pufry. Pro zjištění interferencí pomocných látek byla

vyrobena tableta s placebem (místo účinné látky propranololu obsahovala adekvátní množství laktózy, zastoupení dalších pomocných látek bylo stejné). Měření provedená s touto tabletou nevykazovala žádný rozdíl ve výšce signálu oproti signálu samotného KRB pufru. Výška píků vzorků byla porovnávána s výškami píků standardů, které byly nasávány pomocí autosampleru. Optimální rychlost průtoku vzorku detektorem byla $50 \mu\text{l s}^{-1}$. Protože sledované koncentrace v jednotlivých místech systému D, A a B byly dosti rozdílné, byly pro analýzu zvoleny různé objemy vzorků. V místech D a A, kde byla měřená koncentrace vyšší, byl odebíraný objem pouze $25 \mu\text{l}$, kdežto v místě B, kde byly očekávány nižší koncentrace, byl použit větší objem vzorku, a sice $50 \mu\text{l}$. Pro vyhodnocení koncentrací byly sestrojeny dvě různé kalibrační křivky – pro koncentrace v místech D a A polynomická druhého řádu (odebíraný objem $25 \mu\text{l}$; $R^2 > 0,999$) a pro koncentrace v místě B lineární (objem vzorku $50 \mu\text{l}$; $R^2 > 0,9999$). Relativní směrodatná odchylka byla $1,17 \%$ pro $n=4$ v různých koncentračních hladinách.

Automatizované měření disoluce a permeace

Nejprve bylo provedeno předběžné měření a testování SIA systému. Byla naměřena disoluce tablety s obsahem 10 mg propranololu HCl a permeace uvolněné látky pomocí fluorescenčního detektoru. V permeační části systému nebyly použity živé buňky, ale pouze polyesterová membránová vložka transwell® s póry $0,4 \mu\text{m}$ pro simulaci permeace. Disolučním médiem nebyl KRB pufr, ale voda. Odběr vzorku z místa B byl každých $4,5 \text{ min}$ a z místa A a D střídavě co $0,9 \text{ min}$. Na obrázku **XX** je pomocí tří křivek znázorněn koncentrační profil disoluce a permeace pro tabletu s obsahem 10 mg propranololu HCl v čase.



Obr. 15 Koncentrace naměřené v disolučně/permeačním systému pomocí SIA

Modrá křivka (kolečka) ukazuje koncentrace v daných časech v místě D, fialová křivka (čtverečky) znázorňuje koncentrace naměřené v místě A. Žlutá křivka (trojúhelníčky, ypsilonová osa na pravé straně) ukazuje závislost koncentrace na čase v místě B, tedy na bazolaterální straně permeačního modulu. Je tedy kumulativním znázorněním množství léčiva prošlého přes membránu. Křivky znázorňují výsledek pouze jednoho měření. Křivka B vykazuje místy i nesprávné klesající tendence, což může být následkem toho, že objem bazolaterální nádoby nebyl přesně znám, což ovlivnilo výpočet koncentrace v bodě B.

Koncentrační maxima dosažená u křivky A (fialová) byla nižší než u křivky D (modrá), což je pochopitelné. Během průchodu látky systémem dochází k jejímu rozmývání, detekovaný pík se rozšiřuje a zmenšuje. Také je zřejmý časový posun mezi maximy křivky D a A. Z grafu také vyplývá, že největší vzestupy koncentrace v bazolaterální části byly v souladu s maximálními koncentracemi v místě A.

Tvar křivek naměřených pomocí SIA systému byl ve shodě s křivkami naměřenými pomocí ručního odběru a HPLC analýzy. Protože z předběžných výsledků bylo zřejmé, že systém je schopen automatizovaného monitorování disolučního a permeačního procesu, bylo přistoupeno k další fázi pokusu.

V následující části experimentu byly vloženy Caco-2 buňky do permeační části systému. Při disolučně/permeačním pokusu s buňkami byl odběr vzorku a jeho analýza prováděna střídavě z bodu D a A častěji než v předchozím experimentu. Po třetím cyklu odběrů z místa D a A byl odebrán vzorek z místa B. Celková doba nutná pro odběr vzorku a jeho následnou analýzu pro jednotlivá místa po optimalizaci byla: 0,7 min v místě D; 0,9 min v místě A a 1,3 min v místě B. V místě B je tento proces delší, protože se započítává i doplnění pufru v bazolaterální nádobce. Výsledkem disolučně/permeační studie byly křivky obdobné jako v předběžném experimentu. Frekvence 60 vzorků za hodinu byla pro analýzu dostatečná. V některých místech by mohl být počet bodů i větší, aby získaný disoluční profil byl přesnější. Jako například v počáteční fázi disoluční křivky před dosažením koncentračního maxima. V další části disoluční křivky byl již počet bodů zcela dostačující. Bylo detekováno 98 % celkového obsahu propranololu v tabletě, což poukazuje na správnost měření.

Srovnání manuálně prováděné a automatizované analýzy

Byly porovnány grafy disoluce a permeace 10 mg tablety propranololu s normálním uvolňováním získané pomocí manuálního odběru a HPLC analýzy a SIA automatizovaného procesu. Křivky koncentrací v místě A a B u obou systémů vykazovaly obdobný tvar, výsledky byly srovnatelné. Nový automatizovaný disolučně/permeační systém spojený se SIA byl ale upravený tak, aby bylo dosaženo lepších časových charakteristik jako jsou lag-time a střední disoluční a permeační čas. Byly zmenšeny jak délky, tak průměry spojovacích hadiček. Tento optimalizovaný disolučně/permeační aparát pak vykazoval vyšší koncentrační maxima disoluční křivky jak v místě D, tak A. Jejich tvary ale přitom nebyly významně rozdílné. Směrodatná odchylka analýzy u těchto křivek při automatizovaném měření se trochu zvětšila, ale to může být důsledek řádově menšího odebíraného objemu (25/50 μ l versus 500 μ l). Díky automatizaci odběru se množství odebraných vzorků skoro zdvojnásobilo.

Tvar křivky znázorňující množství propranololu v bazolaterální části aparátu se změnil. Jeho koncentrace se zvyšuje rychleji. Toto může být

připisováno jak jiným hadičkám v systému, tak hlavně menšímu objemu bazolaterální nádoby. Nicméně po 120 minutách bylo v obou případech detekováno obdobné množství propranololu, které permeovalo přes buňky. Pro koncentrace měřené v bodě B byla směrodatná odchylka při automatizovaném odběru menší.

Co se týče porovnání časových údajů, je třeba konstatovat, že došlo k posunu středního disolučního (MDT) a permeačního (MPT) času. U optimalizovaného disolučně/permeačního aparátu s automatizovaným odběrem byly tyto časy kratší, což bylo způsobeno rozdílnými hadičkami a objemy v systému.

Závěr

Byl úspěšně zautomatizován odběr a analýza v systému pro současné měření disoluce a permeace pevných lékových forem pomocí SIA přístroje. Fluorescenční detekce byla dostatečně citlivá a selektivní pro stanovení koncentrace propranololu v KRB pufru. SIA aparát vykazuje obecně omezení ve dvou oblastech - frekvenci analýzy vzorků, kdy analýza, plnění a promývání vyžaduje určitý čas a omezuje tak množství analyzovaných vzorků na maximum 60-80 měření za hodinu. Dále v selektivitě a citlivosti, kdy ne každá farmaceuticky významná látka vykazuje vlastní fluorescenci. Musí se pak nalézt jiné způsoby detekce tak, aby byla metoda dostatečně selektivní a citlivá. Na druhou stranu je řada pozitivních vlastností sekvenční injekční analýzy, kvůli kterým stojí za to ji pro automatizaci využít. Je to její flexibilita a mnohostrannost, která umožňuje rychlý odběr vzorku z různých míst, variabilitu promývacích kroků, odebíraných objemů, vše dle konkrétních potřeb. V systému bylo využito i možnosti automatizovaného doplnění odebraného množství pufru. On-line měření koncentrací zmenšuje problémy při analýze méně stabilních látek. Další nespornou výhodou bylo odstranění náročného manuálního odběru vzorků a snížení celkových nákladů díky omezení výdajů spojených s HPLC analýzou.

5. PŘÍLOHY

**5.1. PŘÍLOHA I. – SOLICH P., POLÁŠEK M.,
KLIMUNDOVÁ J., RŮŽIČKA J.: TRENDS IN
ANALYTICAL CHEMISTRY 23 (2004) 116-126**

**5.2. PŘÍLOHA II. – KLIMUNDOVÁ J., SKLENÁŘOVÁ H.,
SOLICH P.: JOURNAL OF PHARMACEUTICAL AND
BIOMEDICAL ANALYSIS 37 (2005) 893-898**

**5.3. PŘÍLOHA III. – KLIMUNDOVÁ J., ŠATÍNSKÝ D.,
SKLENÁŘOVÁ H., SOLICH P.: TALANTA, PŘIJATO
DO TISKU**

**5.4. PŘÍLOHA IV. – KLIMUNDOVÁ J., MERVARTOVÁ K.,
SKLENÁŘOVÁ H., SOLICH P.: ANALYTICA CHIMICA
ACTA, PŘIJATO DO TISKU**

Automated sequential injection fluorimetric set-up for multiple release testing of topical formulation

Jana Klimundová, Kateřina Mervartová, Hana Sklenářová, Petr Solich, Miroslav Polášek

Department of Analytical Chemistry, Faculty of Pharmacy, Charles University, Heyrovského 1203, Hradec Králové 50005, Czech Republic

Abstract

A fully automated sequential injection analysis (SIA) device for simultaneous release testing of multiple ointment samples was devised and applied to the release testing of an ointment containing salicylic acid as an active substance. The SIA system consisted of a bi-directional 5-ml syringe pump, two 8-position selection valves, auxiliary peristaltic pump, fluorescence detector and three Franz cells maintained at 32°C (water bath). The ointment sample was placed on top of a synthetic Millipore GTTP poly(carbonate) membrane (thickness 10 µm, pore size 0.2 µm) of the Franz cell containing 15 ml of aqueous phosphate buffer of pH 7.4 as the acceptor liquid. The samples of the acceptor liquid (50 µl) were aspirated in 15 min intervals for the period of 6 hours from each of the 3 cells and dispensed to a fluorescence detector to determine the concentration of salicylic acid (excitation at 297 nm and emission at 405 nm). The volume of the acceptor medium taken for analysis was automatically replenished after each measurement. The calibration curve was rectilinear for 1 – 100 µg ml⁻¹ of salicylic acid. The device allowed simultaneous monitoring of the release tests for up to six cells including automated computer-aided evaluation of the release profile parameters.

Keywords: automation, release, sequential injection, salicylic acid, fluorescence

Introduction

In our previous communication [1] dealing with the automation of release studies of salicylic acid by sequential injection analysis (SIA) concept the release of the active substance from a semisolid pharmaceutical preparation was studied by an experiment based on the guidelines of FDA [2] and OECD [3]. The automated measurement was carried out with a single double-walled Franz cell linked to the SIA system.,

The aim of the present paper is to improve substantially the simple system [1] by devising a novel automated SIA-based device for performing such tests (including on-line release data processing and evaluation) with several Franz type cells simultaneously. Contrary to previous work the diffusion cells employed are single-walled and they are placed in a water bath with thermostat to maintain the same temperature during the whole experiment. The new system complies well with technological guidelines requiring six replicates for one batch release measurement [2, 3]., It is preferable to utilize a system involving several Franz cells and to test both batches in the same run to ensure that the conditions during the test are the same for both batches compared.

Sequential injection analysis SIA [4] was introduced by the research group of Ruzicka and Marshall in 1990 and is now a well established analytical flow technique. The SIA technique is especially suitable for performing long –term automatic analysis [5-12].

The performance of the automated SIA device for carrying out simultaneous release tests with three or more Franz cells proposed in the present paper was examined with Belosalic ointment containing 3% salicylic acid as the active substance. Salicylic acid (2-hydroxybenzoic acid) belongs to the group of non-steroidal anti-inflammatory drugs. Externally, it is used for treatment of acne, in higher concentrations it acts as a keratolytic therapeutic agent. We used native fluorescence of salicylic acid for its detection (excitation wavelength 297 nm and emission at 405 nm as described earlier [13]).

Experimental

Materials

The formulation tested was Belosalic dermal ointment 30 g (Belupo Pharmaceuticals and Cosmetics Ltd., Koprivnica, Croatia) that contains 3% of salicylic acid and 0.05%

of betamethasone. The standards of salicylic acid were obtained from Bochemie Group, Herbacos Bofarma Ltd., Czech Republic. All solutions were prepared from a Millipore Mili-Q RG ultra pure water. A stock solution of salicylic acid (1 mg ml^{-1}) was prepared by dissolving the appropriate amount of the drug in phosphate buffer pH 7.4 under sonication; it was stored in an amber glass bottle in a refrigerator. Diluted working solutions were prepared daily by appropriate dilution of the stock solution with the same phosphate buffer.

The phosphate buffer was prepared by dissolving 3.67 g of sodium hydrogen phosphate and 1.00 g of potassium dihydrogen phosphate in 500 ml of water; the pH was adjusted to 7.4 by phosphoric acid. 0.5 ml of a surfactant solution was added, the buffer was sonicated for 5 min and degassed by purging with helium for 10 min. The surfactant solution was prepared by diluting one drop of dish washer Jar plus (P&G - Rakona a.s., Czech Republic) in 50 ml of water.

A Millipore GTTP poly(carbonate) membrane with pore size $0.2 \text{ }\mu\text{m}$ and thickness $10 \text{ }\mu\text{m}$ was applied in the release studies.

A carrier solution was prepared by treating 300 ml of ultra-pure water with 0.5 ml of the surfactant solution (see above). The carrier solution was sonicated for 5 min and degassed by helium for 10 min.

Apparatus

The SIA system for release testing is depicted in Fig. 2. It was assembled around the FIALab 3500 (FIALab Instruments, USA) SIA analyzer comprising a 5 ml piston pump, peristaltic pump and an eight-port selection valve. Auxiliary eight-port selection valve (Vici Valco Instruments Co. Int., USA) served as an “auto-sampler” for introducing calibration standard solutions. Fluorimetric FIALab PMT-FL detector with D-1000-CE UV light source was connected as a detection unit. The detector was equipped with an Edmund Industrial Optics secondary emission filter (385 nm); the fluorescence signal integration time was 200 ms. A lab-made poly(methylmetacrylate) water bath was designed to accommodate up to nine Franz cells and a thermostat (heating immersion circulator Economy series ED, Julabo Labortechnik GmbH, Germany) maintaining the Franz cells (three pieces in real experiments) at 32°C . The water bath was perched on a Variomag POLY 15-position magnetic stirrer (USA).

All tubing of the SIA system was made of PTFE, i.d. 0.51 mm. The volume of the tubing connecting the sampling port of selector valve SV1 and the confluence point of the Y-piece (see Fig. 1) was approximately 6 μ l.

The Franz cells (Fig. 1) with calibrated internal volume of the acceptor compartment of 15 ml were manufactured in a glass workshop (Faculty of Pharmacy, Charles University, Hradec Kralove, Czech Republic).

The measuring protocol and the SIA system

The samples of acceptor liquid from the Franz cell were aspirated through the Y-piece (Fig. 1) and dispensed into the flow cell of the fluorescence detector. The peak height of the fluorescence signal was proportional to the concentration of salicylic acid. The commercial FIALab software supplied with the SIA analyzer allowed automatic calibration with standard solutions of salicylic acid introduced through selector valve SV2 (see Fig. 2) and calculation of the analyte concentration after each acceptor liquid aspiration.

Release testing:

Initially the membrane was conditioned in the phosphate buffer of pH 7.4 (liberation medium) for 30 min. This interval is shorter compared to 1 hour (cf. our previous paper [1]) since we have found experimentally that such reduction of the conditioning time does not affect the release profile or lag-time.

Thereafter the sample of the ointment under study was spread onto the membrane to form a uniform layer filling the whole liberation aperture defined by a circular opening cut in the poly(methylmetacrylate) auxiliary slabs (Fig. 1). The prepared membrane was fixed between the slabs of the Franz cell, which was then placed in the water bath and the measurement was initiated. In an interval of 5 minutes the second and third conditioned membranes with samples of ointment were mounted to the other Franz cells. The time sequence of operations that processed during the analysis are summarised in Fig. 3. The entire liberation test took 6 hours and afterwards the measurement of calibration standards and automated calculation of the release profiles for all three ointment samples followed.

The SIA procedure was controlled via computer program comprising two cycles:

- Collection of the release data from three Franz cells. The selection valve SV1 that was active during this step (switching among the three Franz cells) was linked to the detector via the auxiliary selection valve SV2. An auxiliary peristaltic pump was utilized to circulate the acceptor medium between the Franz cells and appropriate ports of SV1; the pump was automatically stopped when the sample of the acceptor medium was aspirated into the holding coil of the SIA system. Afterwards the taken volume of acceptor medium was replenished by the same volume of buffer solution BS via one port of the selection valve SV1 (see Fig. 2). This program loop was repeated 24 times.
- Washing of the ports before calibration and the calibration. The port 8 of selection valve SV1 was connected with the valve SV2 during washing of the ports of SV2 and during calibration measurements. Four measurements of each calibration solution were accomplished and the concentration of the salicylic acid in collected acceptor fluid samples was calculated automatically.

Theoretical background of the release study calculations

The sample uptake and replenishing with fresh medium influence the concentration of measured active compound. This is the reason for recalculation of the measured concentration to the real values of the active compound [14]:

$$C_{n, \text{corrected}} = C_{n, \text{measured}} + \text{volume}_{\text{sample}} / \text{volume}_{\text{acceptor, FDC}} \cdot \sum C_{n-1, \text{measured}}$$

C_n - concentration of n-sample, FDC – Franz diffusion cell

The cumulative drug amount (Q_n) permeated at each time point related to the area of tested membrane is obtained as follows:

$$Q_n = C_{n, \text{corrected}} \cdot \text{volume}_{\text{acceptor, FDC}} / \text{diffusion area}$$

Acquired data were linearized using the square root of time transformation and linear plots were obtained by plotting the cumulative amounts released (μg) per square root of time ($\text{h}^{-1/2}$). The slope of the regression line represents the release rate of the product. This release rate is formulation-specific and can be used to control quality of the product.

Results and discussion

The device for ointment release testing

In our previous study regarding automation of ointment release testing [1] the proposed device involved a single thermostated double-walled Franz cell. When designing an apparatus for simultaneous release testing of three or six samples it became obvious that the application of such type of Franz cell is impractical. Therefore an open water bath was designed to accommodate up to nine single-walled Franz cells and a thermostat (heating immersion circulator) maintaining the Franz cells at 32°C. A special plastic holder fixed the cells in the water bath in upright position just above the stirring panels of a multi-position magnetic stirrer. The acceptor liquid in the Franz cells was continuously stirred during the entire release test with the aid of PTFE-coated stirring bars.

The SIA system optimization

To minimize the dead volume of the sample loading system the acceptor liquid was continuously circulated from the acceptor compartment of the Franz cell to the port of the selector valve SV1 and back with use of a peristaltic pump in the same way as it was in previous work. This ensured that the concentration of salicylic acid in the taken sample was the same as in the bulk acceptor solution.

It was impossible to start the measurement of three ointment samples at once because the release test measurement can be commenced for each Franz cell only after mounting the membrane with the sample. Therefore the interval between the initiation of next Franz cell measurement was set to five minutes. The time of the first measurement of the concentration of salicylic acid in the acceptor liquid was 5 min after the initiation of the respective cell and thereafter the measurements were performed regularly in 15 min intervals for each cell (see Fig. 3).

Auxiliary selection valve SV2 serving for the calibration was linked to the SIA system through the RS323 port; the SV2 was controlled by the PC with use of the original FIALab software. The configuration of the selection valves was set as depicted in Fig. 2.

The test of the optimized system

In initial experiments the formation of small air bubbles in the SIA conduits became a serious problem since they were retained in the detector flow cell and influenced negatively the fluorescence signal. This problem was overcome by treating the phosphate buffer (acceptor medium) with a small amount of a surfactant and degassing the carrier liquid (water) and the buffer; sonication for 5 min and subsequent bubbling with helium for 10 min was satisfactory.

The effect of the surfactant addition on the fluorescence signal of salicylic acid was examined. Signals of standard solution of $20 \mu\text{g ml}^{-1}$ salicylic acid in phosphate buffer without and with addition of the surfactant were compared. Each determination was repeated in quadruplicate. No statistically significant difference between these signals was observed; hence the surfactant did not interfere with the detection of salicylic acid.

The repeatability of the SIA-fluorimetric determination of salicylic acid was estimated by running a simulated release test with three Franz cells (with dismantled membrane) containing a standard solution of $10 \mu\text{g ml}^{-1}$ salicylic acid in the acceptor compartment. The RSD of the mean fluorescence signal was 1.27% (20 measurements).

The parameters for salicylic acid analysis

The conditions for the SIA assay of salicylic acid were adopted from our previous work [1] where the aspirated sample volume was $50 \mu\text{l}$ and the flow rate was $50 \mu\text{l s}^{-1}$. The original calibration range of $0.05 - 10 \mu\text{g.ml}^{-1}$ of salicylic acid had to be widened because the concentration of salicylic acid eventually exceeded $10 \mu\text{g.ml}^{-1}$ in the acceptor medium during real release testing. New calibration was carried out with six standard solutions covering the range $1 - 100 \mu\text{g ml}^{-1}$ of salicylic acid. The regression equation for linear response was $I = 7565.2c + 29013$ where I stands for the intensity of fluorescence (arbitrary units) and c is concentration of salicylic acid in $\mu\text{g ml}^{-1}$; correlation coefficient $r^2 = 0.9988$.

The limit of detection was $0.01 \mu\text{g ml}^{-1}$ (3σ) and the limit of quantification was $0.03 \mu\text{g ml}^{-1}$ (10σ) [1].

The release testing of real samples (ointments)

The primary records of simultaneous automated SIA release testing of three samples of

the same batch of the Belosalic ointment are shown in Fig 4. The test with three samples was repeated twice and the mean values for six liberation profiles were linearized. The linear graph was obtained by plotting released amount of salicylic acid per area (Q_n) versus the square root of time elapsed (t_n). The corresponding equation obtained by linear regression was $Q_n = 58.487\sqrt{t_n} - 28.924$ with correlation coefficient $r^2=0.9918$ (see Fig. 5).

Conclusions

Fully automated SIA device for simultaneous release testing of multiple ointment samples was invented. Proper functioning of the device comprising three Franz cells was successfully demonstrated by release testing of real ointments containing salicylic acid. The number of concurrently monitored Franz cells could be possibly increased to six if a six-channel peristaltic pump is employed for effecting the acceptor liquid circulation.

The proposed system is a cost-effective tool for studying the release characteristics of semisolid formulations and also for carrying out batch to batch uniformity tests. Its possible use in bioavailability studies and in the development of skin permeation enhancers will be a subject to further investigations.

Acknowledgement

Financial support by the Grant Agency of Charles University, Grant No. 313/2005/B-CH/FaF and by the Czech Ministry of Education, Research Projects MSMT 0021620822 and FRVS No. 389/2005 is gratefully acknowledged.

Fig. 1 Integration of Franz cell; SV1: selection valve; PP: peristaltic pump

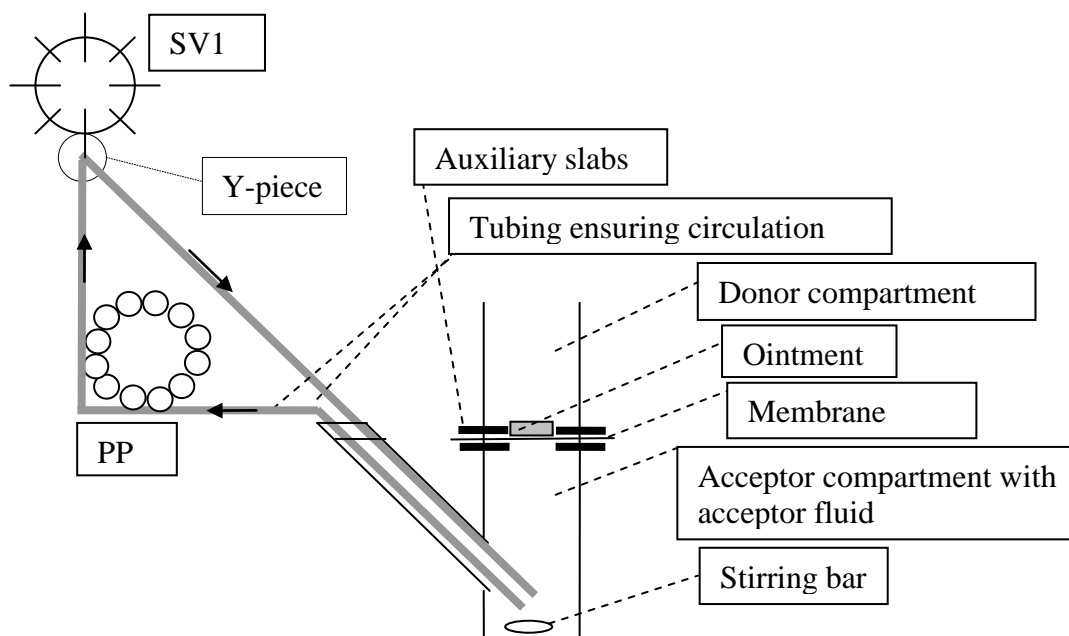


Fig. 2 Scheme of the proposed liberation system; CS: carrier stream; SP: syringe pump; RC: reaction coil; SV1: selection valve; SV2: additional selection valve; D: detector; W: waste; PP: peristaltic pump; WB: water bath; BS: buffer solution; S1-5: standard solutions of salicylic acid for calibration; Selection valves 1 and 2, detector, peristaltic pump and syringe pump were controlled via computer.

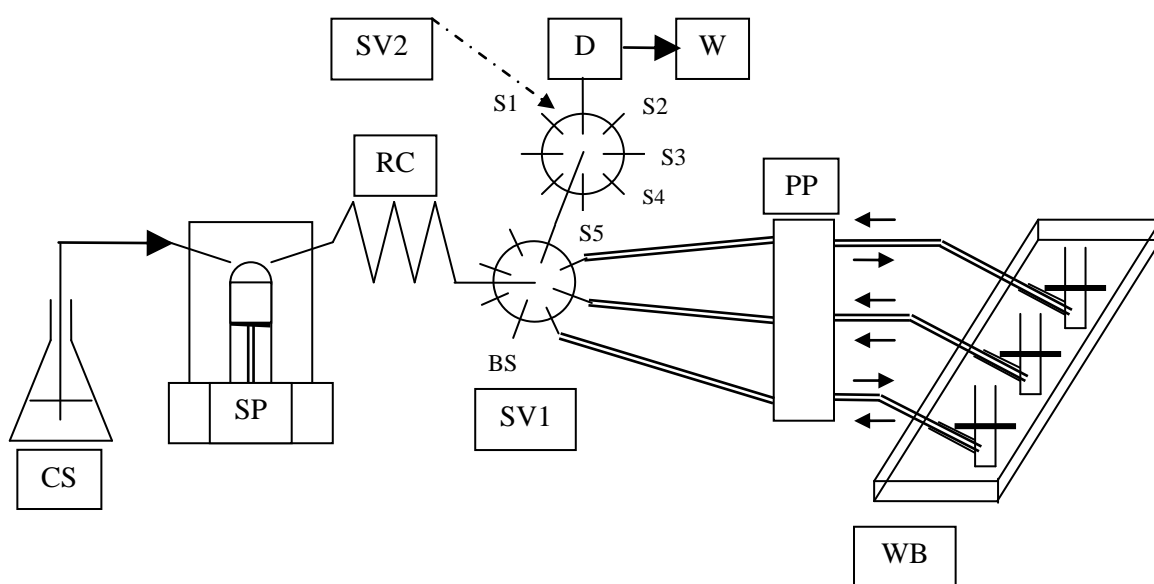


Fig. 3 Time sequence of operations; F1, F2, F3: Franz cell 1-3; I: initiation (the membrane with the sample mounted onto the acceptor compartment); A: sample of acceptor liquid aspirated and measured

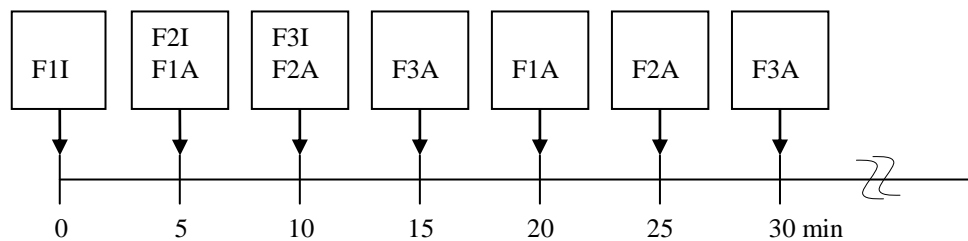


Fig. 4 Record of three measurements (A, B, C). The bars express measured concentration without correction.

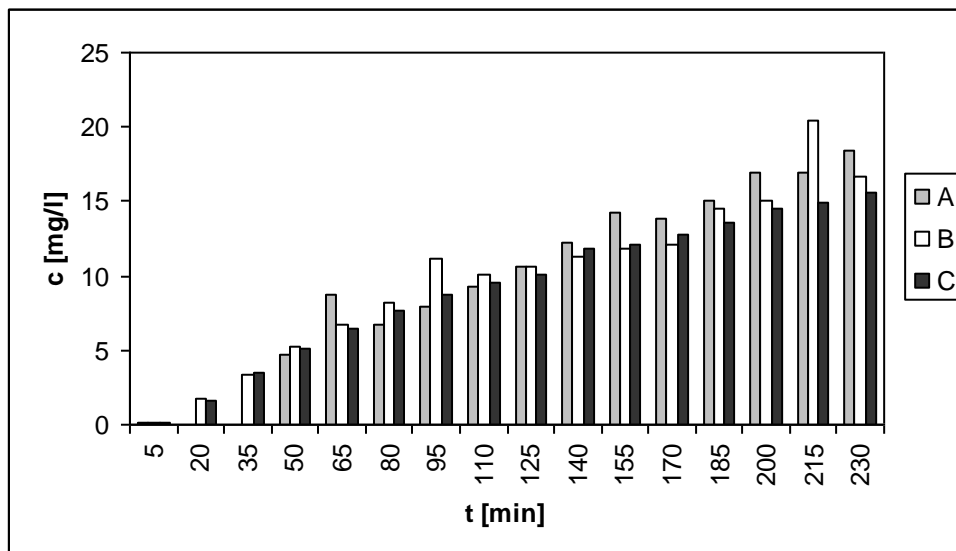
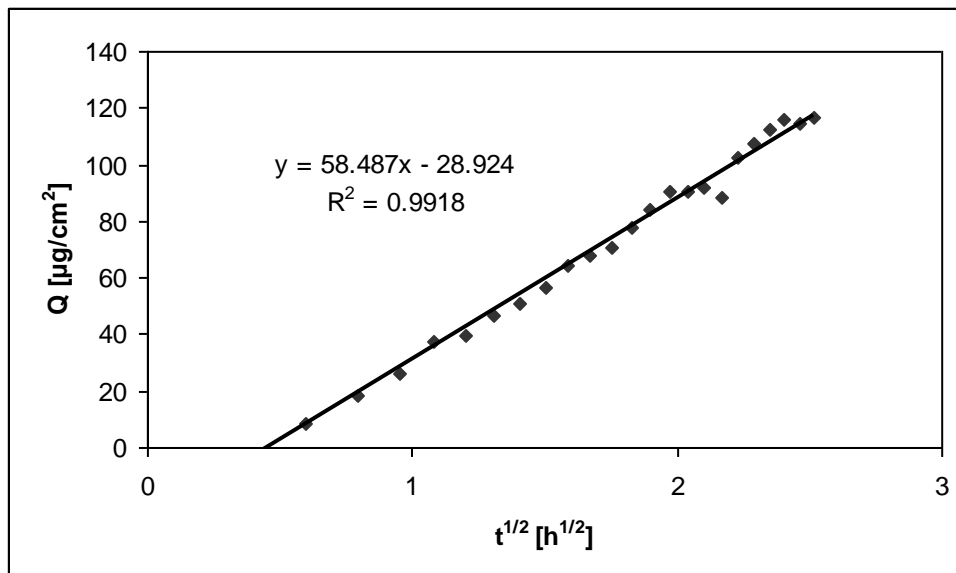


Fig. 5: The linear liberation profile was obtained from average of 6 measurements.

Q...the released amount of salicylic acid across unit of area



References

- [1] J. Klimundová, H. Sklenářová, U.F. Schaefer, P. Solich, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 37 (2005) 893
- [2] SUPACC-SS, FDA (1997) Guidance for Industry. Nonsterile Dosage Forms, SUPACC-SS, CMC7, 19
- [3] OECD Environmental Health and Safety Publications, Series on Trstiny and Assessment No. 28 (2002). Draft Guidance Document for the Conduct of Skin Absorption Studies, 15
- [4] J. Růžička and G.D. Marshall, *Anal. Chim. Acta* 237 (1990) 329
- [5] X.-Z. Liu, Z.-L. Fang, *Anal. Chim. Acta* 358 (1998) 103
- [6] H. Paseková, M. G. Sales, M. C. Montenegro, A. C. Araújo, M. Polášek, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 24 (2001) 1027
- [7] Z. Legnerová, H. Sklenářová, P. Solich, *Talanta* 58 (2002) 1151
- [8] Z. Legnerová, D. Šatínský, P. Solich, *Anal. Chim. Acta*, 497 (2003) 165
- [9] Z. Legnerová, J. Huclová, R. Thun, P. Solich, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 34 (2004) 115
- [10] P. C. A. G. Pinto, M. L. M. F. S. Saraivo, J. L. M. Santos, J. L. F. C. Lima, *Talanta* 38 (2006) 857
- [11] X.-Z. Liu, S.-S. Liu, J.-F. Wu, Z.-L. Fang, *Anal. Chim. Acta* 392 (1999) 273
- [12] P. Solich, H. Sklenarova, J. Huclova, D. Satinsky, U.F. Schaeffer, *Anal. Chim. Acta* 499 (2003) 9
- [13] P. Solich, E. Ogrocká and U. Schaefer, *Pharmazie* 56 (2001) 787
- [14] H. Wagner et al., Human skin and skin equivalents to study dermal penetration and permeation, in: C.-M. Lehr (Ed.), *Cell Culture Models of Biological Barriers*, Taylor & Francis, London (2002), 289

5.5. PŘÍLOHA V. PŘEHLED PUBLIKOVANÝCH PRACÍ

PUBLIKOVANÉ ČLÁNKY

- J. Klimundová, R. Forteza and V. Cerda: *A multisyringe flow injection system coupled with a gas diffusion cell for ammonium determination*, International Journal of Environmental Analytical Chemistry 83 (2003) 233-246 (IF – 0,691)
- P. Solich, M. Polášek, J. Klimundová, J. Ruzicka: *Sequential injection technique applied to pharmaceutical analysis*, Trends of Anal. Chemistry 23 (2004) 116-126 (IF – 3,888)
- J. Klimundová, H. Sklenářová, P. Solich: *Automated System for Release Studies of Salicylic Acid Based on an SIA Method*, J. of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 37 (2005) 893-898 (IF – 1,509)
- J. Klimundová, D. Šatínský, H. Sklenářová, P. Solich: *Automation of simultaneous release tests of two substances by Sequential injection chromatography coupled with Franz cell*, Talanta 2006, v tisku (IF – 2,532)
- J. Klimundová, K. Mervartová, H. Sklenářová, P. Solich, M. Polášek: *Automated sequential injection fluorimetric set-up for multiple release testing of topical formulation*, Analytica Chimica Acta 2006, v tisku (IF – 2,588)
- S. A. Motz, J. Klimundová, U. F. Schaefer, S. Balbach, T. Eichinger, P. Solich, C. M. Lehr: *Automated measurement of dissolution and permeation of propranolol HCl tablets using sequential injection analysis*, Analytica Chimica Acta, zasláno k publikaci

SEZNAM PREZENTOVANÝCH PŘEDNÁŠEK A POSTERŮ

- J. Klimundová, R. Forteza, V. Cerda: *Gas-diffusion multisyringe flow injection system for ammonium determination*, VII International Symposium on Analytical Methodology in the Environmental Field, Valladolid, Španělsko 2002
- J. Klimundová, J. Huclová, P. Solich: *Nové trendy využití SIA ve farmaceutické analýze*, 32. konference Syntéza a analýza léčiv, Velké Karlovice, září 2003
- J. Klimundová: *Automatizace liberačních studií kyseliny salicylové pomocí SIA metody*, přednáška, Studentská vědecká konference PGS, Farmaceutická fakulta UK, Hradec Králové, 1. duben 2004
- J. Klimundová, H. Sklenářová, P. Solich: *Fully automated system for liberation test of topical formulations containing salicylic acid based on sequential injection analysis*; 15th International Symposium on Pharmaceutical and Biomedical Analysis, Florence, Itálie, květen 2004

-
- J. Klimundová, H. Sklenářová, P. Solich: *Využití sekvenční injekční analýzy pro monitorování disolučních a liberačních profilů*; IX sjezd ČFS, Zlín, květen 2004
 - J. Klimundová, P. Solich: *Determination of lidocaine and prilocaine in topical formulation by SIA coupled with monolithic column*; Joint Meeting 2004, Regensburg, Německo, říjen 2004
 - J. Klimundová: *Automation of Franz cell experiments*, přednáška na Saarland University, Saarbruecken, Německo, 10.12. 2004
 - J. Klimundová, K. Mervartová, H. Sklenářová, P. Solich: *Automation of release tests of topical semisolid preparations based on sequential injection analysis*, 2nd International Symposium on Scientific and Regulatory Aspects of Dissolution and Bioequivalence, Athens, Řecko, červen 2005
 - J. Klimundová: *The use of SIA for liberation experiment automation*, přednáška na University of Athens, Athens, Řecko, 2.6.2005
 - J. Klimundová, D. Šatínský, P. Solich: *Automatizace Liberace léčiv pomocí SIA metody*, 34. konference Syntéza a analýza léčiv, Brno, září 2005
 - K. Mervartová, J. Klimundová, H. Sklenářová, M. Polášek: *Automatizace sledování liberace léčiv z mastí technikou sekvenční injekční analýzy*, 34. konference Syntéza a analýza léčiv, Brno, září 2005
 - J. Klimundová, D. Šatínský, P. Solich: *Sequential injection chromatography system coupled with franz cell for automation of simultaneous release test of lidocaine and prilocaine*, The 4th International Conference on Instrumental Methods of Analysis, Iraklion, Crete, Řecko, říjen 2005
 - K. Mervartová, J. Klimundová, H. Sklenářová, M. Polášek: *Automated SIA-fluorimetric method for release testing of topical formulations containing salicylic acid*, The 4th International Conference on Instrumental Methods of Analysis, Iraklion, Crete, Řecko, říjen 2005
 - Solich P., Klimundová J., Sklenářová H., Šatinský D., P. Polášek, M.: *Sequential injection analysis coupled with monolithic columns for liberation test of topical pharmaceutical formulations*; International Chemical Congress of Pacific Basin Societies PACIFICHEM 2005. Book of Abstracts, Abstr. No. 679. Honolulu, USA, 2005

6. **SHRNUTÍ**

V první části této disertační práce byla nejprve zpracována rešerše na téma využití SIA ve farmaceutické analýze a její nové trendy jako jsou Lab on Valve, mikroSIA či Bead Injection.

V experimentální části se tato práce soustředila na specifickou oblast farmaceutické analýzy, a sice na dlouhodobé sledování určitého farmaceuticky významného parametru. Bylo navázáno na práce prováděné na katedře analytické chemie, kdy byly monitorovány disoluční studie pevných lékových forem za pomoci automatizovaného odběru vzorků, provedena jejich detekce a z určených koncentrací byl zjištěn disoluční profil daného přípravku v čase. V této disertační práci byla možnost automatizace využita při dalším z postupů farmaceutické technologie, a sice při stanovování profilů uvolňování léčivé látky z polotuhých topických přípravků. Do systému byly začleňovány různé typy Franzových difúzních cel (dvouplášťové, jednoplášťové), různý počet difúzních cel (1-3), byly studovány rozdílné detekční techniky (fluorescence, absorpce v UV oblasti). Také byla studována rozdílná akceptorová média, různé membrány, porovnávány přípravky s odlišným složením vehikula. Bylo testováno spojení SIC systému s monolitickou kolonou a Franzovou difúzní celou tak, aby bylo možno sledovat uvolňování dvou látek během jedné analýzy současně.

První práce (příloha II) se zabývala získáním časových profilů uvolňování kyseliny salicylové z mastí. Byly studovány různé membrány – jejich lag-time a vliv na difúzi aktivní látky. V systému s nejvhodnější membránou a fosforečnanovým pufrům jako akceptorovým médiem byly získány profily uvolňování kyseliny salicylové u tří komerčně dostupných přípravků (Belosalic, Diprosalic a Triamcinolon S). K detekci bylo použito vlastní fluorescence kyseliny salicylové. Bylo využito výhod, které systém poskytuje a sice programovatelného ovládání a možnosti jednoduchého zpracování výsledků. Po cílené optimalizaci SIA systému software zajišťoval plně automatizovaný odběr vzorku, doplnění objemu akceptorového média, analýzu vzorku. Po skončení sledování procesu uvolňování aktivní látky systém pomocí

připravených standardních roztoků proměřil a vygeneroval kalibrační křivku, podle které pak vypočítal koncentrace jednotlivých vzorků v daných časových intervalech. V této práci byla použita jedna dvouplášťová Franzova cela.

V další práci (Příloha IV) byl vytvořen systém se třemi difúzními celami tak, aby bylo možno sledovat současně uvolňování aktivní látky ze tří vzorků během jedné analýzy. Pro optimalizaci a testování systému bylo užito opět kyseliny salicylové a mast Belosalic. Cely v tomto systému byly jednoplášťové a byly umístěny do speciálně vytvořené termostátované lázně. Ta byla umístěna nad vícemístnou magnetickou míchačku a zajišťovala ukotvení až 9 cel. Pro odebírání vzorků z jednotlivých cel sloužil selekční ventil jako autosampler. Do systému byl začleněn druhý selekční ventil, pomocí něhož byl vyřešen nedostatek vstupů pro umístění roztoků standardů kalibrační křivky.

Jedním z přínosů tohoto systému je možnost získání více profilů uvolňování aktivní látky během kratší doby a tedy zrychlení analýzy. Další výhodou je, že pro testy provedené zároveň v jednom cyklu jsou zachovány stejné podmínky. Tímto se omezuje vliv vnějších faktorů a jejich negativní působení. Systém umožňuje zapojení i více než tří difúzních cel. Limitujícími faktory SIA systému jsou počet poloh selekčního ventilu a počet kanálků přídatné peristaltické pumpy.

Zapojení monolitické kolony s nízkým zpětným tlakem a její využití pro separaci a stanovení jednotlivých složek vícekomponentního přípravku EMLA bylo popsáno v další práci (Příloha III). Možnosti separace byly studovány na monolitické koloně Chromolith Flash RP-18, 25mm x 4.6mm (Merck, Germany) u lokálních anestetik lidokainu a prilokain. Detekce byla provedena spektrofotometricky v UV oblasti. Bylo optimalizováno složení mobilní fáze a nalezen vhodný vnitřní standard. Navržený separační systém byl charakterizován pomocí parametrů běžně užívaných pro popis metod HPLC. Hodnoty obsahu účinných látek v EMLA přípravku stanovená SIC systémem byla ověřena HPLC analýzou. Dále byla studována možnost sledování procesu postupného uvolňování dvou látek současně, tj. spojení toho SIC systému s Franzovou celou. Do systému byla začleněna Franzova cela obdobným způsobem jako v předešlé práci a monitorování procesu uvolňování aktivních

látek z polotuhého přípravku byl zcela automatizován. Byl optimalizován řídicí program a vyhodnocování dat. Bylo vybráno vhodné akceptorové médium a vhodná membrána. Pro získání závislosti uvolněných látek na čase byla použita modelová mast se stejným procentuálním zastoupením lokálních anestetik jako hromadně vyráběný přípravek. Bylo naměřeno šest opakování tohoto testu a byly získány profily uvolňování lidokainu a prilokainu.

V další části byl SIA systém využit pro monitorování koncentrací propranololu v systému, který zahrnoval jak disoluci propranololu z tablet, tak jeho následnou permeaci přes Caco-2 buňky. Tyto dvě *in vitro* metody (disoluce a permeace) měly za cíl simulovat osud tablety v lidském těle *in vivo*. K detekci bylo využito vlastní fluorescence propranololu, která byla dostatečná i v prostředí Krebsova-Ringerova pufru. Odebírání vzorků a měření koncentrací probíhalo ve třech místech systému – po průchodu pufru disolučním průtokovým systémem do kterého byla umístěna tableta s určitým obsahem propranololu; na apikální části vrstvy buněk (tj. koncentrace látky, která byla v kontaktu s buňkami, která je o něco málo nižší než koncentrace disoluční v důsledku mírného naředění v průtokovém systému) a na bazálolaterální straně buněk tj. množství látky proniknuté přes buňky (simulace průchodu střevní stěnou). Takový systém je pak vhodný pro komplexní studování možnosti ovlivnění jak disoluce tak permeace aktivní látky. Data naměřená SIA systémem byla úspěšně porovnána s dříve naměřenými daty získanými pomocí manuálního odběru a HPLC analýzy.

SIA systém pomohl při automatizaci měření koncentrace a tedy k snadnějšímu, levnějšímu a rychlejšímu přístupu k datům. Nebyly spotřebovávány vialky, organické složky mobilní fáze a nebylo nutné čekat na výsledky HPLC analýzy. Díky on-line analýze byla nesprávná data a chyba v systému odhalena rychleji a experiment případně předčasně ukončen. Při odběru z míst D a A střídavě co minutu a z místa B co 5 minut, je automatizovaný odběr značným usnadněním analýzy.

7. ZÁVĚR

Jak vyplývá z rešeršní i experimentální části práce je sekvenční injekční analýza stále se rozvíjející analytickou technikou, který hledá a nachází uplatnění v řadě odvětví analytické chemie včetně farmaceutické analýzy. Jsou vynalézány nové varianty průtokových metod jako multisyringe, multipumping, multicommutation, bead injection, LOV a mikroSIA. Začleňování biosenzorů, RAM, SPE a monolitických kolon do SIA systému přináší větší variabilitu systému a možnost rozšíření využití SIA systému i do budoucna.

Tato technika je charakteristická svým jednoduchým robustním systémem, vysokou variabilitou potenciálních chemických reakcí probíhajících přímo v systému, širokou nabídkou detekčních technik pro stanovení produktů těchto reakcí, dostatečně vysokou frekvencí dávkování vzorků, snadnou automatizovatelností a miniaturizací a především nízkými ekonomickými nároky jak na aparaturu, kterou lze jednoduše sestavit z jednotlivých součástí, tak na spotřebu chemických činidel. Všechny vlastnosti této metody z ní činí techniku vhodnou pro rutinní analýzu rozsáhlého počtu vzorků (screening vzorků, např. při monitorování biotechnologických výrobních procesů - vstupní, mezioperační a výstupní kontrola) nebo dlouhodobého sledování určitého parametru (disoluční studie, permeační studie). Perspektivní využití v případě SIA nabízí snadná a rychlá on-line úprava vzorků (dialýza, oxidačně-redukční reakce, derivatizace na detekovatelné produkty, separace pomocí SPE kolony, extrakce na RAM sorbentech aj.) před vlastním měřením.

Možnost uplatnění SIA ve farmacii se vztahuje nejen na kontrolu kvality a účinnosti léčiv, ale také na hodnocení déletrvajících stabilitních studií. Ve výrobní technologii pomáhá zjišťovat stejnoměrnost obsahu účinné látky v různých farmaceutických přípravcích a rychlost jejího uvolňování z dané lékové formy – disoluční testy. Významná je také oblast studia vazby léčiv či toxických látek na krevní bílkoviny nebo buněčné receptory. Tyto experimenty jsou umožněny díky speciálním průtokovým celám, které pracují s pevnými částicemi a sledují jejich odpověď na procházející roztok studované látky, např. jet-ring cela, LOV. V neposlední řadě je pak velmi praktická i možnost

monitorování kinetických studií daných chemických reakcí (stopped-flow analysis).

Nevýhodou SIA systému byla donedávna neschopnost separace látek podobné chemické struktury a tedy velmi omezená možnost analýzy více látek přítomných v jednom vzorku. Obzvláště u farmaceutické analýzy, kde se ve vzorku můžeme setkat s aktivní látkou a jejím metabolitem či degradačním produktem, což jsou právě látky podobné struktury, a dále také s vícesložkovými přípravky, bylo toto omezení handicapem. Ovšem nový přístup se zapojením monolitické kolony do SIA systému a vytvoření sekvenční injekční chromatografie (SIC) opět posouvá možnosti SIA dále. S tímto novým SIC systémem lze vytvořit malý nenákladný analyzátor schopný automatizovaného monitoringu více látek během jednoho cyklu dlouhodobějšího procesu. Při takové automatizaci dojde jak k úspoře času, tak lidské práce.

Výsledky této disertační práce představují praktickou aplikaci SIA systému v kontrole farmaceuticky významných látek v léčivých přípravcích. Předkládá nové možnosti automatizace analýzy v postupech farmaceutické technologie při monitorování koncentrace látky v různých systémech. Získané výsledky naznačují nové možnosti využití sekvenční injekční analýzy v dalších oblastech analytické a farmaceutické praxe.

8. SUMMARY IN ENGLISH

This work is concerned on sequential injection analysis and its use in the field of pharmaceutical analysis. This flow method is a versatile, multi-purpose analytical system and for this is gaining more popularity in analytical chemistry.

Firstly the review based on pharmaceutical applications was published. The new enhanced techniques such lab-on-valve, micro-SIA, bead injection and sequential injection chromatography was discussed.

The experimental part is focused on the use of SIA for automation of long-lasting processes monitoring in pharmaceutical methods of analysis. Fully automated system for in vitro release testing of semisolid dosage forms was established. This test was based on Franz diffusion cell and its connection with SIA system. The system was tested for monitoring release profiles of three commercial preparations containing salicylic acid (Belosalic, Diprosalic, Triamcinolon S). The release profiles were statistically compared. The native fluorescence of salicylic acid was used for fluorimetric detection. Phosphate buffer pH 7.4 was the receptor medium, different membranes were tested. Samples were taken at 10 min intervals during 6 hours of the release test and each test was followed by calibration with five standard solutions.

Other work was based on the same fluorimetric determination of salicylic acid. The apparatus containing three Franz cells was set up. One-walled cells were used (in contrast with previous double-walled cell) and a water bath for temperature regulation. Sample application, sampling and all steps in SIA program were tested with the ointment Belosalic. The samples of the acceptor liquid (50 μ l) were aspirated in 15 min intervals for the period of 6 hours from each of the 3 cells and dispensed to a fluorescence detector to determine the concentration of salicylic acid. The volume of the acceptor medium taken for analysis was automatically replenished after each measurement. The device allowed simultaneous monitoring of the release tests for up to six cells including automated computer-aided evaluation of the release profile parameters. The system had advantages of shortage of the analysis time and ability of implementation of two compared batches in the same run.

Other work concerned on separation and simultaneous determination of two active substances in topical pharmaceutical formulation composed of local anaesthetics lidocaine (L) and prilocaine (P). The methodology was based on the sequential injection chromatography (SIC) with UV detection at 212 nm. Monolithic column Chromolith Flash RP-18, 25mm x 4.6mm (Merck, Germany) was used. Separation was performed using elution with binary mobile phase composed of acetonitrile-phosphate buffer 0.05 M (40:80, v/v) + 0.01% triethylamine (adjusted to pH 7.1 with H₃PO₄) at flow rate 0.6 ml.min⁻¹. The analysis duration was less than 7 min. The SIC system was then coupled with double-walled Franz cell and fully automated system for in vitro release testing of semisolid dosage forms was developed. Simultaneous measurement of lidocaine and prilocaine release from semisolid preparation was done by this system. Samples (only 10 µl) were taken in 10.5 min intervals during 4 h of the release test. Each test was followed by calibration with five standard solutions, receiving medium was replenished automatically by the system.

All proposed systems can be favourably used for manufacturing process control, for monitoring of pre- and post-changes of product properties, batch uniformity monitoring etc. SIA system could be also used as a screening device in pre-formulation and product development.

Other aim was to automate sampling and quantification of the apparatus for combined determination of dissolution and permeation through Caco-2 monolayer by means of sequential injection analysis. USP apparatus 4 was used for dissolution measurement. Measurement was based on open systems for dissolution and permeation assessment. Dissolution and permeation of immediate release tablets with content of 10 mg of propranolol HCl was evaluated. Native fluorescence of propranolol HCl in Krebs Ringer Buffer (KRB) was used for quantification. Sampling was done at three different locations within the apparatus alternating at sampling port D (dissolution) and A (apical side of Caco-2 monolayer), intermitted by a measurement at sampling port B (basolateral part of Caco-2 monolayer, amount permeated) after every third loop of measurement at D and A. Sampling together with quantification took 0.7 min at sampling port D, 0.9 min at A and 1.3 min at B. Time for sampling at

port B lasted longer because of the time needed for replenishing KRB. Sample volume differed for these different sampling ports and was for permeation monitoring 50 μl and for dissolution monitoring 25 μl . The obtained data was consistent with data obtained by manual sampling followed by HPLC analysis.

The SIA method is relatively simple, low cost and adaptable device. Easy automation of entire analysis and on-line sample pretreatment and evaluation are benefits of this method. Automation decreases labor-intensive manual sampling and drop the high of HPLC measurement. Flexibility and versatility facilitate rapid sampling from different sampling ports with varying washing steps, varying aspiration volumes and enables automated replenishing of the withdrawn buffer. In addition, online measurement could reduce issues when working with unstable compounds.

9. SEZNAM LITERATURY

- [1] M. Miro, J. M. Stela, V. Cerda, *Anal. Chim. Acta* 541(2005) 55
- [2] R. Karlíček, *Česk. farm.* 5 (1982) 190
- [3] M. Valcarcel, M. D. Luque de Castro, *Flow-injection analysis: principles and applications*, Ellis Horwood Ltd., Chichester, 1987.
- [4] J. Růžička, *Flow Injection – CD rom*, the 2nd edition 2002
- [5] <http://www.globalfia.com/tutorial>
- [6] J. Růžička, H. Hansen: *Flow Injection Analysis*, John Wiley & Sons, New York, 1981.
- [7] J. Růžička, G. Marshall, *Anal. Chim. Acta* 237 (1990) 329
- [8] D. Šatínský, L. M. L. D. Santos, H. Sklenářová, P. Solich, M. C. B. S. M. Montenegro, A. N. Araújo, *Talanta* 68 (2005) 214
- [9] A. Pasamontes, M. P. Callao, *Anal. Chim. Acta* 515 (2004) 159
- [10] P. D. Tzanavaras , D. G. Themelis, A. Economou, *Anal. Chim. Acta* 505 (2004) 167
- [11] J. F. van Staden, M. Tsanwani, *Talanta* 58 (2002) 1103
- [12] A. Economou, D. G. Themelis, H. Bikou, P. D. Tzanavaras, P. G. Riga, *Anal. Chim. Acta* 510 (2004) 219
- [13] S. M. Sultan, F. E. O. Suliman, *Analyst* 121 (1996) 617
- [14] S. M. Sultan, Y. A. M. Hassan, K. E. E. Ibrahim, *Talanta* 50 (1999) 841
- [15] F. E. O. Suliman, S. M. Sultan, *Talanta* 43 (1996) 559
- [16] D. Šatínský, P. Solich, P. Chocholouš and R. Karlíček, *Anal. Chim. Acta* 499 (2003) 205
- [17] N. W. Beyene, J. F. van Staden, R. I. Stefan: *Anal. Chim. Acta* 521 (2004) 223
- [18] N. W. Beyene, J. F. Van Staden, *Talanta* 63 (2004) 599
- [19] J. Huclová, D. Šatínský, T. Maia, R. Karlíček, P. Solich, A. N. Araújo, *J. Chromatogr. A* 1087 (2005) 245
- [20] Z. O. Tesfaldet, J. F. van Staden, R. I. Stefan, *Talanta* 64 (2004) 981

-
- [21] P. C. A. G. Pinto, M. L. M. F. S. Saraiva, J. L. M. Santos, J. L. F.C. Lima, *Anal. Chim. Acta* 539 (2005) 173
- [22] J. A. Erustes, R. Forteza, V. Cerda, *Jour of AOAC internat.* 84 (2001) 337
- [23] Z. O. Tesfaldet, J. F. van Staden, R. I. Stefan, *Talanta* 64 (2004) 1213
- [24] S. M. Sultan, N. I. Desai, *Talanta* 45 (1998) 1061
- [25] S. M. Sultan, Y. A. M. Hassan and K. E. E. Ibrahim, *Analyst* 124 (1999) 917
- [26] D. T. Newcombe, T. J. Cardwell, R. W. Cattrall and S. D. Kolev, *Anal Chim Acta* 401 (1999) 137
- [27] D. T. Newcombe, T. J. Cardwell, R. W. Cattrall and S. D. Kolev, *LRA* 12 (2000) 200
- [28] N. Lenghor, J. Jakmune, M. Vilen, R. Sara, G. D. Christian and K. Grudpan, *Talanta* 58 (2002) 1139
- [29] N. Anastos, N. W. Barnett, B. J. Hindson, C. E. Lenehan and S. W. Lewis *Talanta* 64 (2004) 130
- [30] P. D. Tzanavaras, C. K. Zacharis, G. A. Theodoridis, E. A. Kalaitzantonakis, A. N. Voulgaropoulos, *Anal. Chim. Acta* 547 (2005) 98
- [31] D. Šatínský, I. Neto, P. Solich, H. Sklenářová, M. Conceicao, B. S. M. Montenegro, A. N. Araujo, *J. of Separ. Science* 27 (2004) 597
- [32] J. Huclová, D. Šatínský, R. Karlíček, *Anal. Chim. Acta* 494 (2003) 133
- [33] J. Fan, A. Wang, S. Feng and J. Wang, *Talanta* 66 (2005) 236
- [34] N. W. Barnett, C.E. Lenehan, S. W. Lewis, D. J. Tucker and K. M. Essery, *Analyst* 123 (1998) 601
- [35] C. E. Lenehan, N. W. Barnett, S. W. Lewis, *Analyst* 127 (2002) 997
- [36] F. E. O. Suliman and S. M. Sultan, *Microchem. J.* 57 (1997) 320
- [37] J. F. van Staden and M. Tsanwani, *Talanta* 58 (2002) 1095
- [38] F. E. O. Suliman, H. A. J. Al-Lawati, S. M. Z. Al-Kindy, I. E. M. Nour and S. B. Salama, *Talanta* 61 (2003) 221
- [39] S. M. Z. Al-Kindy, A. Al-Wishahi and F. E. O. Suliman, *Talanta* 64 (2004) 1343
- [40] H. Paseková and M. Polášek, *Talanta* 52 (2000) 67
- [41] S. M. Sultan and N. I. Desai, *Analyst* 122 (1997) 911

-
- [42] S. M. Sultan, Y. A. M. Hassan and A. M. Abulkibash, *Talanta* 59 (2003) 1073
- [43] B. A. Gorman, N. W. Barnett, R. Bos, *Anal. Chim. Acta* 54 (2005) 117
- [44] B. Dockendorff, D. A. Holman, G. D. Christian, J. Ruzicka, *Anal. Commun.* 35 (1998) 357
- [45] S. M. Sultan, F. E. O. Suliman and B. B. Saad, *Analyst* 120 (1995) 561
- [46] H. Paseková, M. Polášek, J. F. Cigarro and J. Dolejšová, *Anal. Chim. Acta* 438 (2001) 165
- [47] D. Šatinský, J. Huclová, P. Solich and R. Karlíček, *J. Chromatogr. A* 1014 (2003) 239
- [48] M. Polášek and M. Jambor, *Talanta* 58 (2002) 1253
- [49] J. F. van Staden and R. E. Taljaard, *Anal. Chim. Acta* 323 (1996) 75
- [50] J. F. van Staden and M. Tsanwani, *Fresenius J. Anal. Chem.* 371 (2001) 376
- [51] P. C. C. Oliveira and J. C. Masini, *Anal. Lett.* 34 (2001) 389
- [52] Z. O. Tesfaldet, J. F. van Staden and R. I. Stefan, *Talanta* 64 (2004) 1189
- [53] J. F. van Staden, H. du Plessis and R. E. Taljaard, *Anal. Chim. Acta* 357 (1997) 141
- [54] R. I. Stefan, R. G. Bokretson, J. F. van Staden and H. Y. Aboul-Enein, *Talanta* 59 (2003) 883
- [55] A. M. Pimenta, A. N. Araújo and M. C. B. S. M. Montenegro, *Anal. Chim. Acta* 470 (2002) 185
- [56] R. I. Stefan, J. F. van Staden, C. Bala and H. Y. Aboul-Enein, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 36 (2004) 889
- [57] S. K. Hartwell, B. Srisawang, P. Kongtawelert, J. Jakmune, K. Grudpan, *Talanta* 66 (2005) 521
- [58] A. M. Pimenta, A. N. Araújo, M. C. B. S. M. Montenegro, C. Pasquini, J. J. R. Rohwedder, I. M. Raimundo, Jr., *J. Pharm. Biomed. Anal.* 36 (2004) 49
- [59] R. I. Stefan, J. F. van Staden and H. Y. Aboul-Enein, *Anal. Chim. Acta* 411 (2000) 51
- [60] R. I. Stefan, J. F. van Staden and H. Y. Aboul-Enein, *Talanta* 51 (2000) 969

-
- [61] A. M. Pimenta, A. N. Araújo and M. Conceicao, B. S. M. Montenegro, *Anal. Chim. Acta* 438 (2001) 31
- [62] A. M. Pimenta, A. N. Araújo and M. Conceicao, B. S. M. Montenegro, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 30 (2002) 931
- [63] E. M.G. Santos, A. N. Araújo, C. M.C.M. Couto, M. C. B.S.M. Montenegro, A. Kejzlarová and P. Solich, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 36 (2004) 701
- [64] R. I. Stefan, J. F. van Staden, L. V. Mulaudzi and H. Y. Aboul-Enein, *Anal. Chim. Acta* 467 (2002) 189
- [65] W. W. Kubiak, R. M. Latonen and A. Ivaska, *Talanta* 53 (2001) 1211
- [66] R.I. Stefan, J. F. van Staden, H. Y. Aboul-Enein, *Talanta* 64 (2004) 151
- [67] R. N. Fernandes, M.G. F. Sales, B. F. Reis, E. A. G. Zagatto, A. N. Araújo and M. C. B. S. M. Montenegro, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 25 (2001) 407
- [68] X. Z. Liu, Z. L. Fang, *Anal. Chim. Acta* 358 (1998) 103
- [69] H. Sklenářová, P. Pávek, D. Šatínský, P. Solich, R. Karlíček, F. Štaud and Z. Fendrich, *Talanta* 58 (2002) 1145
- [70] X.-Z. Liu, S.-S. Liu, J.-F. Wu, Z.-L. Fang, *Anal. Chim. Acta* 392 (1999) 273
- [71] Z. Legnerová, H. Sklenářová and P. Solich, *Talanta* 58 (2002) 1151
- [72] P. Solich, H. Sklenářová, J. Huclová, D. Šatínský and U. F. Schaefer, *Anal. Chim. Acta* 499 (2003) 9
- [73] H. Paseková, M. G. Sales, M. C. Montenegro, A. N. Araújo and M. Polášek, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 24 (2001) 1027
- [74] P. C. A. G. Pinto, M. L. M. F. S. Saraiva, J. L. M. Santos, J. L. F. C. Lima, *Talanta* in press
- [75] J. Klimundová, H. Sklenářová, U.F. Schaefer, P. Solich, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 37 (2005) 893
- [76] E. P. Zisiou, P. C. A. G. Pinto, M. L. M. F. S. Saraiva, Ch. S., J. L. F. C. Lima, *Talanta* in press
- [77] Z. Legnerová, J. Huclová, R. Thun and P. Solich, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 34 (2004) 115
- [78] Z. Legnerová, D. Šatínský, P. Solich, *Anal. Chim. Acta* 497 (2003) 165

-
- [79] S. H. Lee, O. J. Sohn, Y. S. Yim, K. A. Han, G. W. Hyung, S. H. Chough, J. Il Rhee, *Talanta* 68 (2005) 187
- [80] R. W. Min, J. Nielsen and J. Villadsen, *Anal. Chim. Acta* 320 (1996) 1999
- [81] X. Liu and E. H. Hansen, *Anal. Chim. Acta* 326 (1996) 1
- [82] R. W. Min, J. Nielsen and J. Villadsen, *Anal. Chim. Acta* 312 (1995) 149
- [83] T. Lindfords, I. Lähdesmäki and A. Ivaska, *Anal. Letters* 29 (1996) 2257
- [84] P. J. Baxter, G. D. Christian and J. Ruzicka, *Chem. Anal.* 40 (1995) 445
- [85] R. I. Stefan, R. G. Bokretzion, J. F. van Staden and H. Y. Aboul-Enein, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 33 (2003) 323
- [86] R. I. Stefan, R. G. Bokretzion, J. F. van Staden and H. Y. Aboul-Enein, *Biosensor and Bioelectronics* 19 (2003) 261
- [87] G. Theodoridis, C. K. Zacharis, P. D. Tzanavaras, D. G. Themelis and A. Economou, *J. Chromatogr.* 1030 (2004) 69
- [88] C. K. Zacharis, G. A. Theodoridis and A. N. Voulgaropoulos, *J. Chromatogr. B* 808 (2004) 169
- [89] P. Panoutsou, A. Economou, *Talanta* 67 (2005) 603
- [90] K. Grudpan, *Talanta* 64 (2004) 1084
- [91] H.L. Zhu, H.W. Chen and Y.G. Zhou, *Anal. Sci.* 19(2) (2003) 289
- [92] N. Soh, H. Nishiyama, Y. Asano, T. Imato, T. Masadome, Y. Kurokawa, *Talanta* 64 (2004) 1160
- [93] X. Chen, J. Wang, Z. Fang, *Talanta* 67 (2005) 227
- [94] Český lékopis 2005 (ČL 2005), Grada Publishing a. s.(2005), str. 1323, 1326, 1324, 512
- [95] M. Chalabala et al.: *Technologie léků*, Galén, Praha 1997, 2001, str. 526, 536
- [96] FDA, *Guidance for Industry, Nonsterile Semisolid Dosage Forms, SUPAC-SS*, 1997, USA
- [97] OECD, *Guidance Document No 28 for conduct of skin absorption studies*, 2004, Paris, France
- [98] *European Pharmacopoeia 5th edition (Ph. Eur. 5)*, Council of Europe, Strasbourg, 2005

-
- [99] United States Pharmacopoeia 28, United States Pharmacopoeial Convention, Rockville, MD 20852, 2005
- [100] D. R. Friend, *J. Controlled Release* 18 (1992) 235
- [101] K. D. Thakker, W. H. Chern, *Dissol. Tech.* 10 (May 2003) 10-11
- [102] H. Wagner et al., Human skin and skin equivalents to study dermal penetration and permeation, in: C.-M. Lehr (Ed.), *Cell Culture Models of Biological Barriers*, Taylor & Francis, London, 2002, 289
- [103] T. Higuchi, *J. Soc. Cosm. Chem.* 11 (1960) 85 - 89
- [104] W. Ritschel, A. S. Hussain Meth and Find Exptl Clin Pharmacol 10 (1988) 39
- [105] O. Siddiqui, *Therapeutic Drug Systems* 6 (1989) 25
- [106] M. T. Dulay, J. P. Quitino, B. D. Benhett, R. N. Zare, *J. Sep. Sci.* 25 (2002) 3
- [107] <http://chrombook.merck.de/chrombook/index.jsp?alias=1A1A4A1>
- [108] H. Minakuchi, K. Nakanishi, N. Soga, N. Ishizuka, N. Tanaka, *J. Chromatogr. A* 762 (1997) 135
- [109] Chromolith columns – Application note, 2002 Merck
- [110] X. He, S. Kadomura, Y. Takekuma, M. Sugawara, K. Miyazaki, *J. Pharm. Sci.* 93 (2004) 71
- [111] X. He, M. Sugawara, M. Kobayashi, Y. Takekuma, K. Miyazaki, *Int. J. Pharm.* 263 (2003) 35
- [112] M. Kobayashi, N. Sada, M. Sugawara, K. Iseki, K. Miyazaki, *Int. J. Pharm.* 221 (2001) 87
- [113] M. Sugawara, Y. Takekuma, K. Miyazaki, S. Kadomura, X. He, N. Kohri, *Eur. J. Pharm. Sci.* 26 (2005) 1
- [114] M.J. Ginski, J.E. Polli, *Int. J. Pharm.* 177 (1999) 117
- [115] M. Kataoka, Y. Masaoka, Y. Yamazaki, T. Sakane, H. Sezaki, S. Yamashita, *Pharm. Res.* 20 (2003) 1674
- [116] S.A. Motz, U.F. Schaefer, S. Balbach, T. Eichinger, C.-M. Lehr, Development of a novel apparatus for simultaneous measurement of drug dissolution and permeability for oral solid dosage forms based on a flow through cell and Caco-2 monolayers, submitted to *J. control. rel.* (2006)

- [117] H. Vogelpoel, J. Welink, G.L. Amidon, H.E. Junginger, K.K. Midha, H. Moller, M. Olling, V.P. Shah, D.M. Barends, *J. Pharm. Sci.* 93 (2004) 1945
- [118] G.L. Amidon, H. Lennernas, V.P. Shah, J.R. Crison, *Pharm. Res.* 12 (1995) 413