

UNIVERZITA KARLOVA
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ
KATEDRA FARMACEUTICKÉ CHEMIE A FARMACEUTICKÉ ANALÝZY



HODNOCENÍ STABILITY GESTODENU S VYUŽITÍM HPLC

Diplomová práce

Alena Oháňková

Vedoucí diplomové práce: PharmDr. Petr Kastner, Ph.D.

Hradec Králové, 2018

„Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci jsou řádně citovány. Práce nebyla použita k získání jiného nebo stejného titulu.“

V Hradci Králové 30. dubna 2018

Alena Oháňková

Poděkování

Ráda bych poděkovala PharmDr. Petru Kastnerovi, Ph.D. za cenné rady a odborné vedení, kterými přispěl k vypracování mé diplomové práce. Poděkování patří i ostatním pracovníkům Katedry farmaceutické chemie a farmaceutické analýzy za pomoc, ochotu a příjemné pracovní prostředí.

Tato diplomová práce vznikla za podpory grantového projektu SVV 260 401.

1. OBSAH

1. OBSAH.....	4
2. ABSTRAKT	6
3. ABSTRACT	7
4. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK.....	8
5. ÚVOD.....	9
6. TEORETICKÁ ČÁST	10
6.1 Hormonální kontraceptiva.....	10
6.1.1 Kombinovaná kontraceptiva	10
6.1.2 Gestagenní kontraceptiva	13
6.2 Gestoden.....	14
6.2.1 Základní lékopisné informace	14
6.2.2 Klasifikace.....	15
6.2.3 Farmakokinetické vlastnosti.....	15
6.2.4 Farmakodynamické vlastnosti.....	16
6.2.5 Kombinovaná kontraceptiva obsahující gestoden.....	17
6.2.6 Studie věnující se vývoji metod pro detekci gestodenu a hodnocení stability gestodenu	18
6.3 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie.....	20
6.3.1 Chromatografie s normálním uspořádáním.....	21
6.3.2 Chromatografie s reverzním uspořádáním	22
6.3.3 Instrumentální vybavení kapalinového chromatografu.....	23
6.3.4 Stanovení léčiv s využitím HPLC	28
7. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	30
7.1 Použité chemikálie a pomůcky.....	30
7.2 Vývoj metody pro následné hodnocení stability	33
7.2.1 Validace metody.....	35
7.3 Hodnocení stability gestodenu	44

7.3.1	Hodnocení stability ve vodném prostředí (experiment č. 1).....	44
7.3.2	Hodnocení stability v přítomnosti oxidačního činidla (experiment č. 2)..	48
8.	VÝSLEDKY A DISKUZE.....	51
9.	ZÁVĚR.....	53
10.	SEZNAM TABULEK	55
11.	SEZNAM OBRÁZKŮ A GRAFŮ	56
12.	POUŽITÁ LITERATURA	57

2. ABSTRAKT

Univerzita Karlova v Praze

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmaceutické chemie a farmaceutické analýzy

Kandidátka: Alena Oháňková

Školitel: PharmDr. Petr Kastner, Ph.D.

Název diplomové práce: Hodnocení stability gestodenu s využitím HPLC

Cílem této diplomové práce byl vývoj a validace HPLC metody a následné hodnocení stability gestodenu za vybraných modelových podmínek. Gestoden je vysoce účinný gestagen nové generace, který je součástí hormonálních kontraceptiv, jež se následně v nízkých koncentracích dostávají do povrchových vod.

Při vývoji metody byly jako výchozí parametry použity parametry lékopisné metody. Chromatografické podmínky byly dále optimalizovány s cílem získat metodu, která sníží její časovou zátěž a náklady. Vyvinutá izokratická metoda zkrátila retenční čas gestodenu o polovinu aniž by zasahovala do mrtvého času kolony a vyhověla všem předepsaným validačním požadavkům. Chromatografické parametry metody jsou následující: rozměry kolony (délka 150 mm, vnitřní průměr 4,6 mm), stacionární fáze (sférický silikagel pro chromatografii oktadecylsilylovaný R (5 μ m), mobilní fáze (voda R, acetonitril R1), eluce (izokratická, 45 % vody + 55 % acetonitrilu), průtoková rychlost (1 ml/min), detekce (spektrofotometrický detektor 254 nm a 205 nm).

Vyvinutá metoda byla aplikována ve dvou stabilitních studiích. Degradace molekuly gestodenu byla pozorována ve dvou typech experimentů prováděných ve vodném prostředí a v prostředí s přídatkem oxidačního činidla. Byla hodnocena stabilita za přírodních podmínek při působení tepla, světla a oxidačního činidla.

Gestoden je ve vodě a v temnu poměrně stálá látka, v nepřítomnosti oxidačního činidla je jeho degradace minimální. Degradace molekuly gestodenu je výrazně urychlena oxidací a dále potencována působením tepla a světla.

Klíčová slova: gestoden, HPLC, stabilita, povrchové vody, steroidní hormony

3. ABSTRACT

Charles University in Prague

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Pharmaceutical Chemistry and Pharmaceutical Analysis

Candidate: Alena Oháňková

Supervisor: PharmDr. Petr Kastner, Ph.D.

Title of thesis: Evaluation of Stability of Gestodene Using HPLC

The purpose of this thesis was to develop and validate the HPLC method and further evaluate the stability of gestodene under selected model conditions. Gestodene is highly effective new-generation gestagen that is a part of hormonal contraceptives that subsequently occurs in low concentrations in surface waters.

The default parameters set in Czech pharmacopoeia were used for the further development of the suitable evaluation method. The chromatographic parameters were optimized in order to obtain the method that would reduce time and costs. The developed isocratic method has shortened the retention time of gestodene by half without interfering with the dead retention time of the column and has met all prescribed validation requirements. The chromatographic parameters of the developed method are as follows: column (length 150 mm, internal diameter 4.6 mm), stationary phase (octadecylsilylated R (5 μ m) spherical silica gel, mobile phase (water R, acetonitrile R1), elution (isocratic, 45 % water + 55 % acetonitrile), flow rate (1 ml/min), detection (spectrophotometric detector 254 nm and 205 nm).

The developed method was used in two stability studies. Degradation of gestodene molecule was observed in two types of experiments in aqueous medium and medium with oxidizing agent. The stability was evaluated under the natural conditions of heat, light and oxidation.

Gestodene is relatively stable substance in water and in the dark, without oxidizing agent is the degradation minimal. The degradation of the gestodene molecule is significantly accelerated by oxidation and further potentiated by heat and light.

Keywords: gestodene, HPLC, stability, surface waters, steroid hormones

4. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

ACN	acetonitril
COC	„Combined Oral Contraceptives“, kombinovaná kontraceptiva
ČL 2017	Český lékopis 2017
EE	ethinylestradiol
FSH	„Follicle-stimulating Hormone“, folitropin, folikuly stimulující hormon
GnRH	„Gonadotropin-releasing Hormone“, gonadotropiny uvolňující hormon
GSD	gestoden
HDL	„High Density Lipoprotein“, vysokodenzitní lipoprotein
HPLC	„High Performance Liquid Chromatography“, vysokoúčinná kapalinová chromatografie
kD	distribuční konstanta
LDL	„Low Density Lipoprotein“, nízkodenzitní lipoprotein
LOD	„Limit of Detection“, limit detekce
LOQ	„Limit of Quantitation“, limit kvantifikace
LH	luteinizační hormon
MF	mobilní fáze
pH	„potential of Hydrogen“, potenciál vodíku
RT	retenční čas
SHBG	„Sex Hormone-binding Globulin“, globulin vázající pohlavní hormony
SÚKL	Státní ústav pro kontrolu léčiv
TEN	tromboembolické nemoci
UV	„Ultraviolet“, ultrafialové záření

5. ÚVOD

S rostoucí popularitou hormonálních kontraceptiv se stále častěji dostává do popředí vědeckého zájmu znečištění povrchových vod tzv. endokrinními disruptory, látkami jež mohou významně narušit homeostatické mechanismy organismů. Ačkoliv se tyto látky vyskytují v povrchových vodách ve velmi nízkých koncentracích, jejich nepříznivé účinky na životní prostředí byly prokázány a popsány v celé řadě vědeckých publikací.

Cílem této diplomové práce je vývoj metody pro detekci a následné hodnocení stability gestodenu za vybraných modeových podmínek. Gestoden patří mezi steroidní hormony, které jsou součástí hormonálních kontraceptiv nové generace. Díky svým výhodným farmakologickým vlastnostem roste jeho využití v antikoncepčních přípravcích. Tyto vlastnosti jsou detailněji popsány v teoretické části této práce, která mimo jiné shrnuje i základní poznatky z publikací, které se věnovaly vývoji metod pro detekci a výzkumu stability tohoto hormonu.

Teoretická část práce popisuje i základní poznatky o vysokoučinné kapalinové chromatografii (dále jen „HPLC“), která byla využita pro detekci gestodenu ve zkoumaných vzorcích. Tato analytická metoda je velmi přesná a vhodná i pro detekci látek při velmi nízké koncentraci a nalézá proto široké využití téměř ve všech odvětvích farmaceutického výzkumu.

Vývoj a validace vhodné HPLC metody pro hodnocení stability je součástí experimentální části práce. Vyvinutá metoda je následně použita pro vyhodnocení stability dvou vzorků (vodné prostředí, prostředí s přídavkem oxidačního činidla), které byly vystaveny působení tepla, světla a oxidace.

Cíl práce: Vývoj a validace HPLC metody pro detekci gestodenu a následné hodnocení stability gestodenu při působení vybraných modelových podmínek (teplo, světlo, oxidace).

6. TEORETICKÁ ČÁST

6.1 Hormonální kontraceptiva

Hormonální kontraceptiva jsou přípravky sloužící primárně k vyvolání dočasné reverzibilní neplodnosti. Mechanismus účinku hormonální antikoncepce je komplexní a působí na několika úrovních reprodukčního systému. Nejvýznamnějším efektem je blokáda ovulace supresí hypotalamických releasing faktorů s následnou inhibicí gonadotropinů (nedochází ke zrání folikulů ani k tvorbě žlutého tělíska), ovlivňuje rovněž charakter cervikálního hlenu (zabraňuje prostupnosti spermií), děložní sliznice (stává se nereceptivní pro nidaci plodového vejce) a tubární motility. [1]

Nejčastěji bývají kontraceptiva rozdělena podle složení na kontraceptiva kombinovaná (estrogeno-gestagenní) a gestagenní.

6.1.1 Kombinovaná kontraceptiva

Kombinovaná kontraceptiva (zkráceně „COC“ (combined oral contraception)) se skládají vždy ze dvou hormonů, estrogeneru a progestinu. Všechny v současnosti používané přípravky obsahují ethinylestradiol (zkráceně „EE“) v kombinaci s různorodými gestagenními složkami. Gestageny lze dělit dle nejrůznějších kritérií, např.:

- dle charakteru základního steroidního skeletu [2]:
 - **progesteron a jeho pregnenová analoga** (progesteron, hydroxyprogesteron, medroxyprogesteron-acetát, megestrol-acetát, chlormadinon-acetát, dydrogesteron, medrogeston, delmadinon-acetát, nomegestrol-acetát, promegeston, trimegeston),
 - **deriváty testosteronu a 19-nortestosteronu** (norethisteron, lynestrenol, tibolon, dienogest, ethynodiol),
 - **deriváty 13-ethyl-18,19-nortestosteronu** (norgestrel, levonorgestrel, desogestrel, ethonogestrel, norgestimát, norelgestromin, gestoden, gestrinon),
 - **drospirenon** (gestagen odlišné struktury, nejbližší progesteronu),

- dle androgenní aktivity (čím menší androgenní efekt, tím menší vliv na metabolismus sacharidů a příznivější vliv na poměr HDL:LDL cholesterolu) [3]:
 - **progestiny s reziduální androgenní aktivitou** (deriváty estranu: norethisteron acetát a jeho prekurzor lynestrenol, a derivát 13-ethylgonanu: levonorgestrel),
 - **progestiny s minimální androgenní aktivitou** (deriváty 13-ethylgonanu: desogestrel (sám není aktivní, aktivní je až jeho hlavní metabolit ethonogestrel (3-ketodesogestrel)), norgestimát (hlavně jeho metabolity, především norelgestromin (17-deacetyl norgestimát) a také levonorgestrel) a gestoden (sám je účinnou látkou, má i klinicky nevýznamnou antimineralokortikoidní aktivitu)),
 - **progestiny s antiandrogenní aktivitou** (nejsilnější antiandrogenní účinek má cyproteron acetát (derivát 17 α -hydroxyprogesteronu), zhruba poloviční antiandrogenní účinek má dienogest a drospirenon (odvozený od 17 α -spironolaktanu, má výraznou antimineralokortikoidní aktivitu)),
 - **progestiny s antiandrogenní a antimineralokortikoidní aktivitou** (drospirenon - jeho antiandrogenní účinek je zhruba poloviční ve srovnání s cyproteron acetátem; antimineralokortikoidní účinek blokuje zadržování vody, které mohou způsobit estrogeny (cestou aktivace systému renin - angiotensin - aldosteron)).

Důležitým dělicím hlediskem jsou i farmakokinetické údaje jednotlivých gestagenů. Čím je vyšší jejich biologická dostupnost, tím nižší může být podaná dávka a není tak zatěžován jaterní metabolismus. Gestageny ovlivňují aktivitu jaterních enzymatických procesů, spojených především s činností cytochromu P-450. Nejsilnějším inhibátorem cytochromu P-450 je gestoden, slabšími inhibátory jsou desogestrel, levonorgestrel, norgestimát a pravděpodobně i drospirenon.

Z hlediska antiandrogenního působení gestagenů je důležitá i informace o cirkulaci syntetického gestagenu v krvi uživatelky. Výhodnější je sérová cirkulace gestagenu s albuminem či ve volné frakci než vazba na SHBG (angl. sex hormone-binding globulin). Čím méně se gestagen na SHBG váže, tím více vazebné kapacity poskytuje jiným hormonům, především testosteronu. Spojením testosteronu s SHBG se sníží hladina volného testosteronu v séru, což vede k výraznému zlepšení kvality pleti a

snížení činnosti mazových žláz. Protože chlormadinon acetát a dienogest se na SHBG téměř vůbec neváží, je jejich působení v tomto směru nejvýhodnější. [4]

Kombinovaná kontraceptiva lze podle hodnot hladin hormonů v jednotlivých fázích cyklu dále dělit na přípravky [5]:

- **monofázické** (hladina hormonů je po celou dobu cyklu neměnná),
- **bifázické** (množství estrogenu se nemění, množství progestinu je vyšší ve druhé fázi cyklu),
- **trifázické** (ve druhé třetině cyklu je vyšší dávka estrogenu i progestinu, ve třetí třetině cyklu je dávka estrogenu opět nižší a dávka progestinu ještě vyšší, což nejněpodobněji napodobuje hormonální změny přirozeného menstruačního cyklu),
- **estrofázické** (ve třech fázích stoupá dávka estrogenu, na našem trhu nejsou) a
- **kombifázické** (v první fázi cyklu je vyšší dávka estrogenu a nižší dávka progestinu než ve druhé polovině cyklu).

Často se lze setkat také s dělením kombinovaných kontraceptiv dle množství ethinylestradiolu na přípravky s vysokou (obvykle nad 40 µg EE), nízkou (30 – 37,5 µg EE) a velmi nízkou dávkou (15 – 20 µg EE). Přípravky s vysokým dávkováním se v současnosti využívají jen ve výjimečných případech (např. při opakovaném nepravidelném krvácení), mnohem častější je užívání přípravků s nízkou a velmi nízkou dávkou ethinylestradiolu. Na trhu se objevují i přípravky s tzv. extrémně nízkou dávkou (15 µg EE), které jako progestin obsahují výhradně gestoden. Postupné snižování obsahu ethinylestradiolu v antikoncepčních přípravcích vedlo k výraznému snížení počtu úmrtí na kardiovaskulární příhody a napomohlo i k snížení incidence méně závažných vedlejších účinků. [1], [5]

Kontracepční přípravky lze užívat perorálně ve formě tablet nebo aplikovat depotně (injekce, náplasti, vaginální pesary). Mechanismus účinku kombinovaných kontraceptiv je trojí: přímá inhibice pulzní sekrece gonadoliberinu (GnRH), pokles citlivosti hypofýzy na GnRH a následně pokles sekrece folitropinu (FSH) a blokáda luteizačního hormonu (LH) uprostřed cyklu. Spolehlivost blokády ovulace závisí na dávce estrogenů. V případě přípravků s nízkými dávkami EE může dojít k luteální insuficienci, antikoncepční účinek je ovšem zabezpečen změnou struktury cervikálního hlenu vlivem progestinů. [5]

6.1.2 Gestagenní kontraceptiva

Gestagenní kontraceptiva na rozdíl od kombinovaných forem obsahují pouze progestin a jsou proto vhodnou alternativou pro uživatelky s kontraindikacemi COC nebo pro kojící ženy. Nejčastěji bývají produkovány ve formě tzv. minipilulek, podkožních implantátů, nitroděložních tělísek nebo depotních injekcí. Existují i ve formě tzv. postkoitální antikoncepce, kterou lze užít do 72 hodin po nechráněném pohlavním styku.

Metoda gestagenní antikoncepce spočívá v její kontinuální aplikaci a má několik antikoncepčních účinků. Základním mechanismem je její účinek na mukopolysacharidy děložního hrdla, jejichž makromolekuly ovlivňují strukturu cervikálního hlenu, který se stává nepropustným pro spermie. Dalším podstatným účinkem je blokáda ovulace cestou negativní zpětné vazby a následného poklesu produkce gonadotropinů. Progestiny ovlivňují rovněž změny peristaltiky tuby a struktury endometria. [5]

Nejčastěji bývá gestagenní forma antikoncepce předepisována ženám s poruchami menstruačního cyklu a s anémií, jelikož snižuje intenzitu menstruačního krvácení. Tyto formy antikoncepce jsou rovněž vhodné pro kojící ženy a ženy trpící premenstruačním syndromem nebo menstruačními migrénami. Hlavní nevýhodou gestagenní antikoncepce jsou ovšem časté poruchy a nepravidelnosti menstruačního cyklu.

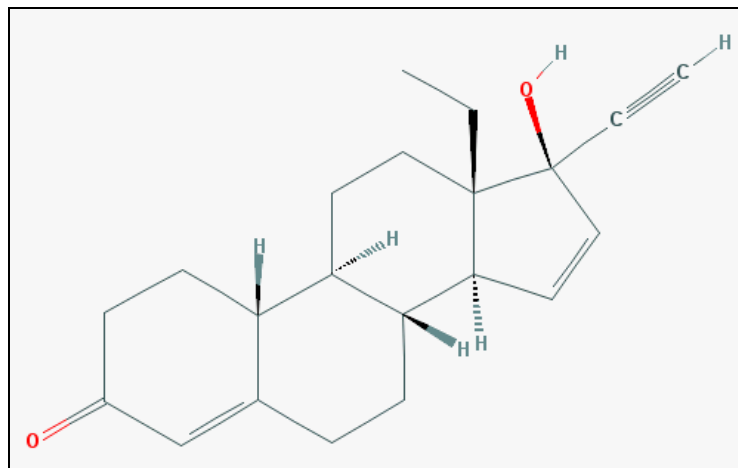
6.2 Gestoden

Gestoden (zkráceně „GSD“) je gestagen tzv. třetí generace, který byl syntetizován ve výzkumných laboratořích společnosti Schering AG v 80. letech minulého století. [6] Vznikl modifikací molekuly levonorgestrelu, od kterého se liší dodatečnou dvojnou vazbou v poloze 15, která má za následek čtyřikrát vyšší afinitu k progesteronovým receptorům. [2] V monofázické kombinaci s ethinylestradiolem je využíván jako vysoce účinné kontraceptivum.

6.2.1 Základní lékopisné informace

Chemický název: 17-hydroxy-18a-homo-19-nor-17 α -pregna-4, 15-dien-20-yn-3-on

Sumární vzorec: C₂₁H₂₆O₂



Obrázek 1: Strukturální vzorec gestodenu

Zdroj: PubChem [8], dostupné na:

<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/gestodene#section=Top>

Relativní molekulová hmotnost (Mr): 310,4

Registrační číslo CAS: 60282-87-3

Charakteristiky: Je to bílý nebo nažloutlý krystalický prášek prakticky nerozpustný ve vodě, snadno rozpustný v dichlormethanu, dobře rozpustný v methanolu a mírně rozpustný v ethanolu (96 %). Vykazuje polymorfismus. [7]

6.2.2 Klasifikace

Nejčastěji bývá gestoden řazen mezi tzv. gestageny třetí generace. Toto rozdělení ovšem odráží pouze historickou posloupnost, v jaké byly jednotlivé hormony syntetizovány a uváděny na trh. Jako vhodnější se jeví například klasifikace podle základní molekuly, dle které lze gestoden zařadit mezi tzv. gonany.

6.2.3 Farmakokinetické vlastnosti

Známy metabolity gestodenu jsou dihydrogestoden, 3,5-tetrahydrogestoden a hydroxygestoden. [8] Tyto metabolity jsou ovšem velmi málo farmakologicky účinné, vlastní účinnou látkou je proto samotný gestoden. [9]

Gestoden se po perorálním podání vstřebává rychle a úplně trávicím ústrojím s poločasem absorpce přibližně 1 hodina. Téměř nepodléhá first-pass efektu a jeho biologická dostupnost tak dosahuje téměř 100 %. Maximální koncentrace v séru je dosaženo přibližně za 30 min. [9], [10] Po dosažení tohoto maxima se hladina gestodenu v séru snižuje ve dvou fázích s poločasem 1 hod a 12 – 14 hodin. [8], [9]

Biologický poločas gestodenu je 17 hodin, v kombinaci s ethinylestradiolem se prodlužuje o 3 hodiny, což je podstatné pro zachování antikoncepčního účinku při vynechání dávky. [11] Při kontinuálním perorálním podávání po dobu 10 dnů dosahuje gestoden trvalé hladiny v plazmě, která je 4 – 5 krát vyšší než po jednorázové aplikaci. [10] Příčinou této kumulace je zvyšující se vazebná kapacita v séru a snižující se rychlost jeho eliminace. [9] V séru se gestoden váže 65 – 75 % na SHGB (sexual hormone binding globulin) a 24 – 34 % na albumin. [11] Zbytek tvoří volná frakce (cca 0,5 – 2 %). Relativní distribuce těchto vazeb závisí na množství SHGB v séru. [8]

Gestoden se z velké části metabolizuje redukcí, oxidací a konjugací. [10] Metabolizace probíhá primárně v játrech cytochromem P-450. Přestože ethinylestradiol je metabolizován také cytochromem P-450, gestoden neinhibuje jeho metabolismus. [8] Vniklé metabolity se vylučují močí (50 %) a stolicí (33 %) s poločasem asi 1 den. [10] Méně než 1 % látky se vylučuje močí v nezměněné formě. [9]

6.2.4 Farmakodynamické vlastnosti

Gestoden má relativně vysokou afinitu nejen k progesteronovému receptoru, ale váže se i na další steroidní receptory: glukokortikoidní, mineralokortikoidní a androgenní receptory. Díky vysoké afinitě k progesteronovému receptoru patří mezi nejúčinnější gestageny, ve srovnání s ostatními gestageny má nejnižší prahovou dávku pro efektivní inhibici ovulace. [12]

V kombinaci s estrogenem (nejčastěji ethinylestradiolem) působí na organizmus uživatelky tak, že inhibuje ovulaci potlačením nárůstu hladiny luteizačního hormonu uprostřed cyklu a mění charakter cervikálního hlenu a děložní sliznice.

Základem gestodenu je gonanové jádro, proto tento syntetický hormon zcela postrádá zbytkovou estrogenní a téměř plně androgenní aktivitu. [4], [13] Gestoden je silným inhibitorem cytochromu P-450. Důsledkem inhibice je při opakovaném podání kumulace všech látek, které jsou odbourávány souvisejícími jaterními metabolickými procesy. Cytochrom P-450 je specifickým bílkovinným komplexem, který se podílí mimo jiné na aktivaci katecholaminů a metabolismu kyseliny arachidonové, na odbourávání melatoninu, estrogenů, gestagenů, testosteronu a mnoha dalších látek. Inaktivace enzymatických systémů cytochromu P-450 se nejspíše podílí i na schopnosti inhibice ovulace. Následkem inhibice degradačních enzymů je i schopnost kumulace gestodenu při opakovaném podávání. [4] Nicméně jako součást kombinovaného přípravku gestoden nesnižuje koncentraci SHGB indukovanou estrogeny (převážnou část přípravku tvoří ethinylestradiol, který významně zvyšuje množství SHGB v séru). [4], [9]

Ze všech gonanů má gestoden nejsilnější afinitu k mineralokortikoidnímu receptoru, která se pohybuje na úrovni 20 % spironolaktonu, což pozitivně ovlivňuje retenci tekutin a zabraňuje tak nárůstu hmotnosti uživatelé kombinovaných kontraceptiv. [9], [11]

Kombinované přípravky obsahující gestoden dle publikovaných výzkumů zvyšují hladinu triglyceridů (20 – 50 %), mírně zvyšují HDL cholesterol a snižují hladinu LDL cholesterolu. Užívání kombinované antikoncepce s gestodenem může být provázeno i zvýšením inzulínové rezistence. Nicméně tyto efekty jsou spíše připisovány estrogenní složce přípravků, samotný gestoden má minimální účinek na metabolismus lipidů a uhlohydrátů. [12], [14]

Výsledky výzkumů, které se věnují účinkům kontraceptiv s gestodenem na riziko tromboembolické nemoci (TEN), jsou nejednoznačné a přímá souvislost mezi užíváním kombinovaných přípravků obsahujících gestoden a rizikem TEN nebyla zatím prokázána. Výsledky studií prokázaly pouze vliv na koagulační faktory VII a X a antitrombin III. [14] Prokoagulační posun v koncentracích faktorů srážlivosti je částečně kompenzován zvýšením fibrinolytické aktivity. Přímý vztah mezi změnou produkce koagulačních faktorů a rizikem trombózy ovšem nebyl prokázán. [9]

6.2.5 Kombinovaná kontraceptiva obsahující gestoden

V současnosti je na českém trhu dle údajů Státního ústavu pro kontrolu léčiv (SÚKL) registrováno přibližně 30 druhů kombinovaných kontraceptiv, jejichž součástí je gestoden. [15] Mezi nejčastěji uváděné vedlejší účinky léčivých přípravků, které dle dostupných studií pociťovaly uživatelky monofázických a trifázických léčivých přípravků s gestodenem, patří napětí v prsou, bolest hlavy, akné, nervozita, deprese a závratě. Některé studie uvádějí i nárůst systolického a diastolického krevního tlaku. [12]

Mezi nekontraceptivní příznivé vedlejší účinky kontraceptiv s gestodenem patří naopak kontrola menstruačního cyklu a krvácení, utlumení dysmenorey, snížené riziko karcinomu endometria a ovaria, pánevních zánětů, sideropenické anémie, kongestivní pelipatie, mimoděložního těhotenství, vzniku funkčních ovariálních cyst a hyperandrogenního syndromu. [11], [12]

Jako většina léčivých přípravků i kombinovaná kontraceptiva s gestodenem mají kontraindikace, které je vždy třeba důsledně zvážit. Absolutními kontraindikacemi užívání hormonální antikoncepce jsou hormonálně dependentní nádory, zvýšené riziko hluboké žilní trombózy, akutní nebo chronické onemocnění jater spojené s poruchou jejich funkce a primární plicní hypertenze. Mezi relativní kontraindikace patří plánované operace většího rozsahu a operace dolních končetin, přítomnost více faktorů zvyšujících riziko hluboké žilní trombózy, závažné dyslipidemie, onemocnění jater, která nejsou absolutní kontraindikací, diabetes mellitus s cévními komplikacemi, vaskulární migréna, závažný prolaps mitrální chlopně a starší kuřačky. [3]

6.2.6 Studie věnující se vývoji metod pro detekci gestodenu a hodnocení stability gestodenu

Vývoji metody pro determinaci gestodenu se ve své práci věnovali Laban, A. et al., kteří vyvinuli metodu pro stanovení gestodenu v kombinovaných kontraceptivech obsahujících ethinylestradiol. Pro separaci těchto komponentů využili kolonu Waters Symmetry Shield RP18. Metoda byla založena na izokratické eluci s mobilní fází obsahující methanol a vodu v poměru 80:20 o průtoku 1 ml/min. Jednotlivé komponenty byly detekovány s využitím UV detektoru o vlnové délce 220 nm. Tato metoda umožňuje detekovat gestoden při 2,3 µg/ml. Retenční čas gestodenu při využití této metody je 3,22 min, což z něj činí velice rychlou metodu pro jeho detekci. [16]

Determinací gestodenu ve vzorcích říčních vod se zabývali čeští vědci Matějček, D. a Kubáň, V.. Testy byly prováděny s použitím kolony Zorbax SB Phenyl (100 mm × 2,1 mm s velikostí částic 3,5 µm) a mobilní fází složenou z methanolu a vody. Metoda využívala gradientovou eluci od 70 do 100 % (v/v) v sedmé minutě, tento poměr byl udržován až do desáté minuty a následně došlo k poklesu množství methanolu na 70 %, který postupně klesal až do dvanácté minuty. Pro vyhodnocení byl využit detektor o vlnové délce 244 nm. Retenční čas gestodenu při využití této metody byl 4,22 min. [17]

Vývoj stabilitu-indikující metody pro kombinované antikoncepční přípravky obsahující ethinylestradiol a gestoden popisují ve své práci i Kishore, K. et al.. Chromatografickou separaci prováděli na koloně Zorbax SB Phenyl (250 mm × 4,6 mm; 5 µm) s využitím mobilní fáze A (0,1% roztok kyseliny orthofosforečné) a mobilní fáze B (acetonitril a 0,1% roztok kyseliny orthofosforečné v poměru 9:1) při průtoku 1ml/min. Využita byla gradientová eluce trvající 65 minut. Pro vyhodnocení byly použity detektory o vlnové délce 210 nm a 240 nm.

Tyto metody byly následně aplikovány pro vyhodnocení stability gestodenu za následujících podmínek: přidána kyselina (1N HCl) a zahříváno ve vodní lázni při teplotě 60 °C po dobu 2 hodin, přidán hydroxid (1N NaOH) a zahříváno ve vodní lázni po dobu 2 hodin, přidán 3% peroxid vodíku a ponecháno na pracovním stole po dobu 2 hodin, zahříváno při teplotě 105 °C po dobu 24 hodin, fotolýza (1,2 mil. Lx/hod a 200 Wh/m²). Největší procentuální degradace byla naměřena při působení hydroxidu a tepla po dobu 2 hodin (12,96% degradace). Nižší degradaci vykazovalo působení kyseliny a tepla po dobu 2 hodin (5,69% degradace). Působení ostatních výše uvedených faktorů mělo srovnatelný vliv na degradaci gestodenu (1,19 – 1,36 %). [18]

Naopak pomalejší degradaci gestodenu v kyselém prostředí popisují Salvia et al., kteří se věnovali degradaci steroidních hormonů v půdě. Poločas rozpadu gestodenu v jílovité půdě o pH 6,25 byl 8 dnů, v písčité půdě o pH 8,07 byl poločas rozpadu o 2,4 dnu delší. Na jeho degradaci mohly ovšem působit další fyzikální a chemické vlivy. [19]

Stabilitu gestodenu při anodické oxidaci ve vodném prostředí zkoumali mexičtí vědci Nájera-Aguilar et al. Testy byly prováděny za použití roztoku Na_2SO_4 jako nosičového elektrolytu a diamantových elektrod dopovaných bórem. Hodnocenými faktory byla koncentrace podpůrného elektrolytu, pH reakčního média a proudová hustota. Při optimálních podmínkách (0,02 M Na_2SO_4 , pH 4 a proudové hustotě 32 mA/cm²) bylo dosaženo degradace 93 % počáteční koncentrace gestodenu v reakční době 5 minut. Ke kompletní degradaci došlo po 15 minutách. [20]

Degradaci gestodenu z povrchových vod s využitím ultrazvuku se zabývali i Hongxiang et al.. Ve své práci zkoumali rychlost degradace s využitím dvou typů ultrazvukových reaktorů při různých hodnotách pH, teploty a tlaku. Působením ultrazvuku o výkonu 2,1 W/ml při pH 7 a původní koncentraci gestodenu 10 µg/l došlo k jeho degradaci ve vodném roztoku při udržované laboratorní teplotě zhruba po 30 minutách působení. Působení vyšších teplot a tlaku bylo pro sonochemickou degradaci vyhodnoceno jako nepříznivé, neboť docházelo vlivem tlaku par ke zpomalení kavitačního kolapsu. [21]

6.3 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie

Pro hodnocení stability vybraného hormonu byla pro experimentální část práce zvolena vysokoúčinná kapalinová chromatografie (angl. High-performance liquid chromatography, dále jen „HPLC“). Tato separační analytická metoda je v současnosti jednou z nejvyžívanějších analytických metod.

Chromatografické metody obecně využívají rozdílné distribuce složek mezi dvě nemísitelné fáze, pohyblivou (mobilní) a nepohyblivou (stacionární). Jednotlivé složky hodnocené směsi jsou odděleny na základě odlišné afinity těchto složek s fázemi, mezi nimiž musí existovat fázové rozhraní. V chromatografickém systému dochází k opakovanému rovnovážnému ustalování separovaných látek mezi mobilní a stacionární fází. Pohyb mobilní fáze je trvalý, brání tak dosažení skutečné termodynamické rovnováhy a posunuje molekuly složek k další části stacionární fáze, kde se vytvoří opět přibližně rovnovážný stav.

Distribuci složky mezi dvě fáze lze popsat tzv. distribuční konstantou k_D , která vyjadřuje poměr mezi koncentrací složky ve stacionární a mobilní fázi. Pro efektivní dělení složek směsi v chromatografickém systému je proto důležité, aby se jednotlivé složky směsi lišily svými distribučními konstantami. Čím vyšší je hodnota distribuční konstanty, tím delší je doba retence její molekuly na stacionární fázi a tím pomaleji postupuje chromatografickým systémem.

Vysokoúčinná kapalinová chromatografie je založena na použití kapalně mobilní fáze, která unáší ionty a molekuly analytů chromatografickou kolonou. Hybnou silou mobilní fáze je vysokotlaké čerpadlo. Eluce jednotlivých složek směsi může být buď provedena izokratickou elucí, která využívá mobilní fázi s konstantním složením o stejné eluční síle nebo gradientovou elucí, u které se složení mobilní fáze programově mění v průběhu eluce ve prospěch silnější eluční složky. [22], [23]

Podle fyzikálně-chemických vlastností separačních mechanismů lze chromatografické metody rozdělit do čtyř základních skupin dle jejich interakce s fázemi: adsorpční, rozdělovací, iontovýměnnou a molekulovou vylučovací (gelovou) metodu.

Při adsorpční chromatografii dochází k separaci díky specifickým adsorpčním charakteristikám částic s povrchem stacionární části. Rozdělovací chromatografie je založena na odlišné rozpustnosti složek vzorku ve dvou nemísitelných kapalných fázích. Stacionární fázi tvoří inertní nosič, na kterém je nanášena nepohyblivá kapalná fáze.

U iontovýměnné chromatografie rozhodují o separaci elektrostatické přitažlivé síly mezi stacionární fází (iontoměničem) a ionty vzorku. Poslední metodou je tzv. metoda gelová, která je založena na separaci látek na základě velikosti jejich molekul. Interakce probíhají na povrchu nebo v pórech stacionární fáze (molekulová síta). [24], [25]

Dalším dělicím hlediskem chromatografických metod bývá kombinace polaritý stacionární a mobilní fáze, které určují, zda se jedná o normální uspořádání (angl. normal-phase chromatography), kde je stacionární fáze polární a mobilní nepolární, nebo reverzní uspořádání (angl. reversed-phase chromatography), kde je stacionární fáze nepolární a mobilní fáze polární.

6.3.1 Chromatografie s normálním uspořádáním

Chromatografie s normálním uspořádáním je založena na retenčním mechanismu, který využívá soutěž dělené látky a mobilní fáze o lokalizovaná adsorpční centra na povrchu stacionární fáze (např. o volné hydroxylové skupiny silikagelu). Adsorpce látky je důsledkem různých polárních sil působících mezi dělenou látkou a povrchem sorbentu a povrchem sorbentu a mobilní fází. S rostoucí polaritou analytů se retence látek na koloně zvyšuje, s rostoucí koncentrací polárního rozpouštědla v mobilní fázi klesá.

Pro separaci látek v normálním uspořádání jsou využívány polární stacionární fáze a mobilní fáze s nižší polaritou. Nejčastěji využívanými stacionárními fázemi jsou silikagel nebo polární chemicky vázané fáze na silikagelovém nosiči. Polární chemicky vázané fáze mohou být dle polaritý jejich dominantní funkční skupiny rozděleny mezi slabě polární (diolová funkční skupina nebo nitroskupina), středně polární (kyanová nebo kyanopropylová skupina) a silně polární (krátké alifatické aminoskupiny (aminopropyl), které vykazují odlišnou selektivitu v porovnání s původním silikagelem). Retenci analytů v normálním uspořádání lze ovlivnit různou eluční silou mobilní fáze, kterou může tvořit celá řada rozpouštědel o různé polaritě. Výběr potřebné polaritý umožňuje tzv. eluotropická řada rozpouštědel, která vychází z eluční síly pentanu. [22]

Použití chromatografie s normálním uspořádáním se dostává v současnosti do pozadí kvůli množství problémů spojených s velmi silnou interakcí malých polárních molekul se silanolovým povrchem stacionární fáze, jež má v důsledku významný efekt na retenci látek. Při jejím použití bývají nejčastěji detekovány následující problémy: špatná reprodukovatelnost separace (včetně extrémní citlivosti na obsah vody v mobilní fázi),

míchání rozpouštědel, pomalé vyrovnávání rovnováhy kolony při změně mobilní fáze a chvostující píky (angl. tailing peaks).

V současnosti je využití normálního uspořádání užitečné zejména pro analytické separace tenkovrstvou chromatografií (angl. thin-layer chromatography), preparativní čištění surových vzorků, oddělování velmi polárních vzorků, které jsou špatně zadrženy nebo separovány reverzní chromatografií, nebo pro odlišení nechirálních izomerů. Díky svým specifickým vlastnostem může být její využití užitečné i v případech, kdy analyzované vzorky obsahují velmi nepolární sloučeniny, které analytici nezajímají. Tyto složky by byly silně zadržovány reverzním systémem, což by vyžadovalo dlouhotrvající eluci, přípravu vzorku nebo použití gradientové eluce. V případě normální chromatografie se velmi nepolární sloučeniny eluují v blízkosti t_0 a nevytvářejí překážky pro izokratickou separaci. [26]

6.3.2 Chromatografie s reverzním uspořádáním

Separace látek v reverzním uspořádání využívá vlastností polárních mobilních fází a méně polárních nebo nepolárních stacionárních fází. Retence látek je ovlivněna nejen množstvím nepolární fáze na nosiči (obsah uhlíků a délka alifatických řetězců), ale především složením mobilní fáze. Eluční síla mobilní fáze roste s klesající polaritou organického rozpouštědla. Retence analytů na reverzních fázích roste s rostoucím počtem a délkou alkylů v homologických řadách, s větším počtem aromatických jader nebo v přítomnosti objemných substituentů (zejména halogenů). Silně polární a iontové látky jsou na nepolárních fázích zadržovány velmi slabě nebo vůbec. Jejich chromatografické chování lze ale ovlivnit změnou pH mobilní fáze, která potlačuje disociaci slabých kyselin či bází.

Stacionární fáze využívané v reverzním uspořádání musí mít nepolární charakter. Nejčastěji se jedná o dlouhé uhlíkaté řetězce navázané na modifikovaný povrch silikagelu (různá velikost pórů dle požadovaných parametrů). Nejfrekventovaněji bývá využíván oktadecylsilan (n-alkan s 18 uhlíky), ale lze použít i jiné alkylové ligandy s různým počtem atomů uhlíku (C_1 , C_4 , C_8 , C_{12}) nebo fenyle. V závislosti na použité mobilní fázi lze použít i polárnější fáze, např. propylaminové nebo propylkyanové. Nosiči mohou být kromě silikagelů i hybridní sorbenty nebo kovové oxidy.

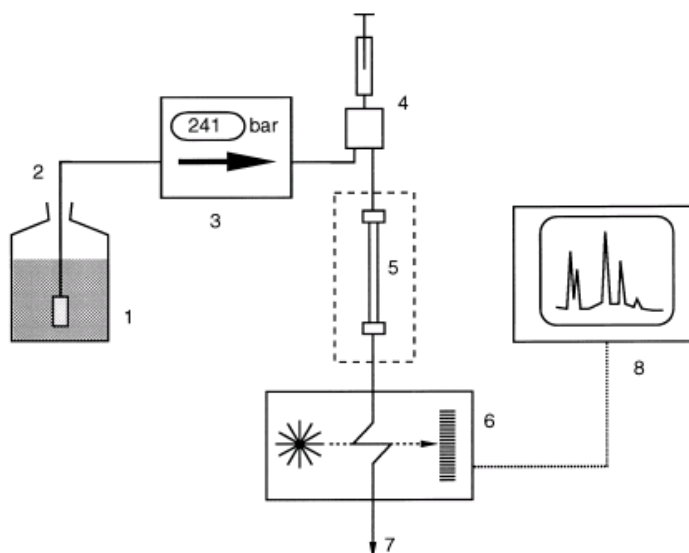
Mobilní fáze využívané při reverzním uspořádání obvykle obsahují vodu v kombinaci s mísitelnými polárními organickými rozpouštědly (nejčastěji methanol, acetonitril,

tetrahydrofuran nebo dioxan). U silně polárních nebo ionizovaných analytů bývají do mobilní fáze přidávány další přísady, které vytvoří s analytem iontové asociáty nebo páry (např. pufrů, soli nebo činidla). Koncentrace organického rozpouštědla v eluentu je dominantním faktorem, který řídí retenci analytů v reverzní chromatografii. Pro využití v chromatografii by měla být používána pouze rozpouštědla v HPLC kvalitě, aby se minimalizovala kontaminace stacionární fáze nečistotami. Při volbě rozpouštědla by měly být zváženy následující faktory: mísitelnost a kompatibilita rozpouštědel, rozpustnost vzorku v eluentu, polarita, světelná transmise, viskozita, stabilita a pH. [22], [25], [27]

Separace na reverzních fázích je v současnosti nejvyužívanější technikou, jelikož je vhodná pro širokou škálu i velice komplexních vzorků.

6.3.3 Instrumentální vybavení kapalinového chromatografu

Pro provedení vysokoúčinné kapalinové chromatografie je zapotřebí kapalinový chromatograf, který obsahuje alespoň následující komponenty (viz obrázek níže). HPLC zařízení může mít řadu obměn a doplňujících prvků, které umožňují provádění sofistikovaných testů.



Obrázek 2: Schéma kapalinového chromatografu

Zdroj: Převzato z MEYER, Veronika. *Practical high-performance liquid chromatography*. [27]

Agenda:

- 1- zásobník mobilní fáze
- 2- přívodní kapilára s filtrem
- 3- vysokotlaké čerpadlo s manometrem
- 4- dávkovač vzorku (sampler)
- 5- chromatografická kolona s termostatem
- 6- detektor
- 7- sběrač frakcí
- 8- systém pro sběr dat

Mezi zásobník mobilní fáze a vysokotlaké čerpadlo mohou být zařazeny ještě odplynovač, tlumiče pulsů a směšovače mobilních fází.

Mobilní fáze je vedena ze zásobníku skrze kovový nebo teflonový filtr pro zachycení suspendovaných tuhých částic. Při izokratické eluci je vedena přímo do vysokotlakého čerpadla zatímco při gradientové eluci jsou proudy mobilní fáze přiváděné ze zásobníků programově míseny ve směšovači, který je zařazen před vysokotlaké čerpadlo. Gradientová eluce může být realizována i pomocí dvou vysokotlakových čerpadel, potom je směšovač řazen až za čerpadla. Pro odplynění mobilní fáze bývá před vysokotlaká čerpadla řazen i odplyňovač.

Vysokotlaké čerpadlo pohání mobilní fázi přes zařízení pro dávkování vzorku do chromatografické kolony, za kterou je umístěn detektor, jenž zaznamenává změny v koncentraci analytů během průchodu kolonou. Získaná data jsou zpracovávána v navazujícím softwaru, který vyhodnocuje výstupy a vytváří tabulky a grafy. [22], [23], [26]

6.3.3.1 Zařízení pro přípravu a transport mobilní fáze

Jednou ze základních částí chromatografu jsou zásobníky mobilní fáze. Zatímco při izokratické eluci stačí jeden zásobník pro umístění nadefinované mobilní fáze, u gradientové eluce je potřeba zásobníků více. Zásobníky jsou většinou vyrobeny ze skla, jen některé typy chromatografií (např. při analýze iontů sodíku) vyžadují jiný typ zásobníku.

Aby se zamezilo kontaminaci fáze, musí být zásobník dobře uzavřen a bývá rovněž vybaven filtry, které jsou umístěny na konci přítokového vedení, kde zabraňují např.

vniknutí prachu nebo mikroorganismů z okolního prostředí. Doporučuje se pórovitost $\geq 10 \mu\text{m}$, aby mohla fáze volně proudit skrz přírodní filtr. Filtry musí být vyrobeny z materiálů, které jsou inertní vůči fázi. Nejčastěji se využívají filtry z nerez, keramiky nebo polyetheretherketonu.

Spoje zásobníku fáze s odplyňovačem, směšovačem a čerpadlem jsou většinou vyrobeny z teflonu nebo nerez oceli.

Tvorba gradientu může být zajištěna dvěma způsoby. Vysoce přesný, ale technicky náročný způsob představuje nízkotlakový gradient, který vyžaduje sladění periody ventilů a čerpadla a dokonalé odvdoušnění mobilní fáze. Složky mobilní fáze se míchají za atmosférického tlaku ve směšovací komůrce (gradientový ventil) umístěné před vysokotlakovým čerpadlem. Poměr jednotlivých složek je řízen programovým otevíráním a zavíráním ventilů, které jsou umístěny na vstupu gradientového ventilu, pomocí nízkotlakových mikročerpadel nebo rychlého proporcionálního ventilu.

Druhou variantou je vysokotlaký gradient, kdy má každá složka mobilní fáze vlastní vysokotlaké čerpadlo, které vhání složky do směšovací komůrky přímo před kolonou. Oproti nízkotlakovému gradientu umožňuje toto uspořádání menší mrtvý objem a zpoždění gradientu.

Za zásobník bývá často zařazen odplyňovač, který plní důležitou funkci pro přípravu vzorku pro další průchod chromatografem tím, že zabraňuje uvolňování bublinek rozpuštěných plynů. Odplyněné mobilní fáze eliminuje problémy se stabilitou čerpadel, které se mohou zavzdušnit a ovlivnit plynulost průtoku mobilní fáze. To může vést ke špatné opakovatelnosti dávek a retenčních časů. Přítomnost kyslíku může snížit i citlivost detekce.

V současné době jsou nejčastěji využívány dva typy odplynění fáze: probublávání heliem nebo vakuový degaser. Preferovanou variantou je vakuový degaser, který je rychlejší a mnohem účinnější. Mobilní fáze prochází kapilárou, jejíž stěny propouštějí pouze plyny. Rozdíl tlaku uvnitř a vně kapiláry zajišťuje kontinuální odplynění s použitím vakuového čerpadla.

Další součástí chromatografu, je tlumič tlakových pulsů. Tlumení tlakových pulsů je nutné u čerpadel se sinusovou časovou závislostí polohy pístů. Tlumič odstraňuje tyto pulsy zařazením další hlavy v opačné fázi a umožňuje tak bezpulsní průtok bez nežádoucích prodlev. [22], [23], [26]

6.3.3.2 Vysokotlaká čerpadla

Vysokotlaká čerpadla musí zajišťovat plynulý, přesný a bezpulsní průtok mobilní fáze kolonou. Moderní HPLC zařízení umožňují korigovat výstupní tlaky na čerpadlech (1 – 100 MPa) i průtok mobilní fáze (0,1 – 10 ml). Podle způsobu, jakým dochází k rozpořívání pístu čerpadla, lze čerpadla obecně rozdělit do dvou skupin: čerpadla pracující s konstantním tlakem (píst rozpoříván tlakem plynu nebo kapaliny) a čerpadla s konstantním objemovým průtokem (mechanický pohon).

Nejčastěji bývají v chromatografických přístrojích využívány následující typy čerpadel:

- *pneumatická čerpadla* (konstantní tlak plynu na píst, maximální tlak na výstupu jen 3 – 5 MPa, v současnosti využitelné pouze u gelových metod),
- *čerpadla injekčního typu* (tlak vyvíjen speciálním krokovým elektromotorem, maximální tlak 40 – 60 MPa, nevýhodou limitovaný objem pracovního válce potřebný k dosažení stabilního průtoku),
- *pístová čerpadla* (průtok ovládan nastavením otáček elektromotoru, maximální tlak 60 – 100 MPa, umožňuje neomezené dávkování MF na kolonu, nevýhodou je kolísání průtoku, které vyžaduje zařazení další hlavy v opačné fázi) a
- *dvoupístová čerpadla zapojená do série* (každý píst poháněn vlastním krokovým motorem, umožňují minimalizaci tlakových pulsů).

Jsou-li při kapalinové chromatografii využívány pufry, může dojít k jejich krystalizaci na povrchu pístu nebo čerpadla. Je proto nutné zajistit v systému oplach pístů, který je realizován buď samospádem (pasivní oplach) nebo pomocí peristaltické pumpy (aktivní oplach). [22], [23]

6.3.3.3 Dávkovače vzorku

Dávkování vzorků probíhá buď prostřednictvím manuálních smyčkových dávkovačů fungujících na principu přepínacích ventilů (ovládány elektronicky nebo pneumaticky) nebo s pomocí automatických dávkovačů (tzv. autosamplerů). Autosamplery jsou v současnosti využívány mnohem častěji, jelikož umožňují mnohem rychlejší a přesnější nanesení vzorků. Vzorky bývají nanášeny pomocí injekční stříkačky konstrukčně spojené s dávkovačem obsahujícím vialky se vzorky. Vialky bývají

nejčastěji vyrobeny ze skla nebo plastu a uzavírány pryžovým septem nebo perforovanou zátkou z polypropylenu. [23], [24]

6.3.3.4 Kolony

Pro analytické metody bývají v současnosti nejčastěji využívány kolony o vnitřním průměru 2,1 – 5 mm, délce 10 – 300 mm a velikosti částic 1 – 10 μm . Lze vybírat z celé řady komponent s různým obsahem sorbentů i velikosti jeho částic. Materiál, ze kterého je kolona vyrobena musí odolávat vysokým tlakům i chemickému působení mobilní fáze. Nejčastěji bývají používány kolony vyrobené z antikoroziho nerez, ze speciálně tvrzeného skla vloženého v kovovém pouzdru (chemicky stabilnější a odolávají vyšším tlakům) nebo polyetheretherketonu.

Tělo kolony tvoří rovná trubice s hladkým vnitřním povrchem zakončená koncovkou, která zajišťuje těsnost systému za používaného tlaku, distribuuje mobilní fázi i analyt rovnoměrně chromatografickým ložem a zadržuje náplň kolony.

Vlivem průtoku mobilní fáze kolonou za vysokého tlaku dochází ke vzniku teplotního gradientu na koloně působením třecího tepla, jenž může ovlivnit retenci látek i účinnost chromatografické kolony. Aby nedocházelo k nerovnoměrné distribuci tepla v koloně, bývají kolony vybaveny termostaty. [22], [23]

6.3.3.5 Detekční systémy

HPLC detektor je zařízení umístěné přímo za kolonou, které kontinuálně zaznamenává rozdíly v signálu mezi průchodem čisté mobilní fáze a mobilní fáze obsahující analyt. Ve farmaceutické analýze bývá nejčastěji využíván UV detektor, který zaznamenává průchod analytu na základě rozdílné absorpce ultrafialového záření, nebo hmotnostní spektrometrie.

Kromě dvou nejčastěji používaných metod existuje celá řada dalších detekčních metod, např. detektor fluorescenční, elektrochemický, univerzální detektory na bázi aerosolu, refraktometrické, vodivostní, bezkontaktní vodivostní, chemiluminiscenční nebo reakční. [22]

6.3.4 Stanovení léčiv s využitím HPLC

Vysokoúčinná kapalinová chromatografie umožňuje kvalitativní i kvantitativní hodnocení složek směsi. Základem pro kvantitativní určení léčiva je plocha, resp. výška píku. Při stanovení složek směsi bývají nejčastěji využívány následující metody: metoda vnějšího standardu, metoda vnitřního standardu, metoda normalizace, kalibrační metoda a metoda standardního přídatku.

Metoda vnějšího standardu je založena na dvojím dávkování. Nejprve se na kolonu nastříkne analyzovaný vzorek a následně roztok vnějšího standardu (chemická retenční látka (standard) nebo jedna z analyzovaných složek směsi). Koncentrace hodnocených složek směsi se následně spočítá jako poměr ploch píků jednotlivých stanovovaných látek a plochy píku vnějšího standardu.

Další využívanou metodou je metoda vnitřního standardu, kdy se ke známému objemu roztoku hodnoceného vzorku přidá definovaný objem roztoku vnitřního standardu a po promíchání se nastříkne na kolonu. Koncentrace se opět vypočítá jako poměr plochy píků jednotlivých složek a plochy píku vnitřního standardu. Tato metoda je rychlejší a přesnější. Bývá používána především v případech, kdy je příprava vzorků pro analýzu složitější a může při ní dojít k manipulaci se vzorkem, která může mít za následek nepřesnost měření. [28]

Vhodnou metodou pro hodnocení stability je metoda normalizace, která je nejčastěji využívána u plynové chromatografie. Při použití v kapalinové chromatografii je často zapotřebí vyžití tzv. korekčních faktorů, jelikož základním předpokladem metody je, že všechny analyty vykazují přibližně stejnou odezvu u použitého detektoru. Obsah stanovované látky se vypočítá jako procentuální podíl z ploch všech píků na chromatogramu (píky rozpouštědel, činidel a píky pod limitem zanedbatelnosti se neuvažují). [25], [26]

Kalibrační metoda vychází z lineární závislosti mezi plochou píku a odpovídající koncentrací látky. Kalibrační přímka se vypočítá ze série vzorků v definovaném koncentračním rozmezí a na základě výsledků se vypočítá závislost odezvy na koncentraci. Koncentraci analytu lze pak dopočítat z kalibrační křivky.

U vzorků, u nichž je problematické získat prázdný vzorek (tzv. blank) bývá často využívána metoda standardního přídatku. Jedná se o metodu využívanou především pro biologické vzorky. Koncentrace stanoveného analytu v neznámém vzorku je

dopočítávána porovnáním ploch píků ve dvou vzorcích. Analyzovaný vzorek je porovnáván se vzorkem s přidaným známým množstvím analytu. [26]

7. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

Experimentální část této práce je zaměřena na vývoj a validaci metody a následné hodnocení stability gestodenu za vybraných přírodních podmínek.

Při vývoji metody jsem vycházela z lékopisné metody sloužící pro stanovení příbuzných látek, která byla modifikována pro účely dalších testů. Cílem mé práce bylo získat vhodnou metodu pro detekci samotného gestodenu nikoliv jeho nečistot. Současně s vývojem této metody probíhaly i práce mých kolegů zaměřené na detekci jiných hormonů. Proto bylo společným cílem rovněž vyvinout jednoduchou univerzální metodu, která by byla použitelná i pro hodnocení stability ostatních vybraných hormonů. Analýza několika hormonů v mobilní fázi o stejném složení významně eliminuje především časovou zátěž a náklady spojené s obměnami mobilních fází (úspora množstvím použitých rozpouštědel, méně odpadu, úspora času spojeného s obměnou).

7.1 Použité chemikálie a pomůcky

Chemikálie:

- Peroxid vodíku 30%, PENTA s.r.o., Česká republika
- Voda čištěná reverzní osmózou
- Acetonitril (Sigma-Aldrich), Izrael
- Gestoden, Evropský lékopisný standard zakoupený od Evropského ředitelství pro jakost léčiv a zdravotnictví (Štrasburk, Francie)

Laboratorní pomůcky:

- Alobal
- Erlenmayerovy baňky
- Filtry nylonové 0,45 μm
- Injekční stříkačky
- Kádinky
- Kapátka
- Kyvety

- Laboratorní lžička
- Mikropipeta a špičky
- Odměrné baňky se zábrusem
- Odměrné válce
- Pipetovací nástavec
- Pipety dělené a nedělené
- Skleněná fritá
- Stojan na zkumavky
- Stříčka
- Zátky (skleněné a plastové)
- Zkumavky

Přístrojové vybavení:

HPLC sestava č.1

- HPLC jednotka: LC – 20 Prominence, SCHIMADZU, Japonsko
- Řídící jednotka: CBM – 20A
- Degaser: DGU – 20A3
- Čerpadlo: LC – 20AD
- Autosampler: SIL – 20AC HT
- Termostat kolony: CTO – 20AC
- Detektor: SPD – 20A
- Chromatografický software: LCSolution v. 1.22 SP1, SCHIMADZU

HPLC sestava č. 2

- HPLC jednotka: LC – 20 Prominence, SCHIMADZU, Japonsko
- Řídící jednotka: CBM – 20A
- Degaser: DGU – 20A3

- Čerpadlo: LC – 20AD
- Autosampler: SIL – 20AC
- Termostat kolony: CTO – 20AC
- Detektor: SPD – 20A
- Chromatografický software: LCSolution v. 1.22 SP1, SCHIMADZU

Kolona:

- SUPELCO INC.
- LiChrospher RP18 5 µm
- 150 mm × 4,6 mm
- Cat No. 54774
- SN: 607071207

Přístroje:

- Laboratorní váhy: SARTORIUS AG GERMANY CPA225D – 0CE
- Světelný zdroj: Newport Corporation, model 60056, řady Q Arch Source, 100 W xenonová bezozónová Arch lampa, model 6257
- Ultrazvuková lázeň: KRAINTEK s.r.o. 941 44 HUL, K – 10

7.2 Vývoj metody pro následné hodnocení stability

Při vývoji metody jsem vycházela ze základních parametrů lékopisné metody pro zkoušky na čistotu. Tato metoda využívá gradientovou reverzní kapalinovou chromatografii s mobilní fází obsahující acetonitril s vodou a stacionární fází obsahující silikagel modifikovaný nepolárními řetězci C8.

Parametry výchozí lékopisné metody (ČL 2017):

Rozměry kolony: délka 150 mm, vnitřní průměr 4,6 mm

Stacionární fáze: sférický silikagel pro chromatografii oktysilylovaný se stíněnými silanolovými skupinami R (3,5 µm)

Mobilní fáze: voda R, acetonitril R1

Parametry gradientu:

Tabulka 1: Parametry gradientu ČL 2017

Čas [min]	Voda [% V/V]	Acetonitril [% V/V]
0-2	62	38
2-20	62 → 58	38 → 42
20-24	58 → 30	42 → 70
24-32	30	70

Zdroj: Český lékopis 2017 [29]

Průtoková rychlost: 1 ml/min

Detekce: spektrofotometrický detektor, 205 nm a 254 nm

Při použití této metody je retenční čas gestodenu (doba, která uplyne od nástřiku vzorku do dosažení maxima píku) přibližně 12,5 minuty. Metoda byla proto dále optimalizována s cílem zkrátit retenční čas a celkovou dobu analýzy a nalézt metodu vhodnou pro širší okruh steroidních hormonů.

Optimalizace chromatografických podmínek:

Při vývoji metody byla kvůli dostupnosti použita kolona se sférickým silikagelem o velikosti částic 5 µm modifikovaným řetězci C18. V porovnání s lékopisnou metodou (C8, 3,5 µm) byl tedy použit jiný typ stacionární reverzní fáze bez odstínění a s větším průměrem částic. Rozměry kolony zůstaly zachovány (délka 150 mm, vnitřní průměr 4,6 mm).

Při vývoji metody byla nejprve zkoumána metoda izokratická, která se ukázala jako metoda vhodná pro širší okruh hormonů a pro účely dalších testů naprosto dostačující. Metoda gradientová proto nebyla dále vyvíjena. Tato metoda navíc umožňuje snížit technické a instrumentální požadavky metody (např. nutnost ekvibrace kolony na počáteční složení mobilní fáze nebo požadavky na přístrojové vybavení).

Poměry složek mobilní fáze byly postupně upravovány ve prospěch acetonitrilu. Nejvýhodnější poměr mobilní fáze byl stanoven jako podíl 45 % vody a 55 % acetonitrilu. Při tomto složení nezasahoval pík hodnoceného gestodenu (RT asi 6,5 minuty) do mrtvého času kolony a zároveň byla tato metoda dostatečně selektivní (více viz kapitola Selektivita).

Průtoková rychlost (1 ml/min) a volba spektrofotometrického detektoru o vlnové délce 254 nm zůstala oproti lékopisné metodice nezměněna.

Výsledná optimalizovaná metoda zkrátila o polovinu retenční čas gestodenu oproti lékopisné metodě.

Parametry vyvinuté metody:

Rozměry kolony: délka 150 mm, vnitřní průměr 4,6 mm

Stacionární fáze: sférický silikagel pro chromatografii oktadecylsilylovaný R (5 µm)

Mobilní fáze: voda R, acetonitril R1

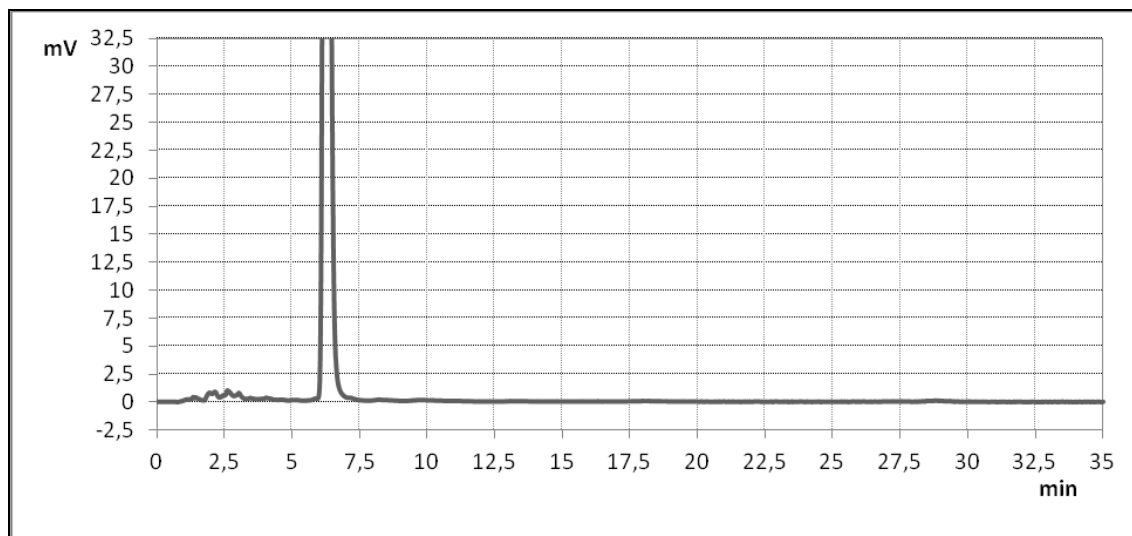
Eluce: izokratická, 45 % vody + 55 % acetonitrilu

Průtoková rychlost: 1 ml/min

Detekce: spektrofotometrický detektor, 254 nm a 205 nm

Chromatogramy byly získávány při obou vlnových délkách, což nám umožnilo kontrolu nad tím, zda je metoda dostatečně selektivní. Výhoda vyšší odezvy detektoru při vlnové délce 205 nm byla ovšem degradována výrazně vyšším šumem, a proto byla pro další měření využita vlnová délka 254 nm.

Chromatogram vyvinuté metody zachycuje následující obrázek:



Obrázek 3: Chromatogram (GSD + H₂O + ACN)
Zdroj: vlastní zpracování

7.2.1 Validace metody

Vyvinutá metoda byla dále testována v souladu s normou ČSN EN ISO/IEC 17025 – Posuzování shody – Všeobecné požadavky na způsobilost zkušebních a kalibračních laboratoří a se směrnicí ICH pro validaci analytických metod. [30], [31] Cílem validace je ověření, že je daná metoda vhodná pro zamýšlený účel. Specifikuje rovněž podmínky, za kterých je daný postup použitelný, a zajišťuje stejnou spolehlivost při opakovaném využití v různých laboratořích. [28]

Při vývoji nové metody je třeba v souladu se směrnicí ICH ověřit následující parametry metody:

- selektivita (specificity),
- linearita (linearity),
- rozsah (range),
- správnost (accuracy),
- přesnost (precision),
- detekční limit (limit of detection, zkráceně „LOD“),
- kvantitativní limit (limit of quantification, zkráceně „LOQ“),

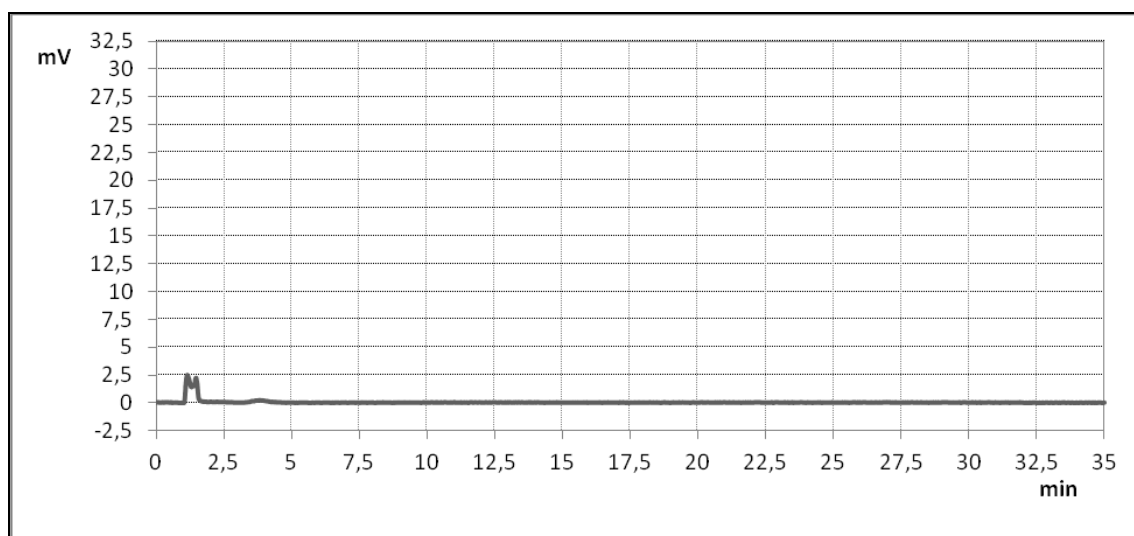
- robustnost (robustness) a
- test způsobilosti (system suitability testing).

Vyhodnocením těchto předepsaných parametrů se věnují následující podkapitoly.

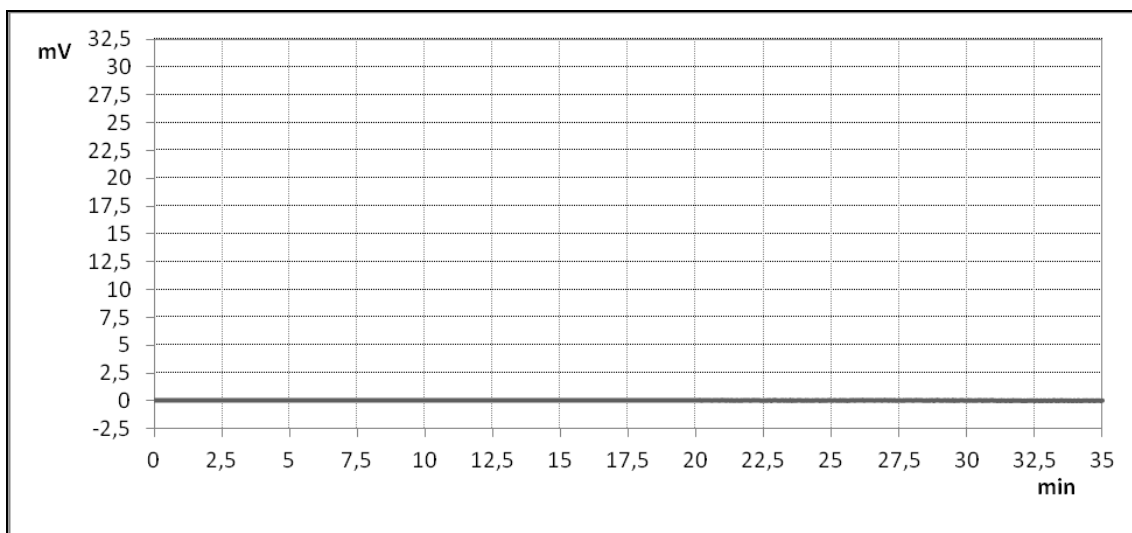
7.2.1.1 Selektivita

Selektivita metody spočívá v její schopnosti správně změřit vybranou látku v přítomnosti jiných látek, které lze v její přítomnosti očekávat (další účinné a pomocné látky, nečistoty z výroby, rozkladné produkty, zbytková rozpouštědla apod.). Postup prokázání selektivity závisí na zamýšleném cíli validované metody a většinou probíhá současně s ostatními testy, např. během stanovení nečistot. [25], [28], [30]

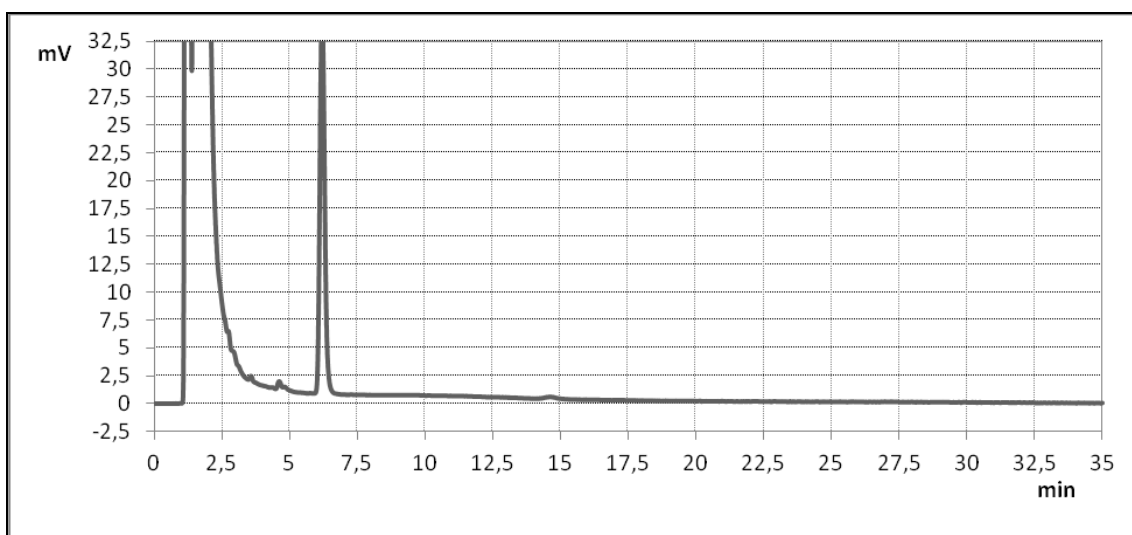
Selektivita vyvinuté metody byla hodnocena porovnáním chromatogramu roztoku obsahujícím analyzovaný hormon s chromatogramy rozpouštědel vyskytujících se ve zkoušeném roztoku při hodnocení stability hormonu (voda, acetonitril, peroxid). Chromatogramy vybraných látek zachycují následující grafy:



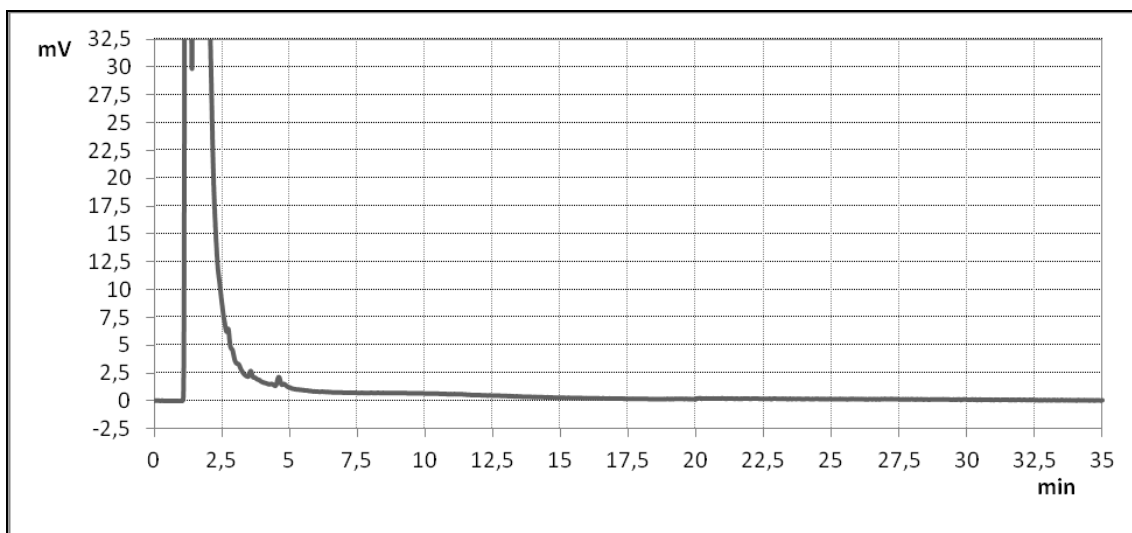
Obrázek 4: Chromatogram acetonitrilu
Zdroj: vlastní zpracování



Obrázek 5: Chromatogram vody
Zdroj: vlastní zpracování



Obrázek 6: Chromatogram vzorku (GSD + ACN + H₂O) s přidaným peroxidem vodíku
Zdroj: vlastní zpracování



Obrázek 7: Chromatogram peroxidu vodíku

Zdroj: vlastní zpracování

Závěr: Provedené porovnání chromatogramů prokázalo dostatečnou selektivitu metody pro stanovení gestodenu. Píky gestodenu se nepřekrývají s píky rozpouštědel a zkoumadel, které se vyskytují v hodnoceném roztoku.

7.2.1.2 Linearita a rozsah

Linearita analytické metody je její schopnost poskytovat výsledky testů, které jsou přímo úměrné koncentraci hodnoceného analytu ve vzorku. V praxi se linearita určuje obvykle z výsledků při pěti a více různých koncentracích roztoků standardů obvykle v rozmezí 50 – 150 % deklarovaného obsahu. Rozsah určuje rozmezí mezi horní a dolní koncentrací analytu, pro které je prokázána přesnost, správnost a linearita. [28], [30], [32]

Pro stanovení linearity bylo použito celkem 5 koncentrací roztoků, které byly připraveny naředěním roztoku standardu gestodenu o koncentraci 0,1 mg/ml (do 10,0ml odměrné baňky bylo naváženo 0,00100 g gestodenu a doplněno acetonitrilem po rysku).

Gestoden je ve vodě prakticky nerozpustný. Vzorky pro stabilitní testování ve vodě byly připravovány jen ve velmi přibližných koncentracích, takže pro zjištění horního bodu rozsahu bylo nejprve nutno pomocí standardního roztoku (gestodenu) v acetonitrilu zjistit dosažené maximální koncentrace ve vodných roztocích. Horní bod rozsahu a tedy i kalibrační přímky byl určen jako 0,01 mg/ml a byl připraven ředěním acetonitrilového standardu (0,1 mg/ml) roven 1:10.

Vzorek č. 1: 500 µl standardu doplnit vodou do 5,0 ml (100%)

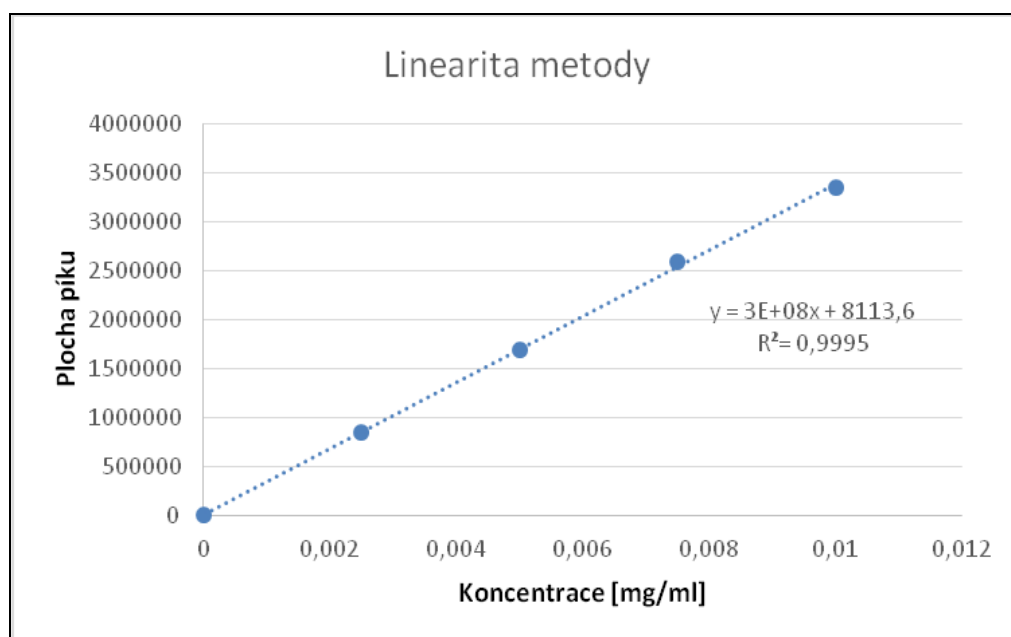
Vzorek č. 2: 375 µl standardu doplnit vodou do 5,0 ml (75%)

Vzorek č. 3: 250 µl standardu doplnit vodou do 5,0 ml (50%)

Vzorek č. 4: 125 µl standardu doplnit vodou do 5,0 ml (25%)

Vzorek č.5: Ke 100 µl ze vzorku č. 1 se přidá 900 µl vody. 100 µl z tohoto roztoku se doplní vodou do 10,0 ml

Výsledky měření zachycuje následující graf:



Obrázek 8: Linearita metody

Zdroj: vlastní zpracování

Závěr: Kalibrační křivka získaná porovnáním hodnoceného standardu na pěti koncentračních úrovních prokázala dostatečnou linearitu metody s koeficientem korelace $R = 0,9997$, jenž indikuje téměř přímou úměrnost.

7.2.1.3 Správnost

Účelem testů správnosti je prokázat, že získaný výsledek je v souladu s konvenčně uznávanými hodnotami nebo referenčními hodnotami. V praxi je možné využít například porovnání s jinými nezávislými metodami s ověřenou správností nebo porovnáním se vzorkem se známým přídatkem standardu. Správnost je následně vyjádřena jako odchylka získané hodnoty od správné hodnoty nebo jako tzv. výtěžnost (recovery), která udává poměr stanovené hodnoty a skutečné hodnoty. [25], [28]

Jelikož určení správnosti lze v našem případě považovat za nepotřebné, bylo po dohodě s vedoucím práce vynecháno.

7.2.1.4 Přesnost

Přesnost vyjadřuje míru shody mezi jednotlivými výsledky metody opakované s homogenním vzorkem. ICH rozlišuje 3 úrovně přesnosti:

- opakovatelnost (angl. repeatability) – metoda opakována jedním pracovníkem stejným způsobem a na totožném přístroji,
- mezilehlá přesnost (angl. intermediate precision) – stejný homogenizovaný vzorek je analyzován ve jedné laboratoři různými analytiky, přístroji nebo s různými činidly,
- reprodukovatelnost (angl. reproducibility) – metoda opakována v různých laboratořích. [28], [30]

Přesnost metody byla pro účely validace naší metody hodnocena pouze na úrovni opakovatelnosti. Opakovatelnost metody byla ověřena analýzou šesti nezávisle připravených homogenizovaných pracovních vzorků.

Příprava vzorků:

Do 50,0ml odměrné baňky bylo naváženo přibližně 1,58 mg gestodenu a doplněno vodou po rysku. Roztok byl rozpouštěn po dobu 15 minut v ultrazvukové lázni a následně přefiltrován přes nylonový filtr o velikosti pórů 0,45 μm . 45 ml tohoto filtrátu bylo odebráno a naředěno v poměru 1:1 s vodou. Z takto připraveného roztoku bylo postupně odebráno po 15,0 ml do každé z šesti Erlenmayerových baněk a přidáno 15,0 ml vody. Každý takto připravený roztok byl řádně promíchán a odebrán 1,0 ml do vialky.

Výsledky testu (směrodatnou odchylku (SD) a relativní směrodatnou odchylku měření (RSD)) zachycuje následující tabulka:

Tabulka 2: Směrodatná odchylka měření

Vzorek č.	Plocha píku
1	582891
2	587532
3	583689
4	583215
5	581027
6	583723
Průměr	583680
SD	1946
RSD	0,33 %

Zdroj: vlastní výpočty

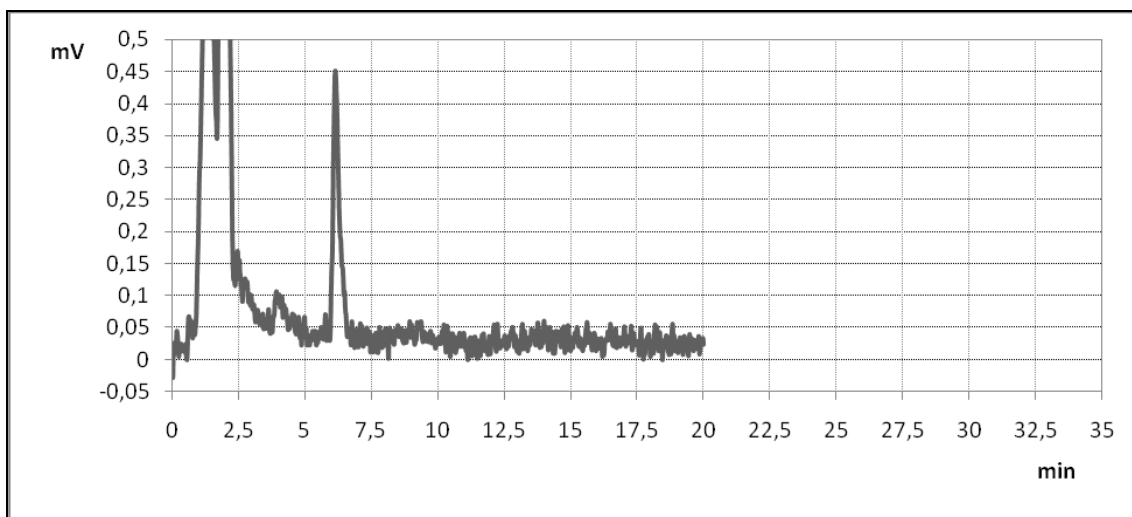
Závěr: Relativní směrodatná odchylka měření je pouze 0,33 % což indikuje velmi dobrou opakovatelnost a v důsledku toho i přesnost metody.

7.2.1.5 Detekční a kvantitativní limit

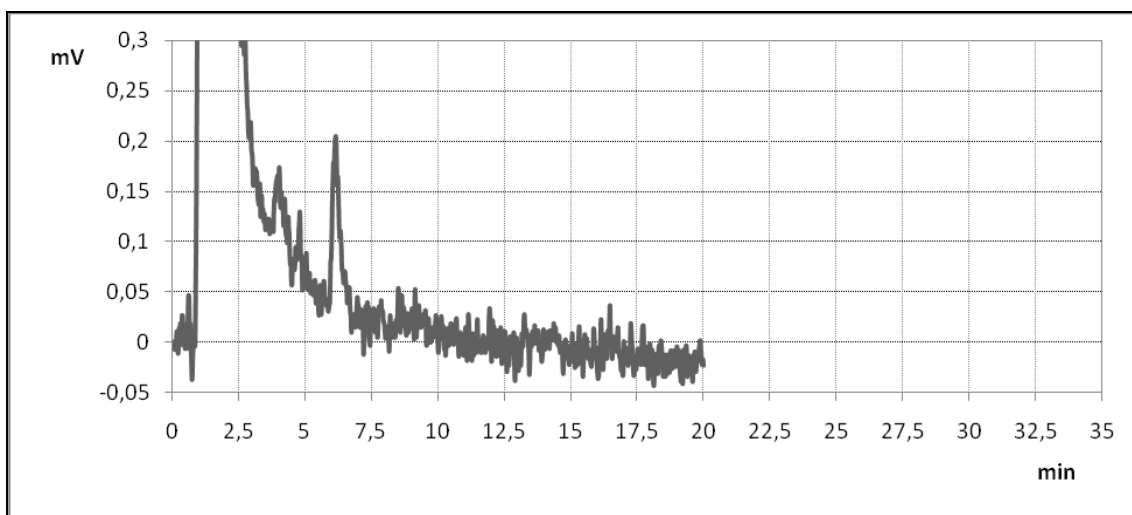
Detekční a kvantitativní limit vyjadřují tzv. citlivost metody. Limit detekce (LOD) představuje nejnižší detekovatelnou koncentraci analytu, limit kvantifikace (LOQ) je nejnižší koncentrace analytu stanovitelná s dostatečnou přesností a správností.

Detekční a kvantitativní limit lze určit například determinací poměru signálu k šumu nebo na základě směrodatné odchylky a sklonu kalibrační křivky. [30]

Limit detekce byl určen dle doporučení ICH směrnice jako poměr signálu k šumu s hodnotou rovnou 3, limit kvantifikace jako poměr signálu k šumu s hodnotou 10. Nejnižší vypočítaná detekovatelná koncentrace analytu získaná výpočtem je $5,4 \times 10^{-6}$ mg/ml. Nejnižší koncentrace stanovitelná s dostatečnou přesností a správností je $1,8 \times 10^{-5}$ mg/ml.



Obrázek 9: Chromatogram pro stanovení limitu kvantifikace ($1,8 \times 10^{-5}$ mg/ml)
Zdroj: vlastní zpracování



Obrázek 10: Chromatogram pro stanovení limitu detekce ($5,4 \times 10^{-6}$ mg/ml)
Zdroj: vlastní zpracování

Závěr: Limit detekce a kvantifikace byl stanoven metodou výpočtu z poměru signálu k šumu. Hodnota limitu detekce je $5,4 \times 10^{-6}$ mg/ml a limitu kvantifikace $1,8 \times 10^{-5}$ mg/ml.

7.2.1.6 Robustnost

Robustnost analytické metody vyjadřuje vliv různých proměnných na její výsledky. Výsledkem posouzení robustnosti je informace o parametrech, které jsou pro hodnocenou metodu kritické.

Závěr: Robustnost byla hodnocena v průběhu vývoje metody. Metoda je velmi robustní, malé změny ve složení mobilní fáze a rychlosti průtoku neovlivňují negativně separaci ani získané výsledky.

7.2.1.7 Test způsobilosti

Nedílnou součástí metody je i test způsobilosti systému, který slouží k zajištění účinnosti a separační způsobilosti chromatografického systému. Test způsobilosti by se měl vyhodnotit při každém použití metody, zejména však před každou změnou chromatografu nebo testováním v jiné laboratoři. V rámci testů způsobilosti lze ověřovat celou řadu parametrů a faktorů dle typu metody, normativních požadavků nebo požadavků vybrané laboratoře. V praxi se nejčastěji ověřují například následující chromatografické parametry: opakovatelnost, rozlišení, faktor symetrie píku, relativní retence nebo poměr signálu k šumu.

Pro účely našich testů byla způsobilost systému hodnocena na úrovni následujících parametrů:

- Opakovatelnost nástřiku – relativní směrodatná odchylka měření ($\leq 2,0\%$)
- Faktor symetrie píku – 1,1 (doporučená hranice dle ČL 2017: $T = 0,8 - 1,5$)
- Retenční čas - R_T (6,5 – 7 min)

Závěr: Testy chromatografického systému hodnocené na úrovni vybraných parametrů prokázaly jeho způsobilost k hodnocení validované metody.

7.3 Hodnocení stability gestodenu

V diplomové práci byl použit Model přírodní degradace residuí léčiv v povrchových vodách, vytvořený prof. RNDr. Jiřím Klimešem, CSc.. [33] Originálnost tohoto modelu spočívá ve využití unifikovaného testovacího systému, využívajícího vybraných ICH parametrů pro zátěžové zkoušky léčiv při stabilitních testech (teplo, světlo, oxidaci), umožňující vypočítat rychlost degradace studovaných léčiv ve vzorcích sladké i mořské vody. Tento jednotný testovací systém umožní na modelových vzorcích určit, jak rychle se budou molekuly léčiv rozkládat, zjistit rozdíly v rychlosti jejich degradace a odhalit pomalu degradovatelná léčiva, která se budou v povrchových vodách hromadit. [34]

Stabilita molekuly gestodenu byla pozorována ve dvou experimentech prováděných ve vodném prostředí.

7.3.1 Hodnocení stability ve vodném prostředí (experiment č. 1)

7.3.1.1 Příprava vzorků pro experiment č. 1

Příprava roztoku: Do 50,0ml odměrné baňky bylo naváženo přibližně 1,54 mg gestodenu a doplněno vodou po rysku. Roztok byl rozpouštěn po dobu 15 minut v ultrazvukové lázni a následně přefiltrován přes nylonový filtr o velikosti pórů 0,45 μm . 30,0 ml tohoto filtrátu bylo odebráno a naředěno v poměru 1:1 s vodou. Výsledný roztok byl rozdělen do čtyř vzorků.

Vzorky č. 1 – 3: Do tří Erlenmayerových baněk se zábrusem bylo odebráno po 10,0 ml roztoku a uzavřeno zátkou. Vzorek č. 1 byl ponechán v temnu při laboratorní teplotě 24 °C. Vzorky č. 2 a č. 3 byly zahřívány v elektrické sušárně při teplotě 50 °C a 80 °C.

Vzorek č. 4: 3,5 ml roztoku bylo umístěno do křemenné kyvety, jež byla uzavřena plastovou zátkou, která ovšem neumožňuje úplně těsné uzavření. Vzorek byl ozařován kolmo ke stěně kyvety ve vzdálenosti přibližně 20 cm světelným paprskem o intenzitě 11 000 LUX.

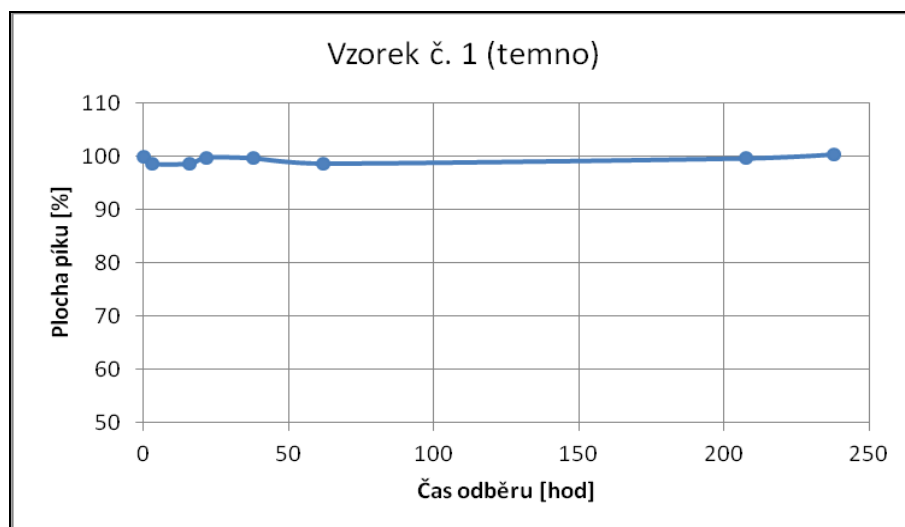
Experiment probíhal v puštěné digestoři, proud vzduchu tedy ochlazoval kyvetu, aby nedocházelo vlivem silného ozařování k nadměrnému zvýšení teploty, která v průběhu pokusu nepřekročila 26°C. Kyveta byla na začátku pokusu zvážena a před každým odběrem doplněna odpařeným úbytkem vody. Po doplnění vody byl roztok promíchán a odebrán vzorek.

Vzorky č. 1 – 3 byly odebírány ve vybraných intervalech v objemu 1,0 ml do vialky a následně vyhodnocovány s pomocí vyvinuté HPLC metody. Vzorek č. 4 byl odebírán v objemu 0,5 ml.

7.3.1.2 Výsledky experimentu č. 1

Vzorek č. 1:

Výsledky experimentu pro vzorek č.1, který byl ponechán v temnu při laboratorní teplotě zachycuje následující graf:



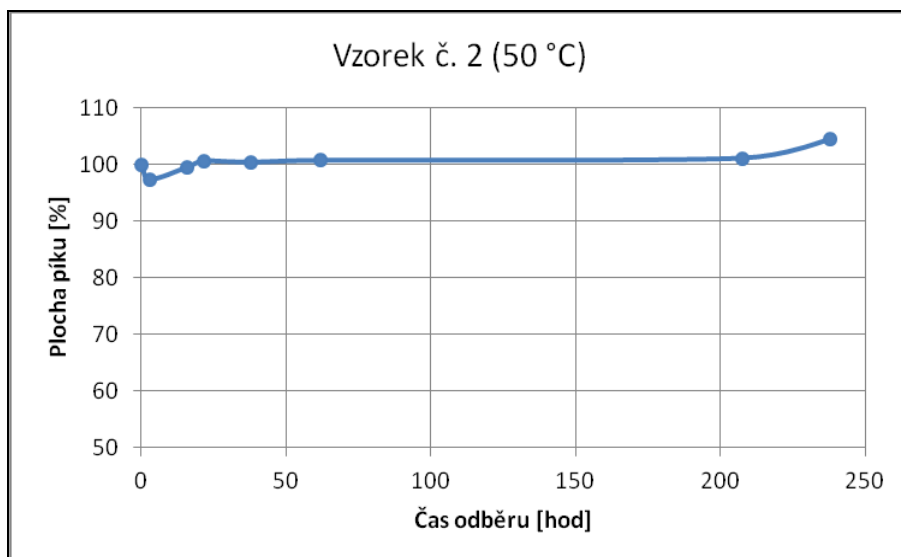
Obrázek 11: Vzorek č. 1 (vodné prostředí, temno)

Zdroj: vlastní zpracování

Závěr: Roztok gestodenu skladovaný v temnu při laboratorní teplotě nevykazoval v průběhu měření téměř žádné změny.

Vzorek č. 2:

Výsledky experimentu pro vzorek č. 2, který byl zahříván v elektrické sušárně při teplotě 50 °C zachycuje následující graf:



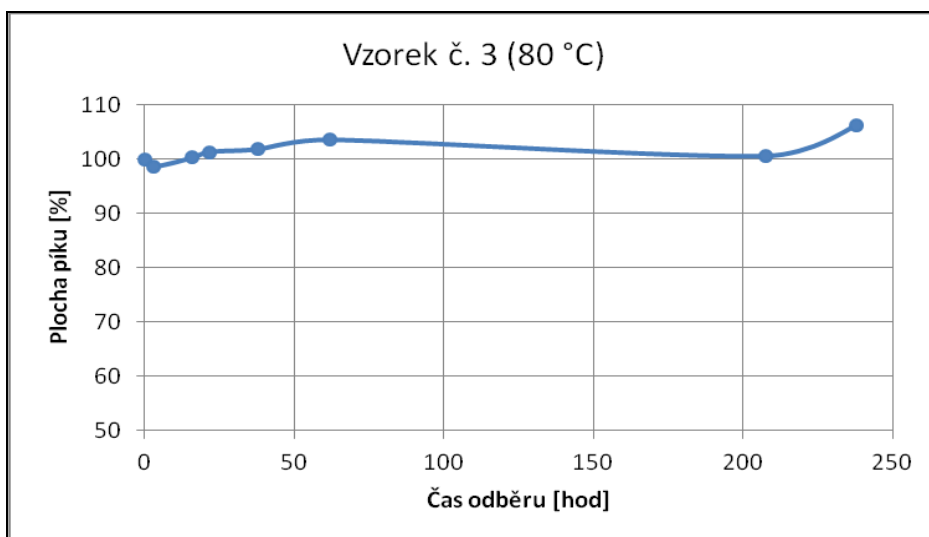
Obrázek 12: Vzorek č. 2 (vodné prostředí, 50 °C)

Zdroj: vlastní zpracování

Závěr: Roztok gestodenu skladovaný při teplotě 50 °C nevykazoval v průběhu měření téměř žádné změny. I přes zábrusový uzávěr pravděpodobně v důsledku odpařování vody ze vzorku docházelo s přibývajícím časem k mírnému zkoncentrování vzorku, který se projevil ve výsledcích měření.

Vzorek č. 3:

Výsledky experimentu pro vzorek č. 2, který byl zahříván v elektrické sušárně v temnu při teplotě 80 °C zachycuje následující graf:



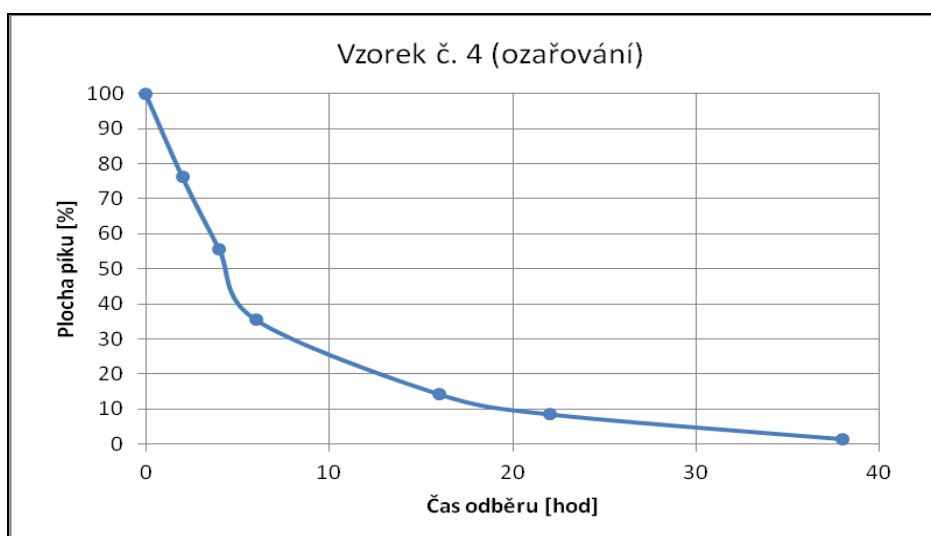
Obrázek 13: Vzorek č. 3 (vodné prostředí, 80 °C)

Zdroj: vlastní zpracování

Závěr: Roztok gestodenu skladovaný při teplotě 80 °C v temnu nevykazoval v průběhu měření téměř žádné změny. I přes zábrusový uzávěr pravděpodobně v důsledku odpařování vody ze vzorku docházelo s přibývajícím časem k mírnému zkoncentrování vzorku, který ovlivnil výsledky měření. Toto zkoncentrování bylo výraznější ke konci pokusu, kdy už zbýval v Erlenmayerově baňce menší objem roztoku.

Vzorek č. 4:

Vzorek č. 4 byl ozařován kolmo světleným paprskem o intenzitě 11 000 LUX. Výsledky experimentu zachycuje následující graf:



Obrázek 14: Vzorek č. 4 (vodné prostředí, ozařování)

Zdroj: vlastní zpracování

Závěr: Světelný paprsek významně urychluje degradaci molekuly gestodenu ve vodném roztoku. K úplnému rozkladu došlo přibližně po 40 hodinách, kdy již nebyl detekován žádný pík.

7.3.2 Hodnocení stability v přítomnosti oxidačního činidla (experiment č. 2)

7.3.2.1 Příprava vzorků pro experiment č. 2

Příprava vzorku: Do 20,0ml odměrné baňky bylo naváženo přibližně 0,63 mg gestodenu a doplněno vodou po rysku. Roztok byl rozpouštěn po dobu 15 minut v ultrazvukové lázni a následně přefiltrován přes nylonový filtr o velikosti pórů 0,45 µm. 10,0 ml tohoto filtrátu bylo odebráno a naředěno v poměru 1:1 s vodou. Z takto připraveného roztoku bylo odebráno 15,0 ml a přidáno 15,0 ml 6% peroxidu vodíku (konečná koncentrace – 3% peroxid vodíku).

Vzorek č. 5 – 6: Do dvou Erlenmayerových baněk se zábrusem bylo odebráno po 10,0 ml roztoku a uzavřeno zátkou. Vzorek č. 5 byl ponechán v temnu při laboratorní teplotě 24 °C. Vzorek č. 6 byl zahříván v elektrické sušárně v temnu při teplotě 50 °C.

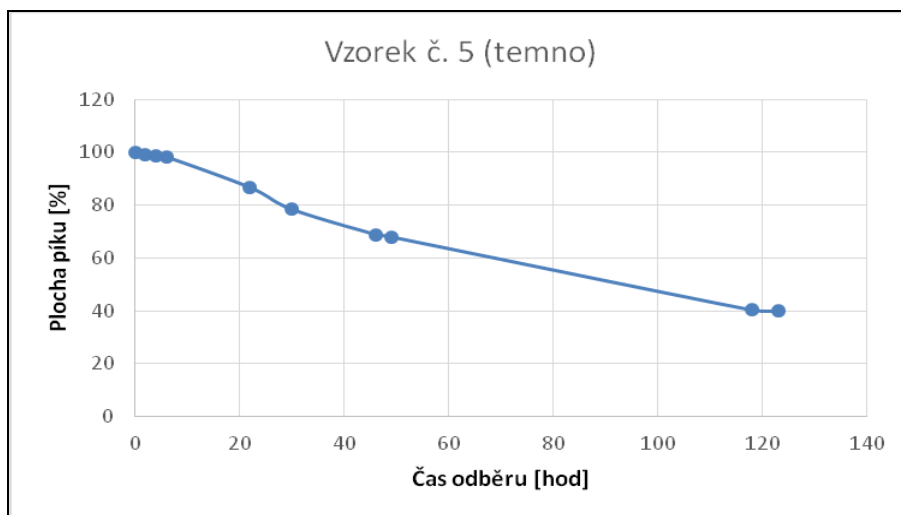
Vzorek č. 7: Abychom se více přiblížili přírodním podmínkám, byl vzorek č. 7 umístěn do zkumavky s plochým dnem a ozařován z vrchu světelným paprskem o intenzitě 11 000 LUX. Zkumavka byla na začátku pokusu zvážena a před každým odběrem doplněna odpařeným úbytkem vody. Po doplnění vody byl roztok promíchán a odebrán vzorek.

Vzorky byly odebírány ve vybraných intervalech v objemu 1,0 ml do vialky a následně vyhodnocovány s pomocí vyvinuté HPLC metody.

7.3.2.2 Výsledky experimentu č. 2

Vzorek č. 5:

Výsledky experimentu pro vzorek č. 5, který byl ponechán v temnu při laboratorní teplotě zachycuje následující graf:



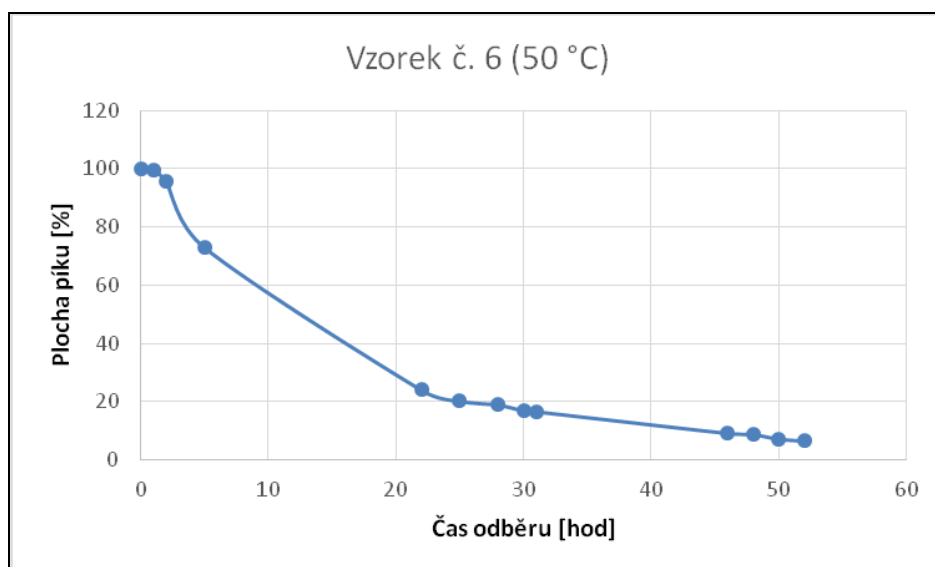
Obrázek 15: Vzorek č. 5 (peroxid vodíku, temno)

Zdroj: vlastní zpracování

Závěr: Gestoden v 3% roztoku peroxidu vodíku skladovaný v temnu při laboratorní teplotě byl na rozdíl od čistě vodného prostředí v průběhu času postupně degradován. Po 120 hodinách došlo v roztoku k poklesu jeho množství na 32 % původní koncentrace.

Vzorek č. 6:

Výsledky experimentu pro vzorek č. 6, který byl zahříván v temnu v elektrické sušárně při teplotě 50 °C zachycuje následující graf:



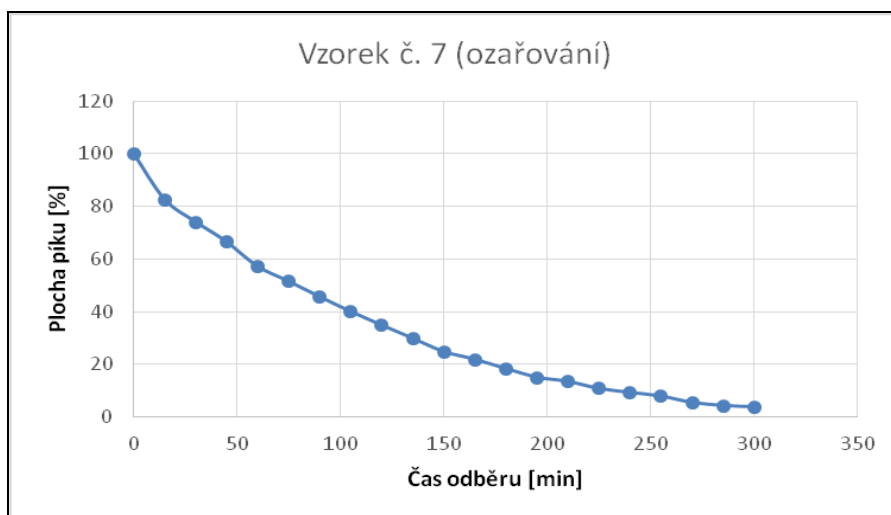
Obrázek 16: Vzorek č. 6 (peroxid vodíku, 50°C)

Zdroj: vlastní zpracování

Závěr: Z grafu je patrné, že molekula gestodenu v 3% roztoku peroxidu vodíku na rozdíl od vodného prostředí velmi rychle degraduje. Po 118 hodinách dochází k téměř úplné degradaci.

Vzorek č. 7:

Vzorek č.3, který byl ozařován svisle světleným paprskem o intenzitě 11 000 LUX. Vzorky byly odebírány po 15 minutách. Výsledky experimentu zachycuje následující graf:



Obrázek 17: Vzorek č. 7 (peroxid vodíku, ozařování)
Zdroj: vlastní zpracování

Závěr: Z grafu je patrné, že světelný paprsek výrazně potencuje účinek roztoku 3% peroxidu vodíku. Již za 5 hodin byla molekula gestodenu téměř plně degradována.

V průběhu všech tří měření s peroxidem byly při hodnocení koncentrace gestodenu identifikovány píky rozkladných produktů, které se vylučovaly v delším retenčním čase.

8. VÝSLEDKY A DISKUZE

Cílem této práce bylo hodnocení stability gestodenu za vybraných přírodních podmínek.

V první části experimentální práce byla vyvíjena vhodná metoda pro jeho následnou detekci ve zkoumaných vzorcích. Při vývoji metody jsem vycházela z lékopisné metody, která byla dále optimalizována s cílem nalézt metodu vhodnou pro širší okruh steroidních hormonů, zkrátit retenční čas a celkovou dobu analýzy.

Jako mobilní fáze byl zvolen acetonitril s vodou v poměru 55:45. Acetonitril jako součást mobilní fáze využívá ve své metodě v kombinaci s kyselinou orthofosforečnou i Kishore, K. et al. (více viz kapitola 6.2.6.). [18] Na rozdíl od lékopisné metody bývá v dostupných vědeckých publikacích často využívána jako mobilní fáze i kombinace methanolu s vodou (viz např. publikace Laban et al., Matějčíček et al. uvedené v kapitole 6.2.6). [16], [17]

Publikované metody nejčastěji využívají gradientovou eluci, která umožňuje rychleji stanovit nejen parentní léčivo, ale i jeho nečistoty. Tato diplomová práce se zaměřuje jen na měření koncentrací léčiva a jednotlivé nečistoty není třeba kvantifikovat, postačovala proto metoda izokratická, která se ukázala pro účely dalších testů jako naprosto dostačující. Vyvinutá metoda splnila všechny validační požadavky, navíc zkrátila retenční čas gestodenu oproti výchozí lékopisné metodě o polovinu.

Původní vyvinutá metoda trvala při pokusech v čistě vodném prostředí pouze 20 minut. Žádné píky neinterferovaly až do doby, kdy byly prováděny experimenty v prostředí s přídavkem oxidačního činidla, kdy se ovšem ukázalo, že se s poměrně dlouhým retenčním časem objevuje pík pravděpodobně rozkladného produktu. Proto musel být celkový čas analýzy pro účely těchto experimentů prodloužen na 35 minut, aby nedošlo k interferenci při dalším nástřiku.

Parametry vyvinuté metody:

Rozměry kolony: délka 150 mm, vnitřní průměr 4,6 mm

Stacionární fáze: sférický silikagel pro chromatografii oktadecylsilylovaný R (5 µm)

Mobilní fáze: voda R, acetonitril R1

Eluce: izokratická, 45 % vody + 55 % acetonitrilu

Průtoková rychlost: 1 ml/min

Detekce: spektrofotometrický detektor, 254 nm a 205 nm

Stabilita gestodenu byla v další části práce hodnocena s využitím vyvinuté metody za podmínek, které simulují přírodní podmínky v povrchových vodách (teplo, světlo, oxidace). Stabilita jeho molekuly byla pozorována ve dvou experimentech prováděných ve čistě vodném prostředí (experiment č.1) a v prostředí s přidavkem oxidačního činidla (experiment č. 2).

V prvním experimentu byl vzorek ponechán v temnu při laboratorní teplotě, zahříván při teplotě 50 °C a 80 °C a ozařován světelným paprskem o intenzitě 11 000 LUX. Vlivem působení tepla v temnu nedošlo v průběhu měření téměř k žádným změnám. Působením světelného záření byla degradace molekuly gestodenu významně urychlena a k jejímu úplnému rozkladu došlo po 40 hodinách.

Druhý experiment byl hodnocen v prostředí 3% peroxidu vodíku. Na rozdíl od vodného prostředí byla molekula gestodenu v průběhu času postupně degradována. V temnu při laboratorní teplotě došlo po 120 hodinách k jeho poklesu na 32 % původní koncentrace. Za stejnou dobu byla molekula gestodenu vystavená působení 50 °C v temnu již zcela degradována. Ozařování světelným paprskem o intenzitě 11 000 LUX výrazně potencovalo účinek oxidačního činidla a již za 5 hodin nebyl detekován žádný pík.

Z výsledků výše uvedených testů je patrné, že gestoden je ve vodě a v temnu velmi stálá látka a v nepřítomnosti oxidačního činidla (peroxidu vodíku) je jeho degradace minimální. Předpokládáme tedy, že v hluboké vodě, kam neproniká světlo a kde je chlad, bude molekula perzistovat velmi dlouho.

Peroxid vodíku velmi výrazně zrychluje rozklad gestodenu a tento rozklad je ještě potencován teplotou. K rozložení na poloviční množství je potřeba asi 7 × kratší čas než v prostředí čisté vody. Příznivý vliv přítomnosti oxidačního činidla na degradaci gestodenu potvrzuje i studie mexických vědců [20], kteří zkoumali jeho stabilitu při anodické oxidaci (více viz kapitola 2.6.2.).

Světlo podobně jako peroxid způsobí urychlení rozkladu. Kombinace peroxidu se světlem je pro degradaci gestodenu nejúčinnější. Oproti vzorku ponechaném v peroxidu v temnu byla jeho degradace 25 × rychlejší.

Pokud tyto poznatky aplikujeme na přírodní podmínky, tak předpokládáme daleko rychlejší degradaci v mělké, prohřáté a dostatečně osluněné vodě nebo v mělké proudící, osluněné a dobře prokysličené vodě.

9. ZÁVĚR

Význam vývoje metod pro detekci a hodnocení stability steroidních hormonů se v posledních letech ve světle rostoucího znečištění životního prostředí endokrinními disruptory dostává do popředí vědeckého zájmu. Hodnocení stability steroidních hormonů v přírodních podmínkách je klíčovým prvkem pro další vědecké výzkumy, které se snaží popsat jejich chování a nalézt metody urychlení jejich degradace.

Cílem práce byl vývoj a validace metody a následné hodnocení stability gestodenu. Jeho popularita díky jeho příznivým vlastnostem roste a ve zvýšené míře se tak jako součást hormonálních kontraceptiv objevuje v povrchových vodách.

V teoretické části této práce byly popsány základní vlastnosti tohoto syntetického hormonu a dostupné vědecké publikace, které se věnují hledání metod jeho detekce, hodnocení stability za vybraných podmínek a způsobům jeho degradace. Součástí teoretické části jsou i základní teoretická východiska vysokoúčinné kapalinové chromatografie, která je využívána v experimentální části práce.

Při vývoji HPLC metody pro hodnocení stability gestodenu byly jako výchozí parametry použity parametry lékopisné metody pro hodnocení čistoty. Chromatografické podmínky byly dále optimalizovány s cílem získat metodu, která sníží časovou zátěž a bude vhodná pro širší okruh steroidních hormonů. Vyvinutá izokratická metoda zkrátila retenční čas gestodenu o polovinu aniž by zasahovala do mrtvého času kolony a eliminovala náklady původní lékopisné metody spojené s obměnami mobilních fází při gradientové eluci. Metoda vyhověla všem předepsaným validačním požadavkům.

Vyvinutá metoda byla využita pro hodnocení stability při působení přírodních podmínek (teplo, světlo a oxidace). Stabilita molekuly gestodenu byla pozorována ve dvou experimentech prováděných ve vodném prostředí (experiment č.1) a prostředí s přídavkem oxidačního činidla (experiment č. 2).

První vzorek byl ponechán v temnu při laboratorní teplotě, zahříván při teplotě 50 °C a 80 °C a ozařován světelným paprskem o intenzitě 11 000 LUX. Experimenty prokázaly, že gestoden je ve vodě a v temnu velmi stálá látka a v nepřítomnosti oxidačního činidla (peroxidu vodíku) je jeho degradace minimální. Peroxid vodíku velmi výrazně urychluje rozklad gestodenu a tento rozklad je ještě potencován teplotou. K rozložení na poloviční množství je potřeba asi 7 × kratší čas než ve vodném prostředí.

Světlo podobně jako peroxid způsobí urychlení rozkladu. Kombinace peroxidu se světlem je pro degradaci gestodenu nejúčinnější. Oproti vzorku, který byl ponechán v peroxidu v temnu, byla jeho degradace 25 × rychlejší.

Výsledky potvrdily, že stabilita molekuly gestodenu ve vodném prostředí je závislá na různorodých fyzikálně-chemických vlastnostech prostředí, ve kterém se vyskytuje. Významným prvkem při degradaci gestodenu je působení světelného záření a oxidace. Množství gestodenu bude tedy nižší v okysličených rychle tekoucích vodách v letním období, zatímco jeho koncentrace bude vyšší v zimních měsících a pomalu tekoucích neokysličených vodách.

10. SEZNAM TABULEK

Tabulka 1: Parametry gradientu ČL 2017.....	33
Tabulka 2: Směrodatná odchylka měření	41

11. SEZNAM OBRÁZKŮ A GRAFŮ

Obrázek 1: Strukturální vzorec gestodenu	14
Obrázek 2: Schéma kapalinového chromatografu	23
Obrázek 3: Průběh chromatogramu (GSD + H ₂ O + ACN)	35
Obrázek 4: Chromatogram acetonitrilu	36
Obrázek 5: Chromatogram vody	37
Obrázek 6: Chromatogram vzorku (GSD+H ₂ O+ACN) s přidaným peroxidem vodíku	37
Obrázek 7: Chromatogram peroxidu vodíku	38
Obrázek 8: Linearita metody	39
Obrázek 9: Chromatogram pro stanovení limitu kvantifikace ($1,8 \times 10^{-5}$ mg/ml)	42
Obrázek 10: Chromatogram pro stanovení limitu detekce ($5,4 \times 10^{-6}$ mg/ml)	42
Obrázek 11: Vzorek č. 1 (vodné prostředí, temno)	45
Obrázek 12: Vzorek č. 2 (vodné prostředí, 50 °C)	46
Obrázek 13: Vzorek č. 3 (vodné prostředí, 80 °C)	46
Obrázek 14: Vzorek č. 4 (vodné prostředí, ozařování)	47
Obrázek 15: Vzorek č. 5 (peroxid vodíku, temno)	49
Obrázek 16: Vzorek č. 6 (peroxid vodíku, 50°C)	49
Obrázek 17: Vzorek č. 7 (peroxid vodíku, ozařování)	50

12. POUŽITÁ LITERATURA

- [1] FANTA, Michael. Kontraceptiva v gynekologické praxi. *Klinická farmakologie a farmacie*. SOLEN MEDICAL EDUCATION, 2008, **22**(4), 149-152.
- [2] BOROEVANSKÝ, Alois a Jozef CSÖLLEI. Farmaceutická chemie: farmakochemie). Brno: Veterinární a farmaceutická univerzita, 2007. ISBN 978-80-7305-013-9.
- [3] ČEPICKÁ LÍBALOVÁ, Zuzana. Přehled kontraceptiv, jejich indikace a kontraindikace. *Lékařské listy*, 2006, **55**(16), 3-11.
- [4] UNZEITIG, Vít. Aktivita hormonů a jejich vliv na organismus uživatelek kombinované orální kontracepce (COC). *Moderní gynekologie a porodnictví*, 2005, **14**(1), 3-10. ISSN: 1211-1058.
- [5] ČEPICKÝ, Pavel. *Úvod do antikoncepce pro lékaře negynekology*. Praha: Levret, 2002. ISBN 80-903183-0-4.
- [6] EDITED BY BENNO RUNNEBAUM, Thomas RABE a Ludwig KIESEL. *Female Contraception Update and Trends*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 1988. ISBN 9783642737909.
- [7] European Pharmacopoeia, 8th edition 2013, english Subscription to Main volume + Supplement 1 + Supplement 2. 8. Aufl. Stuttgart: Deutscher Apotheker Verlag, 2013. ISBN 9783769260991.
- [8] Gestodene. *National Center for Biotechnology Information: PubChem Compound Database* [online]. [cit. 2018-01-15]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/gestodene>
- [9] CIBULA, D. Farmakologie progestinů používaných v preparátech perorální hormonální antikoncepce. *Česká gynekologie*. 2000, **65**(1), 20-27.
- [10] Gestoden. *AISLP: Informační systém léčivých přípravků* [online databáze]. Praha: INPHARMEX, spol. s r.o. [cit. 2018-01-15]
- [11] FAIT, Tomáš. Výhodné vlastnosti gestodenu a jejich využití v kombinované hormonální antikoncepci. *Praktická gynekologie*. 2017, **18**(2), 110-113.

- [12] STANCZYK, Frank Z. a David F. ARCHER. Gestodene: A review of its pharmacology, potency and tolerability in combined contraceptive preparations. *Contraception* [online]. 2014, **89**(4), 242-252 [cit. 2018-01-15]. DOI: 10.1016/j.contraception.2013.12.003. ISSN 00107824. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0010782413007464>
- [13] KUHL, H. Pharmacology of estrogens and progestogens: influence of different routes of administration. *Climacteric* [online]. 2009, **8**(sup1), 3-63 [cit. 2018-01-15]. DOI: 10.1080/13697130500148875. ISSN 1369-7137. Dostupné z: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/13697130500148875>
- [14] SHOUBE, Donna. New progestins–Clinical experiences: Gestodene. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* [online]. 1994, **170**(5), 1562-1568 [cit. 2018-01-15]. DOI: 10.1016/S0002-9378(94)05020-9. ISSN 00029378. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0002937894050209>
- [15] Databáze léků: Účinná látka - gestoden. *SÚKL: Státní ústav pro kontrolu léčiv* [online]. [cit. 2018-01-15].
- [16] LABAN, Aleksandra, Slavko MARKOVIC, Milena STANKOV a Predrag DJURDJEVIC. Simultaneous Determination of Gestodene and Ethinyl Estradiol in Contraceptive Formulations by RP-HPLC. *Analytical Letters* [online]. 2004, **37**(2), 273-282 [cit. 2018-04-15]. DOI: 10.1081/AL-120027792. ISSN 0003-2719. Dostupné z: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1081/AL-120027792>
- [17] MATĚJÍČEK, David a Vlastimil KUBÁŇ. High performance liquid chromatography/ion-trap mass spectrometry for separation and simultaneous determination of ethynylestradiol, gestodene, levonorgestrel, cyproterone acetate and desogestrel. *Analytica Chimica Acta* [online]. 2007, **588**(2), 304-315 [cit. 2018-04-15]. DOI: 10.1016/j.aca.2007.02.028. ISSN 00032670. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0003267007003273>
- [18] KISHORE KUMAR, I, P JAYAPRAKASH, V SIVANNARAYANA REDDY a J SRIRAMULU. A stability-indicating high performance liquid chromatographic method for separation and quantification of impurities in ethinylestradiol and gestodene tablets. *Journal of Pharmaceutical Biology* [online]. 2017, **7**(1), 33-40 [cit. 2018-04-10]. Dostupné z: <http://www.jpbjournal.com/doi/MTMza2FsYWkxNDc4NTIzNjk=>

- [19] SALVIA, Marie-Virginie, Julie EXPERTON, Claire GEANDEL, Cécile CREN-OLIVÉ a Emmanuelle VULLIET. Fate of pharmaceutical compounds and steroid hormones in soil: study of transfer and degradation in soil columns. *Environmental Science and Pollution Research* [online]. 2014, **21**(17), 10525-10535 [cit. 2018-04-15]. DOI: 10.1007/s11356-014-3038-x. ISSN 0944-1344. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s11356-014-3038-x>
- [20] NAJERA-AGUILAR, H. A., R. F. GUTIERREZ-HERNANDEZ, R. GONZALEZ DE LOS SANTOS, C. GARCIA-LARA, R. MENDEZ-NOVELO a M. N. ROJAS-VALENCIA. Degradation of gestodene (GES)-17-ethinylestradiol (EE2) mixture by electrochemical oxidation. *Journal of Water and Health* [online]. 2016, **14**(6), 980-988 [cit. 2018-04-15]. DOI: 10.2166/wh.2016.104. ISSN 1477-8920. Dostupné z: <http://jwh.iwaponline.com/cgi/doi/10.2166/wh.2016.104>
- [21] FU, Hongxiang, Rominder P. S. SURI, Robert F. CHIMCHIRIAN, Edward HELMIG a Richard CONSTABLE. Ultrasound-Induced Destruction of Low Levels of Estrogen Hormones in Aqueous Solutions. *Environmental Science & Technology* [online]. 2007, **41**(16), 5869-5874 [cit. 2018-04-15]. DOI: 10.1021/es0703372. ISSN 0013-936X. Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/es0703372>
- [22] NOVÁKOVÁ, Lucie a Michal DOUŠA. *Moderní HPLC separace v teorii a praxi*. Praha [i.e. Hradec Králové]: Lucie Nováková, 2013. ISBN 978-80-260-4243-3.
- [23] DOUŠA, Michal. *Základy separačních metod se zaměřením na HPLC*. Brno: Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský, 2002. Učební texty pro pracovníky ÚKZÚZ. ISBN 80-86548-09-0.
- [24] SKLENÁŘOVÁ, Hana. *Separační analytické metody – úvod, princip, rozdělení*. Praha. Studijní text. Univerzita Karlova.
- [25] KAZAKEVICH, Yuri. a Rosario. LOBRUTTO. *HPLC for pharmaceutical scientists*. Hoboken, N.J.: Wiley-Interscience, c2007. ISBN 9780471681625.

- [26] SNYDER, Lloyd R., J. J. KIRKLAND a John W. DOLAN. *Introduction to modern liquid chromatography*. 3rd ed. Hoboken, N.J.: Wiley, c2010. ISBN 978-0-470-16754-0.
- [27] MEYER, Veronika. *Practical high-performance liquid chromatography*. 4th ed. New York: John Wiley, c2004. ISBN isbn0-470-09378-1
- [28] KLIMEŠ, Jiří. *Kontrolně-analytické hodnocení léčiv lékopisnými metodami*. 2. vydání. Hradec Králové: Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, 2015. ISBN 978-80-260-8175-3.
- [29] *Český lékopis 2017* [online]. Praha: Grada, 2017 [cit. 2018-01-15].
- [30] The GCC Guidelines for Stability Testing of Drug Substances and Pharmaceutical Products. Edition two. International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use, 2007.
- [31] ČSN EN ISO/IEC 17025:2001 Všeobecné požadavky na způsobilost zkušebních a kalibračních laboratoří v akreditačním systému České republiky. Praha: Český normalizační institut, vydavatelský úsek, 2005.
- [32] AHUJA, Satinder a Stephen. SCYPINSKI. *Handbook of modern pharmaceutical analysis*. San Diego, CA: Academic Press, 2001. Separation science and technology (San Diego, Calif.), v. 3. ISBN 0-12-045555-2.
- [33] NEJEDLÝ, Tomáš a Jiří KLIMEŠ. A model of natural degradation of 17- α -ethinylestradiol in surface water and identification of degradation products by GC-MS. *Environmental Science and Pollution Research* [online]. 2017, **24**(29), 23196-23206 [cit. 2018-04-15]. DOI: 10.1007/s11356-017-9743-5. ISSN 0944-1344. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s11356-017-9743-5>
- [34] KLIMEŠ, Jiří. *Osobní sdělení*. Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Akademia Heyrovského 1203, 500 05 Hradec Králové. [2018-02-01]