

Univerzita Karlova
Farmaceutická fakulta v Hradci Králové
Katedra analytické chemie

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Metody využívané pro analýzu jednoduchých léčivých přípravků II (rešeršní práce)

Vedoucí bakalářské práce:

Doc. PharmDr. Ludmila Matysová, PhD.

Hradec Králové 2018

Hana Uherová Kvapilová

Prohlášení

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

V Hradci Králové

Podpis

Poděkování

Ráda bych poděkovala doc. PharmDr. Ludmile Matysové, Ph.D. za odborné rady a připomínky, výbornou komunikaci a pomoc při vypracování této bakalářské práce a také svému manželovi za podporu.

OBSAH

CÍL A ZADÁNÍ PRÁCE	5
ÚVOD	6
LÉČIVÝ PŘÍPRAVEK	7
Definice.....	7
Rozdělení LP	7
METODY VYUŽÍVANÉ K ANALÝZE	9
Spektrální metody	9
1. Spektrometrie v UV a VIS oblasti.....	10
Instrumentace	10
Použití.....	11
2. Spektrometrie v IR oblasti	12
Instrumentace	13
Použití.....	14
Chromatografické metody	14
Rozdělení chromatografických metod	15
Chromatografické metody je možné rozdělit podle typu separace na:.....	15
1. Tenkovrstvá chromatografie (TLC)	16
Instrumentace	16
Použití.....	17
2. Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC).....	17
Instrumentace	19
Vyhodnocení.....	25
Použití.....	26
3. Plynová chromatografie (GC)	27
Instrumentace	28
Vyhodnocení.....	31
Použití.....	31
PUBLIKOVANÉ ČLÁNKY	32
Sversut, Rubia A.; et al. Souběžné stanovení gatifloxacinu a prednisolonu acetátu v očních přípravcích s využitím UV derivační spektroskopie [11].....	32
Razzaq, Syed N.; et al. Souběžné stanovení dexamethasonu a moxifloxacinu HCl ve farmaceutických přípravcích s využitím HPLC metody indikující stabilitu [12].....	33

Ali, A.; et al. Testování stability indukující metody UHPLC-PDA pro souběžné stanovení antazolinu hydrochloridu a nafazolinu hydrochloridu v očních přípravcích [13].	34
Aljuffali, Ibrahim A; et al. Vývoj a validace stability indukující metody HPLC vhodné k analýze gatifloxacinu ve hromadně vyráběných léčivých přípravcích a farmaceutických přípravcích [14].	34
Mehta, J.; et al. Vývoj a validace přesné metody pro stanovení konzervantu benzalkoniumchloridu v očních kapkách s obsahem latanoprostu [15].	35
Awad, Hanan; et al. Validovaná HPLC testovací metoda pro stanovení alginátu sodného ve farmaceutických přípravcích [16].	36
Dolowy, M.; et al. Rychlá a jednoduchá TLC – denzitometrická metoda pro testování clobetasolu propionátu v topických roztocích [17].	37
Kumar, Naveen G. S.; et al. Vývoj a validace HPLC-UV metody pro současné stanovení fenylefrinu hydrochloridu a ketorolaku tromethaminu v očních přípravcích [18].	38
Upmanyu, N.; et al. Testování obsahu desmopresinu acetátu v nosních sprejích – vývoj validované předkolumnové HPLC-fluorescenční metody [19].	38
Okaru, Alex O.; et al. Robustní HPLC metoda vhodná pro potvrzení stability azitromycinu v tabletách a suspenzích [20].	39
Al-Rimawi F.; et al. Vývoj a validace reverzní HPLC metody pro analýzu tetrahydrozolinu hydrochloridu v očních přípravcích [21].	40
Walash M.; et al. Rychlá separace a kvantifikace tří léčivých látek proti glaukomu pomocí HPLC s UV detekcí [22].	41
Gumustas M.; et al. Stanovení antazolinu a tetrahydrozolinu v očních roztocích kapilární elektroforézou a stabilitu indukující HPLC metodou [23].	42
ZÁVĚR	48
SEZNAM ZKRATEK	49
SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	51

CÍL A ZADÁNÍ PRÁCE

Cílem a zadáním této bakalářské práce bylo vyhledat informace o metodách, využívaných k analýze jednoduchých léčivých přípravků a publikované články, které popisují tyto metody.

ÚVOD

Ke získání informací o chemickém složení analyzovaného materiálu slouží analytické metody. Tyto metody jsou rozděleny na kvalitativní a kvantitativní. Při kvalitativním určení neboli důkazu se zjišťuje, zda konkrétní složka (prvek, iont atd.) je obsažena anebo není obsažena ve stanovovaném materiálu. Kvantitativním určením je možné stanovit obsah těchto složek a získanou informaci vyjádřit určitým číselným údajem. Z těchto charakteristik vyplývá, že analýza kvantitativní následuje po analýze kvalitativní. U některých analytických metod je možné provést zároveň určení kvalitativní i kvantitativní [4].

Na zkoušky, které jsou určeny k identifikaci léčiv, jsou kladeny vysoké nároky. Eventuální záměna účinných látek může pacientovi způsobit závažné zdravotní potíže a pro farmaceutického výrobce či distributora znamenat právní dopady. K důkazu léčivé látky v léčivém přípravku je často využívána IR spektrometrie, UV spektrometrie a chromatografické metody [5].

Při stanovení obsahu léčivých přípravků se asi nejvíce využívá vysokoúčinná kapalinová chromatografie [5].

Vyhledávání článků, které popisují metody analýzy léčivých přípravků, bylo zaměřeno na tekuté léčivé přípravky (roztoky, suspenze, kapky), obsahující jednu nebo dvě účinné látky. K vyhledávání byly použity elektronické databáze publikovaných odborných článků PubMed a Web Of Science.

LÉČIVÝ PŘÍPRAVEK

Definice

Léčivý přípravek (LP) se skládá z léčivých a farmaceutických pomocných látek, zpracovaných do vhodné lékové formy [2].

Zákon č. 378/2007 Sb., § 2 odst. 1, písm. a), o léčivech a o změnách některých souvisejících zákonů., definuje léčivý přípravek jako látku nebo kombinaci látek, mající léčebné nebo preventivní vlastnosti v případě onemocnění lidí nebo zvířat a nebo dle písm. b) je léčivým přípravkem látka nebo kombinace látek, která může být použita nebo podána lidem, eventuálně zvířatům s cílem obnovit, upravit nebo ovlivnit fyziologické funkce farmakologickým, imunologickým či metabolickým účinkem, a nebo při nutnosti stanovit lékařskou diagnózu [1].

Z výše uvedené charakteristiky vyplývá, že za léčivé přípravky jsou považovány humánní léčivé přípravky, veterinární léčivé přípravky, humánní imunologické léčivé přípravky (vakcíny, toxiny, séra, alergenové přípravky), veterinární imunologické léčivé přípravky, humánní autogenní vakcíny, veterinární autogenní vakcíny, radiofarmaka, radionuklidové generátory, radionuklidové prekurzory, krevní deriváty, rostlinné léčivé přípravky, transfuzní přípravky, vyhrazené léčivé přípravky, léčivé přípravky pro genovou terapii a léčivé přípravky pro somatobuněčnou terapii [1].

Rozdělení LP

Obecně se léčivé přípravky dělí na hromadně vyráběné LP (HVLP, průmyslová výroba velkých šarží) a individuálně připravované LP (IPLP, připravované v lékárnách na základě lékařského předpisu) [2].

Další možností rozdělení léčivých přípravků je podle lékové formy, do které jsou zpracovány - rozlišujeme pevné lékové formy (granuláty, zásypy, prášky pro injekce, tablety, čípky a globule, tobolky), polotuhé lékové formy (masti, pasty, gely), kapalně lékové formy (roztoky, kapky, sirupy pro vnitřní užití, kloktadla a spreje k aplikaci v ústech,

roztoky, emulze, spreje, pěny na kůži, oční kapky a suspenze, rektální klyzmata a vaginální tekuté přípravky, parenterální LF - injekce a infuze) a do zvláštní skupiny patřící transdermální náplasti [3].

Léčivé přípravky lze kategorizovat také podle způsobu jejich aplikace, a to do třech skupin. První skupinu tvoří gastrointestinální léky, které se aplikují do zažívacího traktu a na organismus působí převážně celkovým účinkem. Patří sem kapalně léky určené pro orální a perorální použití (léčivé kapky, roztoky a kloktadla, sirupy, extrakty a tinktury z bylin) a tuhé léky pro orální a perorální použití (prášky a granuláty, želatinové tobolky, tablety – rozpustné v ústech, sublingvální, žvýkací, pastilky, perorální a šumivé) [3].

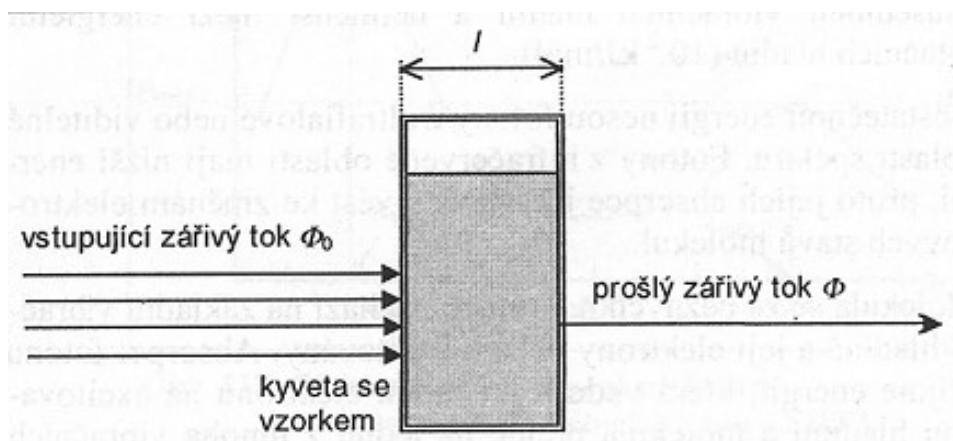
Druhou skupinu představují parenterální léky, které jsou podávány do žíly, svalu, pod kůži atd. a na organismus působí stejně jako gastrointestinální léky převážně celkový účinkem. Do této skupiny jsou zařazeny injekce, infuze, koncentráty pro přípravu injekcí a infuzí, prášky pro přípravu injekcí a infuzí a implantáty [3].

Poslední skupinu představují topické léky, které se nanášejí na určité konkrétní místo na těle a na rozdíl od předchozích dvou skupin léků mají většinou místní účinek. Mezi topické léky patří inhalace (aplikují se do dýchacích cest), kapalně léky k aplikaci na kůži (mazání, spreje, pěny, omývadla, tekuté zásypy, šampóny a léčivá mýdla), polotuhé léky k aplikaci na kůži (masti, krémy, gely, pasty), tuhé topické léky (zásypy), oční léky (oční kapky, oční vody, polotuhé oční léky, oční inzerty, prášky pro oční kapky), nosní a ušní léky (zásypy, omývadla, tampóny, polotuhé nosní léky), rektální léky (čípky, klyzmata, tobolky, polotuhé léky, pěny a tampóny), vaginální léky (vaginální kuličky, vaginální tablety a tobolky, vaginální roztoky a pěny, vaginální tampóny) a transdermální náplasti [3].

METODY VYUŽÍVANÉ K ANALÝZE

Spektrální metody

Jak již bylo zmíněno v úvodu, ke kvalitativnímu určení léčiv se nejčastěji využívají spektrální metody. Principem těchto metod je změření intenzity záření, absorbovaného roztokem zkoumané látky. Vlnová délka záření, síla vrstvy, koncentrace analyzované látky a struktura jsou podmínky, na kterých absorpce závisí. Při měření absorpce vybrané vlnové délky je porovnáván tok záření, který prošel měrnou kvyetou (I) a tok záření, který prošel kvyetou srovnávací (I_0). Pojem transmitance neboli propustnost (T) je definován podílem zářivých toků I a I_0 . Od transmitance se odvozuje absorbance (A), která je určena záporným logaritmem transmitance. Ze závislosti absorbance na vlnové délce nebo vlnočtu procházejícího záření je možné vytvořit absorpční spektrum, které poskytuje základní informace o absorbující látce. Se změnou vlnové délky monochromatického paprsku v průběhu měření dochází k vytvoření plynulé křivky spektra. Podle oblasti spektra, ve které se nachází analyzovaná látka, je absorpční spektrometrie rozdělena na analýzu v ultrafialové (UF, angl. UV) oblasti a analýzu v infračervené (IČ, angl. IR) oblasti [4, 5].



Obr. 1 Absorpce při průchodu záření kvyetou se vzorkem, převzato z: [10]

1. Spektrometrie v UV a VIS oblasti

Absorpční spektra, nacházející se v rozmezí vlnových délek 200–400 nm, jsou uložena v ultrafialové oblasti, rozmezí 400–760 nm je určeno pro viditelnou oblast záření. Podstatou spektrometrie v UV a VIS oblasti je absorpce záření molekulou, ke které dochází při přechodu elektronu z nižšího elektronového stavu do vyššího. Elektronové přechody se týkají valenčních elektronů (vazebných nebo nevazebných), které přecházejí z orbitalů v základním stavu na orbitály antivazebné (excitační) [4, 5].

Absorpce v UV oblasti je typická pro léčiva, která mají ve své molekule skupiny s násobnými (dvojnými nebo trojnými) vazbami – chromofory. Pro aromatické nebo heterocyklické sloučeniny je typický široký konjugovaný systém a intenzivní absorpční pásy, nacházející se v oblasti 200–250 nm. V nearomatických sloučeninách se nacházejí např. chromofory C=C, C=O, C≡N, S=O, N=N. Pokud molekula obsahuje více konjugovaných vazeb, absorpce je přemístěna do oblasti VIS (má vyšší vlnové délky) [5].

Instrumentace

Základní součásti přístrojů – spektrofotometrů – využívaných k měření absorpčních spekter, jsou zdroj záření, monochromátor nebo filtr, kyveta se vzorkem, detektor záření a měrné zařízení. U každého přístroje nalezneme rovněž optická zařízení (zrcadla, čočky, zeslabovací zařízení a elektronické části) [4].

Zdrojem viditelného světla je obvykle žárovka s wolframovým vláknem, produkující polychromatické záření o vlnových délkách v rozmezí 350–2500 nm. Stabilizátor nebo akumulátor zajistí stabilní napájení žárovky a tím i stálou intenzitu světla. Vodíková nebo deuteriová lampa je zdrojem UV záření [4].

Ke získání monochromatického záření lze využít monochromátor nebo spektrální filtry (používají se u jednodušších fotometrů). Světlo, které prochází spektrálními filtry, leží v oblasti 20 – 50 nm, a není tedy čistě monochromatické. Použití hranolu představuje ideální způsob získání monochromatického světla s jakoukoliv vlnovou délkou [4].

Při spektrofotometrickém měření v UV a VIS oblasti se používá kyveta naplněná roztokem vzorku. Skleněné kyvety nebo kyvety z umělé hmoty jsou určeny pro měření ve VIS oblasti, pro oblast UV je nezbytné použít křemenné kyvety [4].

Rozpouštědla, která chceme použít v UV spektrofotometrii, musí být připravena v nejčistším stavu. Nevýhodou některých organických rozpouštědel je jejich výrazná absorpce, z toho důvodu je jejich využití limitováno od určité vlnové délky. Mezi nejčastěji používaná rozpouštědla patří methanol, ethanol, voda aj. V některých případech lze ve funkci rozpouštědla použít zředěné roztoky kyseliny chlorovodíkové a hydroxidu sodného v koncentracích 0,1 - 0,01 mol/l [4, 5].

Intenzita světla prošlého vzorkem je vyhodnocena detektory záření (fotočlánky nebo fotonásobiče). Analogový nebo digitální galvanometr je měrným zařízením [4].

Při použití nevhodného rozpouštědla, záření, které má široké spektrum, nevhodnou teplotou, nesprávně změřenou absorbancí nebo špatně nastavenou vlnovou délkou dochází k chybnému spektrofotometrickému měření. Jelikož měření probíhá na různých typech UV spektrofotometrů, může při měření spekter nastat situace, kdy získáme mírně odlišné výsledky. V lékopisných monografiích se tedy hodnoty získané z UV spekter standardů uvádějí s příslušnou tolerancí (např. polohy maxim a minim jsou uvedeny obvykle s přesností ± 2 nm [4, 5].

Použití

Spektrofotometrie v UV a VIS oblasti je široce využívanou metodou díky své vysoké citlivosti a jednoduchému provedení. V analýze léčiv je důležitá při posouzení totožnosti, čistoty a pro stanovení obsahu léčiv [4].

Kvalitativní analýzou je možné určit identitu, resp. čistotu sloučeniny. Každá skupina atomů (chromoforů) má charakteristicky uložené absorpční pásy. Spektra složitých nebo strukturně blízkých molekul se odlišují velice málo. Z toho důvodu je vlastní spektrum širokým absorpčním pásem, který tvoří vzájemně se překrývající pásy. Při hodnocení průběhu absorpčního spektra je spíše možné určit, který vzorek se ve sloučenině nenachází

než ten, který sloučenina obsahuje. Kvalitativní analýzou lze hodnotit jen čisté látky. Absorpční spektrum neznámé sloučeniny je porovnáno s absorpčním spektrem standardu, který byl změřen za stejných podmínek nebo se vzorovým spektrem z atlasu spekter (toto porovnání je pouze orientační). Je možné říci, že obě látky (tj. neznámý vzorek a standard) jsou identické, pokud mají shodný počet a poloh absorpčních maxim a měření bylo provedeno v různých rozpouštědlech. Často dochází k významnému ovlivnění absorpčního spektra analyzované látky i stopovým množstvím nečistot [4].

Kvantitativní analýza slouží ke stanovení obsahu dané sloučeniny a je založena na Lambert – Beerově zákoně: $A = \epsilon \cdot c \cdot l$, který definuje, že absorbance je přímo úměrná koncentraci absorbující látky (v mol/l) a síle měřené vrstvy (v cm) [5]. Měření obvykle probíhá při vlnové délce maxima absorpčního pásu, protože tehdy je měření nejcitlivější a riziko ovlivnění nepřesným nastavením vlnové délky je nejmenší. Analytická koncentrace stanovované látky a rovnovážná koncentrace absorbentu se musejí rovnat, což je zajištěno chemickým složením roztoku (pH roztoku, přítomností činidla aj.). Organické i anorganické sloučeniny lze stanovit pomocí vlastní absorpce ve viditelné nebo ultrafialové oblasti. Pokud sloučeniny postrádají vlastní absorpci, před jejich stanovením se chemickou reakcí s činidlem převedou (derivatizují) na sloučeniny, které tuto schopnost mají [4].

2. Spektrometrie v IR oblasti

Absorpční spektra typická pro infračervenou oblast jsou umístěna v intervalu 2,5 - 15 μm vlnových délek. Podstatou spektrometrie v IR oblasti je, stejně jako v případě UV spektrometrie, absorpce určitého množství záření molekulami zkoumaného vzorku. Od UV spektrometrie se liší tím, že absorpce IR záření způsobí změny ve vibračně-rotacním stavu molekuly (nedochází ke změně elektronového stavu molekuly) [5].

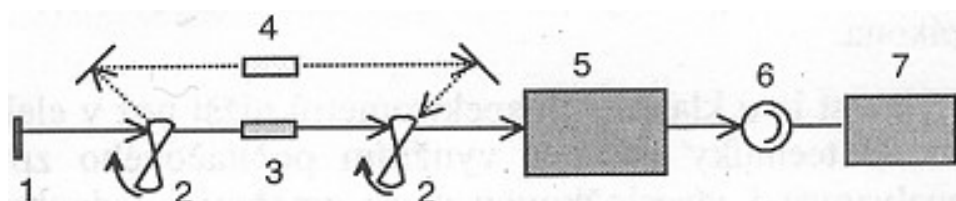
Vibrace, ke kterým při IR spektrometrii dochází, lze rozdělit na vibrace valenční (nastává při nich změna vazebné vzdálenosti mezi atomy a funkčními skupinami v molekule) a vibrace deformační (valenční úhel se změní, délka vazby zůstane stejná) [4, 5].

Absorpční spektrum tvoří velké množství absorpčních pásů. Vibrace každé funkční skupiny jsou charakteristické, z tohoto důvodu se jejich absorpční pásy v IR spektru nacházejí vždy v určitém intervalu vlnových délek. IR spektra mají své místo především při identifikaci struktury organických látek, čehož se využívá v lékopisných monografiích u většiny léčiv [5].

Kvůli vysokým požadavkům na odbornost a specializaci pracoviště se identifikace léčiv z IR spekter získané při měření neprovádí. Místo toho se ke zkouškám totožnosti využívají příslušné CRL léčiv (standarty) nebo referenční spektra léčiv [5].

Instrumentace

K měření IR spekter se používají dvoupaprskové IR spektrometry. Zdrojem IR záření je Nernstova lampa nebo globar. K vytvoření požadovaného monochromatického záření je možné použít hranol nebo odrazovou mřížku. Podmínkou propustnosti IR záření je použití optického systému a kyvet obsahující chlorid sodný nebo bromid draselný. Tyto látky jsou velmi hygroskopické, takže je potřeba zajistit ochranu přístroje i kyvet před vzdušnou vlhkostí. Intenzitu IR záření prošlého vzorkem zaznamenávají detektory (termočlánky, bolometry, tzv. Golayova cela. Pro měření IR spekter je možné použít fázi tuhou, kapalnou i plynnou [4].



Obr. 2 Schéma IR spektrometru, popisky doplněny, převzato z: [10]

1 - zdroj záření, 2 - rotující zrcadla, 3 - kyveta se vzorkem, 4 - srovnávací prostředí, 5 - monochromátor, 6 - detektor, 7 - vyhodnocovací zařízení

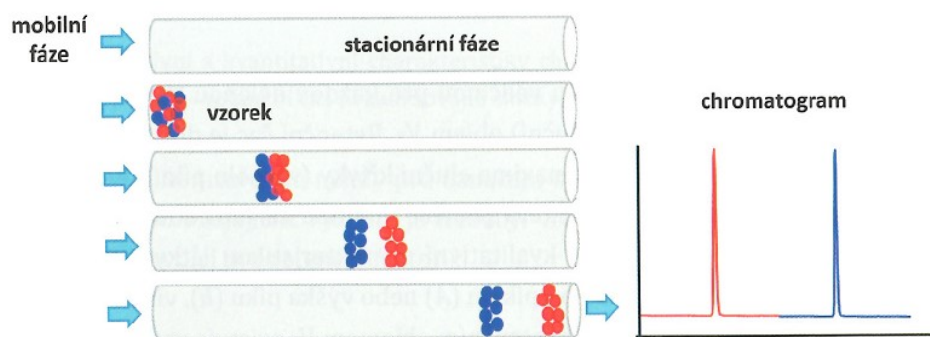
Použití

Spektrometrie v IR oblasti slouží především k určení identity testované sloučeniny, její čistoty a také strukturního uspořádání uvnitř molekuly. Identifikace neznámé sloučeniny se provádí srovnáváním se spektry známých látek (měřených za stejných podmínek) v atlasu spekter. Je důležité, aby počet a vlnčet v maximech absorpčních pásů byl stejný. Analyzovaná látka nesmí obsahovat vlhkost a musí být dostatečně čistá, jinak může dojít ke zkreslení absorpčního spektra [4].

Chromatografické metody

Chromatografické metody mají v analýze léčiv široké využití. Patří mezi metody separační, umožňují tedy kvalitativně i kvantitativně analyzovat oddělené složky směsi [5].

Principem chromatografie je rozdělení analyzovaných látek směsi mezi dvě vzájemně nemísitelné fáze: stacionární (nepohyblivá) fáze zadržuje více nebo méně jednotlivé složky analyzované směsi, mobilní (pohyblivá) fáze vymývá (eluuje) ze stacionární fáze zachycené složky a různou rychlostí je nese po směru toku. Oddělení jednotlivých složek směsi je způsobeno různými rychlostmi jednotlivých složek směsi. Při separaci se opakovaně vytváří rovnováha separovaných látek mezi stacionární a mobilní fází. Stacionární fáze může být tuhá (nazývá se sorbent) nebo kapalná, mobilní fáze může být kapalná (nazývá se eluent) nebo plynná [4, 5, 6].



Obr. 3 Separace směsi dvou látek, převzato z [6]

Rozdělení chromatografických metod

Chromatografické metody lze rozdělit podle různých kritérií, např. podle skupenství stacionární a mobilní fáze, podle způsobu vyvíjení, podle uspořádání mobilní fáze nebo podle typu separačního děje [4].

Základní rozdělení chromatografických metod vychází ze skupenství mobilní fáze, dělí se tedy na kapalinovou chromatografii (LC) – mobilní fází je kapalina a na plynovou chromatografii (GC) – mobilní fází je inertní plyn [5].

Uspořádání kapalinové chromatografie je buď plošné – jedná se hlavně o tenkovrstvou chromatografii (TLC) nebo v současnosti už obsolentní papírovou chromatografii (PC) nebo kolonové uspořádání, při kterém se v analýze využívá především vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC) [5].

Chromatografické metody je možné rozdělit podle typu separace na:

- adsorpční chromatografii – využívá se různá schopnost adsorpce rozdělovaných látek k aktivnímu povrchu adsorbentu (běžně používanými adsorbenty jsou silikagel a oxid hlinitý, ale také oxid hořečnatý, prášková celulóza nebo aktivní uhlí), při kapalinové chromatografii dochází k separaci mezi pevnou fází a kapalnou fází (LSC), v případě plynové chromatografie separace probíhá mezi pevnou fází a plynnou fází (GSC)
- rozdělovací chromatografii – může být kapalinová nebo plynová, v případě kapalinové rozdělovací chromatografie se separované látky rozdělují mezi dvě navzájem nemísitelné kapaliny na základě jejich odlišné rozpustnosti (LLC), stacionární fází je kapalina, uchycená na vhodném nosiči, u plynové rozdělovací chromatografie je rozdělení separovaných látek ovlivněno jejich různou rozpustností v kapalně stacionární fází, mobilní fází je plyn (GLC)
- iontově výměnnou chromatografii (IEC) – může být pouze kapalinová chromatografie, iontoměniče (katexy nebo anexy) tvoří stacionární fází, látky separované touto metodou se obvykle vyskytují v iontové formě a mají různou afinitu

ke skupinám iontoměničů (rozdílnost afinity závisí na různých hodnotách disociačních konstant ionogenních skupin a různé velikosti a mocenství iontů)

- gelovou chromatografií – při tomto typu kapalinové chromatografii probíhá separace složek směsi podle velikosti jejich molekul, nosičem molekul analyzovaných látek je mobilní fáze, která teče kolonou (uvnitř je porézní materiál – gel). Na základě své velikosti molekuly prostupují různě velkými póry, přičemž malé molekuly se snadno dostanou do větších i menších pórů, velkým molekulám je umožněno projít pouze většími póry a molekuly s průměrem větším, než je průměr pórů, projdou skrze kolonu nejrychleji bez zadržení. Z toho vyplývá, že velikost pórů vybraného gelu je pro separaci klíčová.
- afinitní chromatografií – její role v analýze léčiv je minimální [4, 5].

1. Tenkovrstvá chromatografie (TLC)

TLC představuje kombinaci sloupcové adsorpční a rozdělovací chromatografie, které byly modifikovány plošným uspořádáním. Tento typ chromatografie je často využíván k identifikaci léčiv nejen v Českém, ale i Evropském lékopise. Slouží k prokázání látek a také k identifikaci účinných látek, obsažených v různých lékových formách (hlavně ve složených lékových přípravcích). Výhodou TLC je jednoduchá realizace analýzy a dobrá dostupnost potřebných laboratorních pomůcek [4, 5].

Instrumentace

Na inertní podložku se v tenké vrstvě umístí sorbent, který je stacionární fází. Silikagel, oxid hlinitý a prášková celulóza jsou příklady nejběžněji používaných sorbentů [4].

Jednotlivé fáze pracovního postupu u TLC (nanesení vzorku, vyvíjení, detekce, kvalitativní a kvantitativní hodnocení) jsou podobné jako u papírové chromatografie. Na rozdíl od papírové chromatografie je TLC snadno proveditelná, rozdělování látek probíhá rychleji, je jednoduchá na vyhodnocení a dostatečné množství látek nutných k analýze je v řádech mikrogramů. Díky těmto výhodám má TLC velmi široké použití [4].

V současné době se používají komerčně vyráběné TLC chromatogramy. Na hliníkovou fólii nebo na slabou skleněnou desku je aplikován chromatografický sorbent s pojídlem. Tyto TLC chromatogramy přinesly zjednodušení vlastní analýzy, jejich výhodou jsou standardní a neměnné vlastnosti materiálu a vysoká odolnost vůči mechanickému poškození. Ve vrstvě sorbentu některých komerčně vyráběných TLC chromatogramů je příměs fluorescenční látky, která vykazuje maximální fluorescenci při 254 nm (event. při 366 nm). K detekci chromatogramu je možné použít UV lampu (objeví se zelená fluorescence) nebo aplikovat vhodná detekční činidla (barva skvrny analyzovaného léčiva i barva skvrny srovnávacího standardu musí být stejná) [4, 5].

U moderních lékopisných metod se setkáváme s požadavkem ověření separační a detekční schopnosti chromatografické soustavy. Ověření separační schopnosti se provádí nanesením směsi dvou standardů (jsou uvedeny u dané TLC zkoušky), u kterých se po vyvinutí chromatogramu musí objevit dvě jasně separované skvrny. Pro ověření detekční schopnosti je předpisem stanovený postup, po jehož provedení se na TLC chromatogramu musí objevit zřetelně viditelné skvrny, které mají nejnižší předepsanou koncentraci [5].

Použití

Tenkovrstvá chromatografie se rutinně využívá k analýze širokého spektra organických látek. Kromě identifikace látek obsažených v analyzovaných směsích umožňuje určit čistotu látek a provést stanovení látek získaných separací. V analýze léčiv se TLC uplatňuje při identifikaci a stanovení glykosidů, alkaloidů, steroidů, vitamínů a řady léčiv obsažených ve vzorku moče [4].

2. Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC)

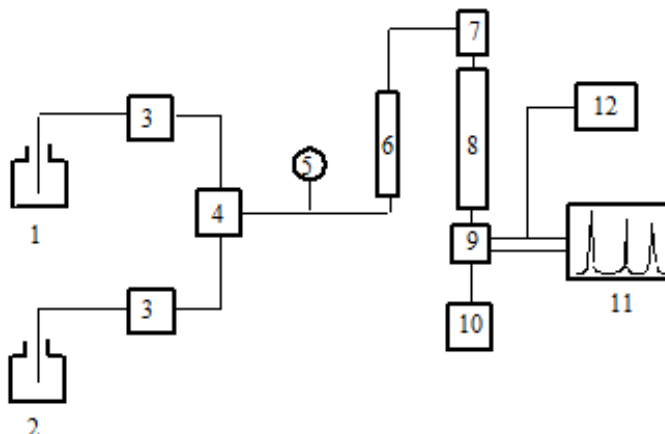
Vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií je možné zařadit mezi nejrychleji se vyvíjející analytické metody současnosti s uplatněním ve všech oblastech analýzy léčiv a využitím v mnoha lékopisných monografiích [5].

Principem separace metodou HPLC je rozdělení látek obsažených v analyzované směsi mezi stacionární fází, kterou je vyplněná kolona a kolonou procházející mobilní fází při působení vysokého tlaku. Tím se liší od klasické kapalinové chromatografie, při které ovlivňuje rychlost průtoku není ovlivněna tlakem. Aby se mobilní fáze pohybovala kolonou s dostatečnou rychlostí, musejí čerpadla pracovat pod vysokým tlakem [4].

Hlavní výhody HPLC jsou:

- tato metoda je vhodná ke kvalitativní i kvantitativní analýze složek získaných ze směsi
- rychlý průběh analýzy a vysoká citlivost (závisí na použitém detektoru)
- velmi malé množství vzorku nutného pro analýzu
- automatizace při provádění metody (přednastavené automatické dávkovače umožní vykonávat velké množství analýz místo operátora)
- na rozdíl od GC je HPLC vhodná pro analýzu tepelně labilních a netěkavých látek (většina léčiv není těkavá) a je tedy i více využívána [4].

Instrumentace



Obr. 4 Blokové schéma kapalinového chromatografu, převzato z: [4]

1,2 - mobilní fáze-eluční činidla; 3 - vysokotlaká čerpadla; 4 - směšovač;
5 - manometr; 6 - dávkovač; 7 - předkolona; 8 - kolona; 9 - detektor; 10 - sběrač
frakcí; 11 - zapisovač; 12 - integrátor

Kolony, používané pro HPLC, jsou obvykle 10–25 cm dlouhé, jejich vnitřní průměr je 3–5 mm, k jejich výrobě se používá nerezová ocel nebo sklo a náplň tvoří homogenní sorbenty. V HPLC mají největší využití tzv. chemicky vázané stacionární fáze – na povrchu silikagelových zrn se nacházejí hydroxylové skupiny, na které se po chemických úpravách navážou různé radikály. Nejvíce používanými radikály jsou uhlovodíkové řetězce, které tvoří většinou 18 (eventuálně 8) uhlíkových atomů. Tyto fáze se označují jako tzv. reverzní fáze a jsou nepolární. Pokud je v radikálu přítomen řetězec o třech uhlících, který má na konci umístěné skupiny $-NH_2$ nebo $-CN$, pak se jedná o fázi středně polární. Při HPLC je možné použít silikagel a oxid hlinitý, což jsou polární sorbenty, jako stacionární fázi, ovšem ve srovnání s chemicky vázanými stacionárními fázemi je využitelnost výrazně menší [5].

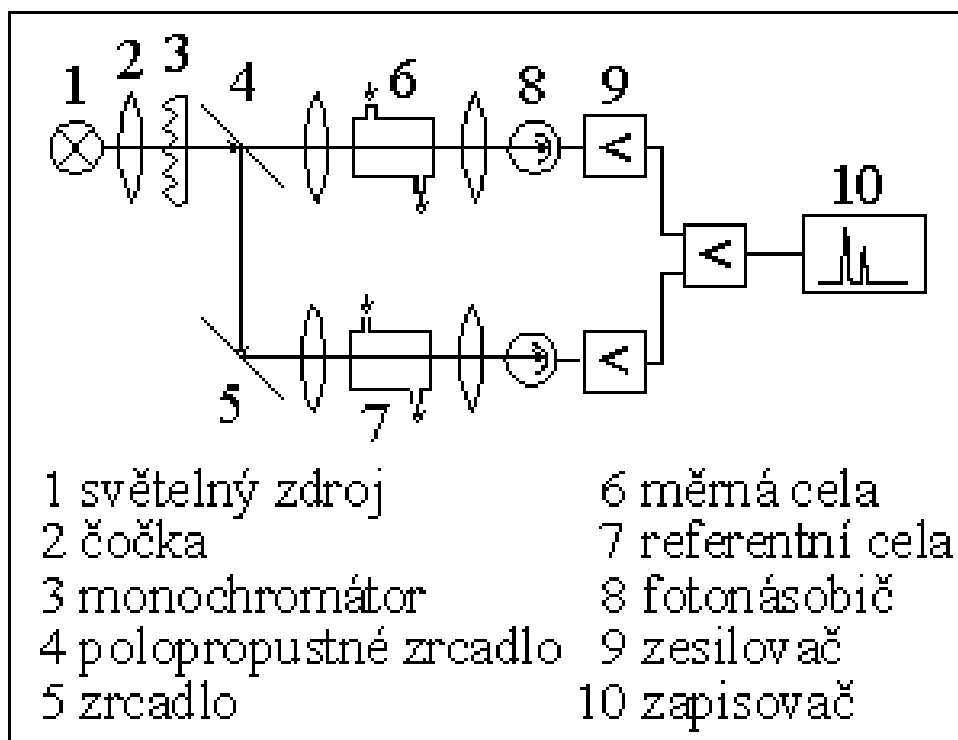
V současnosti jsou dobře dostupné komerčně vyráběné různé typy chirálních stacionárních fází, pomocí kterých je možné chromatograficky analyzovat enantiomery léčiv [5].

Při HPLC působí na mobilní fázi čerpadlo tlakem až 40 MPa a mobilní fáze se pohybuje rychlostí 0,1-10 ml/ min. Mobilní fáze může mít konstantní složení po celou dobu trvání analýzy, jde tedy o tzv. izokratickou eluci, která se při analýzách používá nejčastěji. U tzv. gradientové eluce se naopak složení mobilní fáze v průběhu analýzy mění. Toho se s výhodou používá u směsí, které obsahují složky s výrazně odlišnými elučními parametry [4, 5].

K dávkování analyzovaného vzorku slouží speciální injekční mikrostříkačky nebo dávkovací kohout. Každá možnost má své výhody a nevýhody – injekční stříkačkou je možné odměřit různé objemy, naopak dávkovací kohout nadávkuje pouze pevně daný objem roztoku, avšak přesněji než mikrostříkačkou [4].

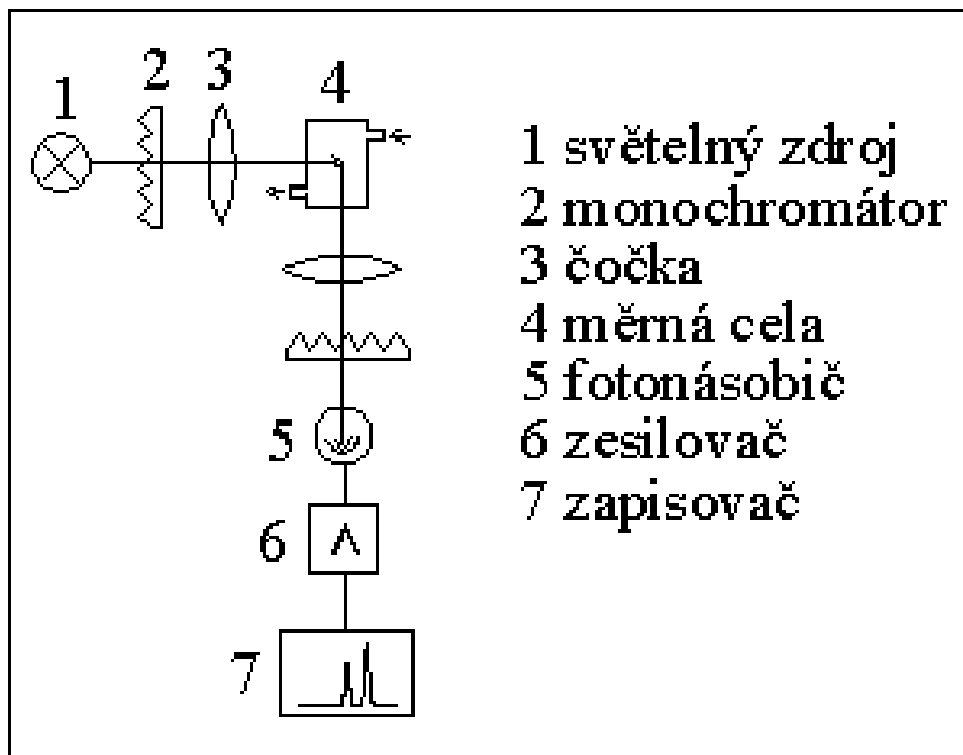
Velmi důležitý je při HPLC výběr detektoru, protože ten výrazně ovlivní citlivost a selektivitu chromatografické analýzy. Na detektory jsou kladeny vysoké nároky: musejí být velmi citlivé, schopné v roztoku detekovat látky velmi nízkých koncentrací (až ng/ml), poskytovat reprodukovatelné výsledky, mít lineární odezvu, u gradientové eluce nesmí odezva záviset na změně složení mobilní fáze. V ideálním případě by měl detektor být univerzální, tedy schopný detekovat všechny separované složky ve směsi. Žádný typ ale nespĺňuje všechny uvedené požadavky [4].

Nejpoužívanějšími detektory v HPLC analýze léčiv jsou spektrofotometrické detektory (obr. 5). Jsou selektivní, velmi citlivé (10^{-9} až 10^{-10} g/ml) a je možné je použít pro gradientovou eluci.



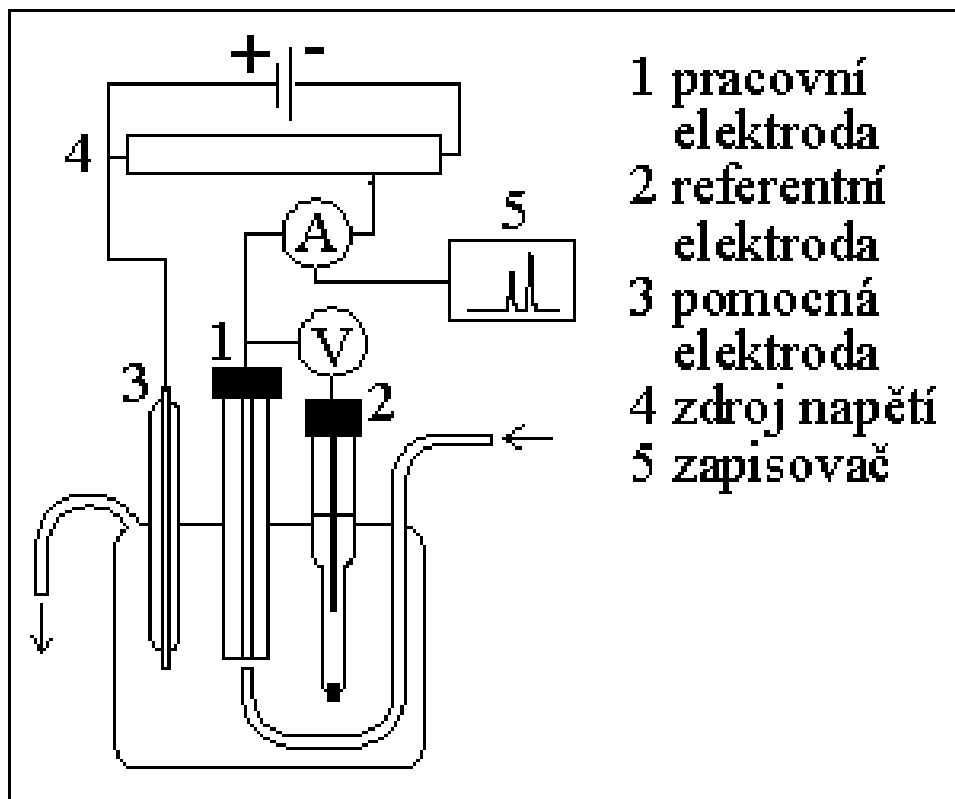
Obr. 5 Schéma absorpčního fotometrického detektoru, převzato z: [8]

Fluorimetrické detektory (obr. 6) se používají u léčiv nebo jejich produktů, které mají schopnost fluorescence. Pokud látky tuto schopnost nemají, derivatizací vhodnými činidly se změny deriváty, které jsou už schopné vydávat fluorescenční záření. V porovnání se spektrofotometrickými detektory jsou méně univerzální, ale zase více citlivé (10^9 až 10^{12} g/ml) a je možné je použít v případě gradientové eluce.



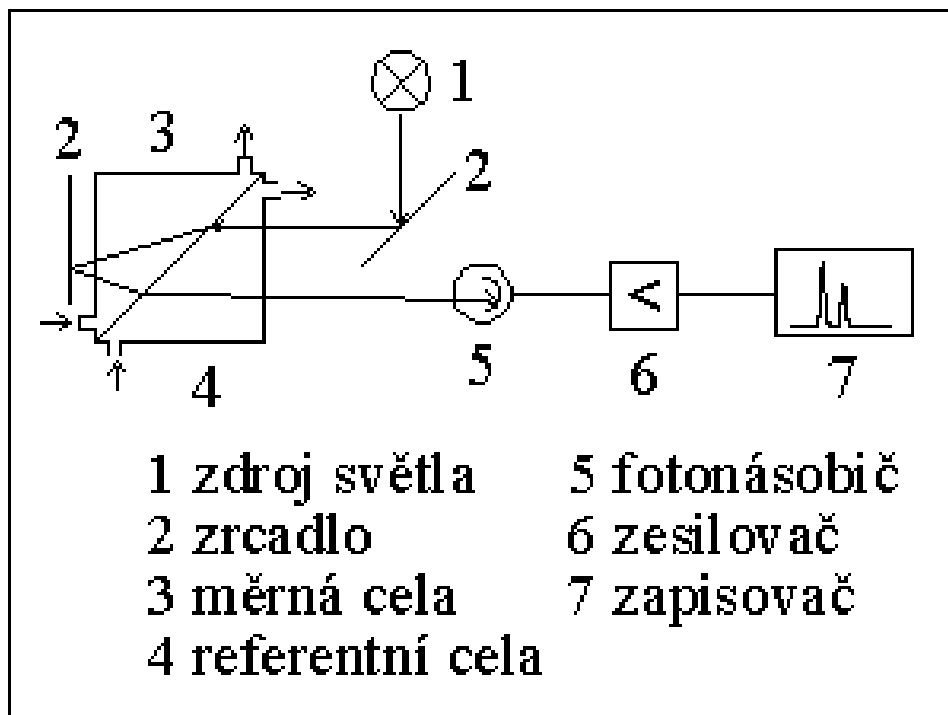
Obr. 6 Schéma fluorimetrického detektoru, převzato z: [8]

Elektrochemické detektory (voltametrický, amperometrický (obr. 7) a polarografický detektor) jsou selektivní, velmi citlivé (10^{-9} až 10^{-12} g/ml), ale většinou nevhodné pro gradientovou eluci.



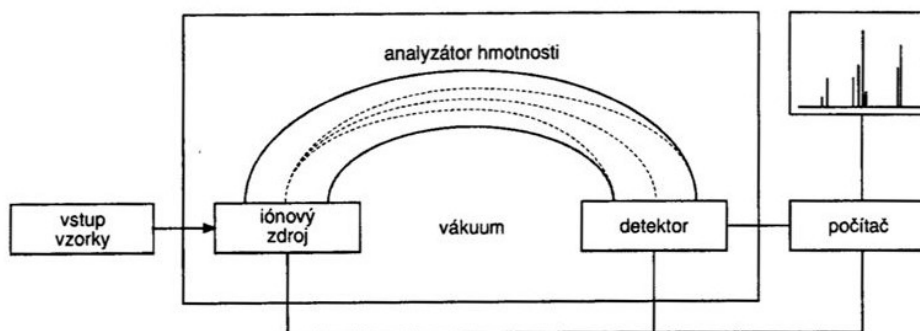
Obr. 7 Schéma amperometrického detektoru, převzato z: [8]

Refraktometrické detektory (obr. 8) jsou schopny detekovat jakoukoliv látku (jsou neselektivní), avšak velkou nevýhodou je jejich nízká citlivost (10^{-6} g/ml) a závislost odezvy detektoru na teplotě. Proto se k analýze léčiv používají jen minimálně. V podmínkách gradientové eluce je nelze použít.



Obr. 8 Schéma refraktometrického detektoru, převzato z: [8]

V současnosti je běžně využíváno spojení HPLC a hmotnostního spektrometru (MS). Hmotnostní spektrometr (obr. 9) je selektivní a velmi citlivý (10^{-10} g/ml). Jeho nevýhodou je vysoká finanční náročnost [5].

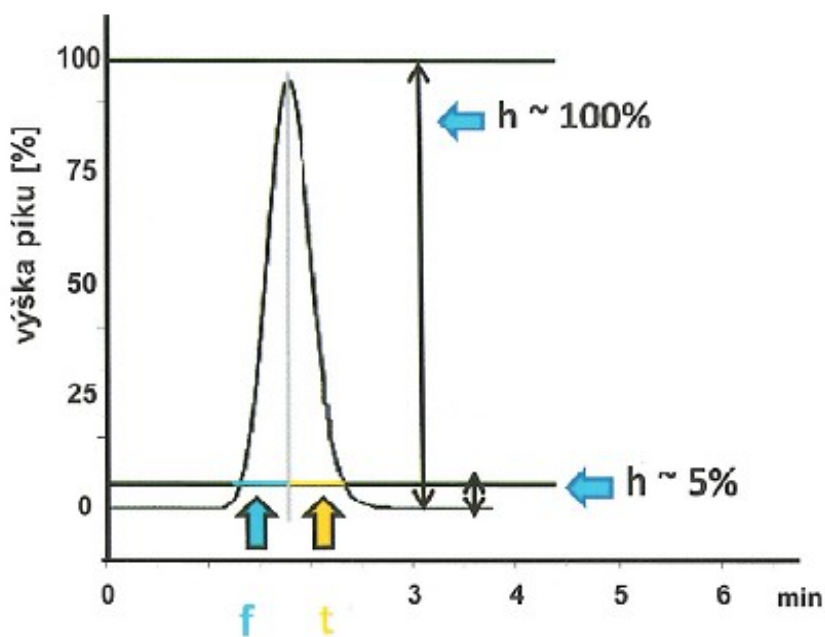


Obr. 9 Schéma hmotnostního spektrometru, převzato z: [9]

Vyhodnocení

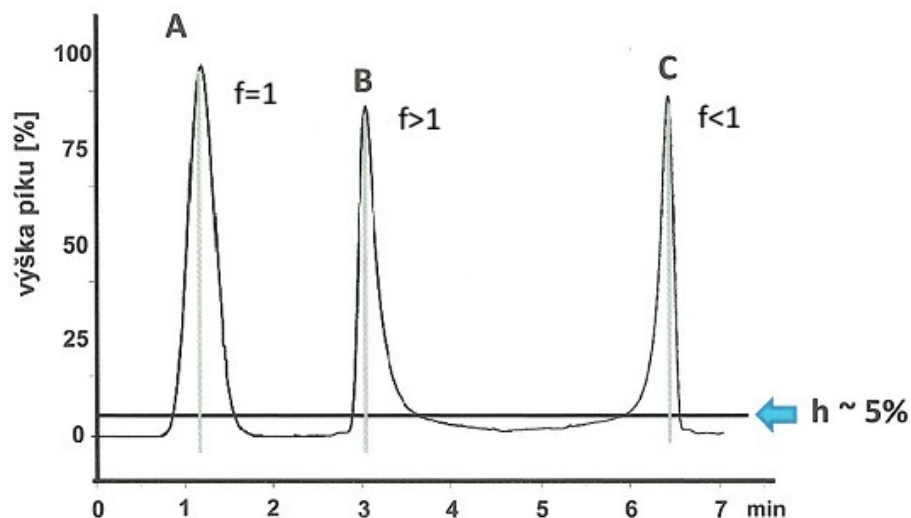
Při správně nastavených podmínkách průběhu HPLC se ve výsledném chromatogramu zobrazí ostré a symetrické chromatografické píky, které reprezentují jednotlivé oddělené složky analyzované směsi. V ideálním případě jsou píky rozděleny až na základní linii [5].

K hodnocení kvality separace a získání informací o účinnosti kolony se používá faktor asymetrie (A_s). Hodnotu A_s lze vypočítat jako poměr šířky sestupné části píku (t) ku šířce vzestupné části píku (f), měřené obvykle v 5 % výšky hodnoceného píku (obr. 10) [6, 7].



Obr. 10 Grafické vyjádření výpočtu asymetrie píku (A_s), převzato z: [7]

V ideální případě je pík dokonale symetrický a jeho hodnota f je 1. Pokud je f větší než 1, nastává chvostování píku. V opačném případě, pokud f je menší než 1, dochází k frontování píků. Tyto jednotlivé případy jsou znázorněny na obr. 11 [7].



Obr. 11 Grafické znázornění symetrického píku (A), chvostujícího píku (B), píku, který frontuje (C), převzato z: [7]

Nežádoucím efektem, který může při separaci látek nastat, je rozmývání píků. Mezi příčiny, které k nim vedou, patří vířivá nebo podélná molekulární difúze a odpor proti přenosu hmoty ve stacionární nebo mobilní fázi [6].

Základní kvalitativní charakteristikou v HPLC je retenční (eluční) čas, který se značí t_R . Retenční čas představuje čas od nástřiku vzorku na kolonu až po dosažení maxima píku. nejčastěji používaným důkazem totožnosti je posouzení, zda se shodují retenční časy chromatografického píku léčiva ve vzorku a píku standardu [5].

Plocha chromatografického píku představuje kvantitativní charakteristiku HPLC [5].

Použití

V analýze léčiv se HPLC uplatňuje především při identifikaci, stanovení obsahu a nečistot léčiv. Výhodou této metody je možnost současné analýzy kvalitativních i kvantitativních parametrů s vysokou selektivitou, citlivostí, a přitom za poměrně krátký čas. Velmi často se HPLC používá k analyzování polykomponentních lékových přípravků. Z chromatogramu lze odečíst hlavní píky, které reprezentují oddělené účinné látky

a eventuálně i menší píky. Ty mohou zobrazovat nečistoty přítomné v analyzovaném vzorku léčiva nebo zbytky pomocných látek obsažených v léčivu [5].

Využití HPLC nalezla i při hodnocení stability léčiv – na chromatogramu je možné rozlišit pík, který reprezentuje účinnou látku a menší píky, patřící rozkladným produktům. [5].

HLPC má důležitou roli při analýze léčiv přírodního původu (v jednotlivých rostlinných drogách je možné analyzovat přítomnost a obsah alkaloidů, glykosidů, vitamínů aj. [5].

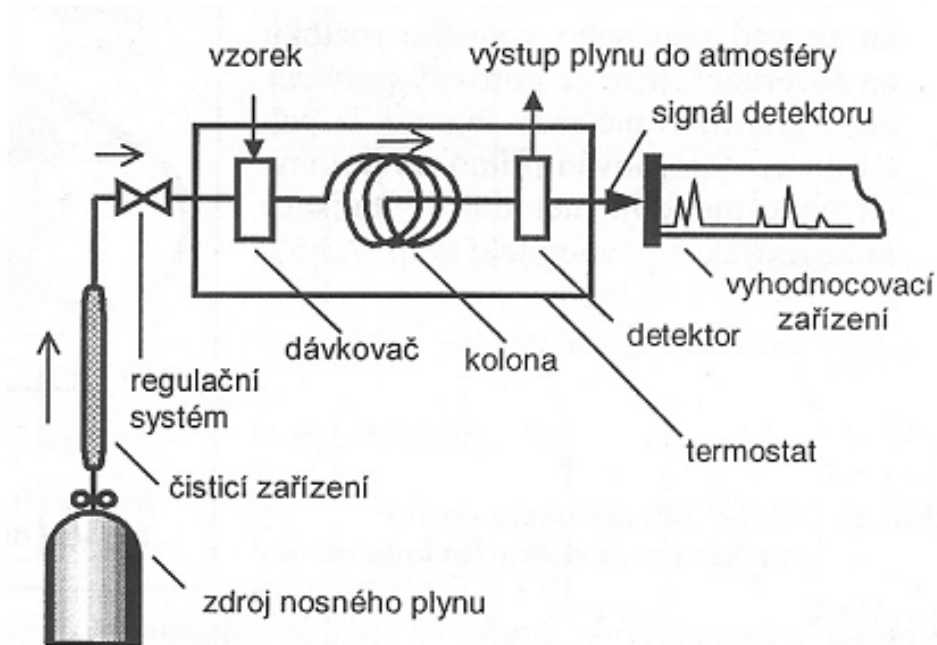
HLPC je možné použít k monitorování léčiv a jejich alkaloidů přítomných v tělních tekutinách (obvykle se jedná o krevní plazmu, sérum a moč) [5].

3. Plynová chromatografie (GC)

Plynovou chromatografií lze charakterizovat jako citlivou metodu, vhodnou k analýze látek, mezi jejíž vlastnosti patří velmi dobrá separační účinnost. Z tohoto důvodu má své místo nejen v Českém lékopise. Ve srovnání s HPLC je ale její uplatnění mnohem menší, protože je vhodná pro analýzu těkavých látek, kterých je asi 10 %. Před vlastní analýzou těkavé látky je nutné ji převést ohřevem na páry (je důležité, aby se látka nerozložila). Pokud jsou látky tepelně nestabilní, před provedením GS analýzy se provede derivatizace [5].

Principem GS je dávkování analyzovaného vzorku do proudu plynu. Plyn nese vzorek kolonou, proto se pro mobilní fázi používá termín nosný plyn. Podmínkou pro transport vzorku je jeho úprava do plynového skupenství. Další postup je analogický s LC – separace jednotlivých látek na koloně je ovlivněna tím, zda jsou látky více či méně zadržovány stacionární fází. Na konci kolony je umístěn detektor, který zaznamenává jednotlivé procházející látky a následným vyhodnocením činnosti detektoru získáme informace o kvalitativních i kvantitativních vlastnostech separovaných látek [10].

Instrumentace



Obr. 12 Schéma plynového chromatografu, převzato z: [10]

Mobilní fázi GC neboli nosným plynem je nejčastěji dusík nebo helium, je možné použít i vodík nebo argon. Nosný plyn slouží k transportu analyzovaného vzorku kolonou a je nutné, aby s analyzovanými složkami vzorku nereagoval (= byl inertní). Při výběru plynu je potřeba vzít v úvahu, zda není toxický, finančně nákladný a problematický při práci s ním. Od používání vodíku se odstupuje kvůli je výrazným negativním vlastnostem, což jsou hořlavost, explozivnost a schopnost hydrogenace některých látek [10].

Čisticí zařízení slouží k zachycení vlhkosti a případných nečistot obsažených v mobilní fázi a zbavuje nosný plyn jiných plynů (např. kyslíku) [10].

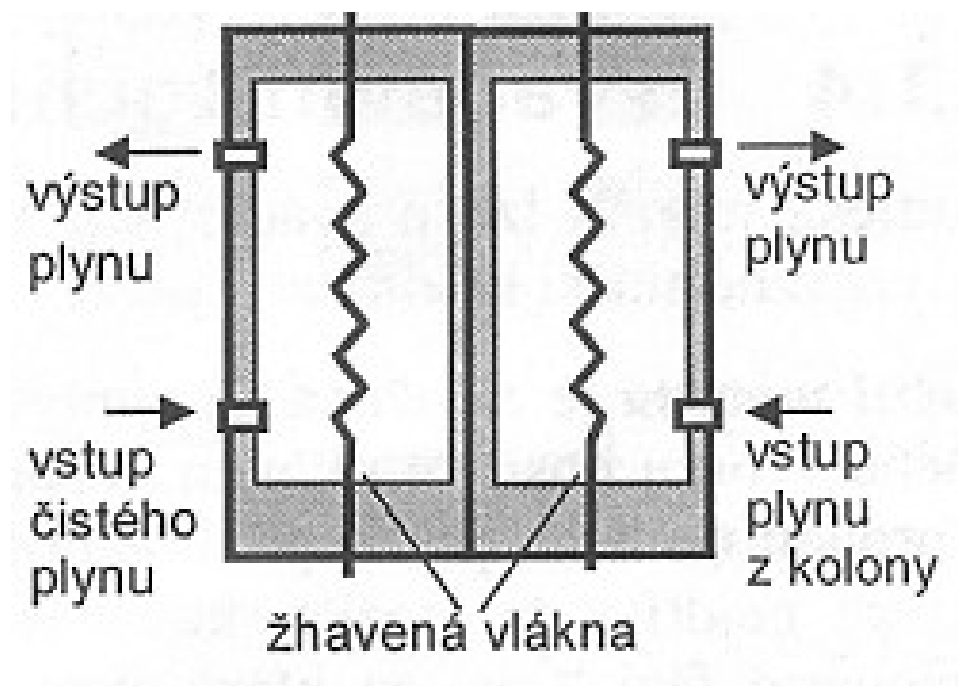
Regulační systém zabezpečuje kontinuální nebo gradientový průtok nosného plynu [10].

Dávkovače mají za úkol vpravit vzorek do proudu nosného plynu, používají se injekční stříkačky nebo dávkovací kohouty [10].

Používané kolony jsou dvojího druhu – náplňové a kapilární. Náplňové kolony jsou 0,5-5 m dlouhé trubice o průměru 2–5 mm, vyrobené z nerezové oceli nebo skla, uvnitř kolony granulovaný adsorbent vhodný pro GSC nebo nosič, na který je uchycena kapalná stacionární fáze pro GLC. Kapilární kolony měří 10–100 m, jejich průměr je 0,1- 0,5 mm a jsou z nerezové oceli nebo skla [5].

Výběr detektoru závisí na vlastnostech analyzovaného vzorku. Nejvíce používanými detektory jsou tepelně vodivostní detektor, plamenový ionizační detektor a detektor elektronového záchytu [10].

Tepelně vodivostní detektor (TCD, obr. 13) měří rozdíl mezi tepelnou vodivostí nosného plynu (vodík nebo helium) a analyzovanou látkou. Jeho to detektor univerzální, s nižší citlivostí v mikrogramech, vhodný pro analýzu anorganických plynů a nízkomolekulárních organických látek. [5, 10].

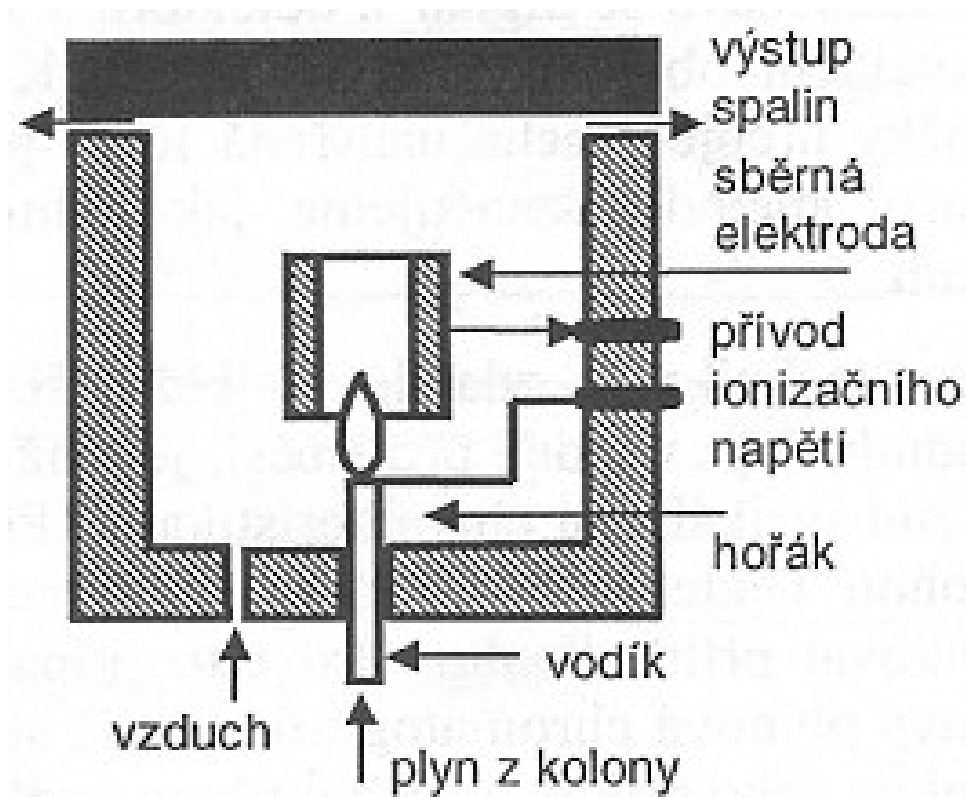


Obr. 13 Schéma tepelně vodivostního detektoru, převzato z: [10]

Ionizační detektory tvoří velkou skupinu různých typů detektorů, které fungují na principu měření ionizačního proudu, vytvořeného pomocí nabitých částic, umístěných v nosném plynu. Mezi ionizační detektory se řadí hmotnostní spektrometr (MS). Původně neutrální atom nebo molekula jsou detektorem ionizovány za vzniku iontů a jejich fragmentů. Vzniklé produkty se separují a měří podle poměru hmotnosti a náboje iontu (m/z). MS jsou univerzálními detektory s vysokou citlivostí v jednotkách nanogramů až pikogramů [5].

V detektoru elektronového záchytu (ECD) je nosný plyn ionizován beta zářením (zdrojem je ^{63}Ni), vzniká tak ionizační proud pomalých elektronů. Detektor je velmi citlivý (v řádech pikogramů) pro halogeny a nitrolátky [5, 10].

V plamenově ionizačním detektoru (FID, obr. 14) probíhá ionizace molekul plynu v kyslíkovodíkovém plameni. Nejvíce se jako nosný používá dusík. Je to detektor velmi citlivý (schopný detekce pikogramových množství analytu), problém může nastat při analýze anorganických par a plynů [5, 10].



Obr. 14 Schéma plamenového ionizačního detektoru, převzato z: [10]

Vyhodnocení

Kvalitativní i kvantitativní hodnocení výsledků GS je totožné s hodnocením u HPLC – chromatografické píky, které se vytvoří po separaci jednotlivých látek ze vzorku musí být symetrické, ostré a rozdělené na základní linii. Kvalitativním ukazatelem v GS je retenční (eluční) čas (t_R), plocha (případně výška) chromatografického píku je parametrem kvantitativním [10].

Použití

GS je separační metoda, obzvlášť výhodná pro analýzu plyných látek, co se týče analýzy léčiv, její použití není zdaleka tak časté jako užití metody HPLC (většina léčiv je netěkavých a termolabilních) [10].

PUBLIKOVANÉ ČLÁNKY

Sversut, Rubia A.; et al. Souběžné stanovení gatifloxacinu a prednisolonu acetátu v očních přípravcích s využitím UV derivační spektroskopie [11].

Ve článku je detailně popisována metoda pro souběžné stanovení gatifloxacinu a prednisolonu acetátu v očních přípravcích, která byla vyvinuta a validována s využitím UV spektrofotometru.

Gatifloxacin patří do čtvrté generace fluorochinolonů a je široce používán v profylaxi a léčbě očních infekcí. Prednisolon acetát je považován za jednu z nejúčinnějších látek ze skupiny syntetických glukokortikoidů, používaných k léčbě očních zánětlivých onemocnění.

Pro experimentální stanovení byl použit přístroj A Thermo Scientific Evolution® (UV – VIS spektrometr), všechna léčiva a srovnávací látky byly váženy na Shimadzu® analytických vahách. Gatifloxacin a prednisolon acetát byly změřeny s využitím derivace 1.řádu UV spektra. V článku je detailně popsána experimentální část, uvedené přístroje, druhy materiálu a reagensů, postup při výběru vhodného rozpouštědla a stanovení vhodných vlnových délek a postup při přípravě standardních roztoků a vzorků. Nedílnou součástí je popis validace metody a jejích analytických parametrů.

Měření stanovovaných látek probíhala ve směs acetonitrilu a vody (70:30, v/v) při vlnové délce 348 nm pro gatifloxacin a 263 nm pro prednisolon acetát. Výhodou této směsi je, že má nízkou absorpci v UV oblasti, takže neovlivňuje stanovované účinné látky.

Z výsledků vyplynulo, že testovaná metoda byla přesná, s relativně standardní deviací menší než 2,50 % pro obě léčivé látky. Tato metoda vykazuje dobrou specificitu, přesnost, správnost, citlivost a robustnost. Výsledky získané UV spektrofotometrií byly statisticky srovnány s výsledky získané HPLC metodou, vyvinutou a validovanou předtím. Navržená metoda UV spektrofotometrie se ukázala být jednodušší, levnější a rychlejší než srovnávací HPLC metoda. V této formě je metoda vhodná pro rutinní analýzy gatifloxacinu a prednisolonu acetátu v očních přípravcích.

Razzaq, Syed N.; et al. Souběžné stanovení dexamethasonu a moxifloxacinu HCl ve farmaceutických přípravcích s využitím HPLC metody indikující stabilitu [12].

Autoři v článku popisují vývoj jednoduché, specifické, citlivé, precizní a přesné metody reverzní HPLC indikující stabilitu pro souběžné stanovení moxifloxacinu hydrochloridu a dexamethasonu v hromadně vyráběných léčivých přípravcích.

Moxifloxacin hydrochlorid je širokospektré ATB, které způsobuje inhibici DNA gyrázy, topoizomerázy II a topoizomerázy IV – enzymů, nezbytných pro dělení bakteriální DNA (buňky se nemohou replikovat). Tato léčivá látka se využívá k léčbě bakteriální konjunktivitidy, keratitidy, při předoperačních a pooperačních infekcích očí. Dexamethason je kortikosteroid, využívaný k léčbě zánětlivých, na kortikoidy reagujících, očních obtížích a při bakteriálních očních infekcích.

K experimentální studii byl použit HPLC systém složený z Shimadzu LC-20A systému vybaveným pumpou (LC-20A5), SPD-M20A detektorem s diodovým polem a DGU-20A5 online degasérem.

Vyvinutá metoda byla optimalizována pro separaci dvou výše zmíněných účinných látek. Jako stacionární fáze byla použita BDS Hypersil C8 kolona (250 mm x 4,6 mm; 5 μ m) při pokojové teplotě, mobilní fáze obsahovala směs 20mmol/l fosfátového pufru a 0,1% (v/v) triethylaminu pH 2,8 (upraveno zředěnou kyselinou fosforečnou) a methanolu (38,5:61,5, v/v). Průtoková rychlost mobilní fáze byla 1,5 ml/min. Chromatografická separace testovaného vzorku trvala 10 minut a k detekci analytů a jejich degradačních produktů byl použit detektor s diodovým polem při $\lambda = 254$ nm. Při všech experimentech byla teplota 25 °C \pm 2 °C.

Metoda poskytovala dobré výsledky při separaci pík analytů od pík degradačních produktů (s přijatelnou mírou chvostování). Z toho důvodu je tedy testovaná metoda považována za metodu indikující stabilitu a může být úspěšně využívána pro souběžné stanovení moxifloxacinu hydrochloridu a dexamethasonu v léčivých přípravcích a stabilitních studiích.

Ali, A.; et al. Testování stability indikující metody UHPLC-PDA pro souběžné stanovení antazolinu hydrochloridu a nafazolinu hydrochloridu v očních přípravcích [13].

Článek pojednává o studii nové metody, která je založená na principu UHPLC s tím, že byla optimalizována pro současné stanovení antazolinu hydrochloridu a nafazolinu hydrochloridu v očních přípravcích.

Pro UHPLC analýzu byl použit kapalinový chromatografický systém (Nexera 2, LC-30AD) s detektorem diodového pole (*i*-DReC, SPD-M30A), online degasérem (DGU 20A5). Izokratická separace antazolinu a nafazolinu byla prováděna při 40 °C s použitím ACE Excel 2 C18PFP kolony (100 mm x 2,1 mm; 2 µm) jako stacionární fáze. Mobilní fázi v systému tvořila směs acetonitrilu a fosfátového pufru (60:40, v/v) pH 3,0, obsahující 0,3% trimethylamin. Průtoková rychlost byla 0,6 ml/min. a vstříkovaný objem 1 µl. Oba analyty byly detekovány při vlnové délce 285 nm.

Celkový čas analýzy byl 4,5 min. s retenčním časem 0,92 min. pro nafazolin a 1,86 min. pro antazolin. Ve srovnání s metodou HPLC má UHPLC značné výhody – jedná se především o zkrácení času průběhu analýzy a snížení spotřeby rozpouštědel.

Bylo prokázáno, že navržená UHPLC metoda je jednoduchá a rychlá pro stanovení antazolinu a nafazolinu v komerčně dostupných očních přípravcích a poskytuje výtěžnost v rozmezí 99,6 % až 100,4 %.

Aljuffali, Ibrahim A; et al. Vývoj a validace stability indikující metody HPLC vhodné k analýze gatifloxacinu ve hromadně vyráběných léčivých přípravcích a farmaceutických přípravcích [14].

Článek popisuje jednoduchou a rychlou chromatografickou techniku, která byla vyvinuta a validována pro kvantitativní stanovení gatifloxacinu v tabletách, pevných lipidových částicích (SLNs) a očních kapkách.

Gatifloxacin je syntetické širokospektré fluorochinolonové antibiotikum, připravené z kyseliny nalidixové, využívá se k léčbě širokého spektra infekčních onemocnění.

Analýza byla provedena na vysokoúčinném kapalinovém chromatografu – model Shimadzu ® LC-9A, vybaveným UV-VIS detektorem SPP-61. Testované přípravky byly analyzovány pomocí reverzní fáze SUPELCO ® 516C-C-18-DB, 50306-U, HPLC kolony (250 mm x 4,6 mm; 5 µm) a mobilní fáze složené z pufru hydrogenfosforečnanu disodného a acetonitrilu (75:25, v/v) s kyselinou orthofosforečnou pH 3,3. Rychlost průtoku byla 1,0 ml/min. a koncentrace analytů byly měřeny s využitím UV-VIS detektoru při vlnové délce 293 nm. Analýzy probíhaly při pokojové teplotě (25 °C±2 °C.). Gatifloxacin byl ve všech přípravcích separován během 2,767 min.

Experimentální testování prokázalo, že odhadované množství gatifloxacinu v tabletách, SLNs a očních kapkách neobsahuje interferující příměs pomocných látek. Tím byla prokázána přesnost, správnost, citlivost a účinnost metody, kterou lze používat pro rutinní analytické kontroly kvality gatifloxacinu v hromadně vyráběných přípravcích a farmaceutických přípravcích.

Mehta, J.; at al. Vývoj a validace přesné metody pro stanovení konzervantu benzalkoniumchloridu v očních kapkách s obsahem latanoprostu [15].

V článku je popsána jednoduchá a přesná metoda reverzní fáze HPLC, která byla vyvinuta a validována pro kvantifikaci konzervantu benzalkoniumchloridu v očních kapkách s obsahem latanoprostu.

Stanovení nízkých koncentrací konzervantů ve farmaceutických přípravcích představuje závažný problém v současné farmaceutické analýze očních roztoků.

Analýza byla provedena na kapalinovém chromatografu, složeného z Dionex systému, vybaveného P-680 HPLC pumpou, ASI-100 automatickou injektáží vzorků a termostatovaným kolonovým příslušenstvím TCC-100 a nosičem rozpouštědla SOR-100.

Analyt byl chromatografován na Waters Spherisorb CN (250 mm x 4,6 mm; 5 µm) stacionární koloně. Jako optimální složení mobilní fáze bylo experimentálně stanoveno použití směsi pufru dihydrogenorthofosforečnanu draselného (pH 5,5) a acetonitrilu

(40: 60, v/v). Mobilní fáze byla pumpována s rychlostí průtoku 1 ml/min., při udržování stálé teploty 30 °C. Maximální UV detekce byla dosažena při 210 nm.

Metoda byla úspěšně aplikována pro kvantitativní stanovení konzervační látky benzalkoniumchloridu ve farmaceutických očních roztocích, obsahujících latanoprost, bez interference známých pomocných látek a jiných složek léčiva. Výhodou metody je její robustnost, selektivita, kratší časy analýzy a resistance k malým změnám v pH, rychlosti průtoku a složení mobilní fáze.

Awad, Hanan; et al. Validovaná HPLC testovací metoda pro stanovení alginátu sodného ve farmaceutických přípravcích [16].

Článek se zabývá metodou HPLC, využívající detektor diodového pole, která byla vyvinuta a validována pro kvantitativní stanovení alginátu sodného v perorálních antacidech (v suspenzích).

Alginát sodný je čištěný uhlovodíkový produkt, extrahovaný z hnědých mořských řas. Obsažené látky z mořských řas (algináty a kyselina algininová) se hojně využívají v potravinářském průmyslu, biotechnologiích a medicíně pro svoji schopnost tvořit gel.

K instrumentaci byl využit Shimadzu kapalinový chromatograf, složený z kontrolního systému CBM-20A, modulu pro dodávku rozpouštědla, online degaséru, autosampleru, DAD SPD-M20A a LC pracovní stanice.

Fenylová stacionární fáze (250 mm x 4,6 mm; 5 μ m) byla pro experiment využívána při pokojové teplotě. Eluce probíhala za izokratických podmínek s mobilní fází složenou z 0,5mmol/l kyseliny fosforečné (v 1 litru destilované vody), upravenou na pH 7,0 hydroxidem sodným. Rychlost průtoku byla 0,7 ml/min. při teplotě 25 °C, vlnové délce 200 nm vhodné pro UV detekci a vstříkovacímu objemu 20 μ l. Eluce alginátu sodného trvala 2,65 \pm 0,1 min.

Metoda byla validována pro její specifitu, linearitu, přesnost, správnost a robustnost a může být využita pro rutinní analýzu alginátu sodného v hromadně vyráběných léčivých přípravcích.

Dolowy, M.; et al. Rychlá a jednoduchá TLC – denzitometrická metoda pro testování clobetasolu propionátu v topických roztocích [17].

V článku je popsána rychlá, jednoduchá a levná TLC metoda s denzitometrickou detekcí při 246 nm. Tato metoda byla pečlivě validována pro testování clobetasolu propionátu v topických přípravcích, obsahujících účinnou látku v množství 0,50 mg/ml.

Clobetasol 17- propionát je jeden z nejsilnějších lokálních kortikosteroidů, využívající své imunosupresivní a protizánětlivé aktivity v léčbě kožních zánětlivých onemocnění (chronický ekzém, psoriáza, atopická dermatitida).

Na základě preklinických studií se nejvhodnějším složením stacionární fáze ukázalo potažení chromatografických plátů běžně užívaným silikagelem 60 F₂₅₄, což se týče mobilní fáze, byla použita směs toluenu a methanolu (40:9,8, v/v). Separace probíhala na předem aktivovaných TLC plátech při teplotě 110 °C a po dobu 20 minut. Testované roztoky o objemu 5 µm clobetasolu propionátu byly aplikovány na TLC pláty Camag mikropipetami. Experimentálně bylo stanoveno, že saturace TLC kolony mobilní fází po dobu 20 minut před vlastní analýzou zajišťuje dobrou reprodukovatelnost a ostré píky testovaných látek. Chromatografické pláty se nechaly vysušit a poté byly skvrny detekovány při maximální vlnové délce 246 nm.

Hlavní výhodou testované metody jsou nízké náklady v porovnání s HPLC metodou a nutnost minimální přípravy vzorků, což má za následek poměrně krátký čas analýzy ve srovnání s TLC denzitometrií a spektrofotometrickými metodami popisovanými pro ostatní farmaceutické přípravky jiných lékových forem (mléka, krémy).

Pomocí testované TLC – denzitometrické techniky může být clobetasol propionát přítomný ve vzorku efektivně oddělen od jeho příbuzných sloučenin. Průměrná výtěžnost testovaného clobetasolu propionátu byla v rozmezí 98,7 % - 101,0 %. Testovaná hodnota účinné látky byla ve shodě s lékopisnými požadavky, proto je metoda vhodná pro laboratorní rutinní kontroly kvality clobetasolu propionátu v topických roztocích. Předkládaný TLC – denzitometrický postup může být použit jako náhrada metody HPLC, pokud ta není dostupná.

Kumar, Naveen G. S.; et al. Vývoj a validace HPLC-UV metody pro současné stanovení fenylefrinu hydrochloridu a ketorolaku tromethaminu v očních přípravcích [18].

Autoři článku popisují jednoduchou, rychlou a citlivou HPLC metodu s UV detekcí, která byla vyvinuta a validována pro kvantifikaci fenylefrinu hydrochloridu a ketorolaku tromethaminu ve farmaceutických lékových formách.

Fenylefrin je alfa – 1 adrenergní receptorový agonista používaný jako dekonjestant, v lécích způsobujících dilataci pupil a na zvýšení krevního tlaku. Ketorolak tromethamin je nesteroidní protizánětlivá účinná látka.

Chromatografická separace byla provedena na LC-100 vysokoúčinném kapalinovém chromatografu, vybaveným degasérem, detektorem diodového pole s volitelnou vlnovou délkou a autosamplerem.

Chromatografická separace probíhala na C18 koloně (250 mm x 4,6 mm; 5µm) a za přítomnosti mobilní fáze jednoduchého složení – 10mmol/l pufru dihydrogenfosforečnanu draselného s triethylaminem (pH 3,14) a acetonitrilem (40:60, v/v) při průtokové rychlosti mobilní fáze 0,5 ml/min. Detektor byl nastaven na hodnotu 302 nm, analýza probíhala za teploty 37 °C a trvala 8 min.

Z výsledků analýzy vyplynulo, že testovaná HPLC-UV metoda má výrazné výhody oproti předchozím publikovaným metodám, protože pro chromatografickou separaci používá mobilní fázi jednoduchého složení, analýza trvá kratší čas a příprava vzorků je jednodušší.

Upmanyu, N.; et al. Testování obsahu desmopresinu acetátu v nosních sprejích – vývoj validované předkolonové HPLC-fluorescenční metody [19].

V článku je autory popsána jednoduchá a specifická HPLC-fluorescenční metoda, která byla navržena pro kvantifikaci desmopresinu acetátu v nanogramových množstvích, obsažených v nosních přípravcích.

Desmopresin acetát je syntetický analog vasopresinu, doporučený k léčbě diabetes insipidus, lehkých forem hemofilie a Von Willebrandovy nemoci. Bylo nutné vyvinout citlivou a selektivní metodu pro testování nízkých koncentrací výše zmíněné účinné látky, obsažené v nosních přípravcích.

Účinná látka a konzervanty byly společně eluovány na C8 koloně (50 mm x 2,1 mm; 3,5 μm) s mobilní fází složenou z 0,1% kyseliny trifluoroctové, acetonitrilu a isopropylalkoholu (70:25:5). Emise byla měřena při vlnové délce 450 nm a rychlost průtoku byla 0,8 ml/min. Reakce byla optimalizována pro podmínky vhodného pH, k zajištění stability vytvořených fluoroforů a času potřebného pro reakci.

Maximální fluorescenční intenzita byla dosažena za 3 min. po smísení roztoků a zůstala konstantní po dobu nejméně 30 min. při teplotě 20-25 °C.

Vyvinutá HPLC-fluorescenční metoda byla úspěšně využita pro kvantifikaci desmopresinu acetátu v nosních sprejích. Metoda je specifická, citlivá, přesná a správná, a tedy vhodná ke kvantifikaci koncentrace 50 mg/ml účinné látky v přípravcích s dostatečnou přesností a správností.

Okaru, Alex O.; et al. Robustní HPLC metoda vhodná pro potvrzení stability azitromycinu v tabletách a suspenzích [20].

Azitromycin je semi-syntetické makrolidové ATB, klinicky užívané k léčbě širokého spektra bakteriálních infekcí.

Článek popisuje vývoj, validaci a aplikaci jednoduché, izokratické a robustní metody reverzní fáze HPLC, vhodnou k analýze azitromycinu v tabletách a suspenzích.

Optimální chromatografické podmínky pro separaci byly zajištěny vhodným složením mobilní fáze, která obsahovala acetonitril, 0,1 mol/l pufr dihydrogenfosforečnanu draselného (pH 6,5), 0,1 mol/l hydroxid tetrabutylamonný (pH 6,5) a vodu (25:15:1:59, v/v/v/v). Průtoková rychlost mobilní fáze byla 1,0 ml/min. Stacionární fáze byla složena z reverzní fáze XTerra® (250 mm x 4,6 mm; 5 μm), udržována při teplotě 43 °C s UV detekcí při 215 nm. Degradací produkty azitromycinu v kyselém a oxidačním prostředí při teplotě 37 °C byly odděleny od aktivní složky přípravku, čímž došlo k potvrzení lékové stability testovanou metodou.

Al-Rimawi F.; et al. Vývoj a validace reverzní HPLC metody pro analýzu tetrahydrozolinu hydrochloridu v očních přípravcích [21].

V této práci je popsán postup při vývoji a validaci jednoduché, přesné, správné metody, indikující stabilitu účinné látky tetrahydrozolinu hydrochloridu v očních přípravcích (kapkách).

Tetrahydrozolin je látka patřící mezi alfa agonisty, jeho hlavní mechanismus účinku spočívá ve zúžení spojivkových cév. To má za následek zmírnění začervenání očí, způsobené drobnými podrážděními očí. Látka se používá v očních a nosních přípravcích ve formě kapek.

Stanovení látky probíhalo metodou HPLC v reverzním módu, izokratickou elucí s použitím UV detekce. Validace metody byla prováděna na základě požadavků Amerického lékopisu na zkoušky stanovení, zahrnující přesnost, správnost, selektivitu, robustnost a linearitu.

Experiment byl prováděn na HPLC systému (Dionex systém, USA) s detektorem (PDA – 3000), vybaveným pumpou (LPG – 3400A), autosamplerem (WPS – 300SL), kolonovým vybavením a nosičem rozpouštědla. Chromatografická analýza byla prováděna na koloně C8 (125 mm x 4,6 mm, i.d.; 5 µm).

Mobilní fáze byla připravena rozpuštěním 1,0 g dihydrogenfosforečnanu draselného v 1000 ml vody, přidáním 3,0 ml triethylaminu a pH upraveno na 3,0 roztokem zředěné kyseliny fosforečné. Filtrovaná a přečerpaná směs acetonitrilu a pufru byla testována jako mobilní fáze pro analýzu tetrahydrozolinu hydrochloridu. Byly také testovány různé rychlosti průtoku (1,0; 1,5 a 2,0 ml/min.). UV detekce probíhala při vlnové délce 240 nm.

Předběžné studie zahrnovaly testování C8 a C18 kolon a testování řady složek mobilní fáze. Pro své výhodné chromatografické parametry byla nakonec zvolena jako stacionární fáze C8 kolona (125 mm x 4,6 mm, i.d.; 5 µm) a jako mobilní fáze směs acetonitrátu a fosfátového pufru pH 3,0 (20:80 v/v) s průtokovou rychlostí 1,0 ml/ min.

a detekcí při vlnové délce 240 nm. Při těchto podmínkách bylo dosaženo nejlepších podmínek pro separaci tetrazolinu hydrochloridu.

Walash M.; et al. Rychlá separace a kvantifikace tří léčivých látek proti glaukomu pomocí HPLC s UV detekcí [22].

V této práci je popsána studie, při které byla vyvinuta a validována jednoduchá a přesná HPLC metoda pro rychlou separaci 3 účinných látek užívaných při léčbě glaukomu – timolol maleát, brimonidin tartarát a latanoprost.

Zelený zákal (glaukom) je neurodegenerativní oční onemocnění, spojené se zřetelnými změnami optického nervu oka.

Při testovací studii byl použit HPLC systém (Shimadzu Corp., Japonsko), spojený s LC – 20 AD chromatografem, SPD – 20A UV – VIS detektorem a DGU – 20A5 online ředící degasér.

Separace výše zmíněných 3 účinných látek byla dosažena v čase < 6 min. za použití BDS Hypersil fenyl kolony jako stacionární fáze a s mobilní fází tvořenou směsí acetonitrilu a fosfátového pufru pH 4,0 (50:50, v/v), rychlostí průtoku 1,2 ml/min. a UV detekcí při 210 nm.

Tato metoda byla lineární při koncentracích v rozmezí 5,0-200,0 µg/ml, 2,0- 80,0 µg/ml a 1,0-25,0 µg/ml. Metoda byla použita pro stanovení fixních kombinací 2 účinných látek pro léčbu glaukomu, ve vzorku byl vždy timolol maleát dohromady s brimonidinem tartarátem anebo s latanoprostem.

Gumustas M.; et al. Stanovení antazolinu a tetrahydrozolinu v očních roztocích kapilární elektroforézou a stabilitu indikující HPLC metodou [23].

Tento článek popisoval studii, jejímž cílem bylo vyvinout a optimalizovat 2 metody – kapilární elektroforézu a HLPC metodu – pro stanovení antazolinu a tetrahydrozolinu v očních přípravcích.

Optimálních elektroforetických podmínek bylo dosaženo s využitím základního elektrolytu (20mmol/l fosfátový pufr, pH 7,0), při kapilární teplotě 25 °C, separačním napětí 22 kV a vstřikovacího tlaku vzorku 50 mbar po dobu 17 sekund.

HPLC analýza byla provedena analytickou kolonou Kinetex (150 mm x 4,6 mm i.d.; 5 µm) s rychlostí průtoku 1 ml/min. mobilní fáze. Mobilní fáze byla složena z 0,05% kyseliny trifluoroctové v dvakrát destilované vodě (pH 3,0; upraveno 5mol/l hydroxidem sodným), acetonitrilu a pufru (63:37, v/v) při pokojové teplotě. Vstřikovaný objem vzorků byl 10µl a vlnová délka na detektoru 215 nm pro sledování obou analytů.

Obě vyvinuté metody se ukázaly být jednoduché a rychlé při stanovení antazolinu a tetrahydrozolinu v očních roztocích při velmi dobré výtěžnosti v rozmezí 97,9 % - 102,70 % pro CE i HPLC.

Tab. 1 Shrnutí informací z vyhledaných publikovaných článků, 1. část

Léková forma analyzovaného léčivého přípravku	Stanovované látky	Použitá analytická metoda	Způsob detekce	Stacionární fáze	Mobilní fáze	Výhody	Zdroj
oční suspenze	gatifloxacin, prednisolon acetát	UV spektrofotometrie	UV spektrofotometr (348 nm-gatifloxacin, 263 nm-prednisolon acetát)	<i>měření probíhalo s přidavkem acetonitrilu a vody (70:30, v/v)</i>		souběžné stanovení dvou účinných látek, výsledky srovnatelné s HPLC	[11]
oční kapky	moxifloxacin hydrochlorid, dexamethason	reverzní HPLC	detektor s diodovým polem (254 nm)	BDS Hypersil C8 kolona (250 mm x 4,6 mm; 5µm)	směs 20mmol/l fosfátového pufru, 0,1% (v/v) trimethylaminu pH 2,8 (upraveno zředěnou kyselinou fosforečnou) a methanolu (38,5:61,5 v/v)	souběžné stanovení dvou účinných látek	[12]

Tab. 2 Shrnutí informací z vyhledaných publikovaných článků, 2. část

oční kapky	antazolin hydrochlorid, nafazolin hydrochlorid	UHPLC	detektor s diodovým polem (285 nm)	ACE Excel 2 C18PPF kolona (100 mm x 2,1mm; 2µm)	směs acetonitrilu, fosfátového pufru (60:40, v/v) pH 3,0 a 0,5% triethylaminu	ve srovnání s HPLC – rychlejší, jednodušší operace, malá množství rozpouštědel, vysoká selektivita	[13]
oční kapky	gatifloxacin	HPLC	UV – VIS detektor (293 nm)	SUPELCO® 516 C-18-DB, 50306-U, HPLC kolona (250 mm x 4,6 mm; 5 µm)	směs pufru hydrogenfosforečnanu disodného, acetonitrilu (75:25, v/v) a kyseliny orthofosforečné (pH 3,3)	jednoduchá, rychlá metoda, vhodná pro rutinní kontroly kvality HVLP obsahujících gatifloxacin	[14]
oční kapky	benzalkonium chlorid	reverzní HPLC	UV detektor (210 nm)	Waters Spherisorb CN (250 mm x 4,6 mm; 5 µm)	směs pufru dihydrogenfosforečnanu draselného (pH 5,5) a acetonitrilu (40:60 v/v)	robustní metoda, resistantní k malým změnám v pH, průtoku a složení mobilní fáze	[15]

Tab. 3 Shrnutí informací z vyhledaných publikovaných článků, 3. část

perorální suspenze	alginát sodný	HPLC	detektor s diodovým polem (200 nm)	fenylová stacionární fáze (250 mm x 4,6 mm; 5 µm)	0,5mmol/l kyselina fosforečná, upravená na pH 7,0 hydroxidem sodným	jednoduchá, specifická metoda, vhodná pro rutinní analýzu	[16]
topické roztoky – sprej, roztok na kůži, šampón	clobetazol propionát	TLC	denzitometr (246 nm)	silikagel 60 F ₂₅₄	směs toluenu a methanolu (40: 9,8; v/v)	ve srovnání s HPLC – nižší náklady	[17]
oční kapky	fenylefrin hydrochlorid, ketorolak trometamin	HPLC	UV detektor, detektor s diodovým polem (302 nm)	Pronto SILC 18 (250 mm x 4,6 mm; 5 µm)	směs pufru dihydrogenfosforečnanu draselného s triethylaminem (pH 3,14) a acetonitrilu	jednoduché složení MF, krátký čas analýzy, jednoduchá příprava vzorku	[18]
nosní sprej	desmopresin acetát	HPLC	fluorescenční detektor (450 nm)	C8 kolona (50 mm x 2,1 mm; 3,5 µm)	směs 0,1% kyseliny trifluoroctové, acetonitrilu a isopropylalkoholu (70:25:5)	specifická, citlivá, přesná a správná metoda	[19]

Tab. 4 Shrnutí informací z vyhledaných publikovaných článků, 4. část

perorální suspenze	azitromycin	reverzní HPLC	detektor s diodovým polem (215 nm)	XTerra® (250 mm x 4,6 mm; 5 µl)	směs acetonitrilu, 0,1mol/l pufru dihydrogenfosforečnanu draselného (pH 6,5), 0,1mol/l hydroxidu tetrabutylammonného (pH 6,5) a vody (25:15:1:59, v/v/v/v)	vhodná pro rutinní laboratorní analýzy	[20]
oční kapky	tetrazolin hydrochlorid	reverzní HPLC	detektor s diodovým polem (240 nm)	C 8 kolona (125 mm x 4,6 mm i.d.; 5 µm)	směs acetonitrilu a fosfátového pufru (pH 3,0), (20:80, v/v)	přesná, správná, robustní metoda	[21]
oční kapky	timolol maleát, brimonidin tartarát, latanoprost	HPLC	UV detektor (210 nm)	BDS Hypersil enyl kolona	směs acetonitrilu a fosfátového pufru (pH 4,0), (50:50, v/v)	krátký čas analýzy (<6 min.)	[22]

Tab. 5 Shrnutí informací z vyhledaných publikovaných článků, 5. část

oční kapky	antazolin, tetrahydrozolin	kapilární elektroforéza (CE)	UV detektor (215 nm)	<i>podmínky separace – fosfátový pufr (pH 7,0), kapilární teplota 25 °C, separační napětí 22 kV</i>		jednoduchá a rychlá metoda stanovení	[23]
oční kapky	antazolin, tetrahydrozolin	HPLC	UV detektor (215 nm)	Kinetex kolona (150 mm x 4,6 mm i.d.; 5 µm)	směs 0,05% kyseliny trifluoroctové v 2x destilované vodě (pH upravené na 3,0 5mol/l NaOH), acetonitrilu a pufru (63:37, v/v)	jednoduchá a rychlá metoda stanovení	[23]

ZÁVĚR

Cílem této bakalářské práce bylo vyhledat informace o metodách, které jsou využívány k analýze jednoduchých léčivých přípravků a také vyhledat publikované články, popisující tyto metody. Výsledkem je systematické zpracování jednotlivých analytických metod, popis jejich instrumentace a využití a shrnutí základních informací z publikovaných článků.

Práce je rozdělena na tři části. V první části je definován pojem léčivý přípravek, rozdělení do jednotlivých skupin z různých hledisek. Další část je věnována rozdělení analytických metod, jejich charakteristice, popisu instrumentace a možnostem využití v analýze léčiv.

Třetí část se týká stručného shrnutí informací z publikovaných článků s důrazem na instrumentaci dané použité analytické metody. Důležité informace z nalezených článků jsou zpracovány do tabulek. V tabulkách je uvedena léková forma analyzovaného přípravku, stanovovaná látka (většinou se jedná o účinné látky, ale mohou to být i látky pomocné, například konzervanty), typ použité analytické metody, způsob detekce, u metody HPLC typ a složení stacionární a mobilní fáze (u jiné metody – CE a spektrometrie – jsou uvedeny podmínky analýzy) a výhody použité metody. Z tabulek je na první pohled zřejmé, že nejvíce používanou metodou analýzy léčiv je HPLC, což potvrzuje i informace uvedené v druhé části práce.

SEZNAM ZKRATEK

A	absorbance měřeného roztoku
A_s	faktor asymetrie
ATB	antibiotikum
BDS	základní deaktivovaný oxid křemičity (base deactivated silica)
c	látková koncentrace (v mol/l)
CE	kapilární elektroforéza
DNA	deoxyribonukleová kyselina
ϵ_λ	molární absorpční koeficient (konstanta pro danou látku za daných podmínek při určité vlnové délce, v $\text{dm}^{-3} \text{mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$)
ECD	detektor elektronového záchytu (electron capture detector)
FID	plamenově ionizační detektor (flame ionization detector)
FPD	plamenofotometrický detektor
GC	plynová chromatografie (gas chromatography)
GLC	plynová rozdělovací chromatografie (gas – liquid chromatography)
GSC	plynová adsorpční chromatografie (liquid – solid chromatography)
HPLC	vysokoučinná kapalinová chromatografie (high-performance liquid chromatography)
HVLP	hromadně vyráběný léčivý přípravek
I	tok záření, které prošlo měrnou kyvetou
I_0	tok záření, které prošlo srovnávací kyvetou
IEC	iontově výměnná chromatografie (ion exchange chromatography)
IPLP	individuálně připravovaný léčivý přípravek
IR, IČ	infračervený/á (infrared)
l	tloušťka absorbující vrstvy (v cm)
LF	léková forma
LC	kapalinová chromatografie (liquid chromatography)
LLC	kapalinová rozdělovací chromatografie (liquid – liquid chromatography)
LP	léčivý přípravek
LSC	kapalinová adsorpční chromatografie (liquid – solid chromatography)

MS	hmotnostní spektrometr (mass spectrometr)
PC	papírová chromatografie (paper chromatography)
pH	záporný dekadický logaritmus vodíkových iontů
Ph. Eur.	Evropský lékopis (European Pharmacopoeia)
PID	fotoionizační detektor (photoionization detector)
SLNs	pevné lipidové částice
T	transmitance
TCD	tepelně vodivostní detektor (thermal conductivity detector)
TID	termoionizační detektor
TLC	tenkovrstvá chromatografie (thin layer chromatography)
t_R	retenční čas
UV, UF	ultrafialový/á (ultraviolet)
VIS	viditelné (visual)

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] Zákon č. 378/2007 Sb. Zákon o léčivech a o změnách některých souvisejících zákonů (zákon o léčivech). *Zákony pro lidi.cz* [online]. AION CS, c2010-2018 [cit. 2018-04-26]. Dostupné z: <https://www.zakonyprolidi.cz/cs/2007-378>
- [2] *Lékové formy – část 1* [online]. Praha: VŠCHT, c2014 [cit. 2018-04-29]. Dostupné z: <https://uchpel.vscht.cz/files/uzel/0022888/lekoveformy1.ppt>
- [3] Co je to léková forma a jaké druhy jsou? *Státní ústav pro kontrolu léčiv* [online]. Praha: SÚKL, c2010 [cit. 2018-05-11]. Dostupné z: <http://www.olecich.cz/encyklopedie/co-je-to-lekova-forma-a-jake-druhy-jsou>
- [4] Karlíček, R. a kol. *Analytická chemie pro farmaceuty*. 4., nezměn. vyd. Praha: Karolinum, 2013. 281 s. Učební texty Univerzity Karlovy v Praze. ISBN 978-80-246-2202-6.
- [5] Klimeš, J. a kol. *Kontrolně-analytické hodnocení léčiv lékopisnými metodami*. 2. vydání. Hradec Králové: Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, 2015. 265 stran. ISBN 978-80-260-8175-3.
- [6] Nováková, L. a kol. *Moderní HPLC separace v teorii a praxi*. 1. vyd. Praha [i.e. Hradec Králové]: Lucie Nováková, 2013. 2 sv. (299, 235 s.). ISBN 978-80-260-4243-3.
- [7] Nikolova, I. Chromatografické metody. *Přírodovědecká fakulta Univerzita J. E. Purkyně* [online]. [cit. 2018-05-01]. Dostupné z: http://physics.ujep.cz/~mkormund/P219/chromatograficke_metody_2014.pdf
- [8] Coufal, P. High Performance Liquid Chromatography. *Přírodovědecká fakulta Univerzita Karlova* [online]. Praha, c 1996 [cit. 2018-05-11]. Dostupné z: <http://web.natur.cuni.cz/~pcoufal/hplc.html>

- [9] Hmotnostní spektrometrie. In: *SlidePlayer* [online]. [cit. 2018-05-11]. Dostupné z: <http://slideplayer.cz/slide/4188584/release/woothee>
- [10] KLOUDA, P. *Moderní analytické metody*. Třetí, upravené vydání. Ostrava: Pavel Klouda – nakladatelství Pavko, 2016. 176 stran. ISBN 978-80-86369-22-8.
- [11] Sversut, Rubia A.; Alcantara, Isabella C.; Rosa, Aline M.; et al. Simultaneous determination of gatifloxacin and prednisolone acetate in ophthalmic formulation using first-order UV derivative spectroscopy. *Arabian Journal of Chemistry*. 2017; **10** (5): 604–169. DOI: 10.1016/j.arabjc.2014.11.026.
- [12] Razzaq, Syed N.; Ashfaq, M.; Khan, Islam U.; et al. Simultaneous determination of dexamethasone and moxifloxacin in pharmaceutical formulations using stability indicating HPLC method. *Arabian Journal of Chemistry*. 2017; **10** (3): 321–328. DOI: 10.1016/j.arabjc.2014.11.016
- [13] Ali, A.; Farooq, U.; Ahmed, M.; et al. Stability Indicating UHPLC-PDA Assay for Simultaneous Determination of Antazoline Hydrochloride and Naphazoline Hydrochloride in Ophthalmic Formulations. *Acta Chimica Slovenica*. 2017; **64** (2): 332–341. DOI: 10.17344/acsi.2017.3166
- [14] Aljuffali, Ibrahim A.; Kalam, Mohd. A.; Sultana, Y.; et al. Development and validation of stability-indicating high performance liquid chromatography method to analyze gatifloxacin in bulk drug and pharmaceutical preparations. *Saudi Pharmaceutical Journal*. 2015; **23** (1): 85–94. DOI: 10.1016/j.jsps.2014.06.005
- [15] Mehta, J.; Patidar, K.; Vyas, N. Development and Validation of a Precise Method for Determination of Benzalkonium Chloride (BKC) Preservative, in Pharmaceutical Formulation of Latanoprost Eye Drops. *E – Journal of Chemistry*. 2010; **7** (1): 11–20. DOI: 10.1155/2010/312379

- [16] Awad, H.; Aboul-Enein, Hassan Y. A Validated HPLC Assay Method for the Determination of Sodium Alginate in Pharmaceutical Formulations. *Journal of Chromatographic Science*. 2013; **51** (3): 208–214. DOI: 10.1093/chromsci/bms129
- [17] Dolowy, M.; Kozik, V.; Bak, A.; et al. Rapid and Simple TLC-Densitometric Method for Assay of Clobetasol Propionate in Topical Solution. *Molecules*. 2017; **22** (11): 1888. DOI: 10.3390/molecules22111888
- [18] Kumar, Naveen G. S.; Srinivasa, U. Development And Validation Of A Hplc-Uv Method For Simultaneous Determination Of Phenylephrine Hydrochloride And Ketorolac Tromethamine In Ocular Formulation. *Indo American Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2017; **4** (9): 2789–2795. DOI: 10.5281/zenodo.887213
- [19] Upmanyu, N.; Porwal, Pawan K. Assay of Desmopressin Acetate in Nasal Spray: Development of Validated Pre Column HPLC – Fluorescence Method. *Advanced Pharmaceutical Bulletin*. 2017; **7** (3): 451–459. DOI: 10.15171/apb.2017.054
- [20] Okaru, Alex O.; Abuga, Kennedy O.; Kamau, Franco N.; et al. A Robust Liquid Chromatographic Method for Confirmation of Drug Stability of Azithromycin in Bulk Samples, Tablets and Suspensions. *Pharmaceutics*. 2017; **9** (1): UNSP 11. DOI: 10.3390/pharmaceutics9010011.
- [21] Al-Rimawi F.; Zareer W.; Rabie S.; Quod M. Development and validation of a reversed-phase HPLC method for analysis of tetrahydrozoline hydrochloride in eye drop formulations. *Journal of Pharmaceutical Analysis*. 2012; **2** (1):67-70. DOI: 10.1016/j.jpha.2011.11.001.
- [22] Walash M.; El-Shaheny R. Fast separation and quantification of three anti-glaucoma drugs by high-performance liquid chromatography UV detection. *Journal of Food and Drug Analysis*. 2016; **24** (2): 441-449. DOI: 10.1016/j.jfda.2015.11.006.

[23] Gumustas M.; Alshana U.; Ertas N.; Goger N. G.; Ozkan S.A.; Uslu B. Determination of antazoline and tetrahydrozoline in ophthalmic solutions by capillary electrophoresis and stability-indicating HPLC methods. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2016; **124**: 390-398. DOI: 0.1016/j.jpba.2016.02.032