

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
FARMACEUTICKÁ FAKULTA
V HRADCI KRÁLOVÉ

Katedra analytické chemie

Diplomová práce

**Využití metody sekvenční injekční
chromatografie pro separaci a stanovení
triamcinolon acetonidu a kyseliny salicylové
v léčivém přípravku Triamcinolon-IVAX**

Hradec Králové 2007

Pavel Holík

Děkuji za pomoc při své diplomové práci panu RNDr. Daliboru Šatínskému, Ph.D.,
Mgr. Petru Chocholoušovi, Ph.D. a všem pracovníkům katedry analytické chemie.

Obsah

SEZNAM OBRÁZKŮ	4
SEZNAM TABULEK	5
SEZNAM ZKRATEK	6
1. ÚVOD A CÍL PRÁCE	7
1.1 úvod práce	8
1.2 cíl práce.....	9
2. TEORETICKÁ ČÁST	10
2.1 průtokové neseparační analytické metody	11
2.2 průtokové separační analytické metody.....	14
2.3 stanovované látky	17
3. PRAKTICKÁ ČÁST	19
3.1 použité přístroje	20
3.2 použité chemikálie.....	20
3.3 příprava roztoků.....	21
4. VÝSLEDKY A DISKUSE	22
4.1 vývoj a optimalizace metody	23
4.2 stanovení limitu detekce a kvantifikace.....	25
4.3 stanovení linearitu odezvy	27
4.4 opakovatelnost měření pro různé koncentrace a retenční časy	31
4.5 stanovení v kapkách Triamcinolon – IVAX	34
5. ZÁVĚR.....	43
6. LITERATURA	45
ABSTRAKT	47

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1	schéma FIA analyzátoru	11
Obrázek 2	schéma SIA analyzátoru.....	12
Obrázek 3	schéma Lab-On-Valve systému.....	13
Obrázek 4	schéma SIC systému.....	14
Obrázek 5	makropóry \varnothing 2 μ m.....	15
Obrázek 6	mezopóry \varnothing 13 nm	15
Obrázek 7	kolona Onyx TM monolithic C18 (50 x 4,6 mm) s monolitickou předkolonou (5 x 4,6 mm)	16
Obrázek 8	vzorec kyseliny salicylové	17
Obrázek 9	vzorec triamcinolon-acetonidu	18
Obrázek 10	limit detekce pro SA	25
Obrázek 11	limit detekce pro TCA	26
Obrázek 12	limit detekce pro PP.....	26
Obrázek 13	kalibrační křivka SA.....	28
Obrázek 14	kalibrační křivka TCA.....	29
Obrázek 15	kalibrační křivka PP	30
Obrázek 16	záznam měření pro koncentrace SA 200,00 μ g.ml ⁻¹ , TCA 20,00 μ g.ml ⁻¹ , PP 40,00 μ g.ml ⁻¹	31
Obrázek 17	záznam měření pro koncentrace SA 85,00 μ g.ml ⁻¹ , TCA 8,50 μ g.ml ⁻¹ , PP 17,00 μ g.ml ⁻¹	32
Obrázek 18	záznam měření pro koncentrace SA 12,50 μ g.ml ⁻¹ , TCA 1,25 μ g.ml ⁻¹ , PP 2,50 μ g.ml ⁻¹	32
Obrázek 19	záznam SIC chromatogramu placeba	35
Obrázek 20	záznam SIC chromatogramu vlastního stanovení kapek	35
Obrázek 21	záznam porovnávacího měření kapek metodou HPLC	41

SEZNAM TABULEK

<i>Tabulka 1</i>	<i>program použitý k analýze.....</i>	<i>24</i>
<i>Tabulka 2</i>	<i>naměřené hodnoty pro kalibrační křivku SA</i>	<i>28</i>
<i>Tabulka 3</i>	<i>naměřené hodnoty pro kalibrační křivku TCA</i>	<i>29</i>
<i>Tabulka 4</i>	<i>naměřené hodnoty pro kalibrační křivku PP</i>	<i>30</i>
<i>Tabulka 5</i>	<i>výsledky opakovaného měření pro SA</i>	<i>33</i>
<i>Tabulka 6</i>	<i>výsledky opakovaného měření pro TCA.....</i>	<i>33</i>
<i>Tabulka 7</i>	<i>výsledky opakovaného měření pro PP</i>	<i>33</i>
<i>Tabulka 8</i>	<i>složení dle SPC výrobce (v 10 g)</i>	<i>34</i>
<i>Tabulka 9</i>	<i>výsledky stanovení obsahu v kapkách</i>	<i>36</i>
<i>Tabulka 10</i>	<i>chromatografická data - stanovení obsahu v kapkách</i>	<i>38</i>
<i>Tabulka 11</i>	<i>výsledky opakovaného měření kapek</i>	<i>39</i>
<i>Tabulka 12</i>	<i>výsledky porovnávacího měření kapek metodou HPLC</i>	<i>40</i>
<i>Tabulka 13</i>	<i>chromatografická data - porovnávací měření HPLC.....</i>	<i>41</i>
<i>Tabulka 14</i>	<i>porovnání chromatografických dat získaných měřením SIC a HPLC....</i>	<i>42</i>

SEZNAM ZKRATEK

ČL05	Český lékopis 2005
FIA	průtoková injekční analýza (Flow Injection Analysis)
HPLC	vysokoučinná kapalinová chromatografie (High Performance Liquid Chromatography)
IS	vnitřní standard
MF	mobilní fáze
PP	propylparaben
PL	pomocná látka
RSD	relativní směrodatná odchylka
SA	kyselina salicylová
SIC	sekvenční injekční chromatografie (Sequential Injection Chromatography)
SIA	sekvenční injekční analýza (Sequential Injection Analysis)
TCA	triamcinolon acetonid

1. ÚVOD A CÍL PRÁCE

1.1 ÚVOD PRÁCE

Trend vývoje laboratorních analýz je jednoznačný - jak v minulosti, tak i v současné době je kladen důraz na co možná nejvyšší citlivost, přesnost, automatizaci, výkonnost a rychlost detekce a stanovení daného analytu. Výsledkem těchto požadavků vznikla celá řada přístrojů pro instrumentální analýzu s vysokou přesností, citlivostí a téměř maximální eliminací jednoho z největších zdrojů chyb měření – lidského faktoru. Současně s tímto vývojem se však tyto přístroje staly více složitějšími, nákladnějšími, pouze s velmi úzkým spektrem použití a bez možnosti jejich jednoduchých změn a přizpůsobení se podmínkám měření. Jako alternativa k těmto finančně nákladným a velice specifickým přístrojům se ukázala metoda sekvenční injekční analýzy (SIA), kdy právě její rychlost, jednoduchost, flexibilita, velice nízká spotřeba vzorku a činidel, plná automatizace a univerzálnost použití jí dělá konkurenceschopnou.

V případě této diplomové práce se jednalo o spojení systému SIA se separačním prvkem, tj. s komerčně dostupnou krátkou monolitickou chromatografickou kolonou. Toto spojení bylo již dříve testováno na jiných aplikacích a bylo označeno jako sekvenční injekční chromatografie (SIC).

1.2 CÍL PRÁCE

Cílem této diplomové práce bylo potvrdit možnost využití sekvenční injekční chromatografie (SIC) při stanovení vícesložkových vzorků pomocí chromatografického separačního děje a porovnat tuto metodu s HPLC. Úkolem bylo pomocí SIC současně separovat a stanovit obsah triamcinolon acetonidu a kyseliny salicylové v léčivém přípravku Triamcinolon – IVAX.

2. TEORETICKÁ ČÁST

2.1 PRŮTOKOVÉ NESEPARAČNÍ ANALYTICKÉ METODY

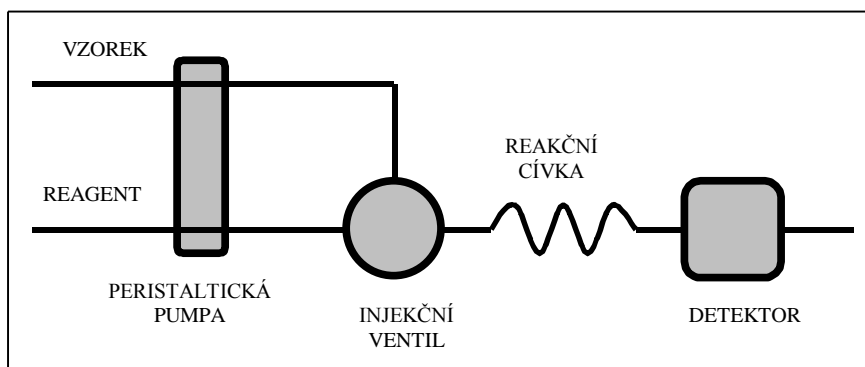
Průtokové analytické metody umožnily automatizovat složité postupy při analýze velkých sérií vzorků instrumentálními metodami, a tak podstatným způsobem zvýšit produktivitu zejména rutinních stanovení v analytických laboratořích.

2.1.1 Průtoková injekční analýza

První generace průtokových metod - průtoková injekční analýza (Flow Injection Analysis – FIA) je založena na injikování kapalného vzorku dávkovacím ventilem do kontinuálního nesegmentovaného nosného proudu kapaliny vhodného složení, nejčastěji reakčního činidla. Při pohybu nadávkované zóny vzorku v nosném proudu dochází k disperzi analyzovaného roztoku do činidla s následnou chemickou reakcí za vzniku detekovatelného produktu, který je plynule nosným proudem unášen do detektoru. Tvar získaného signálu ve formě píku je založen na koncentračním gradientu, který se vytváří na základě disperze vzorku a nosného proudu^[1, 2]. Chemická reakce však probíhá pouze do určité míry, a proto jsou jednotlivé kroky analýzy časově přesně definovány, což je nezbytné pro maximální možnou reprodukovatelnost měření^[3].

Systém je tvořen peristaltickou pumpou, injekčním dávkovacím ventilem (jednoduchý nebo dvojitý), reakční dávkovací smyčkou a detektorem. Typická základní konfigurace FIA systému je znázorněna na obrázku č. 1. Způsoby detekce závisí na vlastnostech analyzovaných látek a na použitém chemismu reakce. Nejčastěji se jedná o UV-VIS nebo IR spektrofotometrii, fluorimetrii, amperometrii, potenciometrii, apod.

Obrázek 1 schéma FIA analyzátoru

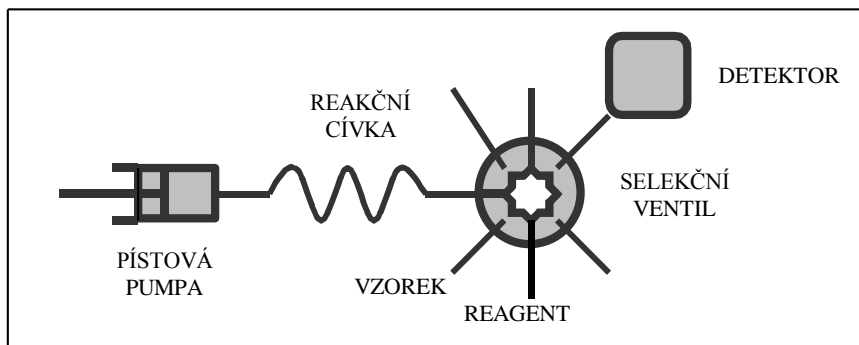


2.1.2 Sekvenční injekční analýza

Sekvenční injekční analýza (Sequential Injection Analysis – SIA) byla vyvinuta v roce 1990 kolektivem analytiků z University of Washington vedeným profesorem Růžičkou a Marshalllem jako druhá generace průtokových metod, během odstraňování nevýhod a nedokonalostí techniky průtokové injekční analýzy (FIA)[^{4,5}]. Sekvenční injekční analýza si ponechala ze základních vlastností FIA nesegmentovaný tok nosného proudu a princip kontrolované parciální disperze zóny vzorku v nosném proudu.

Oproti FIA technice sekvenční injekční analýza využívá k vytvoření nosného proudu obousměrné pístové pumpy spojené s dvoucestným solenoidním ventilem, umožňující jak obrácení, tak i zastavení toku v jakémkoliv místě analýzy (systém s diskontinuálním tokem). Také průtoková rychlost je variabilní a spolu s možností zastavení toku (stopped-flow) představuje důležitý prvek, který po optimalizaci systému vede k rychlé analýze. Stopped-flow metoda je využívána zejména pro chemické reakce s pomalou kinetikou, při které po zastavení toku na určitou dobu získáme daleko větší podíl produktu reakce a odpovídající vyšší signál detektoru[⁶]. Další výhodnou změnou oproti FIA je vícecestný selekční ventil (6 – 12 portů), pomocí něhož jsou aspirovány do nosného proudu malé objemy vzorku a činidel přeměňujících analyt na stanovitelný produkt[⁵]. Mezi pístovou pumpou a selekčním ventilem je umístěna mísící cívka, která slouží zároveň jako pojistka proti vniknutí vzorku a činidel do pumpy. Na konci celého systému je opět vhodně zvolený detektor podle analyzovaného vzorku. Standardní konfigurace SIA systému je znázorněna na obrázku č. 2.

Obrázek 2 schéma SIA analyzátoru



2.1.3 Další generace průtokových metod

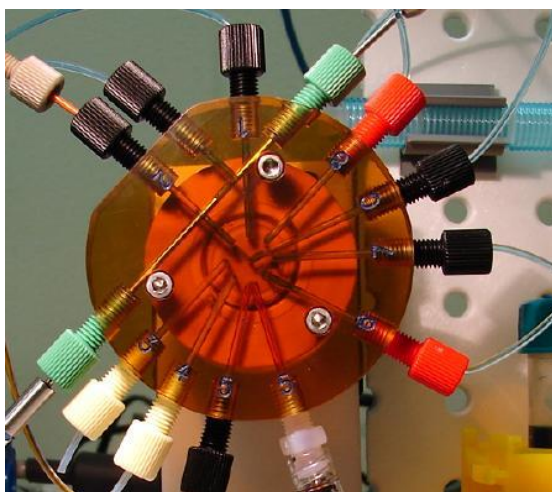
2.1.3.1 Bead injection (BI)

SIA technika umožňuje použití pevných částic v takzvané konfiguraci „jet-ring“ cely^[7], jejímž principem je aspirace pevných částic (tzv. „bead injection“)^[8] s imobilizovaným činidlem nebo enzymy do portu speciálně upraveného ventilu. Mikrosféry sorbentu jsou v suspenzi ve vodě nebo vhodném pufru většinou v poměru 1:10 - 1:20 (m/v). Po průchodu zóny vzorku přes naplněnou jet-ring celu dochází k reakci, v dalším kroku následuje vymytí částic pomocí obrácení směru toku nosného proudu. Při každém měření tak vzniká nová extrakční kolona přímo v systému nadávkováním suspenze obsahující částice sorbentu. Odpadají tak nutnost eluce a riziko zkřížené kontaminace vzorků. Nejčastěji se tento typ reaktoru používá pro extrakce na principu imunochemických reakcí^[9,10].

2.1.3.2 Lab-On-Valve (LOV)

Jako třetí generace průtokových metod je označována technika Lab-On-Valve (LOV, laboratoř ve ventilu) vytvořená v roce 2000. Podstatou je víceúčelový plexisklový (později i chemicky inertní) nástavec připojený přímo na šesticestý selekční ventil SIA přístroje. V nástavci je vytvořena detekční cela, což umožňuje miniaturizovat operace s kapalinami – dávkování, provedení reakce a následnou detekci^[11].

Obrázek 3 schéma Lab-On-Valve systému



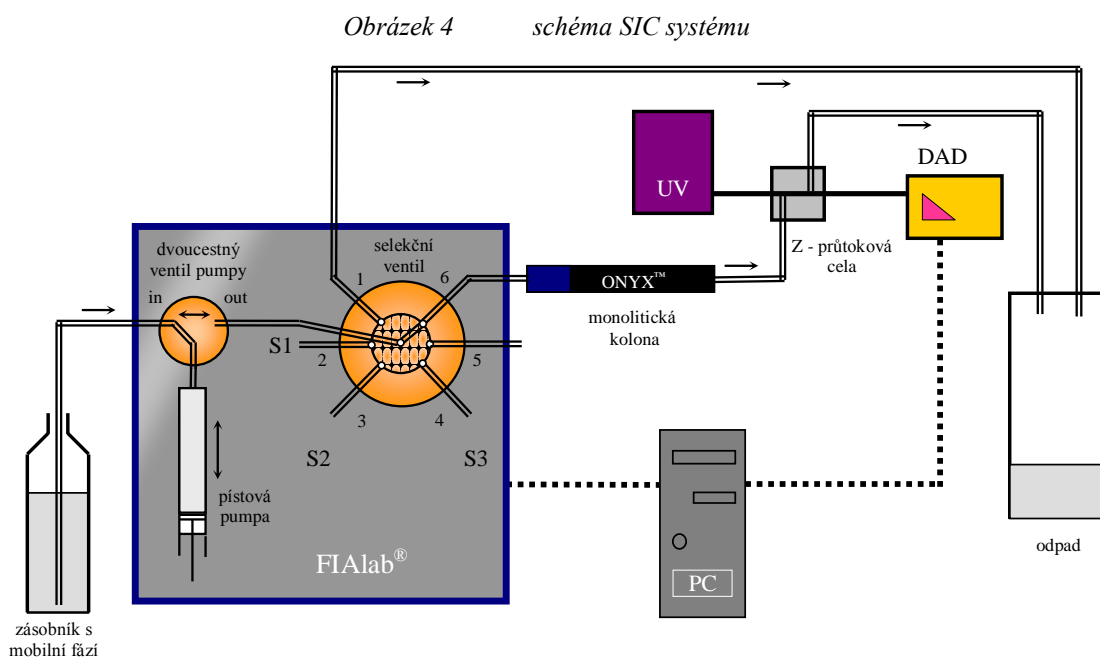
2.2 PRŮTOKOVÉ SEPARAČNÍ ANALYTICKÉ METODY

2.2.1 Sekvenční injekční chromatografie

Sekvenční injekční chromatografie (SIC) vznikla zařazením komerčně dostupné krátké monolitické kolony do systému SIA. SIC tak otevírá novou cestu v sekvenční injekční analýze – řeší problém simultánního stanovení látek ve vícesložkovém vzorku pomocí chromatografické separace a tím umožňuje současné stanovení několika látek ve směsi nebo v matici.

Nově vyvinutá metoda zachovává výhody klasické SIA a přináší nové možnosti. Díky úspěšnému začlenění monolitických kolon do SIA systému^[12, 13, 14] se značně rozšířil potenciál metody a její význam v praxi. V porovnání s běžnými separačními technikami (HPLC, CE) pak separace v SIA umožňuje snížit náklady na analýzu (nekontinuální tok – úspora činidel a organického odpadu a zejména nižší finanční náročnost na instrumentaci).

Níže zmíněné vlastnosti monolitických kolon umožňují jejich zapojení do SIA přístroje (nízkotlaké průtokové metody, kde maximální tlak, který je schopna vyvinout pístová pumpa v SIA, je asi 2,5 MPa) a tím rozšíření možností této metody^[15]. Krátká komerčně dostupná monolitická kolona je zapojena mezi vícecestný selekční ventil a průtokovou celu detektoru. Základní schéma znázorňuje obrázek č. 4.

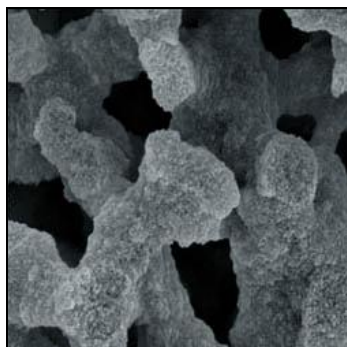


2.2.1.1 Monolitické chromatografické stacionární fáze

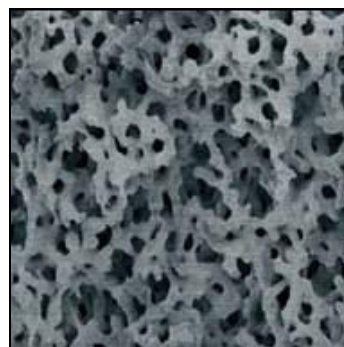
Monolitické chromatografické stacionární fáze se vyznačují naprosto odlišnou strukturou v porovnání s konvenčními částicovými stacionárními fázemi. Zatímco běžně používané kolony jsou plněny malými sférickými částicemi sorbentu, monolitické kolony obsahují sorbent, který není tvořen částicemi, nýbrž jedním kusem monolitního porézního materiálu^[16, 17].

Výroba monolitů je odlišná od klasické přípravy stacionární fáze. Vyrábí se ze silikagelu bez příměsí kovů a pomocí nové „Sol-Gel“ technologie umožňující získat vysoce porézní monolitické tyčinky silikagelu s unikátní dvojí porézní strukturou. Větší póry (průměr obvykle 2 μm) se nazývají makropóry - Obrázek 5, díky nimž je odpor kolony velmi malý a umožňuje použití vyšších průtoků mobilních fází bez negativního zvýšení zpětného tlaku. Menší póry (průměr obvykle 13 nm) tzv. mezopóry - Obrázek 6 tvoří velký účinný povrch sorbetu s dostatečnou vazebnou kapacitou, a tím umožňují velmi dobrou separační účinnost takto naplněných analytických kolon.

Obrázek 5 makropóry \varnothing 2 μm



Obrázek 6 mezopóry \varnothing 13 nm



2.2.1.2 Komerčně dostupné monolitické kolony

Dnes jsou komerčně dostupné např. Chromolith™ (silikagel s reverzní modifikovanou fází, firma Merck®, Darmstadt, Německo), Shift (iontovýměnná i reverzní fáze na bázi polymethakrylátových nebo polystyrénových kopolymerů, ISCO, Lincoln, USA) nebo Monoliths (reverzní polystyrénová fáze, LC Packings, Amsterdam, Holandsko). Nově dostupné monolitické kolony začala v poslední době vyrábět také firma Phenomenex® (dodavatel Chromservis, Praha, Česká Republika) pod značkou Onyx™ (stacionární fáze je buď silikagel nebo silikagel modifikovaný C18 nebo C8 reverzní fází).

Obrázek 7 kolona Onyx™ monolithic C18 (50 x 4,6 mm) s monolitickou předkolonou (5 x 4,6 mm)



2.3 STANOVOVANÉ LÁTKY

2.3.1 Kyselina salicylová (*Acidum salicylicum*)

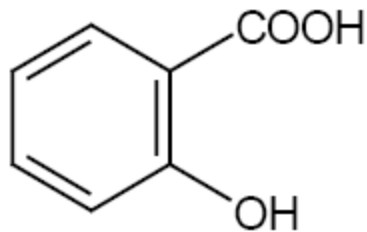
Jedná se o kyselinu 2-hydroxybenzoovou.

Počítáno na vysušenou látku, obsahuje 99,0 % až 100,5 % sloučeniny C₇H₆O₃.

Mr 138,12

CAS 69-72-7

Obrázek 8 vzorec kyseliny salicylové



Bílý krystalický prášek, bílé nebo bezbarvé jehlicovité krystaly. Je těžce rozpustná ve vodě, snadno rozpustná v lihu 96% a v eteru, mírně rozpustná v dichlormetanu^[18].

2.3.2 Triamcinolon acetonid (*Triamcinoloni acetonidum*)

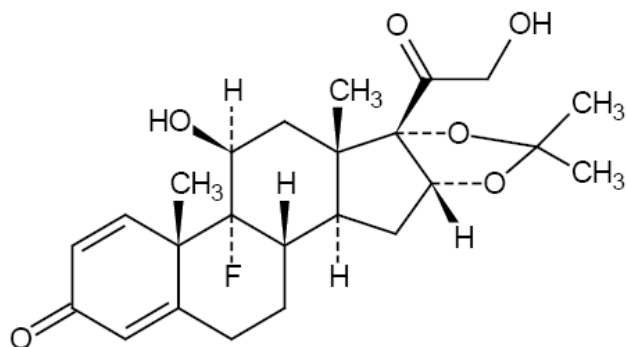
Je to 9-fluor-11 β ,21-dihydroxy-16 α ,17-isopropylidendioxypregna-1,4-dien-3,20-dion.

Počítáno na bezvodou látku, obsahuje 97,0 % až 103,0 % sloučeniny C₂₄H₃₁FO₆.

Mr 434,50

CAS 76-25-5

Obrázek 9 vzorec triamcinolon-acetonidu



Bílý nebo téměř bílý krystalický prášek. Je prakticky nerozpustný ve vodě, mírně rozpustný v lihu 96%, velmi těžce rozpustný v eteru. Vykazuje polymorfismus^[19].

3. PRAKTICKÁ ČÁST

3.1 POUŽITÉ PŘÍSTROJE

- FIALab[®] 3000 automatický SIA systém (FIALab[®] Instruments, USA), Software FIALab for Windows 5.0[®]
- Kolona Onyx[™] monolithic C18 (50 x 4,6 mm) (Phenomenex[®], USA)
- Předkolona monolitická (5 x 4,6 mm) (Phenomenex,®), USA)
- Detektor diod-array Ocean Optics S2000 - UV - VIS (Ocean Optics, Inc.,USA)
- UV - VIS lampa Analytical Instrument System D1000 CE (Ocean Optics, Inc.,USA)
- Solarizovaná optická vlákna (Avantes Inc., USA)
- Průtoková cela Z - 1 cm (Avantes Inc., USA)
- Hadičky ø 0,75 mm (PTFE)
- HPLC systém –Shimadzu prominence, (Shimadzu corporation, Japonsko)
- detektor UV, DAD
- Analytické váhy Sartorius AG (Sartorius Gottingen, Německo)
- Ultrazvuková lázeň Sonorex RK31
- Digitální pH-metr PHM 220 MeterLab (Radiometer Analytical, Francie)

3.2 POUŽITÉ CHEMIKÁLIE

- Methanol Chromasolv, for LC (Sigma-Aldrich, ČR)
- Acetonitril Chromasolv, for LC (Sigma-Aldrich, ČR)
- Acidum salicylicum ČL 2005 (Herbacos-Bofarma, ČR)
- Triamcinolu acetonidum (Sicor, Itálie)
- Propylparaben (Zentiva, ČR)
- Deionizovaná voda čištěná Milli-Q systém (Millipore Corp., Bedford, MA)

3.3 PŘÍPRAVA ROZTOKŮ

3.3.1 Příprava mobilní fáze

Byla připravena mobilní fáze smísením 350 ml acetonitrilu a 650 ml vody a její pH bylo upraveno na 3,3 přidáním koncentrované kyseliny octové (99%). Takto připravená mobilní fáze byla sonikována v ultrazvukové lázni 5 min a odplyněna pomocí hélia.

3.3.2 Příprava vnitřního standardu

Vnitřní standard byl připraven rozpuštěním přesně 40,00 mg propylparabenu v metanolu v kalibrované odměrné baňce na 10,00 ml.

3.3.3 Příprava vzorku

Pomocí automatické mikropipety bylo odpipetováno do kalibrované odměrné baňky na 10,00 ml přesně 100,00 μl kapek Triamcinolon – IVAX, dále přidáno 100,00 μl základního roztoku propylparabenu (vnitřního standardu) a doplněno po rysku mobilní fází. Vzorek byl sonikován v ultrazvukové lázni po dobu asi 5 minut. Takto připravený roztok vzorku obsahoval 200,00 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ SA, 20,00 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ TCA a 40,00 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ PP.

3.3.4 Příprava roztoků standardů

3.3.4.1 Kyselina salicylová

Roztok byl připraven rozpuštěním přesně 200,00 mg kyseliny salicylové v metanolu, v kalibrované odměrné baňce na 10,00 ml.

3.3.4.2 Triamcinolon acetonid

Porovnávací roztok pro analýzu kapek byl připraven rozpuštěním přesně 20,00 mg triamcinolonu acetonidu v metanolu, v kalibrované odměrné baňce na 10,00 ml.

Tyto koncentrace roztoků standardů odpovídaly skutečným koncentracím v léčivém přípravku Triamcinolon – IVAX.

4. VÝSLEDKY A DISKUSE

4.1 VÝVOJ A OPTIMALIZACE METODY

4.1.1 Výběr mobilní fáze

Výběr optimální mobilní fáze byl proveden s přihlédnutím ke zkušenostem z předchozích prací s podobnými látkami. V dostupné literatuře a zdrojích na internetu (Web of Science; ScienceDirect) nebyla bohužel nalezena žádná práce zabývající se současnou chromatografickou separací triamcinolon acetonidu a kyseliny salicylové. Z tohoto důvodu bylo při výběru vycházeno z fyzikálně-chemických vlastností stanovovaných látek a dále z jejich předpokládaného chování v daných chromatografických podmínkách. Byly testovány směsi metanol/voda a acetonitril/voda. Jako optimální mobilní fáze byla vybrána směs acetonitril/voda v poměru 35:65 (v/v) pH 3,3 – 3,4. Daného pH bylo dosaženo přidáním koncentrované kyseliny octové (99%) do mobilní fáze

4.1.2 Vytvoření a optimalizace programu analýzy

Přístroj SIA je ovládán počítačovým softwarem, pomocí něhož se jednotlivé kroky měření nastavují zadáním jednoduchých příkazů. Schéma programu analýzy je uvedeno v tabulce. K analýze byly zvoleny podmínky optimalizované po zkušebních měřeních.

Tabulka 1 program použitý k analýze

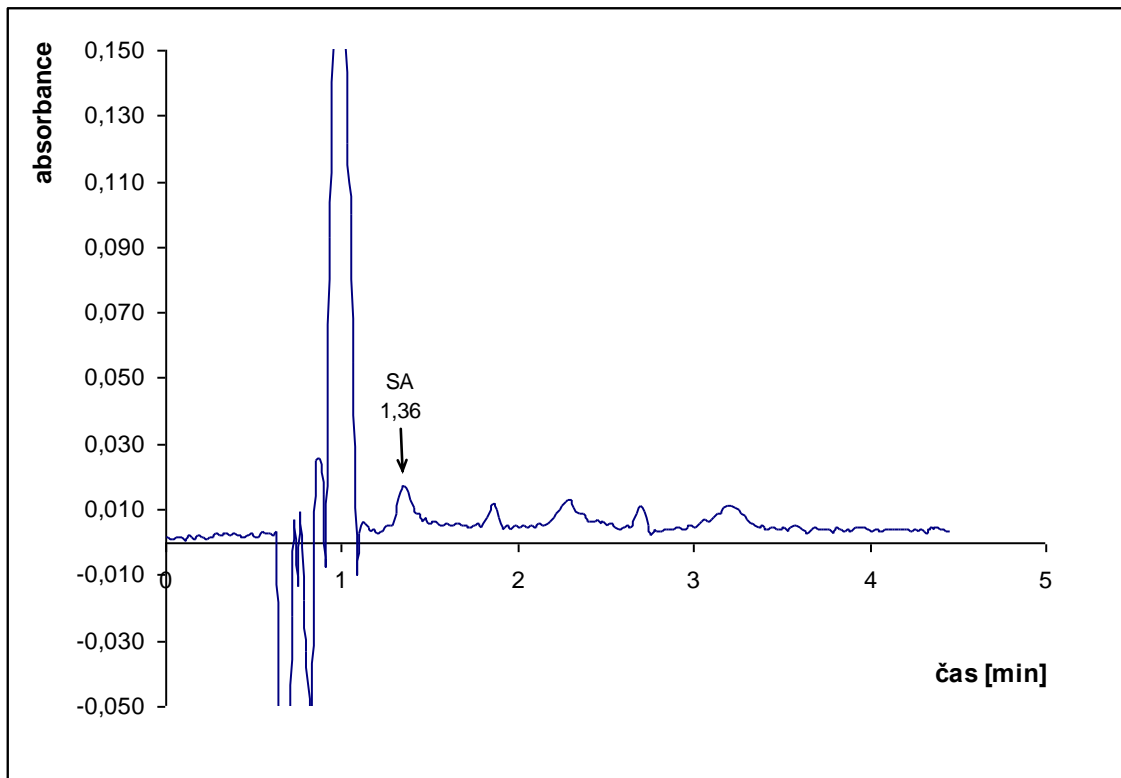
Jednotka	Příkaz	Parametr	Úkon
dvoucestný ventil pumpy	pozice In		nastavení do polohy In
pístová pumpa	nastavit průtokovou rychlost [$\mu\text{l.s}^{-1}$]	100	
pístová pumpa	nasát [μl]	4000	nasávání mobilní fáze
dvoucestný ventil pumpy	pozice Out		nastavení do polohy Out
selekční ventil	ventil port 2		
pístová pumpa	nastavit průtokovou rychlost [$\mu\text{l.s}^{-1}$]	10	
pístová pumpa	nasát [μl]	10	nasávání vzorku
selekční ventil	ventil port 6		
pístová pumpa	nastavit průtokovou rychlost [$\mu\text{l.s}^{-1}$]	15	
pístová pumpa	vytlačit [μl]	1740	eluce SA
pístová pumpa	nastavit průtokovou rychlost [$\mu\text{l.s}^{-1}$]	15	
pístová pumpa	vytlačit [μl]	700	eluce TCA
pístová pumpa	nastavit průtokovou rychlost [$\mu\text{l.s}^{-1}$]	15	
pístová pumpa	vytlačit [μl]	1560	eluce PP

4.2 STANOVENÍ LIMITU DETEKCE A KVANTIFIKACE

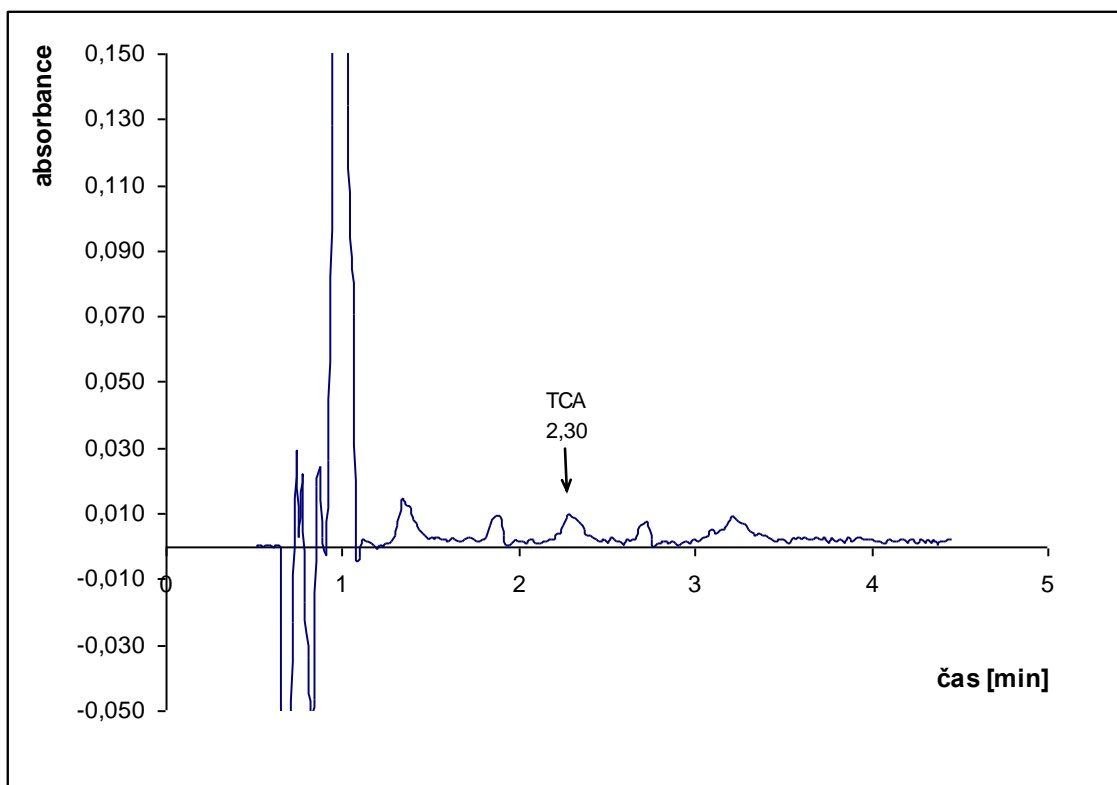
Pro stanovení limitu detekce byl používán zásobní roztok standardních látek v metanolu. K analýze bylo dávkováno 10 μl vzorku a odezva měřena při jedné vlnové délce 240 nm (absorpční maximum TCA). Postupným snižováním koncentrace standardů až ke koncentracím pro SA 1,00 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, pro TCA 0,66 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ a pro PP 0,33 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, byl získán experimentálně pík analytu, který byl zřetelně třikrát vyšší než šum základní linie (3σ). Tyto hodnoty koncentrací byly definovány jako limit detekce (LOD).

Limit kvantifikace (LOQ) byl vypočten jako trojnásobek limitu detekce, což odpovídá hodnotám 3,00 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ pro SA, 2,00 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ pro TCA a 1,00 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ pro PP.

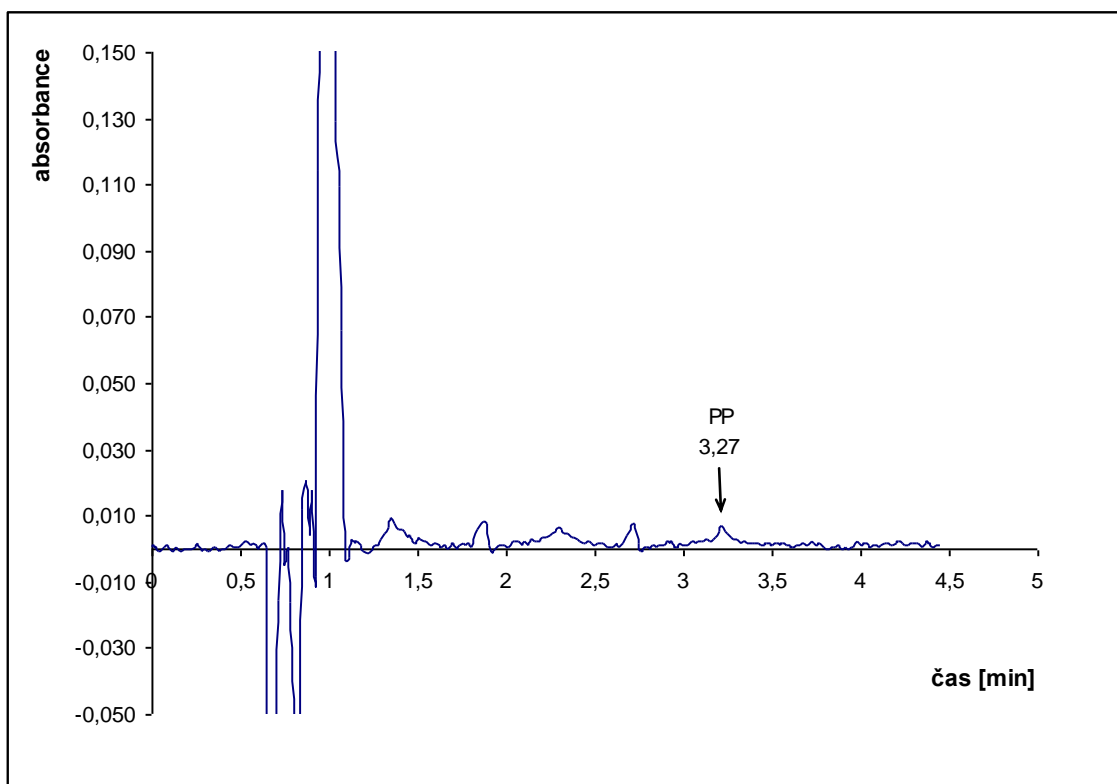
Obrázek 10 limit detekce pro SA



Obrázek 11 limit detekce pro TCA



Obrázek 12 limit detekce pro PP



4.3 STANOVENÍ LINEARITY ODEZVY

Linearita odezvy byla stanovena pro každou látku. K analýze bylo dávkováno 10 μl vzorku a každá koncentrace byla změřena ve smyčce čtyřikrát a do výpočtu byl zařazen průměr ze tří nejbližších výsledků. Odezva byla měřena při 240 nm.

Pro linearitu odezvy je rozhodující korelační koeficient přímky, pro všechny tři měřené látky byl korelační faktor vyšší než 0,999. Lékopis předepisuje minimálně 0,99.

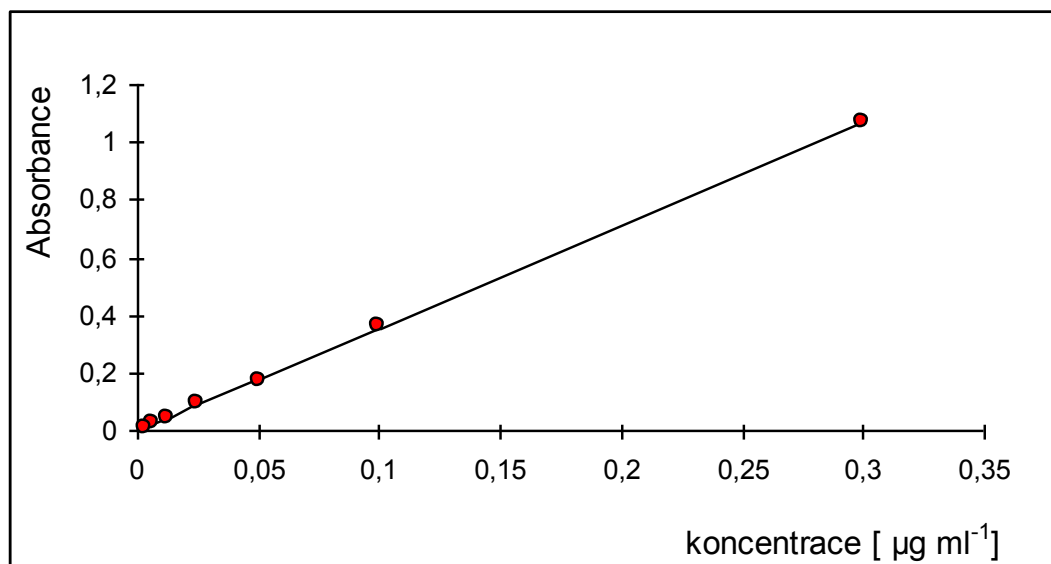
4.3.1 Kalibrační křivka kyseliny salicylové

Pro kyselinu salicylovou byla změřena lineární odezva absorbance u sedmi připravených roztoků s koncentracemi 3,1 až 300,0 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. Postupně byly tyto roztoky měřeny od nejvyšší k nejnižší koncentraci, vždy ve smyčce čtyř nástřiků. Korelační koeficient byl vyšší než 0,999 a reziduální odchylka byla 0,002449.

Tabulka 2 naměřené hodnoty pro kalibrační křivku SA

Koncentrace [$\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$]	Absorbance	Počet bodů	n = 7	Odhad chyby
300,00	1,0670	Směrnice	0,003552	$9,390 \cdot 10^{-6}$
100,00	0,3590	Abs. člen	0,001790	$1,141 \cdot 10^{-3}$
50,00	0,1764	Korelační koef.	0,999983	
25,00	0,0940	Reziduální odch.	0,002449	
12,50	0,0470			
6,25	0,0220			
3,13	0,0121			

Obrázek 13 kalibrační křivka SA



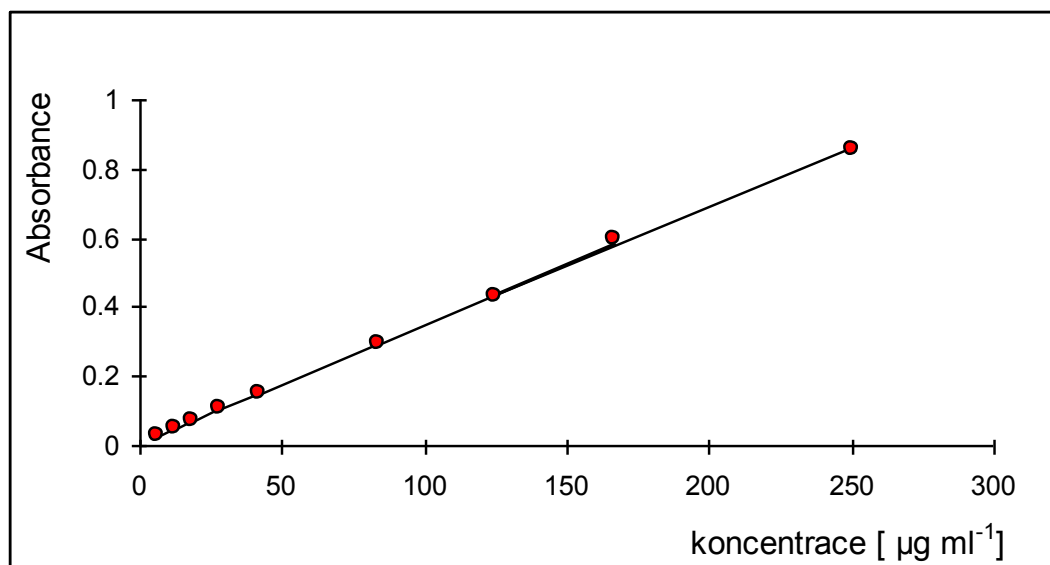
4.3.2 Kalibrační křivka triamcinolonu acetonidu

Pro triamcinolon acetonid byla změřena lineární odezva absorbance u devíti připravených roztoků s koncentracemi 6,2 až 250,0 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. Postupně byly tyto roztoky měřeny od nejvyšší k nejnižší koncentraci, vždy ve smyčce čtyř nástřiků. Korelační koeficient byl vyšší než 0,999. Reziduální odchylka byla 0,006442.

Tabulka 3 naměřené hodnoty pro kalibrační křivku TCA

Koncentrace [$\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$]	Absorbance	Počet bodů	n = 9	Odhad chyby
250,00	0,8579	Směrnice	0,003424	$2,710 \cdot 10^{-5}$
125,00	0,4345	Abs. člen	0,009670	$3,077 \cdot 10^{-3}$
166,66	0,5947	Korelační koef.	0,999781	
83,33	0,2957	Reziduální odch.	0,006442	
41,66	0,1489			
27,77	0,1051			
18,51	0,0722			
12,34	0,0520			
6,17	0,0304			

Obrázek 14 kalibrační křivka TCA



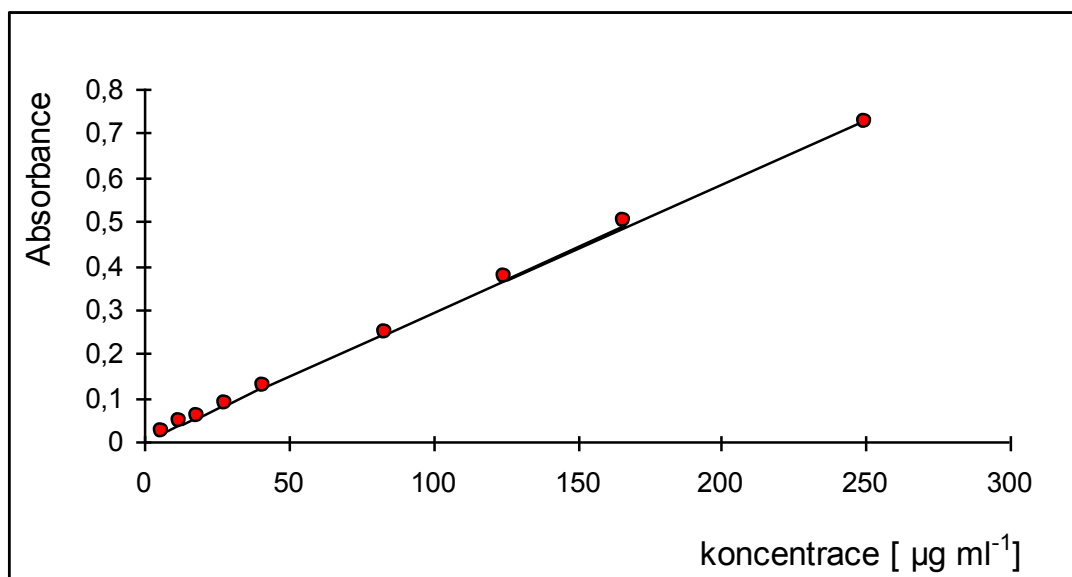
4.3.3 Kalibrační křivka propylparabenu

Pro propylparaben byla změřena lineární odezva absorbance u devíti připravených roztoků s koncentracemi 6,2 až 250,0 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. Postupně byly tyto roztoky změřeny od nejvyšší k nejnižší koncentraci, vždy ve smyčce čtyř nástřiků. Korelační koeficient byl vyšší než 0,999 a reziduální odchylka byla 0,00578.

Tabulka 4 naměřené hodnoty pro kalibrační křivku PP

Koncentrace [$\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$]	Absorbance	Počet bodů	n = 9	Odhad chyby
250,00	0,7240	Směrnice	0,002905	$2,43 \cdot 10^{-5}$
125,00	0,3722	Abs. člen	0,006269	$2,762 \cdot 10^{-3}$
166,66	0,5017	Korelační koef.	0,999754	
83,33	0,2490	Reziduální odch.	0,005783	
41,66	0,1241			
27,77	0,0872			
18,51	0,0595			
12,34	0,0433			
6,17	0,0204			

Obrázek 15 kalibrační křivka PP



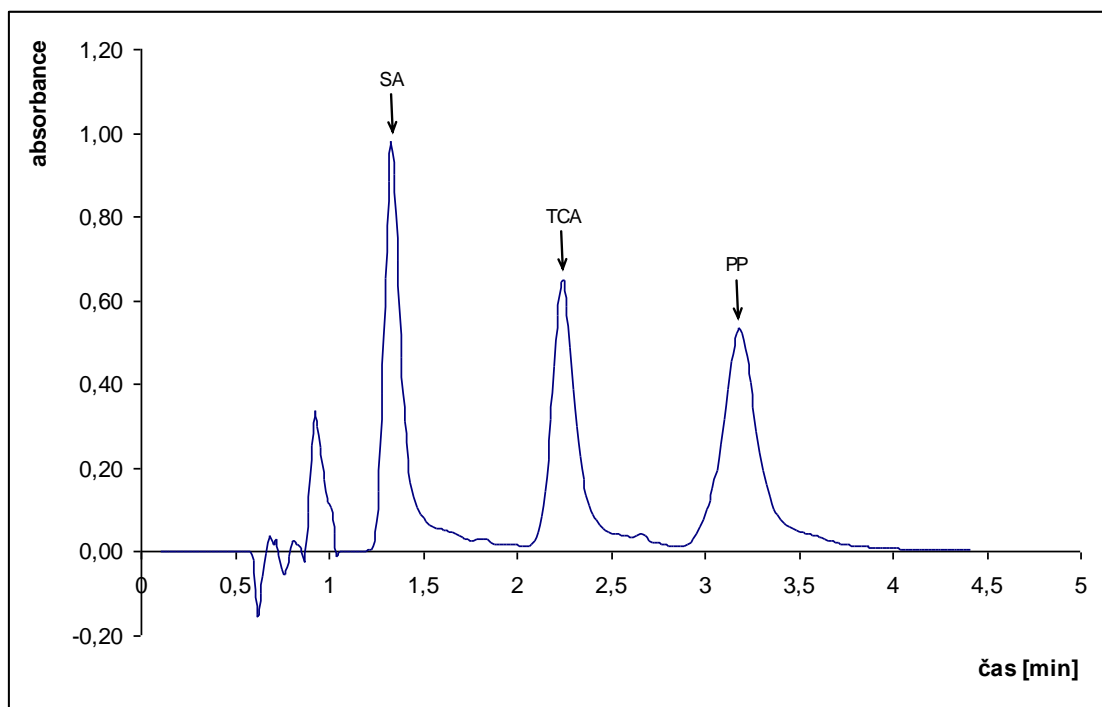
4.4 OPAKOVATELNOST MĚŘENÍ PRO RŮZNÉ KONCENTRACE A RETENČNÍ ČASY

Bylo provedeno opakované měření v sérii deseti nástřiků pro všechny tři látky rozpuštěné v metanolu. Koncentrace byly pro SA 200,00 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$; 85,00 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$; 12,50 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, pro TCA byly 20,00 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$; 8,50 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$; 1,25 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, a pro PP 40,00 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$; 17,00 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$; 2,50 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. Z naměřených hodnot pro jednotlivé koncentrace byla vypočtena relativní směrodatná odchylka (RSD) pro retenční čas a výšku píků.

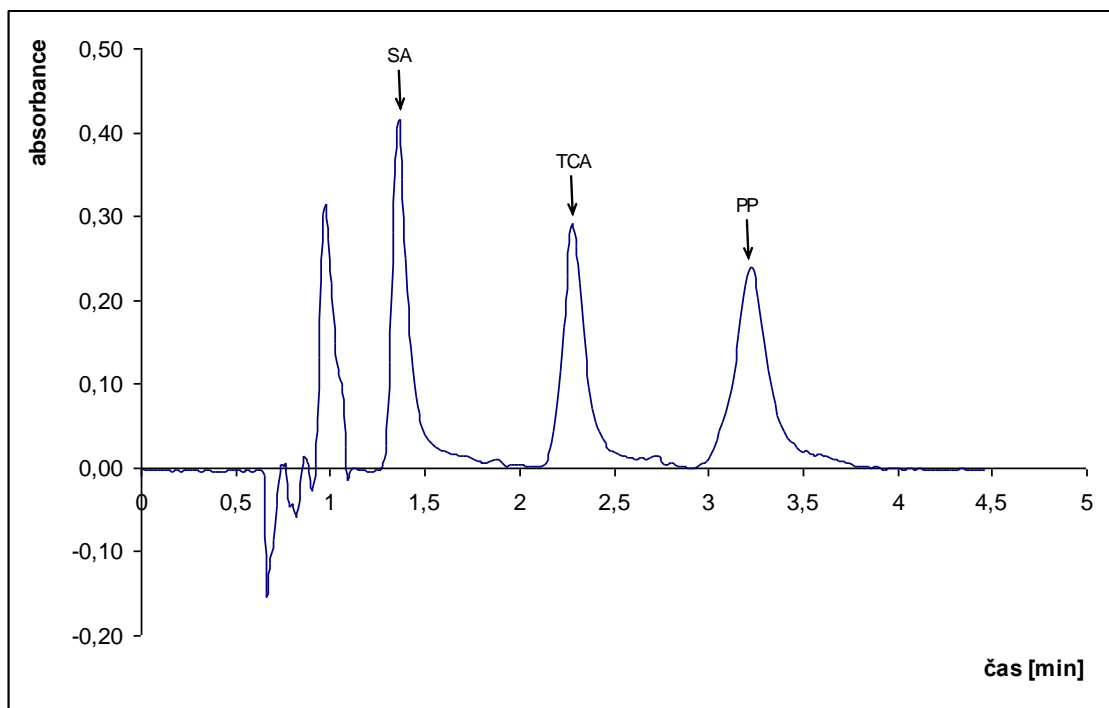
Vzorec použitý k výpočtu relativní směrodatné odchylky

$$RSD_{\%} = \frac{100}{\bar{y}} \sqrt{\frac{\sum (y_i - \bar{y})^2}{n - 1}}$$

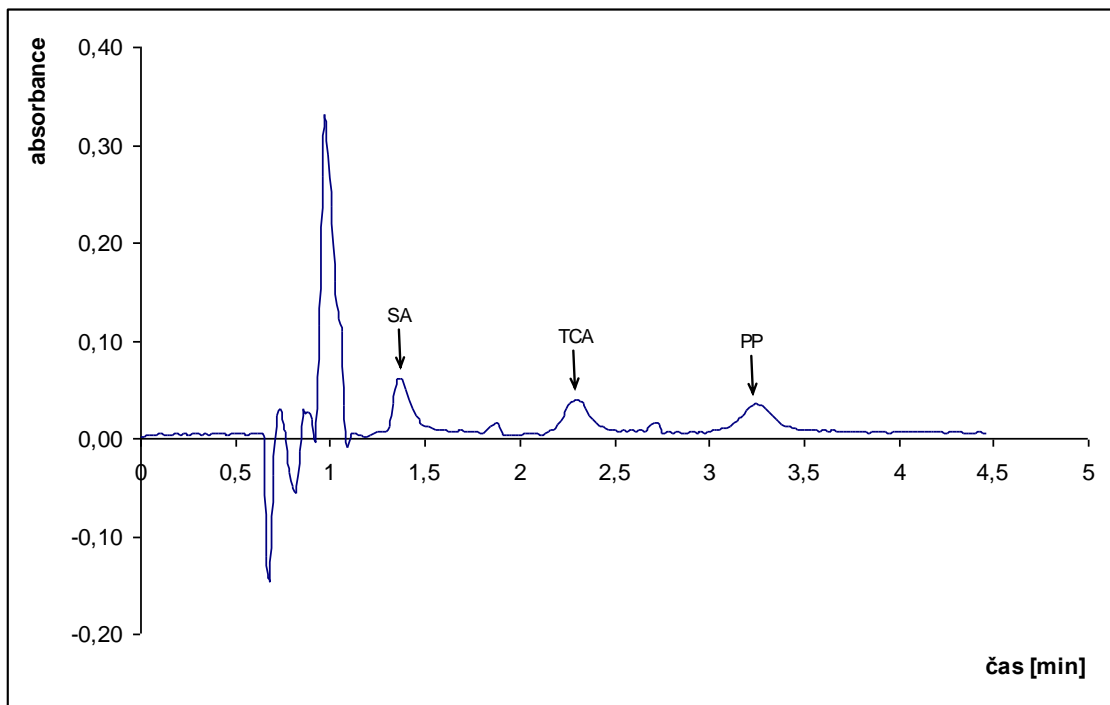
Obrázek 16 záznam měření pro koncentrace SA 200,00 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, TCA 20,00 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, PP 40,00 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$



Obrázek 17 záznam měření pro koncentrace SA $85,00 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, TCA $8,50 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, PP $17,00 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$



Obrázek 18 záznam měření pro koncentrace SA $12,50 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, TCA $1,25 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, PP $2,50 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$



Výsledky opakovatelnosti měření

KYSELINA SALICYLOVÁ

Tabulka 5 výsledky opakovaného měření pro SA

Koncentrace	Počet měření	Průměr hodnot retenčních časů [min]	RSD [%]	Průměr hodnot absorbancí	RSD [%]
200,00 $\mu\text{g.ml}^{-1}$	10	1,39	0,86	0,9745	1,06
85,00 $\mu\text{g.ml}^{-1}$	10	1,37	0,48	0,4216	1,33
12,50 $\mu\text{g.ml}^{-1}$	8	1,38	0,52	0,0594	1,78

TRIAMCINOLON ACETONID

Tabulka 6 výsledky opakovaného měření pro TCA

Koncentrace	Počet měření	Průměr hodnot retenčních časů [min]	RSD [%]	Průměr hodnot absorbancí	RSD [%]
20,00 $\mu\text{g.ml}^{-1}$	10	2,31	0,86	0,6537	0,71
8,50 $\mu\text{g.ml}^{-1}$	10	2,30	0,50	0,2931	1,22
1,25 $\mu\text{g.ml}^{-1}$	8	2,32	0,61	0,0389	2,00

PROPYLPARABEN

Tabulka 7 výsledky opakovaného měření pro PP

Koncentrace	Počet měření	Průměr hodnot retenčních časů [min]	RSD [%]	Průměr hodnot absorbancí	RSD [%]
40,00 $\mu\text{g.ml}^{-1}$	10	3,27	1,14	0,5363	0,72
17,00 $\mu\text{g.ml}^{-1}$	10	3,25	0,60	0,2400	1,31
2,50 $\mu\text{g.ml}^{-1}$	8	3,28	0,85	0,0317	1,96

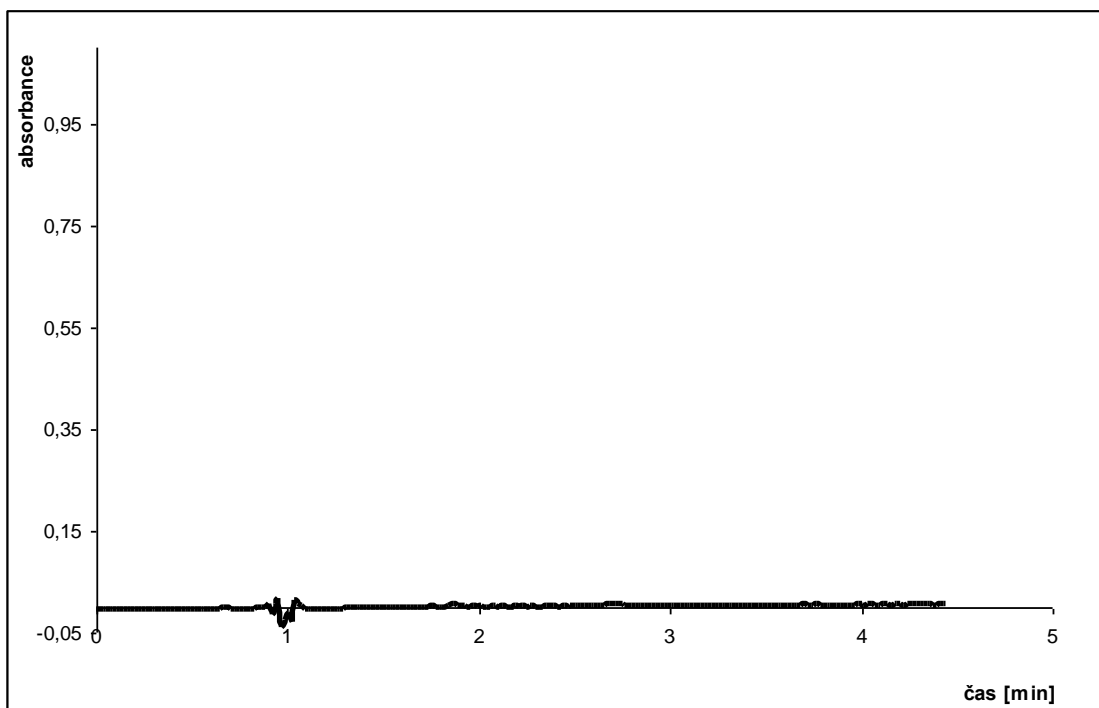
4.5 STANOVENÍ V KAPKÁCH TRIAMCINOLON – IVAX

Bylo změřeno šest různých originálních balení kapek Triamcinolon – IVAX. Vzorky k vlastnímu měření byly připraveny odpipetováním 100,00 μl léčivého přípravku Triamcinolon – IVAX do odměrné baňky na 10,00 ml, přidáno 100,00 μl základního roztoku PP (vnitřního standartu) a doplněno po rysku mobilní fázi. Naředěný roztok vzorku byl sonikován cca. 5 minut v ultrazvukové lázni (zároveň se roztok odplynul). Takto připravený vzorek pro analýzu obsahoval 200,00 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ SA, 20,00 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ TCA a 40,00 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ PP. Porovnávací roztok standardních látek (SA, TCA a PP) byl připraven ve stejných koncentracích a jako rozpouštědlo byla použita také mobilní fáze. Bylo provedeno šest měření s třemi nástřiky ve smyčce.

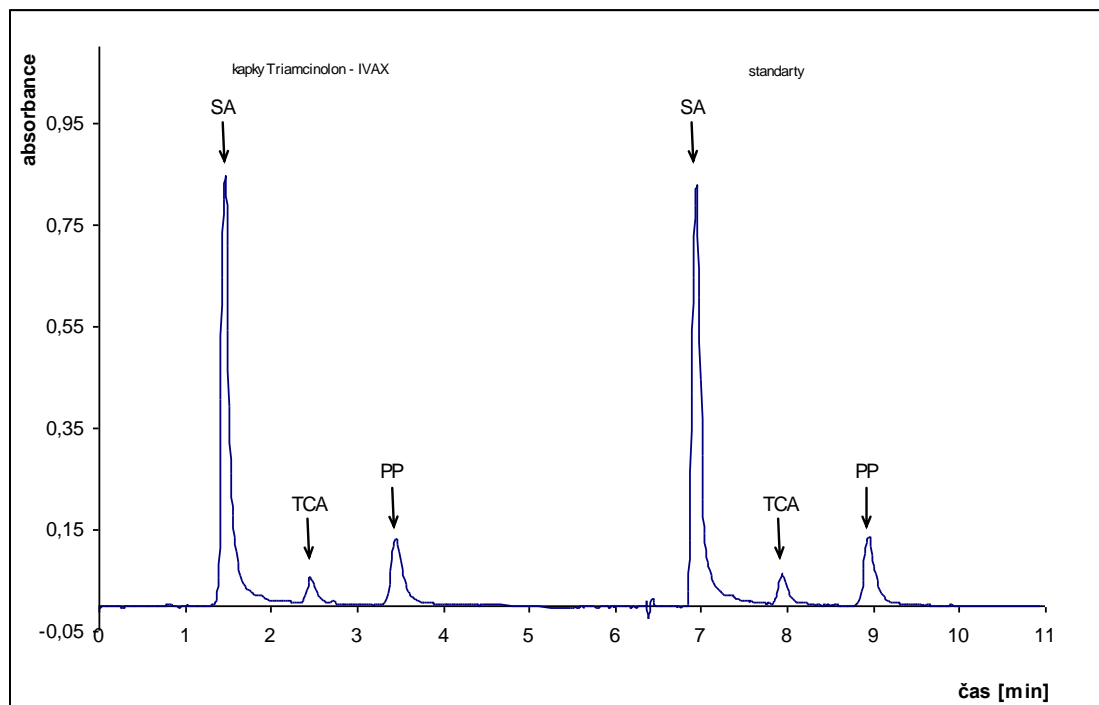
Tabulka 8 složení dle SPC výrobce (v 10g)

Název látky	Množství [mg]
Triamcinoloni acetonidum	20,00
Acidum salicylicum	200,00
Carbaethopendecinii bromidum	5,00
Aqua purificata	10,00
Ethanolum 95%	PL
Dinatrii edetas dihydricus	PL

Obrázek 19 záznam SIC chromatogramu placeba



Obrázek 20 záznam SIC chromatogramu vlastního stanovení kapek



4.5.1 Stanovení obsahu účinných látek v kapkách Triamcinolon-IVAX

Pro vyhodnocení obsahu účinných látek metodou vnitřního standardu byl použit níže uvedený vzorec.

$$C_i = \frac{A_V / A_{ISV}}{A_S / A_{ISS}} \cdot 100$$

C_i = obsah stanovené složky v %

A_V = výška píku vzorku

A_S = výška píku standardu

A_{ISV} = výška píku vnitřního standardu ve vzorku

A_{ISS} = výška píku vnitřního standardu v roztoku standardů

Tabulka 9 výsledky stanovení obsahu v kapkách

Vzorek	Obsah [%]	
	SA	TCA
1	101,19	105,52
2	99,24	100,32
3	96,93	102,93
4	101,43	107,50
5	101,26	105,70
6	99,32	102,23
Průměr:	99,89	104,03
RSD:	1,83	2,55

Charakteristika chromatografického procesu

Retenční čas a retenční objem

$$V_R = t_R v$$

V_R - retenční objem

t_R - retenční čas

v - průtoková rychlost mobilní fáze

Faktor symetrie píku (A_s)

$$A_s = \frac{w_{0,05}}{2d}$$

$w_{0,05}$ - šířka píku v jedné dvacetině jeho výšky

d - vzdálenost mezi kolmicí spuštěnou z vrcholu píku a vzestupnou částí píku v jedné dvacetině jeho výšky

Účinnost kolony a zdánlivý počet teoretických pater (N)

$$N = 5,54 \left(\frac{t_R}{w_h} \right)^2$$

t_R - retenční čas

w_h - šířka píku v polovině jeho výšky

Rozlišení píků (R_s)

$$R_s = \frac{1,18(t_{R2} - t_{R1})}{w_{h1} + w_{h2}} \quad t_{R2} > t_{R1}$$

t_{R2} , t_{R1} - retenční časy dvou sousedních píků

w_{h1} , w_{h2} - šířky píků v poloviční výšce

Rozlišení větší než 1,5 odpovídá rozdělení píků na základní linii.

Tabulka 10 chromatografická data - stanovení obsahu v kapkách

Parametry	SA	TCA	PP
Retenční čas [min]	1,38	2,31	3,27
Faktor symetrie píku	1,95	1,65	1,64
Počet teoretických pater	1475	2188	3135
Rozlišení píků	$R_{SA/TCA} = 6,03$	$R_{TCA/PP} = 4,52$	

4.5.2 Mezigenní opakované měření kapek Triamcinolon – IVAX

Stanovení mezigenní opakovatelnosti měření bylo uskutečněno za účelem potvrzení správnosti metody a techniky stanovení. Stejný vzorek kapek byl změřen třikrát, první a druhé měření bylo provedeno dva dny po sobě, třetí měření po týdnu.

Pro stanovení mezigenní opakovatelnosti měření kapek bylo připraveno 10,00 ml nového zásobního roztoku kapek Triamcinolon - IVAX stejným postupem jako při předchozím stanovení. Zásobní měřený roztok kapek obsahoval 200,00 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ SA; 20,00 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ TCA a 40,00 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ PP. Porovnávací roztok standardních látek (SA, TCA a PP) byl připraven ve stejných koncentracích opět rozpuštěním v mobilní fázi.

Tabulka 11 výsledky opakovaného měření kapek

Měření		Výška píku		
		SA	TCA	PP
1. den	1	1,1180	0,0703	0,1474
	2	1,1175	0,0711	0,1457
	3	1,1046	0,0692	0,1464
2. den	1	1,0845	0,0685	0,1462
	2	1,0760	0,0675	0,1477
	3	1,0673	0,0682	0,1485
3. den	1	1,1205	0,0690	0,1475
	2	1,1264	0,0707	0,1508
	3	1,0954	0,0700	0,1487
Průměr		1,10	0,07	0,15
RSD (%)		1,94	1,73	1,05

4.5.3 Porovnávací měření HPLC

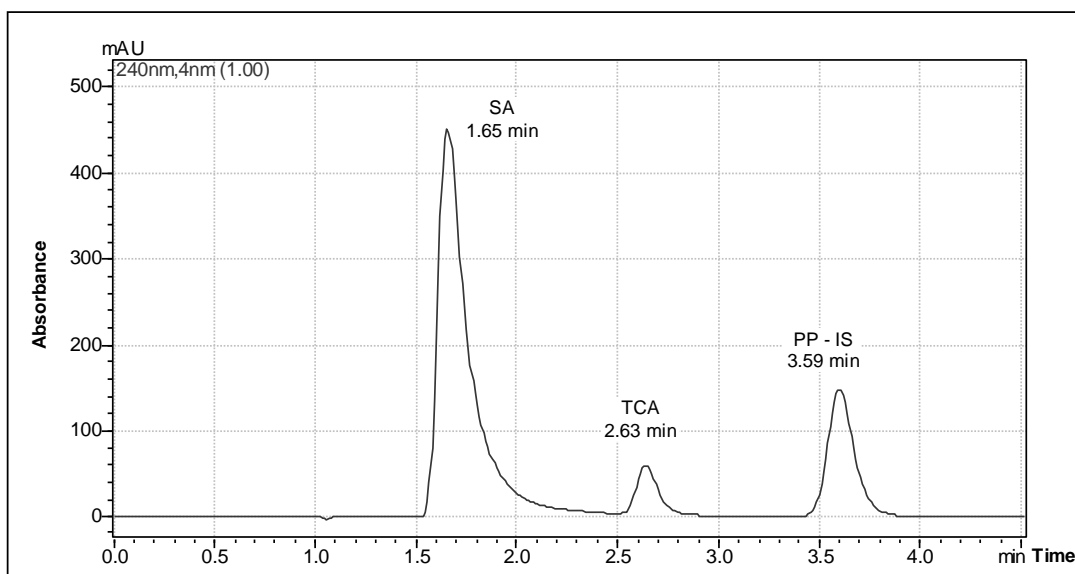
K potvrzení správnosti aplikace systému SIC pro analýzu léčivého přípravku Triamcinolon – IVAX a k porovnání naměřených hodnot, byly stejné vzorky změřeny pomocí HPLC, kde byly nastaveny identické podmínky měření s použitím stejné kolony a mobilní fáze.

Program vyhodnocující výstupy na HPLC je mnohem dokonalejší a měří plochy píků, což je metoda daleko přesnější než měření výšky píků, kterou využívá software systému SIC.

Tabulka 12 výsledky porovnávacího měření kapek metodou HPLC

Vzorek	Obsah [%]	
	SA	TCA
1	100,99	100,69
2	102,30	101,01
3	102,20	104,12
4	99,62	100,65
5	100,54	100,83
6	102,77	101,76
Průměr:	101,40	101,51
RSD:	1,20	1,32

Obrázek 21 záznam porovnávacího měření kapek metodou HPLC



Tabulka 13 chromatografická data - porovnávací měření HPLC

Parametry	SA	TCA	PP
Retenční čas [min]	1,65	2,63	3,59
Faktor symetrie píku	2,03	1,23	1,19
Počet teoretických pater	812	2620	3085
Rozlišení píků	$R_{SA/TCA} = 4,51$	$R_{TCA/PP} = 4,06$	

4.5.4 Srovnání chromatografických parametrů metody SIC a metody HPLC

Zjištěné hodnoty metody SIC a metody HPLC byly srovnatelné u všech základních parametrů. Retenční časy píků, výška píků, symetrie píků i délka celé analýzy byly odpovídající.

Porovnání naměřených hodnot metodou SIC a HPLC je v Tabulka 14.

Tabulka 14 porovnání chromatografických dat získaných měřením SIC a HPLC

Parametry	SA		TCA		PP	
	SIC	HPLC	SIC	HPLC	SIC	HPLC
Retenční čas [min]	1,46	1,65	2,64	2,63	3,45	3,59
Faktor symetrie píku	1,95	2,03	1,65	1,23	1,64	1,19
Počet teoretických pater	1475	812	2188	2620	3135	3085
Rozlišení píků	$R_{SA/TCA} = 6.03$	$R_{SA/TCA} = 4.51$	$R_{TCA/PP} = 4.52$	$R_{TCA/PP} = 4.06$		

5. ZÁVĚR

Výsledky měření potvrdily, že sekvenční injekční chromatografii je možné použít pro simultánní stanovení účinných látek v léčivém přípravku Triamcinolon – IVAX. Naměřené hodnoty metodou SIC byly srovnatelné s kontrolním měřením pomocí HPLC a zjištěné výsledky tedy dokazují, že je tato nová generace průtokových metod alternativou HPLC v analytických laboratořích při zachování správnosti dosažených výsledků. Jednou z mála nevýhod této techniky je však horší softwarové zpracování naměřených dat, kdy například program pracuje pouze s výškou píku.

Optimální podmínky pro analýzu jsou: mobilní fáze acetonitril-voda v poměru 35:65 (v/v), pH 3,3 až 3,4 upraveno přidáním koncentrované kyseliny octové (99%). Množství MF potřebné pro jednu analýzu je 4 ml; množství vzorku k jedné analýze 10 μl ; průtoková rychlost pumpy 15 $\mu\text{l}\cdot\text{s}^{-1}$. Pro analýzu byla použita kolona Onyx™ monolithic C18 (50 x 4,6 mm) s monolitickou předkolonou (5 x 4,6 mm); detekční cela Z o délce optické dráhy 1 cm s podélným směrem paprsku vůči toku; UV–VIS spektrofotometr s nastavenou vlnovou délkou 240 nm; jako vnitřní standard byl použit propylparaben.

Metoda vykazovala tyto hodnoty: limit detekce pro kyselinu salicylovou 1,00 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, pro triamcinolon acetonid 0,66 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ a pro propylparaben 0,33 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$; limit kvantifikace pro kyselinu salicylovou 3,00 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, pro triamcinolon acetonid 2,00 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ a pro propylparaben 1,00 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$; délka jedné analýzy 5,1 min; lineární odezvu absorbance u koncentrací 3,1 až 300,0 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ pro kyselinu salicylovou, 6,2 až 250,0 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ pro triamcinolon acetonid a propylparaben, při korelačním koeficientu vyšším než 0,999; opakovatelnost měření absorbance u deseti (osmi) nástřiků pro kyselinu salicylovou při koncentracích 200,00 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, 85,00 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, 12,50 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, pro triamcinolon acetonid při koncentracích 20,00 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, 8,50 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, 1,25 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ a pro propylparaben při koncentracích 40,00 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, 17,00 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, 2,50 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ vykazovala relativní směrodatnou odchylku do 2,00 %, opakovatelnost měření pro retenční časy za stejných podmínek vykazovala relativní směrodatnou odchylku pro kyselinu salicylovou a triamcinolon acetonid do 1,00 %, pro propylparaben do 1,50 %.

6. LITERATURA

-
- ¹ Růžička J.: Flow Injection – CD, the 2nd edition 2002.
- ² <http://www.flowinjection.com/> - FIA tutorial - 08/2006.
- ³ Hana Paseková, Disertační práce: Využití automatizovaných průtokových metod ve farmaceutické analýze, FaF UK, kat. analytické chemie, 2001.
- ⁴ Růžička J., Marshall G.: Anal. Chim. Acta 237 (1990) 329.
- ⁵ Hana Paseková, Miroslav Polášek, Petr Solich, Chem. Listy 93, 354 - 359 (1999)
- ⁶ Peterson K. L., Logan B. K., Christian G. D.: Růžička J., Anal. Chim. Acta 337 (1997) 99.
- ⁷ Růžička J.: Anal. Chim. Acta 308 (1995) 14.
- ⁸ Růžička J.: Analyst 125 (2000) 1053.
- ⁹ Garden S.R., Strachan N.J.C.: Anal. Chim. Acta 444 (2001) 187.
- ¹⁰ Dreveny D., Michalowski J., Seidel R., Gubitz G.: Analyst (Amsterdam) 123 (1998) 2271.
- ¹¹ Wu C.-H., Scampavia L., Ruzicka J., Zamost B., Analyst 126 (2001) 291.
- ¹² Klimundová J., Šatínský D., Sklenářová H., Solich P., Talanta, 69 (2006) 730.
- ¹³ Šatínský D., Santos L., Sklenářová H., Solich P., Montenegro M.C., Araújo A.N., Talanta, 68 (2005) 214.
- ¹⁴ Šatínský D., Huclová J., Ferreira R.L.C., Montenegro M.C., Solich P., J. Pharm. Biomed. Anal., 40 (2006) 293.
- ¹⁵ Petr Chocholouš, Petr Solich, Dalibor Šatínský, Talanta, Vol 72 (2007) 854-858
- ¹⁶ <http://www.chromolith.com> – 03/2007.
- ¹⁷ Švec F., Chem. Listy, 98 (2004) 232.
- ¹⁸ Český lékopis 2005, Grada Publishing, Praha (2005) str. 1480 - 1482
- ¹⁹ Český lékopis 2005, Grada Publishing, Praha (2005) str. 5366 – 5369