

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

**KATEDRA ANALYTICKÉ CHEMIE**

**Vývoj a validace UHPLC metody pro stanovení mikonazolu,  
ekonazolu a jeho nečistot v tuhých disperzích**

**DIPLOMOVÁ PRÁCE**

Vedoucí diplomové práce: doc. PharmDr. Ludmila Matysová, Ph.D.

Hradec Králové, 2019

Kristýna Arnoltová

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

V Karlových Varech 29. 4. 2019

Kristýna Arnoltová

Na tomto místě bych ráda poděkovala doc. PharmDr. Ludmile Matysové, Ph.D. a Mgr. Kateřině Kučerové za cenné připomínky a odborné rady, kterými přispěly k vypracování této diplomové práce.

# Abstrakt

Univerzita Karlova

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra analytické chemie

**Kandidát:** Kristýna Arnoltová

**Školitel:** doc. PharmDr. Ludmila Matysová, Ph.D.

**Název diplomové práce:** Vývoj a validace UHPLC metody pro stanovení mikonazolu, ekonazolu a jeho nečistot v tuhých disperzích

Předmětem diplomové práce bylo vytvořit novou analytickou metodu na stanovení mikonazolu, ekonazolu a jeho tří nečistot. Byla použita metoda ultra-vysokoúčinné kapalinové chromatografie (UHPLC).

Pro separaci byla použita kolona Kinetex<sup>TM</sup> XB C18 o rozměrech 50 x 2,1 mm s povrchově porézními částicemi o velikosti 1,7 μm. Jako mobilní fáze byl zvolen octanový pufr o pH 7,8 ve směsi s metanolem v poměru 80:20, a acetonitril ve směsi s metanolem v poměru 60:40, v celkovém poměru 60:40. Použita byla gradientová eluce. Průtoková rychlost byla nastavena na 0,6 ml/min. Jako vnitřní standard byl vybrán butylparaben. Všechny látky byly detekovány při vlnové délce 225nm. Celková doba analýzy byla 9 min.

Po optimalizaci separačních podmínek byla metoda částečně validována a využita k praktickému měření na stanovení obsahu mikonazolu v tuhých disperzích, kde byla testována vhodnost různých polymerů jakožto nosičů účinné látky.

# Abstract

Charles University

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Analytical Chemistry

**Candidate:** Kristýna Arnoltová

**Supervisor:** doc. PharmDr. Ludmila Matysová, Ph.D.

**Title of the diploma thesis:** Development and validation of UHPLC method for determination of miconazole, econazole and its impurities in solid dispersions

The aim of the submitted thesis was to create a new analytical method for the determination of miconazole, econazole and its three impurities. Ultra-high performance liquid chromatography (UHPLC) was used.

A Kinetex<sup>TM</sup> XB C18 column, 1.7  $\mu\text{m}$  particle size, 50 x 2.1 mm was used for the separation. The mobile phase was composed of the acetate buffer pH 7.8 in a mixture with methanol (80:20) and of acetonitrile with methanol (60:40), in a total ratio of 60:40. A gradient elution was used. Flow rate was set to 0.6 ml / min. Butylparaben was chosen as the internal standard. All substances were detected at a wavelength of 225nm. Total analysis time was 9 minutes.

After optimization of the separation conditions, the method was partially validated and used for practical measurements to determine the content of miconazole in solid dispersions.

## SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

**UHPLC** - ultra-vysokoučinná kapalinová chromatografie (ultra-high performance liquid chromatography)

**HPLC** - vysokoučinná kapalinová chromatografie (high performance liquid chromatography)

**HVLP** – hromadně vyráběný léčivý přípravek

### Nečistoty ekonazolu

- Nečistota č. 1 - (1RS)-1-(2,4-dichlorfenyl)-2-(1H-imidazol-1-yl)ethan-1-ol,
- Nečistota č. 2 - (2RS)-2-[(4-chlorbenzyl)oxy]-2-(2,4-dichlorfenyl)ethan-1-amin,
- Nečistota č. 3 - 1-(4-chlorbenzyl)-3-[(2RS)-2-[(4-chlorbenzyl)oxy]-2-(2,4-dichlorfenyl)ethyl]-1H-imidazol-3-ium

**MF** – mobilní fáze

**IS** – vnitřní standard (internal standard)

**PLGA** – lineární kopolymer DL-kyseliny mléčné a kyseliny glykolové v poměru 1:1

**3T** – PLGA polyester větvený 3 % tripentaerythritolu v reakční směsi

**8D** – PLGA polyester větvený 8 % dipentaerythritolu v reakční směsi

**2A** – PLGA polyester větvený 2 % kyseliny polyakrylové o molární hmotnosti 2 000 g/mol v reakční směsi

# OBSAH

<b>1</b>	<b>ÚVOD</b> .....	<b>9</b>
<b>2</b>	<b>CÍL</b> .....	<b>10</b>
<b>3</b>	<b>TEORETICKÁ ČÁST</b> .....	<b>11</b>
3.1	ANTIMYKOTIKA.....	11
3.1.1	<i>Azolové deriváty</i> .....	11
3.1.2	<i>Mikonazol</i> .....	11
3.1.3	<i>Ekonazol</i> .....	12
3.2	ULTRA-VYSOKOÚČINNÁ KAPALINOVÁ CHROMATOGRAFIE.....	13
3.2.1	<i>Rozdíly mezi UHPLC a HPLC</i> .....	14
3.2.2	<i>Stacionární fáze používané pro UHPLC</i> .....	15
3.2.3	<i>Použití UHPLC</i> .....	17
3.3	REŠERŠE PRACÍ ZALOŽENÝCH NA SEPARACI EKONAZOLU A MIKONAZOLU POMOCÍ HPLC, UHPLC.....	18
<b>4</b>	<b>EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST</b> .....	<b>20</b>
4.1	POUŽITÉ CHEMIKÁLIE.....	20
4.2	PŘÍSTROJOVÉ VYBAVENÍ A POMŮCKY.....	21
4.3	PŘÍPRAVA ROZTOKŮ.....	22
4.3.1	<i>Tlumivý octanový roztok</i> .....	22
4.3.2	<i>Tlumivý fosforečnanový roztok</i> .....	22
4.3.3	<i>Mobilní fáze</i> .....	22
4.3.4	<i>Roztoky standardů</i> .....	23
<b>5</b>	<b>VÝSLEDKY A DISKUZE</b> .....	<b>25</b>
5.1	OPTIMALIZACE CHROMATOGRAFICKÉ METODY.....	25
5.1.1	<i>Vlnová délka detekce</i> .....	25
5.1.2	<i>Složení mobilní fáze, gradient a hodnota pH</i> .....	25
5.1.2.1	<i>Voda jako součást vodné složky MF</i> .....	25
5.1.2.2	<i>Octanový pufr jako součást vodné složky MF</i> .....	26
5.1.2.3	<i>Fosforečnanový pufr jako součást vodné složky MF</i> .....	29
5.1.3	<i>Analytická kolona</i> .....	31
5.1.4	<i>Vnitřní standard</i> .....	31
5.2	SOUHRN OPTIMÁLNÍCH CHROMATOGRAFICKÝCH PODMÍNEK.....	32
5.3	VALIDACE ANALYTICKÉ METODY.....	34
5.3.1	<i>Test způsobilosti systému</i> .....	34
5.3.1.1	<i>Opakovatelnost</i> .....	34
5.3.1.2	<i>Kapacita separace</i> .....	36
5.3.1.3	<i>Faktor symetrie</i> .....	37
5.3.1.4	<i>Rozlišení</i> .....	38
5.3.2	<i>Validace analytické metody</i> .....	39
5.3.2.1	<i>Linearita</i> .....	39
5.3.2.2	<i>Přesnost</i> .....	41
5.3.2.3	<i>Robustnost</i> .....	41
5.3.2.4	<i>Stabilita</i> .....	42
5.3.2.5	<i>Selektivita</i> .....	42

<b>6</b>	<b>VYUŽITÍ NOVÉ METODY V ANALÝZE DISOLUČNÍCH MÉDIÍ .....</b>	<b>44</b>
6.1	NOSIČE TUHÝCH DISPERZÍ .....	44
6.1.1	<i>Polyestery kyseliny mléčné a glykolové .....</i>	<i>44</i>
6.1.2	<i>Degradace polymerů kyseliny mléčné a glykolové .....</i>	<i>46</i>
6.2	PŘÍPRAVA TUHÝCH DISPERZÍ .....	47
6.3	DISOLUČNÍ TESTY .....	48
6.4	STANOVENÍ OBSAHU MIKONAZOLU V TUHÝCH DISPERZÍCH POMOCÍ UHPLC .....	50
6.4.1	<i>Příprava vnitřního standardu .....</i>	<i>50</i>
6.4.2	<i>Příprava vzorků a měření vzorků.....</i>	<i>50</i>
6.4.3	<i>Stanovení obsahu mikonazolu v polymeru.....</i>	<i>50</i>
6.5	VÝSLEDKY MĚŘENÍ.....	52
6.5.1	<i>Výsledky z měření vzorků z disolučních testů .....</i>	<i>52</i>
6.5.2	<i>Výsledky měření na stanovení obsahu mikonazolu v polymeru.....</i>	<i>55</i>
<b>7</b>	<b>ZÁVĚR.....</b>	<b>56</b>
<b>8</b>	<b>SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ .....</b>	<b>58</b>
	<b>SEZNAM TABULEK.....</b>	<b>61</b>
	<b>SEZNAM OBRÁZKŮ .....</b>	<b>62</b>



# 1 ÚVOD

Tato práce se zabývá vývojem vhodné chromatografické metody, která bude využita ke stanovení mikonazolu či ekonazolu uvolněného z matrice polymeru.

Pro své nesporné výhody oproti jiným metodám, jako citlivost, rychlost a nižší náklady na analýzu, byla pro stanovení použita ultra-vysokoúčinná kapalinová chromatografie (UHPLC).

Mikonazol a ekonazol patří mezi látky s antifungálním působením, které spadají do skupiny azolových derivátů, konkrétně imidazolových. Využívají se k lokální terapii mykotických onemocnění.

Moderním trendem ve vývoji lékových forem je využívat větvené polymery jako nosiče účinných látek, a to hlavně z důvodu možnosti ovlivňování uvolňování účinné látky a zvýšení její biodostupnosti. Stanovení toho, jak se léčivá látka z nosiče uvolňuje, to znamená jak rychle a v jakém množství, je pro samotný výzkum stěžejní.

## 2 CÍL

Cílem práce bylo vyvinout citlivou a rychlou chromatografickou metodu, která bude využita při analýze mikonazolu v disolučním médiu. Disoluční testy pro ověření postupného uvolňování mikonazolu/ekonazolu z nové lékové formy byly prováděny na katedře Farmaceutické technologie Univerzity Karlovy v Hradci Králové.

Testy se prováděly s mikonazolem a ekonazolem jakožto strukturně podobnou léčivou látkou a jeho nečistotami, u nichž se předpokládala strukturní podobnost s nečistotami mikonazolu.

Byly ověřeny některé validační parametry (test způsobilosti systému, linearita, přesnost, robustnost, stabilita, selektivita), aby bylo zajištěno, že je metoda vhodná pro daný účel.

## 3 TEORETICKÁ ČÁST

### 3.1 Antimykotika

Antimykotika neboli antifungální látky, specificky působí na houbové organismy. Tyto organismy mohou být pro člověka škodlivé jak v přímém napadení živé tkáně nebo v produkci mykotoxinů, tak v nepřímém působení, jako je například vyvolání alergie. Houbové organismy způsobují mykózy, ty rozlišujeme na povrchové a systémové<sup>[1]</sup>.

Látky s protihoubovým působením dělíme do několika skupin podle původu. Mohou být syntetického původu, mezi ně patří azolové deriváty, allylaminové deriváty a flucytosin. Dále původu přírodního jako polyenová antibiotika a griseofulvin. A poslední polosyntetického původu, echinokandinové deriváty<sup>[1]</sup>.

#### 3.1.1 Azolové deriváty

Azolové deriváty nebo také azolová chemoterapeutika patří mezi širokospektrá antifungální léčiva, která je možné rozdělit do dvou skupin a to na deriváty imidazolu a deriváty triazolu. Mechanismus účinku této skupiny spočívá ve specifické inhibici 14- $\alpha$ -demethylasy, která je nezbytná pro biosyntézu ergosterolu, hlavní součást buněčné membrány hub. V plazmě se naopak kumulují toxické methylované steroly<sup>[1][2]</sup>.

Právě do skupiny imidazolových derivátů řadíme ekonazol a mikonazol, kterými se tato diplomová práce zabývá<sup>[1]</sup>.

#### 3.1.2 Mikonazol

Mikonazol spadá do skupiny azolových chemoterapeutik. Využívá se hlavně k lokální terapii kožních a slizničních mykóz. V současné době je v České republice mikonazol v rámci HVLP (hromadně vyráběný léčivý přípravek) obsažen pouze ve formě mikonazol nitrátu v kombinaci s metronidazolem, konkrétně v přípravku Klion-D 100 vag tbl<sup>[2][3]</sup>.

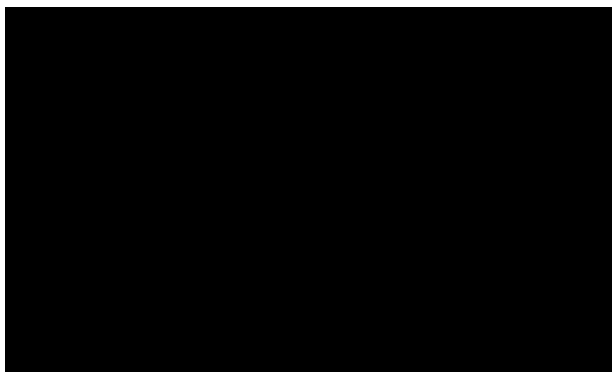
Definice<sup>[4]</sup>

Chemicky se jedná o 1-{(2RS)-2-[(2,4-dichlorbenzyl)oxy]-2-(2,4-dichlorfenyl)ethyl}-1H-imidazol

Sumární vzorec: C<sub>18</sub>H<sub>14</sub>Cl<sub>4</sub>N<sub>2</sub>O

Molekulová hmotnost: 416,13

Strukturní vzorec:



Obrázek č. 1: Strukturní vzorec sloučeniny mikonazol <sup>[5]</sup>

### 3.1.3 Ekonazol

Stejně jako mikonazol i ekonazol patří do skupiny azolových antimykotik. V současné době je na českém trhu v podobě vaginálního krému a čípků na léčbu vulvovaginální mykózy, které jsou na rozdíl od přípravku obsahující mikonazol volně prodejné. Nalezneme je pod obchodním názvem Gyno-pevaryl<sup>[3][6]</sup>.

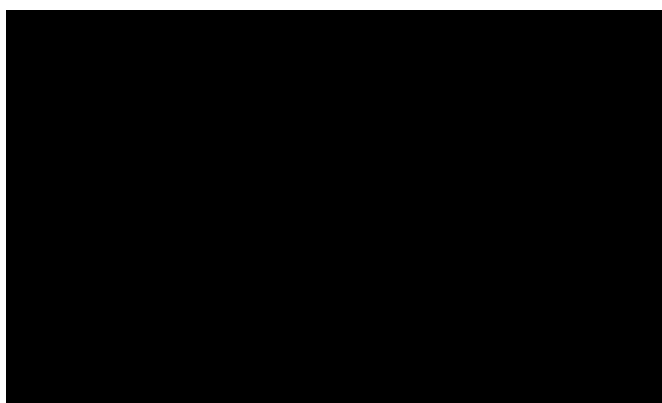
Definice <sup>[4]</sup>

Chemicky se jedná o 1-{{(2RS)-2-[(4-chlorbenzyl)oxy]-2-(2,4-dichlorfenyl)-ethyl}}-1H-imidazol

Sumární vzorec: C<sub>18</sub>H<sub>15</sub>Cl<sub>3</sub>N<sub>2</sub>O

Molekulová hmotnost: 381,69

Strukturní vzorec:



Obrázek č. 2: Strukturní vzorec sloučeniny ekonazol <sup>[5]</sup>

### 3.2 Ultra-vysokoúčinná kapalinová chromatografie

Ultra-vysokoúčinná kapalinová chromatografie (také ultra-high performance liquid chromatography nebo UHPLC) spadá do separačních metod, které pracují na principu rozdílné distribuce složek ve směsi mezi dvě nemísitelné fáze. Mobilní fázi (pohyblivou) tvoří kapalina a fázi stacionární (nepohyblivou) tvoří pevná látka. Stacionární fázi nalezneme v chromatografické koloně ve formě sorbentu, tímto sorbentem protéká mobilní fáze, která je do kolony čerpána pomocí vysokotlakého čerpadla. Jednotlivé složky analyzované směsi unášené mobilní fází se dělí pomocí neustálého ustalování rovnováhy mezi stacionární a mobilní fází. Samotné dělení je závislé na povaze jak fáze mobilní, tak stacionární.

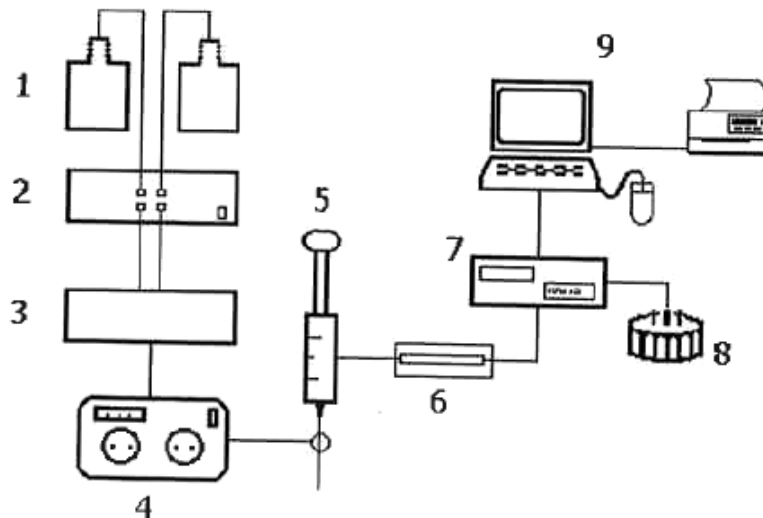
Eluce jednotlivých složek pak může probíhat za použití isokratické eluce (stále stejné složení mobilní fáze) nebo gradientové eluce (v průběhu analýzy je složení mobilní fáze měněno).

Složky směsi jsou separovány na jednotlivé zóny, které jsou při výstupu z kolony rozpoznávány detektorem a signál je následně převeden do formy chromatogramu<sup>[7]</sup>.

Kapalinový chromatograf se skládá z následujících částí<sup>[7]</sup>.

- Zásobníky mobilní fáze, jejichž úkolem je uchovávat mobilní fázi.
- Degaser (odplyňovač), který odplyňuje mobilní fázi.
- Vysokotlaké čerpadlo, které zajišťuje přenos mobilní fáze do systému.
- Autosampler, který vzorek nadávkuje.
- Chromatografická kolona a termostat kolony, zde probíhá samotná separace látek.
- Detektor.
- Počítač a software.

Další součástí chromatografického systému může být směšovač. Ten může být zařazen před čerpadlo nebo v případě systému, který má dvě vysokotlaká čerpadla, může být umístěn až za nimi. Směšovač umožňuje mísit kapaliny ze zásobníků v různém poměru a je tedy nedílnou součástí systému pro gradientovou eluci<sup>[7]</sup>.



Obrázek č. 3: Blokové schéma HPLC. 1 – Zásobníky mobilních fází, 2 – odplyňovač, 3 – směšovač, 4 - vysokotlaké čerpadlo, 5 – dávkovač vzorku, 6 – chromatografická kolona, 7 – detektor, 8 – sběrač frakcí, 9 – počítač<sup>[7]</sup>.

### 3.2.1 Rozdíly mezi UHPLC a HPLC

Kvůli separaci složek směsi v co nejkratším čase stále více dominuje UHPLC zavedená v roce 2004, nad HPLC (vysokoúčinná kapalinová chromatografie). UHPLC je charakterizována mimo jiné použitím kolon s částicemi o rozměrech menších než 2  $\mu\text{m}$  na rozdíl od HPLC, kde se používají částice o velikosti 2,5-5  $\mu\text{m}$ . Klesající velikost částic má pozitivní vliv na zvyšování účinnosti separace a zkracování doby analýzy. Zároveň ale se zmenšením částic stoupá zpětný tlak. Přístroj tedy musí pracovat s tlaky vyššími než 1000 barů neboli 100 MPa. Zatímco HPLC přístroje pracují s tlaky okolo 400 bary neboli 40 MPa.

Další výhodou UHPLC systému je nižší spotřeba mobilní fáze, která vyplývá z nižších průtoků a to přispívá k nižším nákladům na analýzu<sup>[7][8][9][10][11][12]</sup>.

Výše zmíněné rozdíly shrnuje následující tabulka.

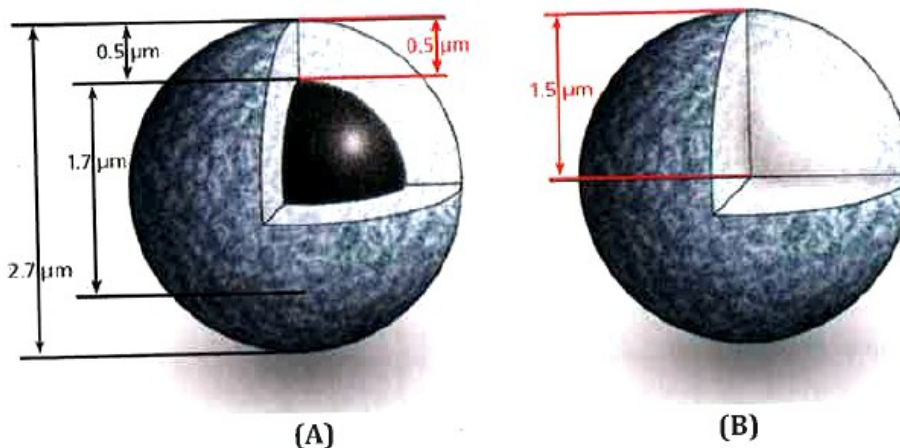
Tabulka č. 1: Rozdíly mezi UHPLC a HPLC

	UHPLC	HPLC
<b>Doba analýzy</b>	kratší	delší
<b>Velikost částic</b>	<2 μm	2,5-5 μm
<b>Tlak na koloně</b>	100 MPa	40 MPa
<b>Spotřeba mobilní fáze</b>	nižší	vyšší
<b>Náklady na pořízení přístroje</b>	vyšší	nižší

### 3.2.2 Stacionární fáze používané pro UHPLC

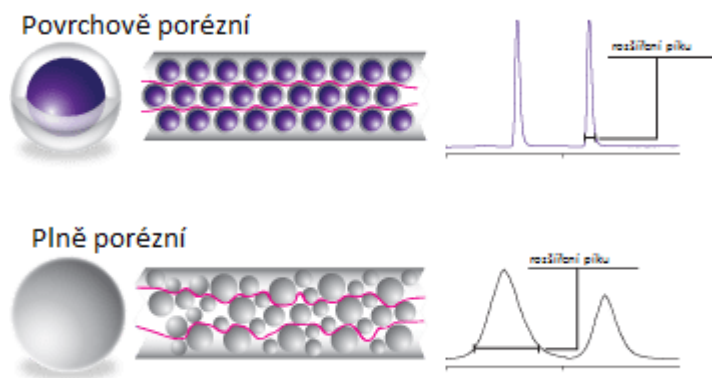
Pro rychlou a účinnou separaci je kvalita a stabilita stacionární fáze stěžejní. Kolony máme dvojího typu buďto monolitní nebo částicové. Částicové pak dále dělíme na ty, které obsahují částice plně porézní nebo povrchově porézní.

Právě povrchově porézní částice mohou zvýšit účinnost a rychlost separace. Jsou tvořeny neporézním jádrem, které obaluje porézní vrstva<sup>[7][13]</sup>.



Obrázek č. 4: Vzhled povrchově porézní částice (A) v porovnání s celkově porézní částicí (B)<sup>[7]</sup>

Pro tuto práci byla použita kolona značky KINETEX<sup>®</sup> s povrchově porézními částicemi (také pod názvem core-shell). Porézní vrstva je na pevném jádře z oxidu křemičitého. Výhodnou je menší rozšiřování píků v porovnání s plně porézními částicemi, a tím zvýšení účinnosti<sup>[13]</sup>.



Obrázek č. 5: Rozdíl v rozmývání (šíři píků) mezi povrchově porézní a plně porézní částicí<sup>[13]</sup>

Oproti plně porézním částicím mohou být tedy core-shell použity pro zvýšení efektivity, snížení spotřeby rozpouštědel a snížení nákladů, jak pro metodu HPLC, tak pro UHPLC. Na trhu existují různé velikosti částic. Pro HPLC systémy se vytvářejí o velikosti 5  $\mu\text{m}$ , pro HPLC i UHPLC lze využít velikost 2,6  $\mu\text{m}$  a čistě pro UHPLC 1,7 a 1,3  $\mu\text{m}$ <sup>[13]</sup>.

Plně porézní	vs	Povrchově porézní	
5 $\mu\text{m}$		5 $\mu\text{m}$	90 %
3 $\mu\text{m}$		2,6 $\mu\text{m}$	85 %
1,7 $\mu\text{m}$		1,7 $\mu\text{m}$	20 %
1,7 $\mu\text{m}$		1,3 $\mu\text{m}$	50 %

Obrázek č. 6: Průměrné zvýšení efektivity při použití povrchově porézních částic oproti plně porézním<sup>[13]</sup>



### 3.2.3 Použití UHPLC

V dnešní době je trendem vzrůstající počet vzorků, které mají být analyzovány v co nejkratším čase. Stále častěji se tedy upřednostňuje použití UHPLC namísto konvenční HPLC, a to především kvůli vysoké rychlosti a účinnosti separace.

Metoda je využívána v řadě různých typů analýz. Jedná se například o farmaceutickou analýzu, kde umožňuje kontrolu stability léků či kontrolu kvality léčiv. Další oblastí je environmentální, kde se uplatňuje například v bio-monitorování znečišťujících látek. Dále potravinová analýza využívaná například k měření kvality nápojů či ke konzervačním analýzám. Rychlá a účinná separace je nezbytná ve forenzní analýze, kde se provádí například kvantifikace léčiv v biologických vzorcích nebo identifikace steroidů v krvi.

Pokud se zaměříme na analýzu léčiv, lze při správném výběru metody a nastavení chromatografických podmínek i z jediného nástřiku získat informace o totožnosti léčiva a stanovit jeho obsah i obsah případných nečistot. UHPLC může být použita i při řešení problémů se stabilitou léčiv, kdy umožňuje sledovat kvalitativní i kvantitativní změny u stanovovaného léčiva a současně hodnotit vznikající rozkladné produkty. UHPLC je možné dále využít v analýze přírodních léčiv, kde je hodnoceno zastoupení obsahových látek v příslušných drogách. A v neposlední řadě umožňuje monitorování léčiv a jejich metabolitů v tělních tekutinách, čehož se využívá při klinických testech<sup>[11][14][15][16]</sup>.

### **3.3 Rešerše prací založených na separaci ekonazolu a mikonazolu pomocí HPLC, UHPLC**

Následující tabulka shrnuje metody, ze kterých se v experimentální části vycházelo. U všech se jednalo o metodu HPLC.

Všechny tyto metody využívaly kolony RP-C18. Jako mobilní fáze byl použit metanol v kombinaci s fosforečnanovým pufrem nebo s acetátovým pufrem a acetonitrem nebo pouze s vodou. Průtoková rychlost byla nastavena ve třech případech na 1,0 ml/min, dále pak na 1,4 ml/min a 1,5 ml/min. Detekce probíhala při vlnových délkách 200 nm, 220 nm a 225 nm. Pokud byl objem nástřiku uveden, byl 10  $\mu$ l nebo 20  $\mu$ l.

Tabulka č. 2: Příklady metod stanovujících ekonazol, ekonazol-nitrát

Metoda	Stacionární fáze (rozměr kolony; velikost částic)	Mobilní fáze	Režim	Průtoková rychlost	Detekce	Nástřik
HPLC 1 [14]	C18 deaktivovaný pro bazické látky (100 x 4,6 mm; 3 μm)	(MeOH : AmAc 20:80) : (MeOH: ACN 40:60) 60:40	gradient	1,5 ml/min	225 nm	10 μl
HPLC 2 [17]	Bondclone <sup>®</sup> , RP-C18 (300 x 3.9; 10 μm)	MeOH : H <sub>2</sub> O 57:43	gradient	1,4 ml/min	220 nm	-
HPLC 3 [18]	RP-C18 (250 x 4,6 mm; 5 μm)	MeOH : NH <sub>4</sub> H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 85:15	isokratický	1,0 ml/min	200 nm	-
HPLC 4 [19]	RP-C8 (250 x 4,6 mm; 5 μm)	MeOH : NH <sub>4</sub> H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 85:15	isokratický	1,0 ml/min	200 nm	20 μl
HPLC 5 [20]	RP-C18 (250 x 5,0 mm; 5 μm)	MeOH : NH <sub>4</sub> H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 85:15	isokratický	1,0 ml/min	200 nm	10 μl

## 4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

### 4.1 Použité chemikálie

- Metyl 4-hydroxybenzoát (99%), Fluka analytical, Sigma Aldrich, Česká republika
- Etyl 4-hydroxybenzoát (99%), Sigma Aldrich, Česká republika
- Propyl 4-hydroxybenzoát (99%), Fluka analytical, Sigma Aldrich, Česká republika
- Butyl 4-hydroxybenzoát (99%), Fluka analytical, Sigma Aldrich, Česká republika
- Methanol (HPLC grade), Sigma Aldrich, Česká republika
- Acetonitril (HPLC grade), Sigma Aldrich, Česká republika
- Ekonazole for systém suitability CRS, European Pharmacopoeia Reference Standard, Strasbourg, Francie
- Mikonazole, Sigma Aldrich, Česká republika
- Octan amonný (98%), Sigma Aldrich, Česká republika
- Ultračistá voda (čištěná systémem Milli-Q RG, Millipore, USA)
- Hydrogenfosforečnan amonný, Sigma Aldrich, Česká republika
- Hydroxid sodný (p.a.), Penta, Česká Republika

## 4.2 Přístrojové vybavení a pomůcky

- UHPLC systém Liquid Chromatograph – Nexera X2- Shimadzu, Japonsko
  - Vysokotlaké pumpy LC – 30AD
  - Autosampler SIL-30AC
  - Degasser DGU-20A 5R
  - Detektor – DAD SPD-M30A
  - Komunikační jednotka s počítačem CMB-20A
  - Kolonový termostat CTO-20AC
- Chromatografická kolona
  - Kinetex™ 1,7 µm, XB-C18 100A, 50 x 2 mm, Phenomenex, USA
- Analytické váhy
- Automatické pipety
- pH metr, SCHOTT, Česká Republika
- Filtry, 47 mm, 0,2 µm, Nylon Membrane Filter, PALL CORPORATION, USA
- Jednorázové hypodermické jehly MEDOJECT, CHIRANA T. Injecta, Slovenská republika
- Filtry na stříkačky, 4 mm, 0,2 µm PTFE membrána, GE Healthcare, UK
- Stříkačky 1ml, TERUMO, Philippines

## 4.3 Příprava roztoků

### 4.3.1 Tlumivý octanový roztok

Množství látky, které bylo potřeba navážít pro přípravu roztoku octanu amonného, bylo vypočítáno dle následující rovnice:

$$c = \frac{n}{V} = \frac{\frac{m}{M}}{V} \rightarrow m = c \times V \times M$$

$m$  ... potřebné množství dané látky (g)

$c$  ... molární koncentrace (mol/l)

$M$  ... molární hmotnost (g/mol)

Koncentrace odpovídala 0,77 g/l, neboli 0,01 mol/l. Vypočítaná navážka 0,1542 g byla převedena do 200 ml odměrné baňky, rozpuštěna a doplněna na požadovaný objem ultračistou vodou. Následně byl takto připravený pufr přefiltrován přes filtr o velikosti pórů 0,2  $\mu\text{m}$ .

### 4.3.2 Tlumivý fosforečnanový roztok

K přípravě byl použit hydrogenfosforečnan amonný. Potřebné množství k přípravě roztoku bylo zjištěno pomocí výše zmíněné rovnice tak, aby výsledná koncentrace odpovídala 0,05 mol/l. Navážka 1,3209 g byla rozpuštěna v ultračisté vodě a doplněna na objem 200 ml. pH tohoto roztoku bylo 7,68 a nebylo upravováno. Pufr se opět před použitím zfiltraval pomocí aparatury přes filtr (0,2  $\mu\text{m}$ ).

### 4.3.3 Mobilní fáze

Mobilní fáze (MF) číslo jedna byla složena pouze z vody a metanolu v poměru 57:43. pH vodné složky po přípravě bylo 6,89, případně bylo na tuto hodnotu upraveno.

Následující mobilní fáze byla složena z vodné a organické části. Vodná složka byla tvořena octanovým puftrem a metanolem v poměru 80:20. Organická složka byla tvořena acetonitrilem a metanolem v poměru 60:40. Celkový poměr fází byl 60:40 ve prospěch vodné

části. Tyto poměry byly zachovány po celou dobu analýzy. K rozdílům v celkovém poměru fází docházelo až následně během gradientové eluce. pH této mobilní fáze se upravovalo pomocí roztoku hydroxidu sodného. Hodnoty pH jsou uvedeny v kapitole 5.1.2.2.

Při dalším testování byl octanový pufr nahrazen fosforečnanovým. Nejprve byla zkoušena MF s 85 % metanolu. Následně byl pufr s metanolem smíchán v poměru 50:50. Naposledy byl k metanolu přidán acetonitril pro zlepšení tvaru píků a poměry vodné a organické složky byly upraveny tak, že se shodovaly s poměry MF s octanovým pufrém. Přehled znázorňuje tabulka č. 3.

**Tabulka č. 3: Shrnutí složení mobilních fází**

<b>Mobilní fáze A</b>	<b>Mobilní fáze B</b>	<b>Poměry A:B</b>
<b>H<sub>2</sub>O</b>	MeOH	43:57
<b>AmAc : MeOH (80:20)</b>	ACN : MeOH (60:40)	60:40
<b>NH<sub>4</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub></b>	MeOH	15:85
<b>NH<sub>4</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub></b>	MeOH	50:50
<b>NH<sub>4</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> : MeOH (80:20)</b>	ACN : MeOH (60:40)	60:40

#### 4.3.4 Roztoky standardů

Připraveny byly 2 roztoky standardů, roztok standardu ekonazolu a jeho tří nečistot a následně roztok mikonazolu. Po nalezení metody, vedoucí k oddělení všech 5 látek, jimiž jsou ekonazol, tři jeho nečistoty a mikonazol, byl vybírán vhodný vnitřní standard. K tomuto účelu byl připraven roztok směsi parabenů (metylparaben, etylparaben, propylparaben, butylparaben).

Zásobní roztok ekonazolu a jeho nečistot byl připraven rozpuštěním navážky 8,9 mg v 1 ml metanolu. Zásobní roztok mikonazolu byl připraven rozpuštěním 100,1 mg v 10 ml metanolu. Roztok parabenů byl připraven tak, aby výsledná koncentrace přibližně odpovídala 0,1 mg/ml. Toho bylo docíleno navážkou přibližně 1 mg od každého parabenu a tyto navážky byly následně rozpuštěny v 10 ml metanolu. Tyto roztoky byly použity pro vývoj metody.

Po vývoji metody se přistoupilo k validaci, pro tento účel byly připraveny pracovní roztoky látek. Pracovní roztok butylparabenu a mikonazolu byl připraven z navážky 50,2 mg mikonazolu a 1,02 mg butylparabenu v 10 ml metanolu. Výsledná koncentrace mikonazolu byla 5,02 mg/ml a butylparabenu 0,102 mg/ml. Tento roztok byl následně brán jako standard při měření vzorků mikonazolu dodaných z katedry Farmaceutické technologie Univerzity Karlovy v Hradci Králové. Pracovní roztok ekonazolu a jeho nečistot byl shodný s předchozím, tedy 8,9 mg v 1 ml metanolu.



## 5 VÝSLEDKY A DISKUZE

### 5.1 Optimalizace chromatografické metody

Cílem optimalizace bylo najít vhodné podmínky pro stanovení ekonazolu, jeho nečistot a mikonazolu. U mikonazolu bylo předpokládáno, že nečistoty budou strukturně blízké nečistotám ekonazolu. Při optimalizaci metody bylo čerpáno z Českého lékopisu 2017<sup>[4]</sup> a nalezených článků týkajících se ekonazolu a jeho nečistot<sup>[17,18,19,20]</sup>. Níže budou uvedené jednotlivé problematiky, které byly během optimalizace řešeny.

#### 5.1.1 Vlnová délka detekce

Hodnota vlnové délky, při které bylo měřeno, odpovídá vlnové délce nalezené v Českém lékopisu 2017 v článku ekonazol, tedy 220 nm. Tato vlnová délka byla vyzkoušena i na mikonazol a byla vybrána jako vhodná. Butylparaben má maximum při vlnové délce 254 nm, ale při vlnové délce 220 nm je jeho odezva dostatečná.

#### 5.1.2 Složení mobilní fáze, gradient a hodnota pH

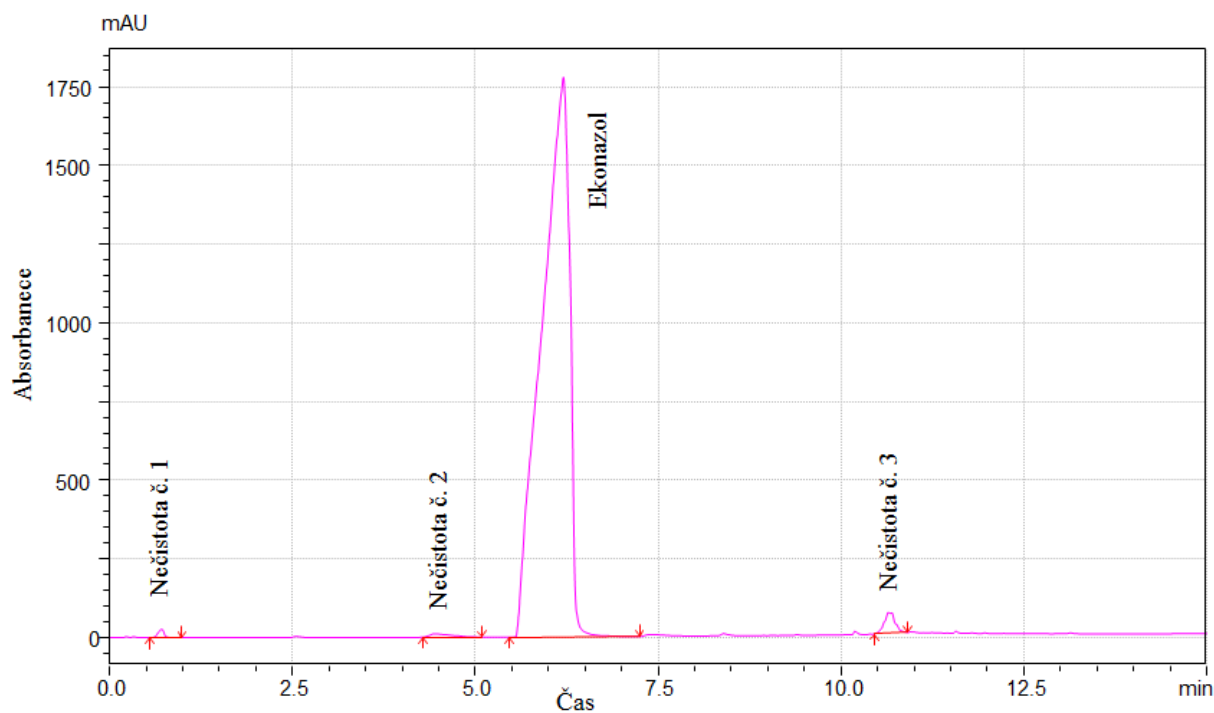
Při hledání vhodné mobilní fáze se vycházelo z metody dle Českého lékopisu 2017<sup>[4]</sup>, kde se pracuje s octanovým pufrem a dále z příslušných článků<sup>[17,18,19,20]</sup>, kde byl použit fosforečnanový pufr nebo čistá voda. Vše bylo kombinováno s metanolem a dalšími látkami, jak už bylo zmíněno výše.

##### 5.1.2.1 Voda jako součást vodné složky MF

Nejjednodušší možností byla mobilní fáze, která kombinovala pouze vodu a metanol. pH vody bylo 6,89. Bylo zjištěno, že intenzita odezvy nečistot byla velmi potlačena. Tento postup byl tedy zamítnut hned na začátku a nebyl dále rozvíjen. Voda proto byla nahrazena pufrem.

Tabulka č. 4: Rozpis gradientu u metody s MF č. 1

Doba analýzy (min)	Mobilní fáze A (%; H <sub>2</sub> O)	Mobilní fáze B (%; MeOH)
0→6,5	43→28	57→72
6,5→10	28→2	72→98
15	2	98



Obrázek č. 7: Chromatogram ekonazolu a jeho tří nečistot. Mobilní fáze MeOH : H<sub>2</sub>O

57:43; pH 6,89; kolona C18 XB (50 x 2,1 mm, 1,7 µm); průtok 0,6 ml/min; nástřik 2 µm; gradientová eluce.

#### 5.1.2.2 Octanový pufr jako součást vodné složky MF

Další v pořadí byl zkoušen octanový pufr jako součást vodné složky MF. Nejdříve nebyla hodnota pH upravována a byla ponechána na výchozí hodnotě 6,35. Při tvorbě gradientu se vycházelo z článku v Českém lékopise 2017<sup>[4]</sup>. Začátek gradientu byl na 60 % vodné složky. Tento poměr se v průběhu 20 minut lineárně měnil až na konečných 10 % vodné složky.

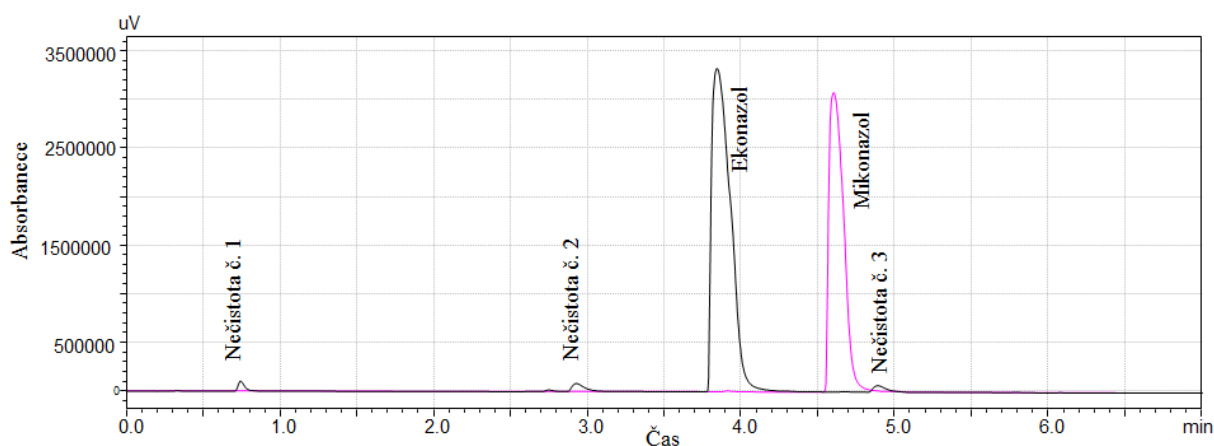
Takto provedená analýza byla zbytečně dlouhá. Píky všech látek byly značně rozmyté a málo intenzivní. Následující tabulka shrnuje testované změny gradientu tak, aby bylo docíleno co nejrychlejší analýzy a dostatečné separace všech látek.

Tabulka č. 5: Vývoj gradientu u druhé zkoušené MF

Doba analýzy (min)	Mobilní fáze A (% V/V)	Mobilní fáze B (% V/V)
0→20	60→10	40→90
0→15	60→10	40→90
0→10	60→10	40→90
0→7	60→25	40→75
0→7	60→15	40→85
0→7	60→5	40→95

Pozn.: Červeně označený řádek – vybrán jako vhodně nastavený gradient

Jako vhodná se ukázala být metoda s časem analýzy do 7 minut, při které se gradient během 7 minut lineárně měnil z poměru 60 % vodné fáze na 95 % organické fáze.



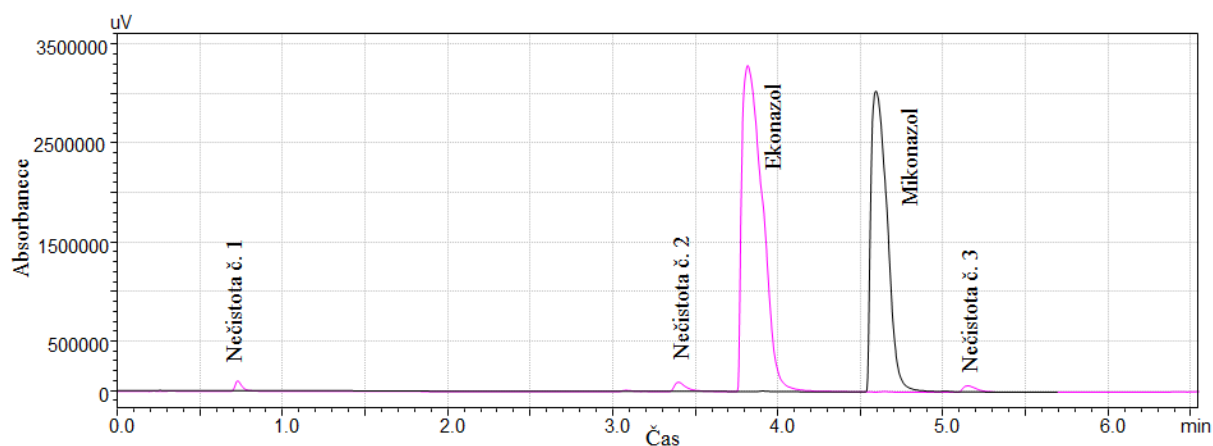
Obrázek č. 8: Chromatogram ekonazolu, jeho tří nečistot a mikonazolu. Mobilní fáze [(MeOH : AmAc 20:80) : (MeOH : ACN 40:60)] 60:40; pH 6,35; kolona C18 XB (50 x 2,1 mm, 1,7 µm); průtok 0,6 ml/min; nástřík 2 µm; gradientová eluce.

Během postupného zkracování analýzy a úpravy gradientu docházelo k přibližování píků analyzovaných látek. Ty se zároveň stávaly symetričtějšími a užšími. Jako problematické se ukázalo chvostování píků, které by nevyhovovalo validačním kritériím, a také nízké rozlišení mezi píky mikonazolu a nečistoty č. 3.

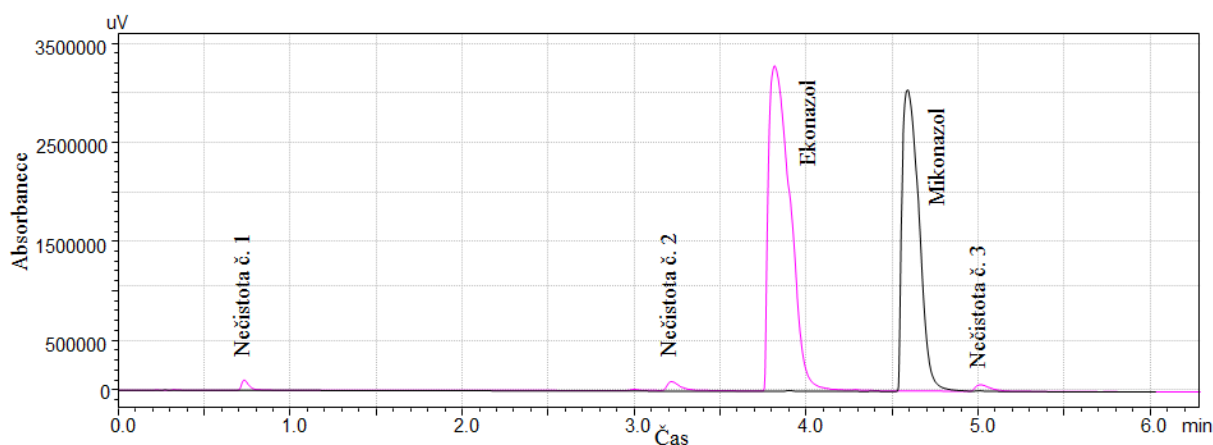
Tyto parametry byly optimalizovány změnou pH. Jednotlivé kroky jsou popsány níže.

## Úprava hodnoty pH

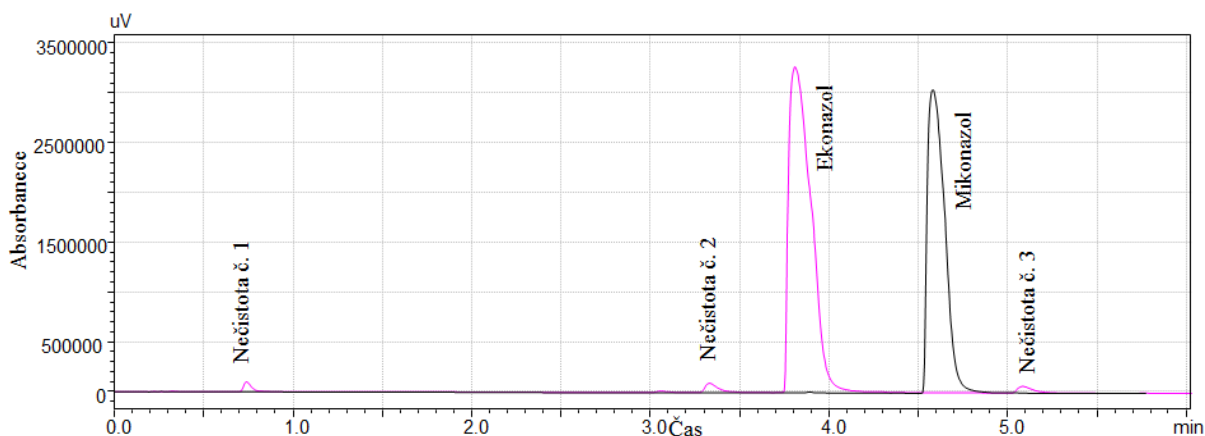
Jako stěžejní se ukázala být hodnota pH roztoku octanového pufru. Původní pH pufru bylo 6,35. Postupně byly vyzkoušeny různé hodnoty pH, přičemž byl zachován původně nastavený gradient. Nejprve se vyzkoušela hodnota vyšší a to pH 8,18. Tímto pH se vyřešil problém koeluce mikonazolu a nečistoty č. 3, ovšem na úkor koeluce nečistoty č. 2 a ekonazolu. Z toho důvodu byla hledána hodnota pH mezi původní 6,35 a 8,18, která by byla kompromisem, a při níž by se dostatečně oddělily všechny látky. Byly vyzkoušeny hodnoty 7,36 a 7,82. 7,82 se ukázala jako vhodná.



**Obrázek č. 9: Chromatogram ekonazolu, jeho tří nečistot a mikonazolu.** Mobilní fáze [(MeOH : AmAc 20:80) : (MeOH: ACN 40:60)] 60:40; **pH 8,18**; kolona C18 XB (50 x 2,1 mm, 1,7  $\mu$ m); průtok 0,6 ml/min; nástřík 2  $\mu$ m; gradientová eluce.



**Obrázek č. 10: Chromatogram ekonazolu, jeho tří nečistot a mikonazolu.** Mobilní fáze [(MeOH : AmAc 20:80) : (MeOH: ACN 40:60)] 60:40; **pH 7,36**; kolona C18 XB (50 x 2,1 mm, 1,7  $\mu$ m); průtok 0,6 ml/min; nástřík 2  $\mu$ m; gradientová eluce.



**Obrázek č. 11: Chromatogram ekonazolu, jeho tří nečistot a mikonazolu.** Mobilní fáze [(MeOH : AmAc 20:80) : (MeOH: ACN 40:60)] 60:40; **pH 7,82**; kolona C18 XB (50 x 2,1 mm, 1,7 µm); průtok 0,6 ml/min; nástřik 2 µm; gradientová eluce.

Metoda využívající octanový pufr s upraveným pH na 7,82 byla nakonec vybrána jako optimální a následně byla validována.

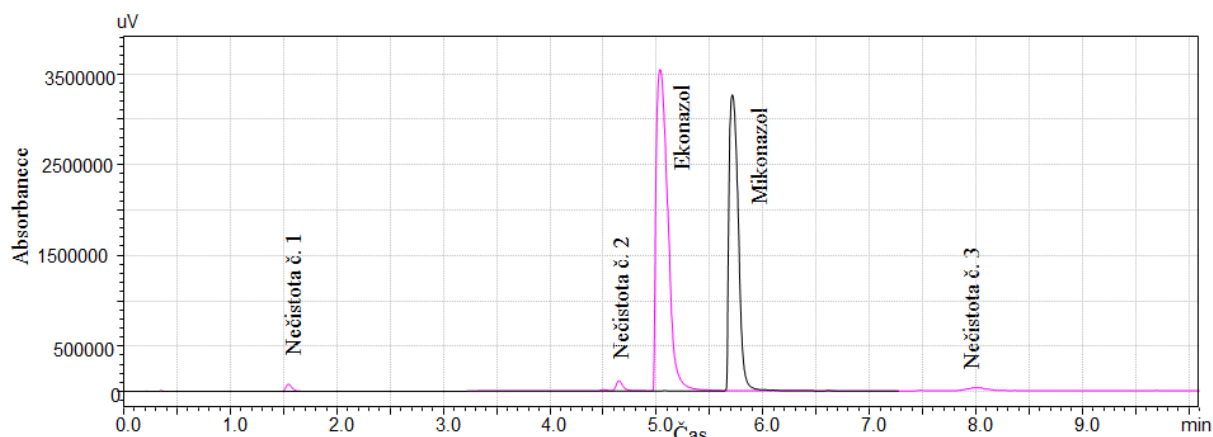
Během vývoje metody byla zkoumána i další možná alternativa složení mobilní fáze s fosforečnanovým pufrům.

### 5.1.2.3 Fosforečnanový pufr jako součást vodné složky MF

Jako poslední byla MF, která ve své vodné složce používá fosforečnanový pufr. Nejprve bez gradientu pouze v kombinaci s 85 % metanolu. pH fosforečnanového pufru bylo 7,75. Doba analýzy byla nastavena na 10 minut. Po naměření bylo zjištěno, že se látky pravděpodobně eluovaly s mrtvým objemem.

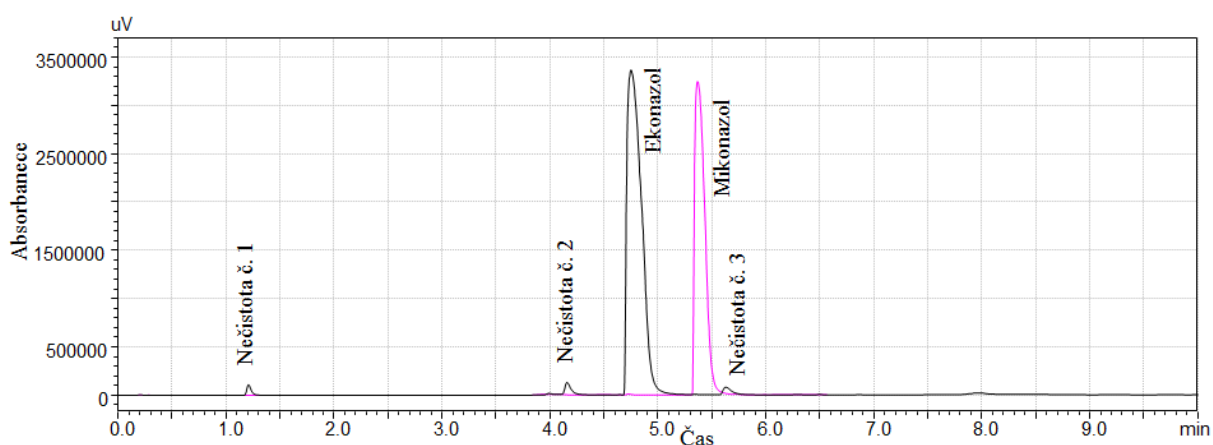
Do metody byl zařazen gradient. Čas analýzy byl nastaven na 15 minut, při kterém se gradient lineárně měnil z poměru 50 % vodné fáze na 95 % organické fáze (metanol) a to do sedmé minuty. Následně analýza probíhala isokraticky. Zvýšení poměru vodné fáze na začátku zpomalilo eluci a látky se separovaly.

Takto už bylo možné identifikovat všechny látky, ovšem analýza byla delší a nečistota č. 3 velmi rozmytá.



**Obrázek č. 12: Chromatogram ekanazolu, jeho tři nečistot a mikonazolu.** Mobilní fáze MeOH : NH<sub>4</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 50:50; pH 7,75; kolona C18 XB (50 x 2,1 mm, 1,7 μm); průtok 0,6 ml/min; nástřík 2 μm; gradientová eluce.

Jako poslední byl s tímto pufrům vyzkoušen poměr mobilních fází shodný s analýzou s octanovým pufrům. Stejně byl nastaven i gradient. I přesto, že píky nevykazovaly tak vysokou míru chvostování jako s octanovým pufrům, i jejich oddělení bylo dosud nejlepší, ukázal se být tento postup nejhorší, neboť se tato směs pravděpodobně srážela.



**Obrázek č. 13: Chromatogram ekanazolu, jeho tři nečistot a mikonazolu.** Mobilní fáze (MeOH : NH<sub>4</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 20:80) : (MeOH: ACN 40:60) 60:40; pH 7,75; kolona C18 XB (50 x 2,1 mm, 1,7 μm); průtok 0,6 ml/min; nástřík 2 μm; gradientová eluce.

### 5.1.3 Analytická kolona

Pro analýzu byla vybrána kolona Kinetex<sup>TM</sup> C18 XB, neboť je vhodnější pro separaci bazických látek. Při průtoku 0,6 ml/min byla tato kolona schopna separovat všech 6 látek, včetně vnitřního standardu do 6 minut. Celková doba analýzy byla prodloužena ještě o 3 minuty z důvodu ustálení podmínek po gradientové eluci.

### 5.1.4 Vnitřní standard

Správný vnitřní standard by měl splňovat následující podmínky. Měl by mít podobnou strukturu a fyzikálně chemické vlastnosti s analyzovanou látkou, měl by být chemicky čistý, stálý a neměl by mít vliv na průběh analýzy.

Vnitřní standard byl vybrán poté, co byly určeny chromatografické podmínky analyzovaných látek. Byl použit roztok směsi parabenů, který byl analyzován za stejných podmínek jako předchozí látky. Parabeny sice nesplňují hned první podmínku a to, že by měly být strukturně podobné s analyzovanou látkou, ale vzhledem k tomu, že se v jedné analýze vyskytují ekonazol, mikonazol a další 3 strukturně podobné nečistoty, byla varianta parabenů zvolena jako vhodné řešení.

Ze směsi všech parabenů byl vybrán butylparaben. Ostatní byly vyloučeny z následujících důvodů. Propylparaben měl retenční čas velice blízký s nečistotou ekonazolu číslo 1. Metylparaben a etylparaben byly dobře odděleny, ovšem v porovnání s butylparabenem byly eluovány velmi blízko mrtvého retenčního času.

Butylparaben tedy vyhovoval podmínkám tím, že neovlivňoval analýzu, byl stálý a neprodlužoval čas analýzy, protože byl eluován jako druhá látka v pořadí.

## 5.2 Souhrn optimálních chromatografických podmínek

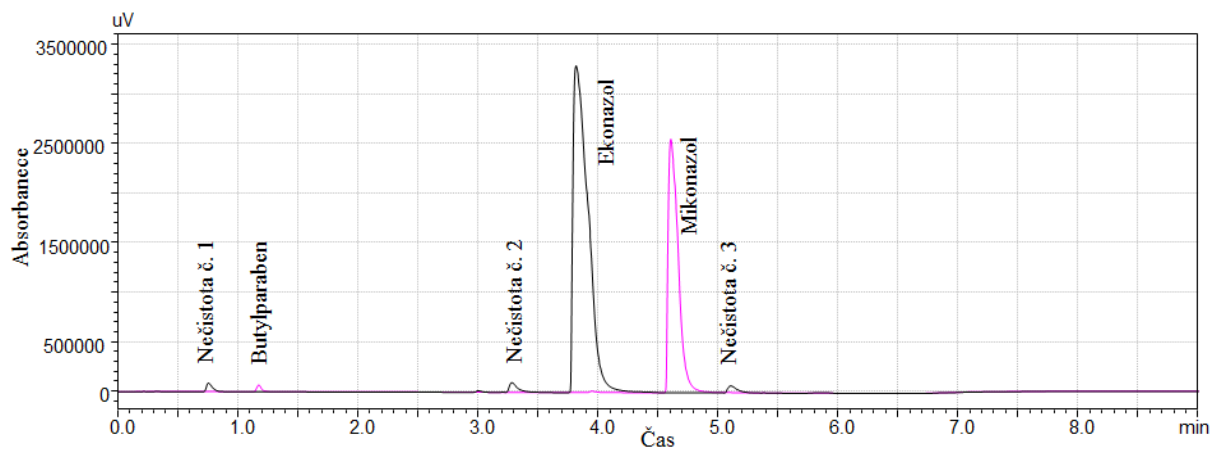
Z výše uvedených pokusů byly následně určeny optimální podmínky pro stanovení látek, které shrnuje následující tabulka.

Tabulka č. 6: Souhrn optimálních chromatografických podmínek

<b>Analytická kolona</b>	Kinetex <sup>TM</sup> XB C18, 50 x 2,1 mm, 1,7 µm	
<b>Mobilní fáze (%)</b>	A : B (60:40)	
<b>Mobilní fáze A (%)</b>	octanový pufr : metanol (80:20)	
<b>Mobilní fáze B (%)</b>	acetonitril: metanol (60:40)	
<b>Změna složení poměru MF (Gradient)</b>	Čas (min)	Změna poměru MF (A:B; %)
	0,00	60:40
	6,00	13:87
	6,01	60:40
	9,00	60:40
<b>Průtoková rychlost</b>	0,6 ml/min	
<b>pH</b>	7,8	
<b>Vlnová délka</b>	225 nm	
<b>Vnitřní standard</b>	butylparaben	
<b>Nástřikový objem</b>	2 µl	
<b>Retenční čas ekonazolu</b>	3,8 min	
<b>Retenční čas mikonazolu</b>	4,6 min	
<b>Teplota</b>	25°C	
<b>Celkový čas analýzy</b>	9 min	



Separace mikonazolu, ekonazolu, jeho tří nečistot a vnitřního standardu při optimálních podmínkách.



**Obrázek č. 14: Chromatogram ekonazolu, jeho tří nečistot, mikonazolu a IS (butylparabenu).** Mobilní fáze [(MeOH : AmAc 20:80) : (MeOH: ACN 40:60)] 60:40; pH 7,8; kolona C18 XB (50 x 2,1 mm, 1,7  $\mu$ m); průtok 0,6 ml/min; nástřik 2  $\mu$ m; gradientová eluce.

## 5.3 Validace analytické metody

Validace je zdokumentovaný proces dokazující vhodnost metody pro zamýšlený účel. Zajišťuje, že metoda bude opakovaně poskytovat výsledky, které poskytovat má. Existují čtyři základní procesy, při kterých se provádí analytická validace: zkoušky totožnosti, kvantitativní zkoušky na obsah nečistot, limitní zkoušky pro kontrolu nečistot a nakonec zkoušky na stanovení obsahu účinné látky ve vzorcích. Základem je výběr validačních parametrů. Mezi ně zahrnujeme linearitu, přesnost, správnost, opakovatelnost, robustnost.

Pro validaci analytické metody byly vybrány následující parametry: test způsobilosti systému, linearita, přesnost, robustnost, stabilita standardu a selektivita<sup>[21][22]</sup>.

### 5.3.1 Test způsobilosti systému

Test způsobilosti systému představuje nepostradatelnou součást analytické metody a slouží k zjištění přiměřené účinnosti systému. Tento test je založen na vyhodnocení, že přístroj, elektronika, analytická metoda a vzorky spolu splňují požadavky<sup>[4][21]</sup>. Pro tuto metodu byly vybrány následující zkoušky: opakovatelnost, kapacita separace, faktor symetrie a rozlišení.

#### 5.3.1.1 Opakovatelnost

Opakovatelnost určuje, jak moc jsou shodné výsledky naměřené za nejlepších možných podmínek (tzn. v jedné laboratoři, stejným analytikem, na stejném přístroji, během jednoho dne, pokud je to možné). Měří velikost náhodné chyby zahrnuté ve výsledcích metody. Tato náhodná chyba je pak číselně vyjádřena v procentech pomocí relativní směrodatné odchylky (RSD)<sup>[4][19][23]</sup>.

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

*n ... počet jednotlivých hodnot*

*$\bar{y}$  ... průměr jednotlivých hodnot*

*$y_i$  ... jednotlivé naměřené hodnoty*

Postup provedení zkoušky byl následující. Ze standartního roztoku látek bylo provedeno šest nástřiků. Změřeny byly retenční časy látek a plochy pod píky. Z naměřených hodnot se stanovil průměr a následně byla vypočítána relativní směrodatná odchylka. Výsledky jsou zaznamenány v níže uvedených tabulkách.

**Tabulka č. 7: Opakovatelnost nástřiku ekonazolu a mikonazolu**

Nástřik	Ekonazol		Mikonazol	
	Retenční čas (min)	Plocha pod píkem	Retenční čas (min)	Plocha pod píkem
<b>1</b>	3,816	28332129	4,610	14957567
<b>2</b>	3,818	28436614	4,607	14948768
<b>3</b>	3,818	28312699	4,605	14912367
<b>4</b>	3,810	28335080	4,611	14928682
<b>5</b>	3,808	28290509	4,618	14884936
<b>6</b>	3,801	28238257	4,633	14868734
<b>Průměr</b>	3,812	28324215	4,614	14916842
<b>SD</b>	0,007	65531	0,010	35129
<b>RSD</b>	<b>0,18 %</b>	<b>0,23 %</b>	<b>0,22 %</b>	<b>0,24 %</b>

**Tabulka č. 8: Opakovatelnost nástřiku nečistoty ekonazolu č. 1, č. 2, č. 3**

Nástřik	Eko-nečistota 1		Eko-nečistota 2		Eko-nečistota 3	
	Retenční čas (min)	Plocha pod píkem	Retenční čas (min)	Plocha pod píkem	Retenční čas (min)	Plocha pod píkem
<b>1</b>	0,754	303282	3,281	442627	5,101	393741
<b>2</b>	0,755	304504	3,282	447304	5,106	395592
<b>3</b>	0,753	304206	3,282	442873	5,103	392336
<b>4</b>	0,754	304598	3,274	446242	5,098	392824
<b>5</b>	0,754	303759	3,272	448717	5,091	393176
<b>6</b>	0,753	303332	3,265	446442	5,089	392254
<b>Průměr</b>	0,754	303947	3,276	445701	5,098	393321
<b>SD</b>	0,001	576	0,007	2448	0,007	1242
<b>RSD</b>	<b>0,10 %</b>	<b>0,19 %</b>	<b>0,21 %</b>	<b>0,55 %</b>	<b>0,13 %</b>	<b>0,32 %</b>

**Tabulka č. 9: Opakovatelnost nástříku butylparabenu (IS)**

Nástřík	Butylparaben	
	Retenční čas (min)	Plocha pod píkem
1	1,172	172620
2	1,173	172437
3	1,171	172936
4	1,172	173241
5	1,180	172772
6	1,188	172605
<b>Průměr</b>	1,176	172769
<b>SD</b>	0,007	286
<b>RSD</b>	<b>0,57 %</b>	<b>0,17 %</b>

Hodnota relativní směrodatné odchylky pro hodnoty retenčních časů i ploch pod píky by neměla přesáhnout 1 %. Všechny měřené vzorky tomuto kritériu vyhovují.

#### 5.3.1.2 Kapacita separace

V případě gradientové eluce je nutné pro hodnocení účinnosti kolony využít parametr kapacita separace. Jedná se o počet píků, které mohou být rozlišeny v určitém časovém úseku tak, aby všechny látky byly rozděleny na základní linii. Opět bylo provedeno šest nástříků. Zde byla důležitá šířka píku v polovině jako výšky ( $w_{0,5}$ ) pro všechny analyzované složky směsi. Hodnoty byly zprůměrovány a následně byla vypočítána kapacita separace pomocí rovnice<sup>[7]</sup>:

$$n_p = 1 + \left( \frac{t_g}{4 * \bar{y}} \right)$$

$n_p$  ... kapacita separace

$t_g$  ... 6 (počet analyzovaných látek)

$\bar{y}$  ... průměr naměřených hodnot  $w_{0,5}$

Tabulka č. 10: Kapacita separace jednotlivých složek směsi

Nástřík	1	2	3	4	5	6	Průměr	n <sub>p</sub>
	Hodnota w <sub>0,5</sub>							
<b>Eko-nečistota 1</b>	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	<b>29,21</b>
<b>Butylparaben</b>	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	<b>38,97</b>
<b>Eko-nečistota 2</b>	0,07	0,07	0,07	0,07	0,07	0,07	0,07	<b>23,06</b>
<b>Ekonazol</b>	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15	<b>11,33</b>
<b>Mikonazol</b>	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	<b>17,22</b>
<b>Eko-nečistota 3</b>	0,08	0,08	0,08	0,08	0,08	0,08	0,08	<b>18,93</b>

Hodnoty by se měly pohybovat nad 10. Tomuto požadavku vyhovují všechny složky analyzované směsi.

### 5.3.1.3 Faktor symetrie

Faktor symetrie (A<sub>S</sub>) určuje do jaké míry je pík symetrický neboli, jak moc je patrné chvostování či frontování píku. Přičemž hodnota 1,0 představuje úplnou symetrii píku.

Lze ho vypočítat z rovnice<sup>[4]</sup>:

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

*w<sub>0,05</sub> ... šířka píku v jedné dvacetině jeho výšky*

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

Tabulka č. 11: Faktor symetrie píku (A<sub>S</sub>) složek analyzované směsi

A <sub>S</sub>	1	2	3	Průměr
<b>Eko-nečistota 1</b>	1,868	1,901	1,874	<b>1,88</b>
<b>Butylparaben</b>	1,374	1,38	1,376	<b>1,38</b>
<b>Eko-nečistota 2</b>	2,107	2,117	2,177	<b>2,13</b>
<b>Ekonazol</b>	2,903	2,937	2,936	<b>2,93</b>
<b>Mikonazol</b>	2,355	2,352	2,362	<b>2,36</b>
<b>Eko-nečistota 3</b>	2,338	2,292	2,266	<b>2,30</b>

Průměr byl vypočítán ze tří nástřiků.

#### 5.3.1.4 Rozlišení

Hodnota rozlišení ( $R_S$ ) udává míru rozdělení dvou po sobě eluujících se složek směsi. Hodnota vyšší než 1,5 znamená rozdělení na základní linii. Vypočítá se z rovnice<sup>[4]</sup>:

$$R_S = \frac{1,18(t_{R2} - t_{R1})}{W_{h1} - W_{h2}} \quad \text{kde } t_{R2} > t_{R1}$$

$t_{R1}$  a  $t_{R2}$  ... retenční časy piků

$W_{h1}$  a  $W_{h2}$  ... šířky piků v poloviční výšce

Tabulka č. 12: Rozlišení ( $R_S$ ) složek analyzované směsi

	<b><math>R_S</math></b>
<b>Eko-nečistota 1 - butylparaben</b>	5,1
<b>Butylparaben- eko-nečistota 2</b>	21,7
<b>Eko-nečistota 2 - ekonazol</b>	3,0
<b>Ekonazol - mikonazol</b>	4,2
<b>Mikonazol - eko-nečistota 3</b>	3,2

Hodnoty  $R_S$  by se měly pohybovat nad 1,5. Tomuto parametru vyhovují všechny analyzované látky.

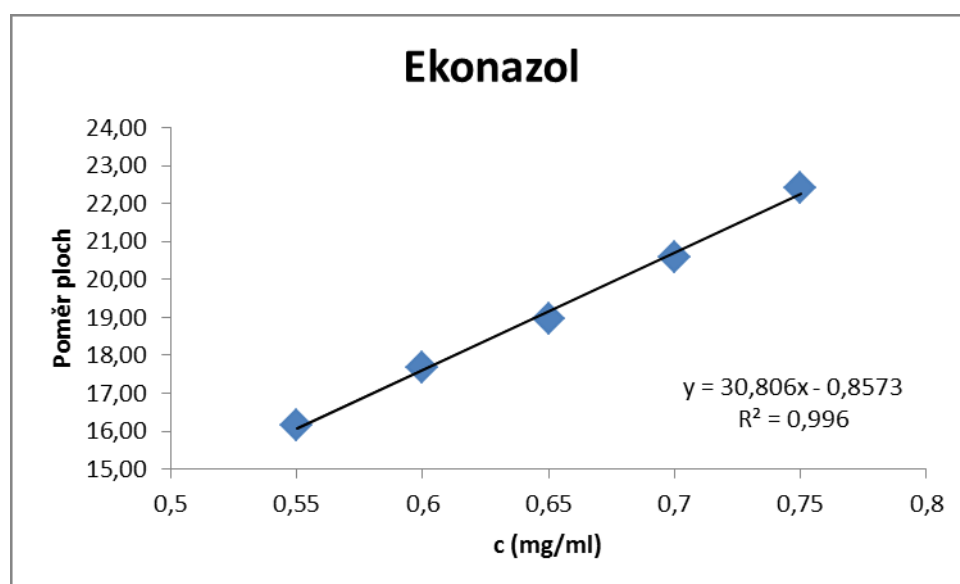
### 5.3.2 Validace analytické metody

#### 5.3.2.1 Linearita

Linearita udává schopnost metody poskytovat výsledky, které jsou přímo úměrné koncentraci analytu ve vzorku. Statisticky popisuje stupeň lineární závislosti mezi výsledky měření a koncentrací <sup>[21][23]</sup>.

Tabulka č. 13: Linearita ekonazolu

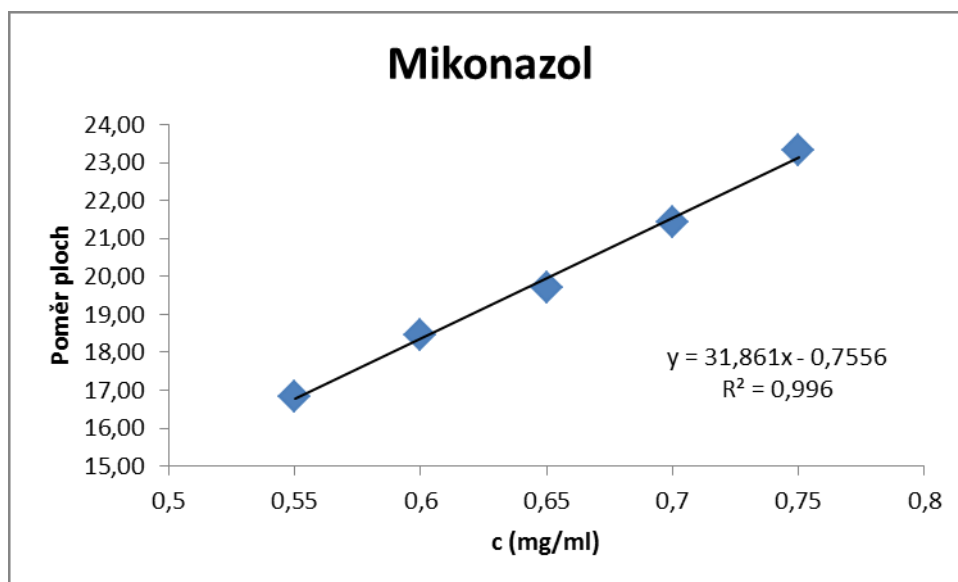
c (mg/ml)	Plocha pod píkem ekonazolu (E)	Plocha IS	Poměr ploch E/IS
0,55	2854179	176518	16,1693
0,60	3011283	170216	17,6910
0,65	3245950	171245	18,9550
0,70	3519223	170820	20,6020
0,75	3784688	168844	22,4153



Obrázek č. 15: Graf kalibrační závislosti ekonazolu.

Tabulka č. 14: Linearita mikonazolu

c (mg/ml)	Plocha pod píkem mikonazolu (M)	Plocha IS	Poměr ploch M/IS
0,55	2973414	176518	16,8448
0,60	3140488	170216	18,4500
0,65	3377665	171245	19,7242
0,70	3661193	170820	21,4331
0,75	3937201	168844	23,3186



Obrázek č. 16: Graf kalibrační závislosti mikonazolu.

Hodnota korelačního koeficientu pro ekonazol je stejná jako pro mikonazol tedy 0,996.



### 5.3.2.2 Přesnost

Přesnost analytické metody vyjadřuje shodu mezi řadou měření získaných z vícenásobného odběru stejného homogenního vzorku za předepsaných podmínek. Tato míra shody je pak vyjádřena jako standardní odchylka<sup>[21]</sup>.

Bylo připraveno šest vzorků mikonazolu s přidavkem butylparabenu (IS), které byly vždy třikrát změřeny. Důležitá byla plocha pod píkem těchto látek v jednotlivých vzorcích. Z těchto hodnot byl následně vypočítán průměr a vyhodnocena relativní směrodatná odchylka. Následující tabulka zobrazuje průměrné hodnoty poměru ploch mikonazolu s vnitřním standardem butylparabenem ze šesti vzorků a relativní směrodatnou odchylku.

Tabulka č. 15: Přesnost stanovovaná na vzorku mikonazolu s IS

Vzorek	Poměr ploch M/IS
1	38,849
2	38,759
3	38,722
4	38,815
5	38,710
6	38,873
<b>RSD (%)</b>	<b>0,174%</b>

Tyto analyty zkoušce vyhovují, neboť maximální hodnota RSD může být do 5 %.

### 5.3.2.3 Robustnost

Robustnost analytické metody udává, jak moc je metoda ovlivnitelná malými změnami v nastavení podmínek a ukazuje použitelnost metody v běžné praxi<sup>[22][23]</sup>. V tomto případě byl zjišťován vliv změny teploty a hodnoty pH na průběh celkové analýzy.

V případě změny teploty byly zkoušeny hodnoty vyšší a to 30°C a 40°C. Bylo zjištěno, že se zvyšující se teplotou se analýza urychlí, ale pík mikonazolu a nečistoty číslo 3 se neseperují až na základní linii.

Vliv pH byl testován už při samotném vývoji metody, kde se při pH nižším než bylo zvolené 7,8, neseperoval mikonazol s nečistotou č. 3, a u pH vyššího naopak ekonazol s nečistotou č. 2. Zde byl zkoušen opět vliv jak hodnoty nižší tak vyšší než 7,8 a to konkrétně

7,5 a 8,0. Zjistilo se, že nižší pH není vhodné používat, jelikož nelze rozlišit jednotlivé látky v dostatečné míře. Vyšší pH se ukázalo také jako vhodné, ale z důvodu zvýšení životnosti kolony, bylo zvoleno jako optimální pH 7,8. Použitá kolona je při gradientové eluci stabilní pouze do hodnoty 8,5.

#### 5.3.2.4 Stabilita

Stabilita standardu mikonazolu byla zjištěna z naměřených hodnot vzorku skladovaného za teploty 4°C. Měření bylo provedeno v časech 0 h, 24 h a 72 h. Z naměřených hodnot ploch pod píkem byl udělán průměr a následně vypočítán faktor stability T.

**Tabulka č. 16: Stabilita standardu mikonazolu**

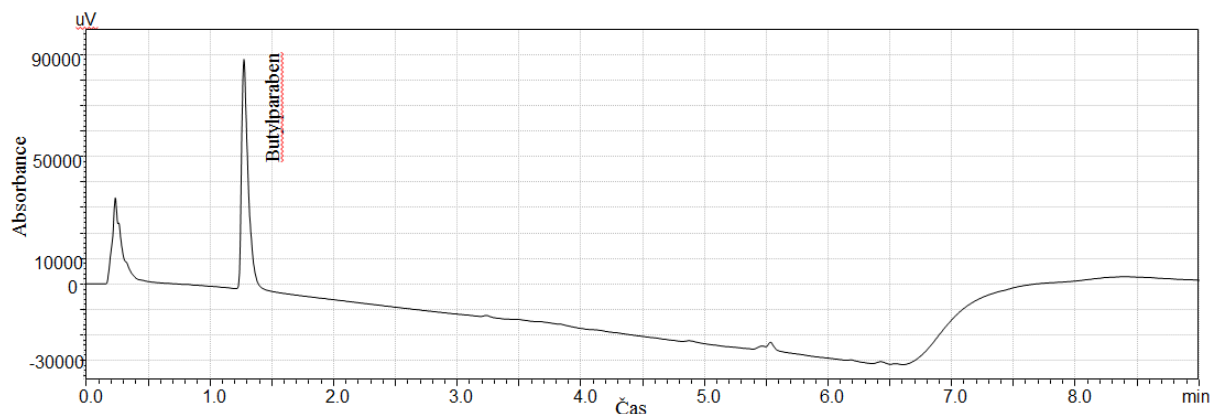
Čas (h)	Průměrná plocha	Faktor stability (T)
0	14170446	0,27
24	14182381	0,30
72	14281636	0,52

Hodnota faktoru stability má být do 1, což vzorek splňuje. Standard je stabilní při uchování v lednici tři dny.

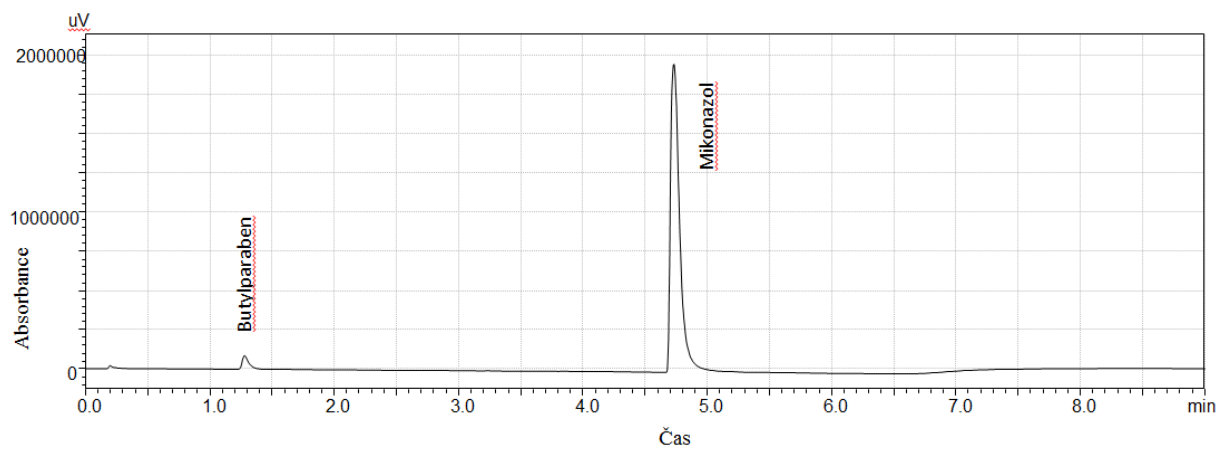
#### 5.3.2.5 Selektivita

Selektivita metody je schopnost poskytovat přesný a správný signál pro určení daného analytu. To znamená, že vliv potenciálních interferentů (matrice) je zanedbatelný<sup>[23]</sup>.

Následující chromatogramy zobrazují nástřik placebo s vnitřním standardem a nástřik vzorku s vnitřním standardem. Je patrné, že matrice neovlivňuje analýzu mikonazolu.



**Obrázek č. 17: Nástřik placebo a vnitřního standardu**



Obrázek č. 18: Nástřik vzorku a vnitřního standardu

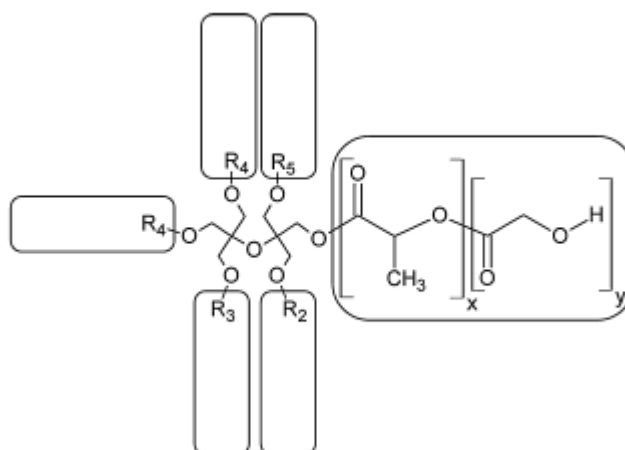
## 6 VYUŽITÍ NOVÉ METODY V ANALÝZE DISOLUČNÍCH MÉDIÍ

Poté, co byla metoda úspěšně optimalizována a částečně validována, byla použita k měření obsahu mikonazolu ve vzorcích, které byly dodány z disolučních zkoušek z katedry Farmaceutické technologie Univerzity Karlovy v Hradci Králové. V této kapitole budou uvedeny bližší specifikace vzorků, stručný popis disolučních testů a následně samotná analýza pomocí UHPLC a z ní plynoucí závěry.

### 6.1 Nosiče tuhých disperzí

#### 6.1.1 Polyestery kyseliny mléčné a glykolové

Kopolymery odvozené od kyseliny DL-mléčné a kyseliny glykolové, známé jako PLGA (poly(laktid-co-glykolid)), se hojně využívají jak v chirurgii, ortopedii, tkáňovém inženýrství, tak právě při formulaci léčivých přípravků<sup>[24]</sup>. Jako nosiče léků se uplatňují zejména hvězdicovité (star-like) nízkomolekulární kopolymery těchto hydroxylových kyselin s vícemocnými alkoholy. Biodegradace těchto sloučenin probíhá průběžně v průběhu několika dnů až několika měsíců v závislosti na molekulární hmotnosti<sup>[25]</sup>.



Obrázek č. 19: Schéma větveného polyesteru<sup>[25]</sup>

V této diplomové práci bylo pracováno se čtyřmi typy polymerů. Prvním z nich byl lineární kopolymer DL-kyseliny mléčné a kyseliny glykolové v poměru 1:1 (PLGA), druhým byl PLGA polyester větvený 3 % tripentaerythritolu v reakční směsi (3T), třetím byl PLGA polyester větvený 8 % dipentaerythritolu v reakční směsi (8D) a čtvrtým byl PLGA polyester větvený 2 % kyseliny polyakrylové o molární hmotnosti 2 000 g/mol v reakční směsi (2A).

Polyestery větvené vícesytnými alkoholy mají koncové hydroxyly, polyester větvený kyselinou polyakrylovou má koncové karboxyly, což je výhodné z hlediska hydrofilicity a vaznosti. Tyto polyestery byly syntetizovány na katedře Farmaceutické technologie Univerzity Karlovy v Hradci Králové.

**Tabulka č. 17: Charakteristika polymerů PLGA, 3T, 8D, 2A**

Označení nosiče	Poměr LA/GA/T(D)(A)	$M_n$ (g/mol)	$M_w$ (g/mol)	$T_g$ (°C)	$g'$
<b>PLGA</b>	50/50/0	1833	4086	17,0	1,00
<b>3T</b>	48,5/48,5/3	7900	20600	21,7	0,31
<b>8D</b>	46/46/8	1600	2500	12,4	0,45
<b>2A</b>	49/49/2	8600	14400	32,8	0,54

*LA kyseliny mléčná*

*GA kyseliny glykolová*

*T tripentaerythritol*

*D dipentaerythritol*

*A kyselina polyakrylová 2 000 g/mol*

*$M_n$  [g/mol] je číselně střední molární hmotnost*

*$M_w$  [g/mol] je hmotnostně střední molární hmotnost*

*$T_g$  [°C] je teplota skelného přechodu*

*$g' = (\eta_{br} / \eta_{lin})$  je větvicí poměr stanovený z vnitřní viskozity lineárního (lin) a větveného (br) polymeru při shodné molární hmotnosti (lineární PLGA má  $g' = 1,0$ )<sup>[26]</sup>*

### 6.1.2 Degradace polymerů kyseliny mléčné a glykolové

Degradace probíhá mechanismem hydrolýzy nestabilních esterových vazeb v polymerním řetězci. Polymerní nosiče léčiv na bázi homopolymerů a kopolymerů kyseliny mléčné a glykolové jsou rozkládány pomocí homogenní degradace, degradace probíhající v celém objemu polymerního tělesa (bulk degradation). Tehdy je rychlost penetrace vody do polymerního tělesa stejná nebo vyšší než rychlost difuze rozpustných degradačních produktů z polymerního tělesa. Vzniklá kyselina L-mléčná vstupuje do citrátového cyklu, kde je metabolizována. Z těla se vylučuje ve formě oxidu uhličitého a vody. Kyselina glykolová je z větší části z těla vylučována, v menším podílu vstupuje do citrátového cyklu. Celková doba degradačního procesu závisí na molární hmotnosti, stupni krystalinity, tvaru a velikosti tělesa a fyzikálně-chemických vlastnostech prostředí. Může trvat řádově od několika dnů až po několik let<sup>[24]</sup>.

## 6.2 Příprava tuhých disperzí

Příprava tuhé disperze byla provedena tavením rozdrobněného polymerního nosiče a mikonazolu. Koncentrace léčiva ve směsi byla 10 %. Jako nosiče sloužily polyestery PLGA, 3T, 8D, 2A. Celkové množství práškové směsi bylo 5000 mg. Byly použity kádinky o objemu 15 ml, do těchto kádinek bylo naváženo 4500 mg nosiče a 500 mg mikonazolu. Směs byla důkladně homogenizována a následně byla roztavena v horkovzdušné sušárně (90°C). Z těchto matric se odebíraly vzorky pro disoluční testy. Bylo odváženo 210 mg na antiadhezivní podklad. Po té, co matrice zatuhla, byly vzorky odloupnuty a vloženy do dialyzačních trubiček. Vždy byly připraveny vzorky A, B a C od všech polymerů (PLGA, 3T, 8D a 2A). K těmto matricím byly připraveny i slepé vzorky, které obsahovaly pouze 210 mg polymerního nosiče. Celkem se tedy vycházelo z 16 vzorků<sup>[25]</sup>.

### 6.3 Disoluční testy

Podstatou zkoušky disoluce je určení množství uvolněné léčivé látky z matrice za přesně stanovených podmínek, jako je složení, objem a teplota disoluční kapaliny, dále přístroj, který má být použit, čas, způsob a množství odebíraného vzorku ke stanovení obsahu účinné látky, případně metoda, která určí obsah účinné látky<sup>[4]</sup>.

V tomto případě, poté co byly vzorky připravené v dialyzačních trubičkách, byly vloženy do vialek a přelity 15,0 ml fosfát-citrátového pufru o pH 7,4. Následně byly umístěny do třepací vodní lázně. Teplota lázně byla 37,0 °C. Dialyzační trubička, po uplynutí časového intervalu, byla pinzetou vyjmuta a přesunuta do nové vialky. Časové intervaly byly 3 h, 6 h, 12 h, 24 h, 48 h a 72 h. U vzorků 8D a PLGA se pokračovalo na 144 h a 216 h. U těchto vzorků byl vyjmut i zbytek vzorku, který po testech zůstal. Množství uvolněného mikonazolu bylo stanoveno metodou UHPLC. Celkem se tedy testovalo 120 vzorků. Vše přehledně zobrazuje následující tabulka.

Tabulka č. 18: Disoluce mikonazolu z polymerů

Vzorek (polymer)	Navážka (mg)	Časový interval (h)								
		3	6	12	24	48	72	144	216	zbytek
3T	215	1-3	1-6	1-12	1-24	1-48	1-72			
3T-A	211	2-3	2-6	2-12	2-24	2-48	2-72			
3T-B	214	3-3	3-6	3-12	3-24	3-48	3-72			
3T-C	217	4-3	4-6	4-12	4-24	4-48	4-72			
2A	208	5-3	5-6	5-12	5-24	5-48	5-72			
2A-A	213	6-3	6-6	6-12	6-24	6-48	6-72			
2A-B	220	7-3	7-6	7-12	7-24	7-48	7-72			
2A-C	219	8-3	8-6	8-12	8-24	8-48	8-72			
8D	205	9-3	9-6	9-12	9-24	9-48	9-72	9-144	9-216	9-zb.
8D-A	219	10-3	10-6	10-12	10-24	10-48	10-72	10-144	10-216	10-zb.
8D-B	221	11-3	11-6	11-12	11-24	11-48	11-72	11-144	11-216	11-zb.
8D-C	207	12-3	12-6	12-12	12-24	12-48	12-72	12-144	12-216	12-zb.
PLGA	210	13-3	13-6	13-12	13-24	13-48	13-72	13-144	13-216	13-zb.
PLGA-A	203	14-3	14-6	14-12	14-24	14-48	14-72	14-144	14-216	14-zb.
PLGA-B	212	15-3	15-6	15-12	15-24	15-48	15-72	15-144	15-216	15-zb.
PLGA-C	207	16-3	16-6	16-12	16-24	16-48	16-72	16-144	16-216	16-zb.



Vzorky označené v tabulce č. 19 jako 3T, 2A, 8D a PLGA představovaly slepé vzorky obsahující pouze polymerní nosič.

Z navážek matrice byly následně dopočítány přesné koncentrace léčiva, které byly využívány ve výpočtech uvedených v další kapitole. Vycházelo se z informace, že matrice obsahují 10 % léčiva a disoluční testy byly prováděny v roztoku o objemu 15 ml. Pouze v případě vzorků 9zb.–16zb. byl objem 5 ml, důvod je uvedený níže.

**Tabulka č. 19: Přesné koncentrace mikonazolu ve vzorcích**

<b>Polymer</b>	<b>Přesná koncentrace (mg/ml)</b>	<b>Polymer</b>	<b>Přesná koncentrace (mg/ml)</b>
3T-A	1,41	8D-A	1,46
3T-B	1,43	8D-B	1,47
3T-C	1,45	8D-C	1,38
2A-A	1,42	PLGA-A	1,35
2A-B	1,47	PLGA-B	1,41
2A-C	1,46	PLGA-C	1,38

**Tabulka č. 20: Přesné koncentrace mikonazolu ve vzorcích 9zb.-16zb.**

<b>Polymer</b>	<b>Přesná koncentrace (mg/ml)</b>	<b>Polymer</b>	<b>Přesná koncentrace (mg/ml)</b>
8D-A	4,38	PLGA-A	4,06
8D-B	4,42	PLGA-B	4,24
8D-C	4,14	PLGA-C	4,14

## **6.4 Stanovení obsahu mikonazolu v tuhých disperzích pomocí UHPLC**

### **6.4.1 Příprava vnitřního standardu**

Koncentrace zásobního roztoku butylparabenu, který byl používán po celou dobu měření, odpovídala 0,2 mg/ml. Byl připraven v množství 200 ml.

Přesná navážka tedy byla 40,2 mg butylparabenu, která byla následně rozpuštěna v metanolu a doplněna do objemu 200 ml.

### **6.4.2 Příprava vzorků a měření vzorků**

Vzorky pocházející z disolučních testů byly dodány ve vialkách z katedry Farmaceutické technologie. Každá vialka byla před odebráním 1 ml vzorku protřepána. Z toho důvodu, že vzorky obsahovaly malé úlomky matrice a byly zakalené, musely být před nástřikem upraveny. Úprava probíhala pomocí filtrace přes filtry (4 mm, 0,2  $\mu$ m PTFE membrána). 1 ml přefiltrovaného vzorku byl naředěn v poměru 1:1 zásobním roztokem vnitřního standardu přímo ve vialce. Poté byly vzorky v těchto vialkách umístěny do zásobníku přístroje UHPLC vytemperovaného na 25°C a měřeny za podmínek, které jsou uvedeny v kapitole 5.2.

Z každé vialky byly provedeny tři nástřiky, všechny potřebné údaje byly zaznamenány a použity k výpočtům. Přibližně po naměření deseti vzorků byl vždy změřen roztok standardu mikonazolu s IS, který byl použit k výpočtu obsahu léčiva ve vzorcích.

Rozdílne probíhala příprava pouze u vzorků *9zb.* – *16zb.*, tyto vzorky byly dodány v suché podobě. Za intenzivního třepání se nechaly rozpouštět po dobu 10 minut, aby bylo zajištěno uvolnění látky. Rozpouštění probíhalo v 5 ml zásobního roztoku vnitřního standardu a ze vzniklého roztoku bylo odebráno potřebné množství, které bylo přefiltrováno a změřeno. Zde roztok nebyl naředěn 1:1.

### **6.4.3 Stanovení obsahu mikonazolu v polymeru**

Jako poslední byl stanoven obsah mikonazolu v polymeru před tím, než byly prováděny disoluční testy. Tato analýza měla zjistit, jestli daný polymer obsahuje mikonazol opravdu v deklarovaném množství. Pro tyto účely byly z katedry Farmaceutické technologie Univerzity Karlovy v Hradci Králové dodány matrice polymerů obsahující 10 % mikonazolu

(stejně jako byly použity k disolučním testům). Z těchto vzorků byla odebrána přesná navážka, která byla rozpuštěna v 5 ml zásobního roztoku butylparabenu. Z takto připravených vzorků bylo odebráno potřebné množství, které bylo opět přefiltrováno a změřeno pomocí UHPLC.

Z navážek se dopočítala přesná koncentrace mikonazolu, s předpokladem, že matrice obsahovala 10 % léčiva.

**Tabulka č. 21: Navážky polymerů pro stanovení obsahu mikonazolu, přesná koncentrace mikonazolu**

<b>Polymer</b>	<b>Navážka (mg)</b>	<b>Přesná koncentrace mikonazolu (mg/ml)</b>
<b>3T</b>	69,5	13,90
<b>2A</b>	70,6	14,12
<b>8D</b>	38,3	7,66
<b>PLGA</b>	70,2	14,04

## 6.5 Výsledky měření

### 6.5.1 Výsledky z měření vzorků z disolučních testů

Po doměření byly u každého vzorku zprůměrovány plochy pod píky ze všech 3 nástříků a následně vypočítaná koncentrace dle rovnice:

$$c_{(vz)} = \frac{\frac{A_{(vz)}}{A_{(IS)vz}}}{\frac{A_{(st)}}{A_{(IS)st}}} * zř.$$

$c_{vz}$  ...koncentrace vzorku

$A_{(vz)}$  ... plocha vzorku

$A_{(IS)vz}$  ... plocha vnitřního standardu ve vzorku

$A_{(st)}$  ... plocha standardu

$A_{(IS)st}$  ... plocha vnitřního standardu ve standardu

$zř.$  ... zředění

Zředění v tomto případě bylo 2. Pouze u vzorku 9zb.-16zb. nebylo se zředěním počítáno.

Takto vypočítané koncentrace (mg/ml) byly následně přepočítány na procentuální obsah, který udává, kolik % z průvodní navážky obsahuje daný vzorek, neboli kolik léčiva se uvolnilo z matrice za daný časový interval. Toto procentuální vyjádření se vypočítalo dle rovnice:

$$\% = \frac{c_i}{c} * 100$$

$c_i$  ... přesná koncentrace mikonazolu vypočítaná z přesné navážky

$c$  ... koncentrace naměřená ve vzorku

Tabulka č. 22: Procentuální obsah mikonazolu uvolňovaný v daných intervalech z matrice 3T

Čas (h)	Vzorek	C <sub>miko.</sub> (mg/ml)	%	Vzorek	C <sub>miko.</sub> (mg/ml)	%	Vzorek	C <sub>miko.</sub> (mg/ml)	%
3	3T-A	0,000	0,00%	3T-B	0,000	0,00%	3T-C	0,000	0,00%
6	3T-A	0,000	0,00%	3T-B	0,000	0,00%	3T-C	0,000	0,00%
12	3T-A	0,0004	0,03%	3T-B	0,0004	0,03%	3T-C	0,0005	0,03%
24	3T-A	0,001	0,04%	3T-B	0,001	0,04%	3T-C	0,002	0,17%
48	3T-A	0,002	0,12%	3T-B	0,001	0,07%	3T-C	0,001	0,09%
72	3T-A	0,001	0,07%	3T-B	0,000	0,02%	3T-C	0,001	0,05%
			0,26%			0,17%			0,34%

Tabulka č. 23: Procentuální obsah mikonazolu uvolňovaný v daných intervalech z matrice 2A

Čas (h)	Vzorek	C <sub>miko.</sub> (mg/ml)	%	Vzorek	C <sub>miko.</sub> (mg/ml)	%	Vzorek	C <sub>miko.</sub> (mg/ml)	%
3	2A-A	0,571	40,18%	2A-B	0,506	34,53%	2A-C	0,289	19,82%
6	2A-A	0,354	24,90%	2A-B	0,257	17,54%	2A-C	0,260	17,80%
12	2A-A	0,072	5,09%	2A-B	0,057	3,87%	2A-C	0,180	12,35%
24	2A-A	0,026	1,80%	2A-B	0,027	1,85%	2A-C	0,039	2,70%
48	2A-A	0,031	2,15%	2A-B	0,033	2,23%	2A-C	0,030	2,06%
72	2A-A	0,017	1,17%	2A-B	0,061	4,16%	2A-C	0,043	2,94%
			75,29%			64,19%			57,67%

Tabulka č. 24: Procentuální obsah mikonazolu uvolňovaný v daných intervalech z matrice 8D

Čas (h)	Vzorek	C <sub>miko.</sub> (mg/ml)	%	Vzorek	C <sub>miko.</sub> (mg/ml)	%	Vzorek	C <sub>miko.</sub> (mg/ml)	%
3	8D-A	0,001	0,04%	8D-B	0,004	0,29%	8D-C	0,001	0,09%
6	8D-A	0,000	0,00%	8D-B	0,001	0,06%	8D-C	0,000	0,00%
12	8D-A	0,002	0,14%	8D-B	0,018	1,25%	8D-C	0,012	0,88%
24	8D-A	0,003	0,20%	8D-B	0,006	0,40%	8D-C	0,007	0,47%
48	8D-A	0,007	0,49%	8D-B	0,019	1,32%	8D-C	0,006	0,45%
72	8D-A	0,008	0,53%	8D-B	0,003	0,23%	8D-C	0,012	0,86%
144	8D-A	0,015	1,03%	8D-B	0,026	1,76%	8D-C	0,024	1,76%
216	8D-A	0,027	1,84%	8D-B	0,010	0,66%	8D-C	0,007	0,53%
zb.	8D-A	1,731	39,53%	8D-B	1,844	41,72%	8D-C	1,778	42,95%
			43,80%			47,68%			47,99%

**Tabulka č. 25: Procentuální obsah mikonazolu uvolňovaný v daných intervalech z matrice PLGA**

Čas (h)	Vzorek	C <sub>miko.</sub> (mg/ml)	%	Vzorek	C <sub>miko.</sub> (mg/ml)	%	Vzorek	C <sub>miko.</sub> (mg/ml)	%
3	<i>PLGA-A</i>	0,0005	0,04%	<i>PLGA-B</i>	0,0004	0,03%	<i>PLGA-C</i>	0,0005	0,04%
6	<i>PLGA-A</i>	0,002	0,12%	<i>PLGA-B</i>	0,001	0,07%	<i>PLGA-C</i>	0,001	0,06%
12	<i>PLGA-A</i>	0,003	0,22%	<i>PLGA-B</i>	0,001	0,08%	<i>PLGA-C</i>	0,001	0,06%
24	<i>PLGA-A</i>	0,0005	0,04%	<i>PLGA-B</i>	0,001	0,05%	<i>PLGA-C</i>	0,001	0,04%
48	<i>PLGA-A</i>	0,001	0,09%	<i>PLGA-B</i>	0,001	0,10%	<i>PLGA-C</i>	0,002	0,11%
72	<i>PLGA-A</i>	0,000	0,00%	<i>PLGA-B</i>	0,000	0,00%	<i>PLGA-C</i>	0,000	0,00%
144	<i>PLGA-A</i>	0,004	0,26%	<i>PLGA-B</i>	0,002	0,14%	<i>PLGA-C</i>	0,003	0,20%
216	<i>PLGA-A</i>	0,006	0,42%	<i>PLGA-B</i>	0,008	0,60%	<i>PLGA-C</i>	0,004	0,27%
zb.	<i>PLGA-A</i>	2,005	49,39%	<i>PLGA-B</i>	2,069	48,79%	<i>PLGA-C</i>	2,015	48,68%
			50,58%			49,86%			49,45%

Červené řádky v tabulkách zobrazují celkové množství léčiva, které se během disolučních testů uvolnilo. 100 % by představovalo hodnotu, která odpovídá původní navážce mikonazolu. Výsledky z matrice 3T lze považovat za nejhorší, neboť celkové množství nedosáhlo ani v jednom případě 0,5 %. Matrice 2A dopadla nejlépe. Léčivo se opravdu uvolňovalo postupně po celou dobu disolučních testů. Matrice 8D a PLGA sice v konečném součtu dosáhly v průměru téměř 50 %, ale většina léčiva zůstala ve zbytku matrice, tudíž se vůbec neuvolňovala nebo uvolňovala velmi pomalu.

### 6.5.2 Výsledky měření na stanovení obsahu mikonazolu v polymeru

Stanovení obsahu mikonazolu v polymeru bylo provedeno proto, aby se zjistilo, jestli daný polymer po přípravě opravdu obsahuje dané množství léčiva, tedy 10 % z navážky.

Následující tabulka zobrazuje výsledky zkoušky.

Tabulka č. 26: Stanovení obsahu mikonazolu v polymeru

<b>Polymer</b>	<b>Koncentrace mikonazolu (mg/ml)</b>	<b>Obsah mikonazolu v polymeru</b>	<b>Úspěšnost inkorporace</b>
<b>3T</b>	0,943	6,78 %	68 %
<b>2A</b>	0,886	6,28 %	63 %
<b>8D</b>	0,534	6,98 %	70 %
<b>PLGA</b>	0,845	6,02 %	60 %

Je patrné, že inkorporace léčiva nebyla úplná, maximální hodnoty dosahovaly 70 % a to v případě polymeru 8D. Nejhůře dopadl polymer PLGA s úspěšností inkorporace pouze 60 %.

Toto zjištění mohlo do značné míry ovlivnit výsledky předchozích testů.

## 7 ZÁVĚR

Pomocí ultra-vysokoúčinné kapalinové chromatografie (UHPLC), byla vyvinuta vhodná metoda pro separaci mikonazolu, ekonazolu a jeho tří nečistot, která dokáže všechny látky včetně vnitřního standardu účinně separovat.

Zvolené optimální podmínky uvádí následující tabulka:

**Tabulka č. 27: Souhrn optimálních chromatografických podmínek**

<b>Analytická kolona</b>	Kinetex <sup>TM</sup> XB C18, 50 x 2,1 mm, 1,7 µm	
<b>Mobilní fáze (%)</b>	A : B (60:40)	
<b>Mobilní fáze A (%)</b>	octanový pufr : metanol (80:20)	
<b>Mobilní fáze B (%)</b>	acetonitril: metanol (60:40)	
<b>Změna složení poměru MF (Gradient)</b>	Čas (min)	Změna poměru MF (A:B; %)
	0,00	60:40
	6,00	13:87
	6,01	60:40
	9,00	60:40
<b>Průtoková rychlost</b>	0,6 ml/min	
<b>pH</b>	7,8	
<b>Vlnová délka</b>	225 nm	
<b>Vnitřní standard</b>	butylparaben	
<b>Nástřikový objem</b>	2 µl	
<b>Retenční čas ekonazolu</b>	3,8 min	
<b>Retenční čas mikonazolu</b>	4,6 min	
<b>Teplota</b>	25°C	
<b>Celkový čas analýzy</b>	9 min	

V testu způsobilosti byly ověřeny opakovatelnost, kapacita separace, faktor symetrie a rozlišení. Dále byly změřeny parametry linearita, přesnost, robustnost, stabilita standardu a selektivita. Všechny naměřené výsledky odpovídaly požadavkům.



Tato metoda byla použita pro stanovení množství mikonazolu v tuhých disperzích. Zkoumala se rychlost a množství uvolněného léčiva z matrice polyesterů odvozených od kyseliny DL-mléčné a kyseliny glykolové. Tyto matrice byly připraveny na katedře Farmaceutické technologie Univerzity Karlovy v Hradci Králové.

Na metodě se bude dále pracovat, uvažuje se i o stanovení ekonazolu, případně obou látek najednou s tím, že analýza nečistot nám podá další informace o průběhu disoluce a budeme moci sledovat stabilitu léčiva během uvolňování.

## 8 SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ

- [1] DOLEŽAL M., BUCHTA V.. Aktuální pohled na skupiny antimykotik. *Praktické lékárenství* [online]. 1/2006, 10 – 14 s. [cit. 2019-01-23]. Dostupné z: <https://www.praktickelekarenstvi.cz/pdfs/lek/2006/01/02.pdf>
- [2] HAŠEK J.. Nové látky v magistraliter receptuře XIV – mikonazol a mikonazol-nitrát. *Praktické lékárenství* [online]. 9/2013, 192 – 195 s. [cit. 2019-01-23 ]. Dostupné z: <https://www.praktickelekarenstvi.cz/pdfs/lek/2013/04/09.pdf>
- [3] Databáze léků. *SÚKL* [online]. [cit. 2019-01-23 ]. Dostupné z: <http://www.sukl.cz/modules/medication/search.php>
- [4] MINISTERSTVO ZDRAVOTNICTVÍ ČR. Český lékopis 2017. Praha: Grada, 2017.
- [5] Wikipedia. Wikipedia [online]. [cit. 2019-04-29]. Dostupné z: <https://www.wikipedia.org/>
- [6] HENDRYCHOVÁ T., MALÝ J.. Volně prodejná antimykotika. *Praktické lékárenství* [online]. 3/2011, 132 – 137 s. [cit. 2019-01-23]. Dostupné z: <https://www.solen.cz/pdfs/lek/2011/03/09.pdf>
- [7] NOVÁKOVÁ L., DOUŠA M.. Moderní HPLC separace v teorii a praxi. I. / Lucie Nováková, Michal Douša a kolektiv. 2013. ISBN 9788026042433.
- [8] WALTER T., ANDREWS R.. Recent innovations in UHPLC columns and instrumentation. *Trends in Analytical Chemistry* [online]. 2014, **63**, 14-20 s. [cit. 2019-02-13]. DOI: 10.1016/j.trac.2014.07.016. ISSN 01659936.
- [9] Chromatografie/UHPLC. *Chromservis* [online]. [cit. 2019-02-13]. Dostupné z: <https://www.chromservis.eu/g/uhplc?lang=CZ>
- [10] GUILLARME D., VEUTHEY J.-L.. UHPLC in Life Sciences. *RSC Chromatography Monographs* [online]. 6/2012, [cit. 2019-02-13]. Dostupné z: <https://books.google.cz/books?id=i7dVxpGBWQC&printsec=frontcover&hl=cs#v=onepage&q&f=false>
- [11] Ultra High Performance Liquid Chromatography. *EAG Laboratories* [online]. 2019 [cit. 2019-02-13]. Dostupné z: <https://www.eag.com/ultra-high-performance-liquid-chromatography-uhplc/>
- [12] Comparison of UHPLC and HPLC in the analysis of benzodiazepine specimens postmortem. *National Center for Biotechnological Information* [online]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4554044/>

- [13] Core-Shell Technology. *phenomenex®* [online]. 2019 [cit. 2019-02-13]. Dostupné z: <https://www.phenomenex.com/Kinetex/CoreShellTechnology>
- [14] DAO T.-T. NGUYEN, DAVY GUILLARME, SERGE RUDAZ, JEAN-LUC VEUTHEY. Fast analysis in liquid chromatography using small particle size and high pressure. *J. Sep. Sci.*, 29, 1836 – 1848, 2006
- [15] High Performance Liquid Chromatography (HPLC) : Principle, Types, Instrumentation and Applications. Copyright © 2019 LaboratoryInfo.com [online]. [cit. 2019-04-29]. Dostupné z: <https://laboratoryinfo.com/hplc/>
- [16] JIŘÍ KLIMEŠ A KOLETIV. Kontrolně-analytické hodnocení léčiv lékopisnými metodami. *Jiří Klimeš a kol.*. 2015. ISBN 978-80-260-8175-3
- [17] GAONA-GALDOS A., GARCÍA P., AURORA-PRADO M., SANTORO M., HACKMANN É.. Simultaneous determination of econazole nitrate, main impurities and preservatives in cream formulation by high performance liquid chromatography. *Talanta*. 2008, 77(2), 673-678 [cit. 2019-02-14]. DOI: 10.1016/j.talanta.2008.07.010. ISSN 00399140.
- [18] VERMA P., PATHAK KK.. Nanosized ethanolic vesicles loaded with econazole nitrate for the treatment of deep fungal infections through topical gel formulation. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine* [online]. 2012, 8(4), 489-496 [cit. 2019-02-14]. DOI: 10.1016/j.nano.2011.07.004. ISSN 15499634.
- [19] SANNA V., GAVINI E., COSSU M., RASSU G., GIUNCHEDI P.. Solid lipid nanoparticles (SLN) as carriers for the topical delivery of econazole nitrate: in-vitro characterization, ex-vivo and in-vivo studies. *The Journal Of Pharmacy And Pharmacology* [online]. 2007, 59(8), 1057-64 [cit. 2019-02-14]. ISSN 00223573.
- [20] SUÑER-CARBÓ J., BOIX-MONTAÑÉS A., HALBAUT-BELLOWA, VELÁZQUEZ-CERRALERO N., ZAMARBIDE-LEDESMA J., BOZAL-DE-FEBRER N., CALPENA-CAMPMANY.. Skin permeation of econazole nitrate formulated in an enhanced hydrophilic multiple emulsion. *Mycoses* [online]. 2017, 60(3), 166-177 [cit. 2019-02-14]. DOI: 10.1111/myc.12575. ISSN 09337407.
- [21] Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology. *ICH – harmonisation for better health* [online]. [cit. 2018-08-29]. Dostupné z: [https://www.ich.org/fileadmin/Public\\_Web\\_Site/ICH\\_Products/Guidelines/Quality/Q2\\_R1/Step4/Q2\\_R1\\_Guideline.pdf](https://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q2_R1/Step4/Q2_R1_Guideline.pdf)
- [22] HPLC.cz [online]. [cit. 2018-08-29]. Dostupné z: <http://www.hplc.cz/>

- [23] Validace metod. EffiChem.cz. [online]. Copyright © 2019 EffiChem. [cit. 2019-02-12]. Dostupné z: <http://www.efficchem.cz/produkty/effvalidation-4-0/moduly/validace-metod/>
- [24] ŠNEJDROVÁ, E., DITTRICH, M.. Poly( $\alpha$ -hydroxykyseliny) jako nosiče léčiv, *Chem.Listy*. 2011, Vol.105, 27-33 s.. [cit. 2019-02-18]. ISSN: 1213-7103. Dostupné z: [http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2011\\_01\\_27-33.pdf](http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2011_01_27-33.pdf)
- [25] SNEJDROVA E., DITTRICH M., DRASTIK. M.. Plasticized branched aliphatic oligoesters as potential mucoadhesive drug carriers. *International Journal of Pharmaceutics*. 2013, 458, 282-286 s.. [cit. 2019-02-18]. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2013.10.030. ISSN 03785173.
- [26] TOMSOVÁ M.. Alifatický polyester větvený na tripentaerythritolu jako nosič v tuhých disperzích.. 2016. Digitální repozitář UK [online]. Copyright © 2017 [cit. 18.02.2019]. Dostupné z: <https://dspace.cuni.cz/handle/20.500.11956/75637>

## SEZNAM TABULEK

	str.
<b>Tabulka č. 1:</b> Rozdíly mezi UHPLC a HPLC	15
<b>Tabulka č. 2:</b> Příklady metod stanovujících ekonazol, ekonazol-nitrát	19
<b>Tabulka č. 3:</b> Shrnutí složení mobilních fází	23
<b>Tabulka č. 4:</b> Rozpis gradientu u metody s MF č. 1	26
<b>Tabulka č. 5:</b> Vývoj gradientu u druhé zkoušené MF	27
<b>Tabulka č. 6:</b> Souhrn optimálních chromatografických podmínek	32
<b>Tabulka č. 7:</b> Opakovatelnost nástřiku ekonazolu a mikonazolu	35
<b>Tabulka č. 8:</b> Opakovatelnost nástřiku nečistoty ekonazolu č. 1, č. 2, č. 3	35
<b>Tabulka č. 9:</b> Opakovatelnost nástřiku butylparabenu (IS)	36
<b>Tabulka č. 10:</b> Kapacita separace jednotlivých složek směsi	37
<b>Tabulka č. 11:</b> Faktor symetrie ( $A_S$ ) složek analyzované směsi	37
<b>Tabulka č. 12:</b> Rozlišení ( $R_S$ ) složek analyzované směsi	38
<b>Tabulka č. 13:</b> Linearita ekonazolu	39
<b>Tabulka č. 14:</b> Linearita mikonazolu	40
<b>Tabulka č. 15:</b> Přesnost stanovovaná na vzorku mikonazolu s IS	41
<b>Tabulka č. 16:</b> Stabilita standardu mikonazolu	42
<b>Tabulka č. 17:</b> Charakteristika polymerů PLGA, 3T, 8D, 2A	45
<b>Tabulka č. 18:</b> Disoluce mikonazolu z polymerů	48
<b>Tabulka č. 19:</b> Přesné koncentrace mikonazolu ve vzorku	49
<b>Tabulka č. 20:</b> Přesné koncentrace mikonazolu ve vzorcích 9zb.-16zb.	49
<b>Tabulka č. 21:</b> Navážky polymerů pro stanovení obsahu mikonazolu, přesná koncentrace mikonazolu	51
<b>Tabulka č. 22:</b> Procentuální obsah mikonazolu uvolňovaný v daných intervalech z matrice 3T	53
<b>Tabulka č. 23:</b> Procentuální obsah mikonazolu uvolňovaný v daných intervalech z matrice 2A	53
<b>Tabulka č. 24:</b> Procentuální obsah mikonazolu uvolňovaný v daných intervalech z matrice 8D	53
<b>Tabulka č. 25:</b> Procentuální obsah mikonazolu uvolňovaný v daných intervalech z matrice PLGA	54
<b>Tabulka č. 26:</b> Stanovení obsahu mikonazolu v polymeru	55
<b>Tabulka č. 27:</b> Souhrn optimálních chromatografických podmínek	56

## SEZNAM OBRÁZKŮ

	str.
<b>Obrázek č. 1:</b> Strukturální vzorec sloučeniny mikonazol	12
<b>Obrázek č. 2:</b> Strukturální vzorec sloučeniny ekonazol	12
<b>Obrázek č. 3:</b> Blokové schéma HPLC	14
<b>Obrázek č. 4:</b> Vzhled povrchově porézní částice (A) v porovnání s celkově porézní částicí (B)	15
<b>Obrázek č. 5:</b> Rozdíl v rozmývání (šíři píků) mezi povrchově porézní a plně porézní částicí	16
<b>Obrázek č. 6:</b> Průměrné zvýšení efektivity při použití povrchově porézních částic oproti plně porézním	16
<b>Obrázek č. 7:</b> Chromatogram ekonazolu a jeho tří nečistot. Mobilní fáze MeOH : H <sub>2</sub> O 57:43; pH 6,89; kolona C18 XB (50 x 2,1 mm, 1,7 μm); průtok 0,6 ml/min; nástřik 2 μm; gradientová eluce.	26
<b>Obrázek č. 8:</b> Chromatogram ekonazolu, jeho tří nečistot a mikonazolu. Mobilní fáze [(MeOH : AmAc 20:80) : (MeOH: ACN 40:60)] 60:40; pH 6,35; kolona C18 XB (50 x 2,1 mm, 1,7 μm); průtok 0,6 ml/min; nástřik 2 μm; gradientová eluce.	27
<b>Obrázek č. 9:</b> Chromatogram ekonazolu, jeho tří nečistot a mikonazolu. Mobilní fáze [(MeOH : AmAc 20:80) : (MeOH: ACN 40:60)] 60:40; pH 8,18; kolona C18 XB (50 x 2,1 mm, 1,7 μm); průtok 0,6 ml/min; nástřik 2 μm; gradientová eluce.	28
<b>Obrázek č. 10:</b> Chromatogram ekonazolu, jeho tří nečistot a mikonazolu. Mobilní fáze [(MeOH : AmAc 20:80) : (MeOH: ACN 40:60)] 60:40; pH 7,36; kolona C18 XB (50 x 2,1 mm, 1,7 μm); průtok 0,6 ml/min; nástřik 2 μm; gradientová eluce.	28
<b>Obrázek č. 11:</b> Chromatogram ekonazolu, jeho tří nečistot a mikonazolu. Mobilní fáze [(MeOH : AmAc 20:80) : (MeOH: ACN 40:60)] 60:40; pH 7,82; kolona C18 XB (50 x 2,1 mm, 1,7 μm); průtok 0,6 ml/min; nástřik 2 μm; gradientová eluce.	29
<b>Obrázek č. 12:</b> Chromatogram ekonazolu, jeho tří nečistot a mikonazolu. Mobilní fáze MeOH : NH <sub>4</sub> H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 50:50; pH 7,75; kolona C18 XB (50 x 2,1 mm, 1,7 μm); průtok 0,6 ml/min; nástřik 2 μm; gradientová eluce.	30
<b>Obrázek č. 13:</b> Chromatogram ekonazolu, jeho tří nečistot a mikonazolu. Mobilní fáze (MeOH : NH <sub>4</sub> H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 20:80) : (MeOH: ACN 40:60) 60:40; pH 7,75; kolona C18 XB (50 x 2,1 mm, 1,7 μm); průtok 0,6 ml/min; nástřik 2 μm; gradientová eluce.	30
<b>Obrázek č. 14:</b> Chromatogram ekonazolu, jeho tří nečistot a mikonazolu. Mobilní fáze [(MeOH : AmAc 20:80) : (MeOH: ACN 40:60)] 60:40; pH 7,82; kolona C18 XB (50 x 2,1 mm, 1,7 μm); průtok 0,6 ml/min; nástřik 2 μm; gradientová eluce.	33
<b>Obrázek č. 15:</b> Graf kalibrační závislosti ekonazolu	39
<b>Obrázek č. 16:</b> Graf kalibrační závislosti mikonazolu	40
<b>Obrázek č. 17:</b> Nástřik placebo a vnitřního standardu	42
<b>Obrázek č. 18:</b> Nástřik vzorku a vnitřního standardu	43
<b>Obrázek č. 19:</b> Schéma větveného polyesteru	44