

**Univerzita Karlova v Praze  
Farmaceutická fakulta v Hradci Králové  
Katedra farmaceutické chemie a kontroly léčiv**



# **HODNOCENÍ TRANSKARBAMU A JEHO NEČISTOT POMOCÍ HPLC II**

**Rigorózní práce**

**Hradec Králové 2007**

**Mgr. Kateřina Stražilová**

## **PODĚKOVÁNÍ**

Tato práce byla vypracována na Katedře farmaceutické chemie a kontroly léčiv Farmaceutické fakulty v Hradci Králové, proto bych ráda poděkovala všem, kteří mi poskytli pracovní podmínky a vytvořili příjemné prostředí pro vykonání této práce. Zejména bych chtěla velmi poděkovat Doc. RNDr. Jaroslavu Sochorovi, CSc. , za odbornou pomoc při vykonání i zpracování experimentální části a za poskytnutí studijních materiálů a také bych velmi ráda poděkovala Mgr. Ivaně Pasákové za odborné a užitečné rady během praktické části v laboratoři a také při jejím zpracovávání.

# OBSAH

<b>1. ÚVOD</b> .....	<b>4</b>
<b>2. TEORETICKÁ ČÁST</b> .....	<b>5</b>
2.1 CHROMATOGRAFICKÉ METODY .....	5
2.1.1 HISTORIE .....	6
2.1.2 ROZDĚLENÍ CHROMATOGRAFICKÝCH METOD .....	7
2.1.3 VYSOKOÚČINNÁ KAPALINOVÁ CHROMATOGRAFIE .....	9
2.1.4 VALIDACE ANALYTICKÉ METODY .....	23
2.1.5 DERIVATIZACE V HPLC .....	27
2.1.6 LITERÁRNÍ REŠERŠE DERIVATIZACE AMINŮ V HPLC .....	30
2.2 TRANSKARBAMY .....	31
2.2.1 Transkarbam 12 .....	32
2.2.2 Kyselina 6-aminohexanová .....	33
<b>3. CÍL PRÁCE</b> .....	<b>34</b>
<b>4. PRAKTICKÁ ČÁST</b> .....	<b>35</b>
4.1 POUŽITÝ MATERIÁL .....	35
4.1.1 Chemikálie .....	35
4.1.2 Chromatografický materiál .....	35
4.1.3 Přístroje .....	36
4.1.4 Pomůcky .....	36
4.2 PŘÍPRAVA PUFRU .....	37
4.3 PŘÍPRAVA VZORKŮ PRO HPLC ANALÝZU .....	37
4.4 CHROMATOGRAFICKÉ PODMÍNKY ANALÝZY .....	38
<b>5. VÝSLEDKY A DISKUSE</b> .....	<b>39</b>
5.1 OPTIMALIZACE PODMÍNEK HPLC ANALÝZY .....	39
5.2 KVANTITATIVNÍ HODNOCENÍ 6-AMINOHEXANOVÉ KYSELINY .....	42
5.3 MODELOVÉ VZORKY .....	48
5.4 VALIDACE CHROMATOGRAFICKÉ METODY .....	49
<b>6. ZÁVĚR</b> .....	<b>59</b>
<b>7. LITERATURA</b> .....	<b>61</b>

# 1. ÚVOD

Vysokoúčinná kapalinová chromatografie je jedna z nejrozšířenějších analytických metod. Řadí se mezi metody separační a umožňuje jak kvalitativní, tak i kvantitativní hodnocení látek. Má velmi široké využití zejména v oblasti léčiv (identifikace, stanovení obsahu, čistoty, hodnocení stability, stanovení v tělních tekutinách či rostlinném materiálu), ale také v dalších odvětvích chemie či potravinářství.

Látky, které jsou schopné urychlovat průnik léčiv přes neporušenou kožní bariéru, nazýváme akceleranty transdermální penetrace. Do této skupiny patří i transkarbam 12, sloučenina, jež byla vyvinuta a patentována na Katedře anorganické a organické chemie Farmaceutické fakulty v Hradci Králové Univerzity Karlovy v Praze. Tato sloučenina je schopna urychlit transport léčiva přes neporušenou kožní bariéru až 40krát rychleji. Transkarbamy jsou svou chemickou strukturou symetrické amoniové soli kyseliny karbamové vznikající reakcí esterů 6-aminohexanové kyseliny. Jsou však velmi nestálé a jedním z předpokládaných rozkladných produktů, vzniklých při nevhodném skladování, je i kyselina 6-aminohexanová, jež je HPLC metodou hodnocena v topickém přípravku.

Tato práce je součástí rozsáhlejšího projektu a navazuje na předchozí práce kolegů, jejichž poznatků využívá a dále je rozšiřuje.

## 2. TEORETICKÁ ČÁST

### 2.1 CHROMATOGRAFICKÉ METODY <sup>[1]</sup>

Chromatografické metody jsou metody separační, které slouží k rozdělování směsí látek přírodního i syntetického charakteru. Izolace chemických individuí ze směsí látek různého původu vždy byla a je jedním ze základních úkolů chemie. Proto byly stále hledány nové a dokonalejší techniky separace, což vedlo k objevu adsorpční chromatografie nebo k rozvoji rozdělovací chromatografie.

Chromatografie je proces, při kterém se chromatografovaná látka pohybuje v systému dvou fází, z nichž jedna je stacionární a druhá mobilní. Látka se rozdělí mezi dvě fáze ve snaze dosáhnout sorpční rovnováhy, která je však neustále porušována tokem mobilní fáze, čímž opakovaně dochází k sorpci a desorpci (po celé délce, až do vymytí) <sup>[1]</sup>.

Význam separačních metod je obrovský, ať už se jedná o odvětví farmaceutické, analytické, organické či biochemické.

### **2.1.1 HISTORIE** <sup>[2]</sup>

V druhé polovině 19. století zkoumali angličtí geologové Thompson a Way adsorpci kationtů z roztoku solí filtrovaných přes různé druhy hlinek. Tím objevili základní zákony výměny iontů. O skutečný rozvoj této metody se zasloužili Adams a Holmes objevem umělých organických iontoměničů r. 1935.

Objevitelem adsorpční chromatografie jako účinné separační metody byl ruský botanik M. S. Cvet, který zkoumal adsorpci rostlinných barviv za použití asi stovky různých adsorbentů. V r. 1903 uveřejnil svou publikaci, kde popsal své výsledky, propracoval postup citlivého dělení a nazval svou metodu chromatografií, i když věděl, že takto lze dělit i látky bezbarvé. V r. 1931 zavedli R. Kuhn, Winterstein a Lederer tuto metodu do chemie polyenových barviv a postupně se vypracovali další postupy na dělení látek, zejména lipofilního charakteru.

Pro dělení látek hydrofilního charakteru chyběl vhodný postup až do objevení rozdělovací chromatografie A. J. P. Martinem a R. L. M. Syngem r. 1941. V r. 1952 jim byla udělena Nobelova cena za objev a zavedení rozdělovací chromatografie typu kapalina-kapalina.

Jednou z nejnovějších chromatografických metod, zavedených do analytické praxe, je vysokoúčinná kapalinová chromatografie. Roku 1963 objevil Giddins, že je možné zkrátit čas analýzy látek dělených sloupcovou rozdělovací chromatografií použitím speciálních sloupců se speciálním vstupním otvorem. Taktéž upozornil na možnosti přenést teorie z plynové chromatografie do vysokoúčinné kapalinové chromatografie. Poté Kirkland a Halász vyvinuli speciální dělicí kolony naplněné sorbentem s průměrnou velikostí částic 30  $\mu\text{m}$ , které snesou tlak do 1MPa a vyřešili též otázku automatizace.

## 2.1.2 ROZDĚLENÍ CHROMATOGRAFICKÝCH METOD

a) *Podle podstaty separačního procesu*<sup>[1]</sup>

**Tab.1 Rozdělení chromatografických metod dle principu separace**

název	princip
adsorpční	adsorpce
rozdělovací	extrakce, rozpouštění
iontově výměnná	elektrostatická interakce a difúze
gelová	difúze
afinitní	selektivní sorpce a desorpce (antigen-protilátka)

**Adsorpční chromatografie** – k separaci dochází v důsledku rozdílné adsorpční afinity jednotlivých složek směsi. Ty jsou rozpuštěné v mobilní fázi a při styku s druhou fází dochází na rozhraní těchto fází k nahromadění (adsorpci) jednotlivých složek. Adsorpce může probíhat jak mezi pevnou stacionární fází a kapalinou, tak i mezi pevnou stacionární fází a plynem.

**Rozdělovací chromatografie** – princip separace závisí na dělicí schopnosti jednotlivých složek směsi mezi dvě nemísitelné anebo jen omezeně mísitelné kapalně fáze. Jinými slovy záleží na jejich rozpustnosti, resp. afinitě jednotlivých složek k jednotlivým fázím. Distribuce složek je dána rozdělovací konstantou.

Užívá se dvoufázový systém, kde jedna z fází bývá organická a druhá vodná. Jedna z kapalných fází musí být pevně ukotvena na vhodném nosiči, druhá volně protéká. Vodná fáze je obvykle zakotvena na hydrofilním nosiči jako je např. silikagel, křemelina, hydrofilní gely, prášková celulóza, aj. Někdy je potřeba opačného uspořádání, kdy hydrofobní nosič je impregnovaný organickou fází a fáze vodná je pak mobilní. Rozdělovat lze též mezi plynnou a netěkavou kapalnou fází, která je vhodně zakotvena. Užívá se spíše pro sloučeniny těkavé a málo rozpustné.

**Iontově výměnná chromatografie** – jak již z názvu vyplývá, principem separace je výměna iontů. Jestliže jednotlivé složky směsi vytvářejí v roztoku ionty, mohou tyto

elektrostaticky interagovat s ionogenními funkčními skupinami měniče a ionty původně vázané na měnič tím vytěšňovat. Výměna probíhá za stejně nabitě molekuly a je tím snadnější, čím větší náboj tyto složky mají.

**Gelová chromatografie** – separace je založena na rozdělení podle velikosti molekul. Přejde-li roztok směsi do kontaktu s pórovitou pevnou fází, budou se jednotlivé molekuly snažit difundovat z roztoku i do nitra pevné fáze, přičemž budou procházet póry. Dle velikosti póru se pak budou jednotlivé zdržovat či volně odcházet. Malé molekuly se šíří bez zábran mezi oběma fázemi, středně velké molekuly budou difundovat do pevné fáze jen částečně a velké molekuly budou rozpuštěny pouze v kapalně fázi.

**Afinní chromatografie** - rozdělení látek je založeno na základě specifických nekovalentních interakcí, které jsou charakteristické zejména pro některé biochemické procesy. Často se používá pro čištění proteinů značených histidinovým zbytkem, biotinem či antigenem, které se specificky váží k pevné fázi.

*b) Podle fází, mezi nimiž dochází k separaci<sup>[1]</sup>*

**Tab.2 Rozdělení chromatografických metod podle fází**

kapalina- pevná látka / LSC (liquid – solid chromatography)	Kapalinová chromatografie
kapalina – kapalina / LLC (liquid-liquid chromatography)	
plyn - kapalina / GLC (gas – liquid chromatography)	Plynová chromatografie
plyn – pevná látka / GSC (gas – solid chromatography)	

Uspořádání kapalinové chromatografie dále dělíme na:

**plošné** – TLC (tenkovrstvá chromatografie), PC (papírová chromatografie) - dnes již překonaná

**kolonové** – nejčastěji využívaná je HPLC<sup>[4]</sup>



### **2.1.3 VYSOKOÚČINNÁ KAPALINOVÁ CHROMATOGRRAFIE**

Vývoj HPLC (z anglického „high performance liquid chromatography“) vyplynul z potřeby najít metodu pro dělení v kapalně fázi, která by byla komplementární k plynové chromatografii (GLC) a dávala současně i možnost kvantitativního hodnocení. Výhodou HPLC je rychlost dělení pohybující se řádově v desítkách minut a které by za jiných okolností trvalo hodiny i dny, popř. by nebylo možné vůbec.

HPLC umožňuje všechny čtyři hlavní aplikace dle mechanismu interakce, tj. adsorpční chromatografii (LSC), rozdělovací chromatografii (LLC), iontově-výměnnou chromatografii (IEC) i gelovou chromatografii (GPC) <sup>[1]</sup>.

#### **2.1.3.1 Základní principy a terminologie** <sup>[1, 3, 6]</sup>

##### *Eluční data*

Charakteristickou veličinou pro každou chromatografovanou látku v daném chromatografickém systému je eluční (retenční) čas  $t_R$  nebo eluční (retenční) objem  $V_R$ . Eluční čas je doba, která uplyne od nástřiku vzorku na kolonu po dosažení maxima eluční křivky a eluční objem je proteklý objem mobilní fáze za tuto dobu. Tyto dvě veličiny spolu souvisejí vztahem

$$V_R = t_R F_M,$$

kde  $F_M$  je objem mobilní fáze proteklé kolonou za jednotku času (tj. průtok mobilní fáze).

Eluční objem je dán součtem dvou objemových veličin

$$V_R = V'_R + V_M,$$

kde  $V'_R$  je redukovaný eluční objem (též nazýván zdánlivý eluční objem) a  $V_M$  je mrtvý objem, představující objem mobilní fáze od místa nástřiku přes kolonu až po detektor. Ten zjistíme experimentálně jako eluční objem nesorbující se látky (inertu).

Hmotnostní distribuční poměr ( $D_m$ ) známý jako kapacitní faktor  $k'$  nebo retenční faktor  $k$  je definován jako:

$$D_m = \frac{\text{množství rozpuštěné látky ve stacionární fázi}}{\text{množství rozpuštěné látky v mobilní fázi}} = K_c \frac{V_s}{V_M},$$

v němž  $K_c$  značí rovnovážný distribuční koeficient (distribuční konstanta),  $V_s$  je objem stacionární fáze a  $V_M$  pak objem mobilní fáze.

Hmotnostní distribuční poměr složky může být určen z chromatogramu s použitím vzorce:

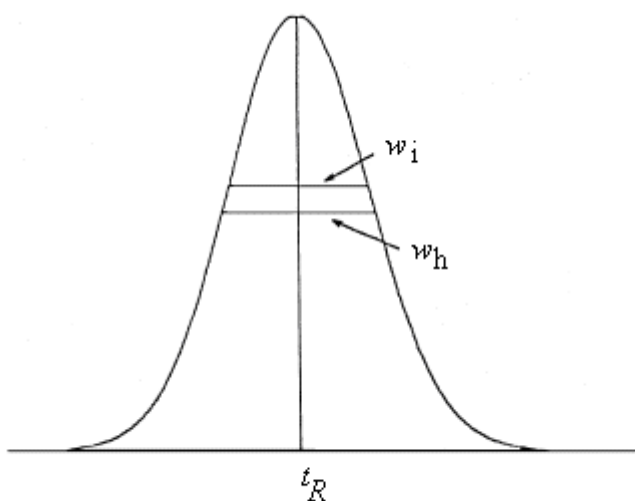
$$D_m = \frac{t_R - t_M}{t_M},$$

v němž  $t_R$  značí retenční čas a  $t_M$  je mrtvý retenční čas.

### Chromatografická data

Pík může být definován plochou píku ( $A$ ) nebo výškou píku ( $h$ ) a šířkou píku v poloviční výšce ( $w_h$ ) nebo výškou píku ( $h$ ) a šířkou píku mezi body inflexe ( $w_i$ ). Pro gaussovské píky (viz obr. 1) platí vzorec:

$$w_h = 1,18w_i,$$

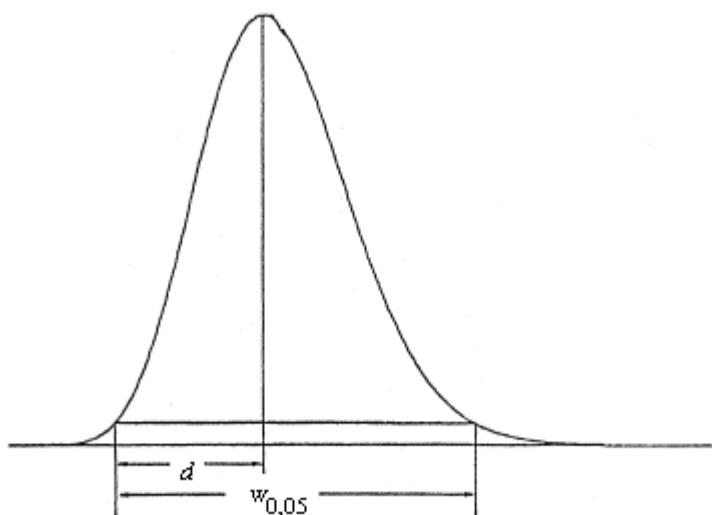


**Obr.1** Ilustrace chromatografického píku (Český lékopis 2005) [6]

Faktor symetrie píku ( $A_s$ ) (viz obr. 2) je charakteristika určující, zda je tvar píku symetrický a zda tzv. "chvostuje". Vypočítá se ze vzorce:

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

kde  $w_{0,05}$  představuje šířku píku v jedné dvacetině jeho výšky a  $d$  je vzdálenost mezi kolmicí spuštěnou z vrcholu píku a vzestupnou částí píku v jedné dvacetině jeho výšky. Ideální symetrie píku je dosaženo, je-li hodnota faktoru symetrie píku rovna 1,0.



Obr.2 Faktor symetrie píků (Český lékopis 2005) [6]

K hodnocení účinnosti kolony byly zavedeny pojmy počet teoretických pater  $N$  a výškový ekvivalent teoretického patra  $H$ .

Účinnost kolony pak může být vypočítána jako zdánlivý počet teoretických pater  $N$  podle vzorce:

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

kde  $t_R$  značí retenční čas a  $w_h$  značí šířku píku v polovině jeho výšky.

Zdánlivý počet teoretických pater se mění se stanovovanou složkou, kolonou a retenčním časem.

### Separační data

Rozlišení ( $R_s$ ) mezi píky dvou složek s podobnou výškou může být vypočteno ze vzorce:

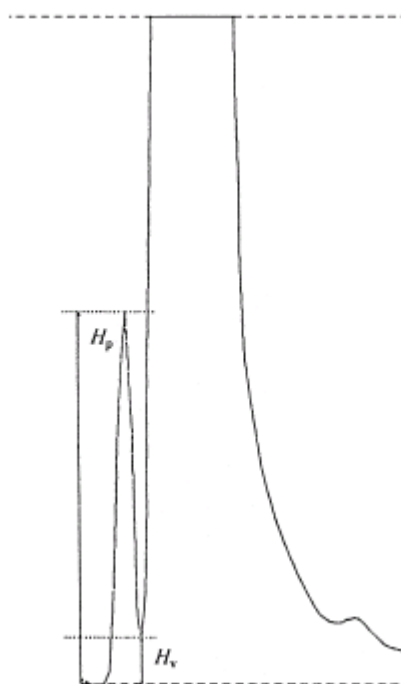
$$R_s = \frac{1,18(t_{R2} - t_{R1})}{w_{h1} - w_{h2}},$$

v němž  $t_{R1}$  a  $t_{R2}$  značí retenční časy a kde  $t_{R2} > t_{R1}$ ,  $w_{h1}$  a  $w_{h2}$  značí šířky píků v poloviční výšce. Rozlišení větší než 1,5 odpovídá rozdělení píků na základní linii. Pro píky, které se vzájemně značně liší svými výškami, nemusí být výše uvedený vzorec vhodný.

Jestliže není zcela oddělena nečistota od analyzované látky, lze použít jako kritérium způsobilosti systému ve zkouškách na příbuzné látky poměr výšky píku k sedlu ( $p/v$ ) (obr. 3):

$$p/v = \frac{H_p}{H_v},$$

v němž  $H_p$  odpovídá výšce píku nečistoty nad extrapolovanou základní linií a  $H_v$  odpovídá výšce nejnižšího bodu křivky oddělující píky nečistoty a analyzované látky (sedlo) nad extrapolovanou základní linií.



Obr.3 Poměr výšky píku k sedlu (Český lékopis 2005) [6]

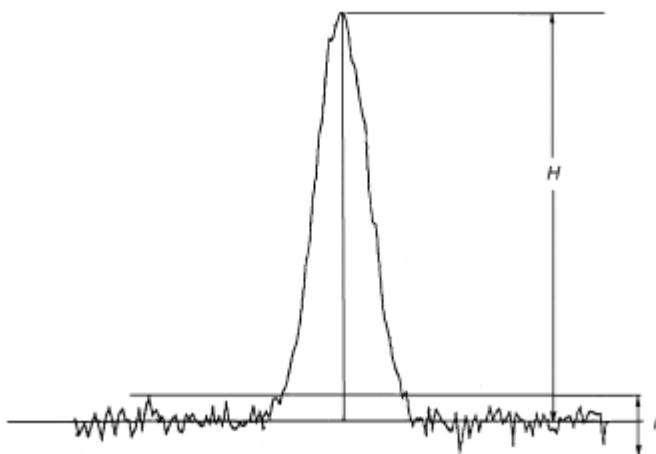
Relativní retence ( $r$ ) se vypočítá ze vzorce:

$$r = \frac{t_{R2} - t_M}{t_{R1} - t_M},$$

v němž  $t_{R2}$  značí retenční čas sledovaného píku,  $t_{R1}$  pak retenční čas referenčního píku (obvykle pík odpovídající zkoušené látce) a  $t_M$  je mrtvý retenční čas. Přesnost stanovení obsahu složek lze hodnotit z poměru signálu k šumu ( $S/N$ ), který se vypočítá ze vzorce:

$$S/N = \frac{2H}{h},$$

v němž  $H$  značí výšku píku (obr. 4) předepsaného porovnávacího roztoku, měřenou od vrcholu píku k extrapolované základní linii signálu a  $h$  je rozpětí šumu pozadí na chromatogramu získaného při slepé zkoušce.



**Obr.4 Poměr signálu k šumu (Český lékopis 2005) [6]**

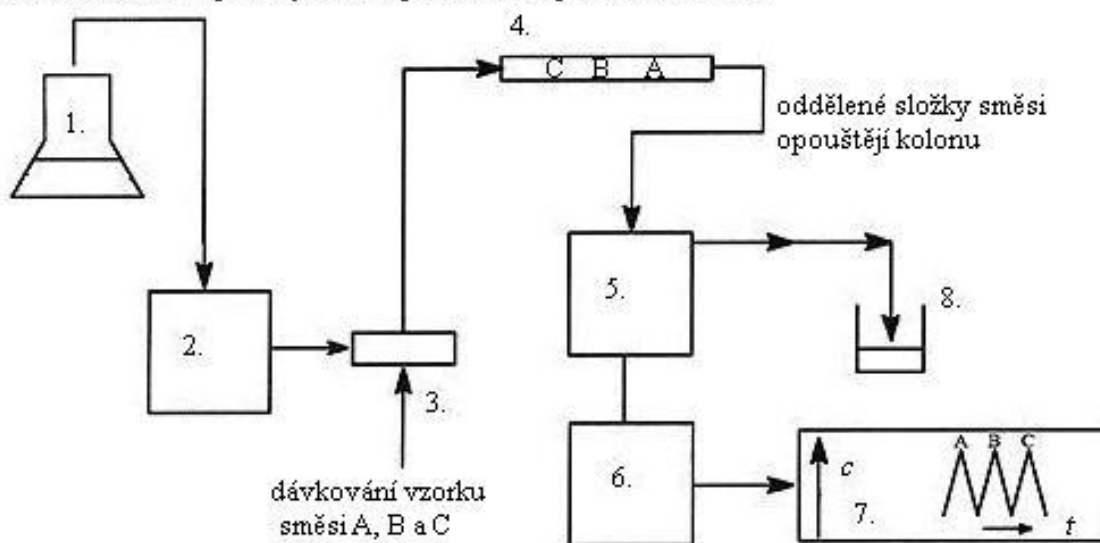
### 2.1.3.2 Instrumentace v HPLC

Dobré přístrojové vybavení je základním předpokladem pro rychlou, citlivou a reprodukovatelnou analýzu. Především je vyžadováno, aby všechny části, které přijdou do styku s mobilní fází, byly vyrobeny z antikorozivních materiálů. Dalším požadavkem je snížení mrtvých objemů na minimum, dosažení dostatečně stabilního a reprodukovatelného průtoku mobilní fáze kolonou a možnost elektronického zpracování signálu z detektoru [2].

Dříve používaná instrumentální zařízení bývala poskládaná z jednotlivých dílů. Dnešní moderní sestavy jsou téměř plně automatizovány, takže obsluha přístroje je velmi jednoduchá.

Mobilní fáze, tvořená zpravidla dvou- až tříložkovou směsí různých rozpouštědel, je dopravována systémem čerpadel přes dávkovací zařízení do kolony, kde se uskutečňuje vlastní separační děj; odtud je vytlačována do detektoru a odpadní nádoby, popř. jímače frakcí. Elektrický signál, vycházející z detektoru, býval dříve zaznamenáván pomocí vhodného zapisovače a současně vyhodnocován elektronickým integrátorem. V dnešní době je tato část nahrazena počítačem a signál je vyhodnocen pomocí vhodného softwaru [2].

Blokové schéma přístrojového vybavení a uspořádání v HPLC :



**Obr.5** Blokové schéma instrumentace v HPLC ([www.protein.iastate.edu/hplc.html](http://www.protein.iastate.edu/hplc.html)):

1. zásobníky mobilní fáze, 2. čerpadlo, 3. dávkovač vzorku, 4. kolona, 5. detektor, 6.vyhodnocovací zařízení, 7. záznam, 8. odpadní nádoba (jímač frakcí)

### **Zásobníky mobilní fáze**<sup>[2]</sup>

Složky mobilní fáze jsou zpravidla umístěny odděleně v zásobnících, které mohou být konstruovány tak, aby bylo možné je přímo odvzdušňovat proudem helia. Moderní automatické sestavy mají již zabudovaný degaser na odplynění mobilní fáze. Vedle odvzdušnění musí být mobilní fáze též zbavena mechanických nečistot filtrací přes filtry o velikosti pórů 2–5  $\mu\text{m}$ . Zásobníky mobilní fáze mohou být ze skla, kovu či plastu, podle počtu složek mobilní fáze obvykle v počtu 1 až 3.

### **Odplyňovač (degaser)**<sup>[3]</sup>

Aby v koloně nebo na jejím výstupu nedocházelo k uvolňování bublinek rozpuštěných plynů, které by účinnost kolony snižovaly a navíc rušily detekci, musí se mobilní fáze odplynit. Existuje několik způsobů odplynění; probublávání inertním plynem (dusík, helium) či pomocí ultrazvukové lázně nebo vakua. Moderní přístroje jsou již vybaveny vlastním degaserem.

### **Čerpadlový systém**<sup>[2,3]</sup>

Vysokotlaká čerpadla jsou jednou z nejdůležitějších součástí kapalinového chromatografu, neboť vedou mobilní fázi ze zásobníků na kolonu a proto jsou na ně kladeny vysoké nároky. Je potřeba zajistit výstupní tlaky v rozmezí 1-60 MPa, aby bylo dosaženo průtoku mobilní fáze v rozmezí 1-20 ml/min s možností zvyšování o 0,1 ml/min, s reprodukovatelností průtoku  $\pm 1\%$  a schopností gradientové eluce. Dále je potřeba zajistit bezpulsní průtok mobilní fáze umístěním tlumičů na výstupu z pumpy.

Principálně lze vysokotlaká čerpadla rozdělit do dvou hlavních skupin podle toho, zda pracují při *konstantním tlaku* anebo při *konstantním objemovém průtoku*. Při konstantním tlaku se využívá tlak plynu přiváděného z tlakové nádoby přes redukční ventil, příp. hydraulické kapaliny (*pneumatická čerpadla*). Druhý typ čerpadel využívá k pohybu pístu či membrány mechanický pohon, čímž se dosahuje konstantního objemového průtoku čerpané kapaliny (*čerpadla s mechanickým pohonem*).

Dále můžeme čerpadla rozdělit na *pístová* a *membránová*. Pístová čerpadla jsou konstruována tak, aby mrtvý objem čerpadla byl co nejmenší. U membránového čerpadla je princip podobný jako u pístového, ale v hlavě je navíc umístěna membrána,

kteřá zprostředkovává styk hydraulické kapaliny vytlačované pístem s mobilní fází na druhé straně membrány

Jiné dělení čerpadel je na *pulsní* a *bezpulsní*; pulsni mají malý objem pracovní komory a potřebného průtoku se dosahuje opakovaným stlačením a vypuzením. Bezpulsní čerpadla pracují s větším objemem, poskytují hladší průtok mobilní fáze a nevyžadují přídavné tlumiče pulsů, ale přesnost tvorby gradientu je horší.

### **Tlumiče pulsů** <sup>[3]</sup>

Zařazení na tlumení pulsů pracují na principu, který spočívá v zachycování tlakových rázů zařazením odporových nebo kapacitních elementů. Odporový element je zapojen v sérii, kapacitní paralelně.

### **Zařazení pro dávkování vzorku** <sup>[2, 3]</sup>

Dávkovače jsou zařazovány mezi pumpu a kolonu a slouží k přesnému odměření a vnesení dávkovaného roztoku vzorku přímo na kolonu. Dobrý dávkovač by měl splňovat několik požadavků. Měl by být rezistentní vůči používané mobilní fázi, schopný snadného vyplachování, prostý zbytečných mrtvých objemů a musí umožňovat dávkování přesně ohraničených množství.

Dávkovat lze dvěma hlavními způsoby; *injekční stříkačkou* malého objemu nebo *dávkovacím ventilem*.

Mnohem jednodušší je dávkování bez přerušování toku mobilní fáze pomocí smyčkového nebo trojcestného dávkovacího ventilu. Moderní přístroje jsou již těmito ventily vybaveny. Umožňují dávkovat přesné objemy vzorku při kontinuálním průtoku mobilní fáze. Některé složitější dovolují dávkování i proměnných objemů (1-2000  $\mu$ l) pomocí vhodných mikrostříkaček a jsou konstruovány až do tlaků 40 MPa. Velmi roste význam automatických dávkovačů (autosamplerů), které jsou schopny dávkovat desítky vzorků bez manuálního zásahu.

### **Chromatografická kolona** <sup>[1, 2, 3]</sup>

Těsně za dávkovačem je umístěna chromatografická kolona. Spoj mezi dávkovačem a kolonou musí tvořit úzká nerezová kapilára, zaručující minimální rozmývání



dávkovaného roztoku v mobilní fázi. Výběrem typu kolony je možno ovlivnit selektivitu dělení. Selektivita kolony je dána chemickou povahou a fyzikálně chemickými vlastnostmi chromatografické náplně. Účinnost kolony je pak podmíněna jejími parametry, velikostí částic náplně, kvalitou naplnění.

Vlastní kolony mohou být zhotoveny z nerezových, skleněných, event. titanových trubek různých délek a vnitřních průměrů. Nejlépe se osvědčuje nerezová ocel, skleněné kolony se hodí pro pracovní tlaky do 10 MPa. Kolony zhotovené z kovu, jejichž vnitřní povrch je potažen tenkou vrstvou skla, spojují dobré vlastnosti a mechanickou odolnost kovových kolon s chemickou odolností skleněných kolon.

Délka kolony je závislá jednak na materiálu, jímž je naplněna, a jednak na tom, kolika teoretických pater je zapotřebí k separaci dané směsi látek. Čím menší je zrnění sorbentu, tím je kolona kratší. Nejpoužívanější velikost zrn je v rozmezí 3-10  $\mu\text{m}$ . Kolony dlouhé 15-25 cm s vnitřním průměrem 3-6 mm se používají k analytickým účelům, delší kolony 25-50 cm s větším průměrem 8-10 mm se hodí k preparativním účelům. Pro práci s biologickým materiálem se doporučuje zařazovat před vlastní kolonu ještě krátkou předkolonku.

S rozměrem kolon souvisí i její celková kapacita. S druhou mocninou průměru kolony stoupá i množství vzorku, kterým můžeme kolonu zatížit.

Jako náplně chromatografických kolon se používají různé sorbenty podle mechanismu separace. U adsorpční chromatografie je to nejčastěji oxid křemičitý nebo oxid hlinitý.

U rozdělovací chromatografie tvoří stacionární fázi buď kapalina zakotvená na pevném nosiči nebo chemicky vázaná organická sloučenina na povrchu pevné fáze. Při iontovýměnné chromatografii jsou náplní kolon různé iontoměniče – makromolekulární matrice obsahující kyselé nebo zásadité funkční skupiny.

Pro zakotvení kapaliny se jako nosiče používají silikagel, křemelina, celulosa nebo Sephadex. Chemicky vázané inertní fáze jsou tvořeny adsorbenty na bázi silikagelu, jehož povrchové hydroxylové skupiny vytvoří reakci s příslušnými látkami (nejčastěji s chlorsilany nebo alkoksysilany) monomolekulární vrstvu na povrchu silikagelové částice (kartáčový typ). Návázány jsou buď dlouhé alkylového řetězce hydrofóbního charakteru (C-8, C-18 –tzv. reverzní fáze) nebo kratší, nejčastěji dvou až tříuhlíkaté řetězce obsahující polární funkční skupinu -CN, -OH, -NH<sub>2</sub>, -COOH.

Pro separaci opticky aktivních látek lze použít chirální stacionární fáze.

## Detektory<sup>[1, 2, 3, 4, 8]</sup>

Výstup z kolony je spojen kovovou kapilárou s detektorem, který registruje okamžité změny ve složení protékajícího eluátu. Pomocí vhodného snímače sleduje některou z vlastností eluátu a signál po zesílení přivádí do zapisovače, který poskytuje záznam závislosti intenzity daného signálu na čase.

Základní požadavky na detektor:

- linearita odezvy v co nejširším rozmezí koncentrací
- dostatečně velký poměr mezi šumem a měřenou hodnotou
- vysoká citlivost
- malá citlivost ke změnám průtoku a tlaku
- možnost užít gradientovou eluci

Detektory lze rozdělit do dvou hlavních skupin - univerzální a selektivní, avšak nejčastějším dělicím kritériem je měřená veličina.

**Tab.3 Přehled nejčastěji používaných detektorů**

Typ detektoru	Detekční limit (g/ml)	Měřená fyzikální veličina
ultrafialový	$10^{-8} - 10^{-10}$	absorpce záření (podmíněna přítomností chromoforních skupin v analyzovaném léčivu)
fluorimetrický	$10^{-9} - 10^{-15}$	fluorescence léčiv, popř. vytváření fluoreskujícího derivátu s vhodným činidlem
refraktometrický	$10^{-6}$	rozdílný index lomu roztoku analyzované látky a mobilní fáze
elektrochemický (polarografický, ampérometrický)	$10^{-9} - 10^{-11}$	oxidoredukční změny analyzovaných léčiv (elektrochemické reakce)
hmotnostní spektrometr		relativní intenzita jednotlivých iontů dle poměru hmotnosti a náboje (m/z)

**Spektrofotometrické detektory** se řadí k nejčastěji používaným. Pracují v ultrafialové a viditelné oblasti světla. Většina rozpouštědel v této oblasti neabsorbují na rozdíl od infračervené oblasti světla. **Ultrafialové detektory** patří mezi nejrozšířenější. Jsou relativně selektivní a zároveň využitelné ve více jak 80% aplikací, vysoce citlivé, s velkou oblastí linearitu odezvy. Mohou být buď s fixní vlnovou délkou – nejčastěji 254 nm či 280 nm – nebo s proměnnou vlnovou délkou. Navíc jsou dnes k dispozici detektory snímající celé UV spektrum během několika málo sekund (rapid scanning) či detektory, u nichž lze detekovat látku současně při řadě vlnových délek (diode array).

**Fluorimetrický detektor** je vysoce selektivní, jeho odezva nezávisí na kolísání teploty a vyznačuje se dobrou linearitou. Princip detekce je založen na absorpci UV záření eluovanou látkou procházející průtokovou celou detektoru, která pak emituje sekundární záření o větší vlnové délce, než jakou má záření excitační. Emitované záření dopadá na fotoelektrický násobič a přemění se na elektrický signál úměrný záření. Takto je možné detekovat látky, které fluoreskují, anebo se dají derivatizací převést na fluoreskující deriváty.

**Refraktometrické detektory** mají jednu velkou přednost – univerzálnost, jsou však méně citlivé a nelze je použít ke gradientové eluci. Měří rozdíl indexu lomu čisté mobilní fáze a mobilní fáze se separovanou složkou. Nevýhodou je též velká závislost měřeného indexu lomu na teplotě.

**Elektrochemické detektory** jsou selektivní a vysoce citlivé. Využívají dějů souvisejících s elektrochemickou reakcí, jež probíhá na fázovém rozhraní elektroda-roztok a umožňuje tedy detekci látek schopných oxidace nebo redukce. Měří se proud procházející mezi polarizovatelnou pracovní elektrodou a pomocnou elektrodou v závislosti na vloženém napětí. Elektrody jsou vyrobeny z různých vodivých materiálů - kovu, uhlíku, skleněných vláken potažených vrstvou uhlíku, z tkaniny uhlíkatých vláken, aj. Nejčastějšími typy elektrochemických detektorů jsou polarografické a ampérometrické.

**Hmotnostní spektrometr** je iontově optické zařízení, které separuje ionty podle poměru jejich hmotnosti a náboje ( $m/z$ ). Je velice citlivý, s minimální spotřebou vzorku. Hmotnostní spektrometrie je destruktivní analytická metoda, sloužící k převedení

molekul na ionty, rozlišení těchto iontů podle poměru  $m/z$  a následnému záznamu relativních intenzit jednotlivých iontů, jejichž interpretací lze určit relativní molekulovou hmotnost ( $M_r$ ) a další strukturální informace.

V počáteční fázi vývoje se využívalo pro spojení HPLC/MS klasické elektronové ionizace (EI), popř. chemické ionizace (CI), které byly později překonány tzv. spojením „Particle beam“, rovněž využívající EI. Tyto techniky se řadí mezi tzv. „tvrdé“ ionizační techniky.

V posledních letech byly navrženy speciální ionizační techniky pro spojení HPLC/MS jako je termosprej, elektrosprej nebo chemická ionizace za atmosférického tlaku, které patří mezi tzv. „měkké“ ionizační techniky a umožňují určení  $M_r$  i pro sloučeniny, u kterých při elektronové ionizaci není pozorován molekulární ion. Jednoduchost hmotnostních spekter získaných „měkkými“ ionizačními technikami je výhodná pro určení  $M_r$  neznámé látky, ale na druhé straně malé množství fragmentových iontů může znesnadňovat odvození struktury<sup>[8]</sup>.

### **2.1.3.4 Princip chromatografického procesu v HPLC**

Na začátek kolony, kterou protéká mobilní fáze, se vnese malý objem směsi (vzorku). Chromatografované látky jsou protékající mobilní fází unášeny kolonou, přičemž opakovaně interagují se stacionární fází a opět přecházejí do fáze mobilní. Liší-li se od sebe distribuční konstanty takto dělených látek dostatečně, pak po určité době dojde k částečnému nebo úplnému rozdělení těchto látek do izolovaných pásů (zón) <sup>[3]</sup>.

Základní **kvalitativní** charakteristikou v HPLC je retenční (eluční) čas  $t_R$ . Důkazem totožnosti zkoumané látky v analyzovaném vzorku je shoda retenčního času chromatografického píku analytu s retenčním časem píku standardu. Některé moderní UV detektory umožňují sejmout UV spektrum v maximu chromatografického píku, proto může být další identifikační charakteristikou shoda UV spekter vzorku a standardu <sup>[4]</sup>.

**Kvantitativní** charakteristikou v HPLC je plocha (event. výška) chromatografického píku.

Pro stanovení jednotlivých složek ve směsi se nejčastěji používají dvě metody:

#### **a) metoda vnějšího standardu**

Tato metoda spočívá ve dvou krocích (dvojím dávkování). V prvním kroku se na kolonu nastříkne roztok analyzovaného vzorku a registruje se chromatografický záznam. V druhém kroku se nastříkne roztok vnějšího standardu a opět se registruje chromatogram. Jako vnější standard se zpravidla u substancí používá standard stanovované látky (CRL), u složených přípravků to pak bývá jedna z analyzovaných složek směsi.

#### **b) metoda vnitřního standardu**

Na rozdíl od předcházející není tato metoda zatížena chybou dvojího nástřiku. Ke známému objemu roztoku vzorku se přidá definovaný objem roztoku vhodného vnitřního standardu a směs se nastříkuje na kolonu. Při výběru vnitřního standardu se musí dbát na to, aby standard byl eluován v blízkosti píků, které budou vyhodnocovány, dále musí mít podobnou koncentraci jako stanovované látky a musí být chemicky inertní.

Předpokladem úspěšné HPLC analýzy je optimalizace chromatografických podmínek tak, aby jednotlivé separované složky směsi poskytovaly ostré chromatografické píky, rozdělené pokud možno až na základní linii<sup>[4]</sup>.

Při *isokratické eluci* se kolona (stacionární fáze) promývá mobilní fází o konstantní eluční síle (konstantním složením) tak dlouho, až všechny složky kolonu opustí.

Při *gradientové eluci* se eluční síla mobilní fáze s časem mění. Změna složení fáze s časem může být buď diskontinuální nebo kontinuální. Diskontinuální znamená vícestupňovou (stupňovitou) eluci, kdežto kontinuální znamená, že se složení mobilní fáze mění lineárně nebo nelineárně. Gradientová eluce se používá v případech, kdy za isokratických podmínek dochází k velkým rozdílům v retenci chromatografovaných látek. Tímto se docílí zkrácení analýzy či ostřejšímu rozdělení látek<sup>[3]</sup>.

Hlavními přednostmi HPLC jsou:

- a) možnost kvalitativního i kvantitativního hodnocení separovaných složek směsi
- b) rychlost analýzy
- c) citlivost stanovení (dle detektoru)
- d) minimální množství vzorku
- e) možnost automatizace<sup>[4]</sup>

Využití HPLC v analýze léčiv je zejména v těchto oblastech:

- a) kontrolně – analytická (identifikaci léčiv, stanovení obsahu, čistota - převážně u složených lékových přípravků)
- b) hodnocení stability léčiv
- c) analýza přírodních léčiv v rostlinném materiálu
- d) monitorování léčiv a jejich metabolitů v tělních tekutinách<sup>[5]</sup>

## 2.1.4 VALIDACE ANALYTICKÉ METODY [5, 7]

Validace analytické metody je proces, kterým se zjišťují nejdůležitější charakteristiky metody. Jejím cílem je prokázat pomocí experimentálních dat a jejich matematického a statistického zpracování, že metoda je vhodná pro zamýšlené použití a získané výsledky analýzy jsou spolehlivé. Validace zajišťuje, že metoda má určitou spolehlivost při opakovaném použití v jedné nebo i v různých laboratořích; provádí se nejenom při vývoji nové metody, ale také byla-li metoda změněna či má-li být přenesena do jiné laboratoře, anebo při průkazu rovnocennosti dvou metod. Postup a provedení validace se dokumentují validačním protokolem.

Podle toho, k jakému účelu má analytická metoda sloužit, ověřují se následující parametry:

### **Přesnost analýzy (precision)**

Tento test hodnotí těsnost shody mezi jednotlivými výsledky metody opakovaně získanými s jedním homogenním vzorkem. Vyjadřuje se jako relativní směrodatná odchylka jednotlivých stanovení.

Dle podmínek se dělí na dvě hlavní složky:

**opakovatelnost** (repeatability), kdy se opakovaně měří stejný vzorek jedním pracovníkem na stejném zařízení, a

**reprodukovatelnost** (reproducibility), kdy se stejný vzorek analyzuje různými pracovníky na různých zařízeních v různých laboratořích.

Někdy se ještě můžeme setkat s podrobnějším dělením na třetí složku - *mezilaborní přesnost*, kdy se metoda provádí s různými činidly, analytiky i přístroji, v různý den, ale v jedné laboratoři se stejným homogenizovaným vzorkem

Předepsaným způsobem se připraví určitý počet vzorků analyzované látky a nastříkne se do chromatografu. Změří se odpovídající plochy píků pro hlavní analyzovanou látku i pro přítomné vedlejší látky a získané hodnoty se použijí pro výpočet průměrné hodnoty ( $\bar{a}$ ) a směrodatné odchylky ( $s$ ) podle vzorců:

$$\bar{a} = (a_i) / n$$

$$s = (a_i - \bar{a})^2 / (n-1),$$

kde  $(a_i)$  odpovídá poměru plochy píku hlavní analyzované látky ku ploše píku přítomné vedlejší látky a  $(n)$  odpovídá počtu jednotlivých stanovení pro daný vzorek.

Relativní směrodatná odchylka se pak vypočítá dle následujícího vztahu:

$$RSD = 100 s / \bar{a}$$

### **Správnost metody (accuracy)**

Tento test charakterizuje těsnost shody mezi výsledky analýzy a přijatou referenční hodnotou. Touto referenční hodnotou může být skutečný známý obsah látky nebo obsah zjištěný jinou nezávislou metodou, jejíž správnost je zaručena.

Správnost se obvykle zjistí analýzou nejméně šesti vzorků. V případě, že se stanovovaná látka nachází v matrici, která může při měření interferovat, testuje se správnost metody pomocí standardního přídatku účinné látky a to buď k samotné matrici nebo k analyzovanému přípravku; její známá koncentrace je  $c_o$ , koncentrace stanovená u modelového vzorku je  $c_i$ .

Správnost se hodnotí pomocí výtěžnosti (recovery), která se vypočítá dle vzorce:

$$R_i (\%) = 100 c_i / c_o$$

### **Linearita (linearity)**

Linearita je definována jako schopnost metody poskytovat v definovaném intervalu výsledky přímoúměrné koncentraci analytu ve vzorku. Tento test hodnotí kvalitu závislosti plochy píku na koncentraci analyzované látky v rozmezí +/- 50% očekávané koncentrace. Linearitu charakterizuje korelační koeficient  $r$  regresní rovnice přímky  $y = ax + b$ , který by se měl blížit jedné.



### **Selektivita (selectivity)**

Selektivita je schopnost analytické metody správně a specificky stanovit analyt v přítomnosti jiných možných látek (další účinné látky, pomocné látky, nečistoty, rozkladné produkty, zbytková rozpouštědla). Testuje se tak, že se připraví jeden roztok standardu analyzované látky s přídavkem asi 5% látek vedlejších. Třikrát se nastříkne do chromatografu, změří se plocha signálu analyzované látky, vypočítá se průměrná hodnota ( $A_i$ ) a selektivita se pak vypočte dle vzorce:

$$SL (\%) = 100 A_o - A_i / A_o$$

Ovšem v praxi se pro hodnocení selektivity více využívá porovnávání vlastních chromatogramů, u kterých se sleduje, zda píky hodnocených látek (standardů, srovnávacích modelových vzorků) neinterferují s píky placebo.

### **Detekční a kvantitativní limit**

Detekční limit (**limit of detection, LOD**) vyjadřuje citlivost metody. Je to nejnížší detekovatelná koncentrace látky, nestanovované kvantitativně, za definovaných experimentálních podmínek. Definuje se jako trojnásobek směrodatné odchylky odezvy slepého pokusu – šumu.

Kvantitativní limit (**limit of quantitation, LOQ**) je taktéž parametrem citlivosti metody a je to nejnížší koncentrace látky stanovitelná s přijatelnou přesností a správností. Definuje se jako desetinásobek směrodatné odchylky šumu.

Směrodatnou odchylku šumu lze odhadnout při měření placebo ze záznamu šumu v okolí retenčního času stanovované látky. Středem šumu se narýsuje nulová linie a od ní se změří největší kladná a záporná amplituda šumu; z tohoto rozpětí je možno odhadnout jeho směrodatnou odchylku vydělením pěti. Za limitující relativní směrodatnou odchylku se považuje 10%.

$$S_n = (r^+ - r^-) / 5$$

Detekční a kvantitativní limit lze také získat výpočtem podle vzorců:

$$\text{LOD} = 3 S_n K / b_1$$

$$\text{LOQ} = 10 S_n K / b_1,$$

kde  $K$  je poměr charakteristický pro stanovovanou látku (plocha píku / výška píku) a  $b$  je poměr daný směrnicí regresní rovnice (plocha píku / koncentrace analytu - viz linearita).

### **Robustnost (robustness)**

Analytická metoda je robustní, jestliže přesnost stanovení není ovlivněna malými změnami pracovních podmínek. U metod využívajících HPLC jsou to zejména složení mobilní fáze, pH vodné složky mobilní fáze, teplota na koloně, rychlost průtoku, aj. K tomuto testu se připraví vzorek standardu analyzované látky, několikrát se nastříkne do chromatografu a změří se odpovídající plochy píku. Před každým nástřikem se změní pracovní podmínky na dvou úrovních – spodní a horní.

### **2.1.5 DERIVATIZACE V HPLC** <sup>[9]</sup>

Derivatizace vzorku v HPLC se obvykle provádí z několika důvodů. Buď je potřeba zvýšit citlivost či umožnit detekci, nebo je potřeba zvýšit rozlišení či umožnit separaci, anebo je potřeba zamezit nežádoucí sorpci látek na koloně.

Derivatizace může být provedena na několika různých úrovních:

- a) Předkolonová derivatizace (pre-column chromatography), kdy chemická reakce probíhá před kolonou
- b) Postkolonová derivatizace (post-column chromatography), kdy chemická reakce probíhá za kolonou
- c) Derivatizace na koloně, kdy chemická reakce probíhá přímo v koloně

Pro účely této práce byla použita předkolonová derivatizace, proto jsou dále podrobněji popsány možnosti této metody.

#### **Předkolonová derivatizace**

Předkolonová derivatizace klade značné nároky na experimentální provedení a zkušenost pracovníka, zejména v reprodukovatelnosti výsledků. Na deriváty jsou kladeny tyto požadavky:

1. derivát musí být chemické individuum a měl by být dostatečně stabilní
2. derivatizační reakce musí probíhat kvantitativně
3. derivatizační reakce nemusí probíhat rychle
4. reakce by měla být pokud možno selektivní
5. reakce by měla být bez vedlejších produktů a měla by probíhat za mírných reakčních podmínek (pH, teplota) tak, aby nebyla nutná předseparace vzniklého individuua
6. při použití nadbytku derivatizačního činidla musí být dobře separovatelné od svých produktů na koloně a pokud možno by mělo mít jiné fyzikálně-chemické vlastnosti (nevykazuje fluorescenční vlastnosti)

## Derivatizační reakce a činidla

Použití derivatizačních postupů, reakcí a činidel se odvozuje od povahy analyzované látky a na základě zkušeností či literární rešerše.

Stanovení aminosloučenin metodou HPLC je limitováno detekcí a to nepřítomností vhodného chromoforu v molekule. Vlastní kvantifikace aminů v HPLC je bez předchozí derivatizace velmi obtížná. Mechanismus derivatizace primární a sekundární aminoskupiny je obvykle reakce nukleofilní substituční reakcí.

Mezi často používaná derivatizační činidla patří **isokyanáty a isothiokyanáty, acylchloridy, arylsulfonylchloridy a nitrobenzeny**.

Pro předkolonovou derivatizaci aminů o počtu uhlíků C3 až C10 a aminokyselin lze použít *fenylisothiokyanát* (PITC). Reakce probíhá ve dvou stupních přes fenylthiokarbamoyl-aminokyseliny až na fenylthiohydantoiny (PTH), které vznikají cyklizací fenylthio-karbamoyluaminokyseliny. Nevýhodou je, že samotné činidlo reaguje s interferujícími látkami (reziduální kyseliny) ve vzorku a ty dávají interferující píky na chromatogramu. Proto se musí vzorek dvakrát odpařovat k suchu a to před přidavkem činidla a následně po reakci se nadbytek činidla odstraňuje za vysokého vakua vysušením přes noc nad pevným NaOH.

S alifatickými i aromatickými primárními a sekundárními aminy reaguje fenylisokyanát za vzniku N,N'-disubstituované močoviny. Reakce je kvantitativní a probíhá v několika minutách. Primární aminy poskytují vždy velmi stabilní deriváty. Reakce probíhá v N,N'-dimethylformamidu, nadbytek činidla se odstraňuje přidavkem alifatického alkoholu.

**Acylchloridy** (p-methoxybenzoylchlorid, m-toluoylchlorid, benzoylchlorid) reagují obecně s aminoskupinou za vzniku amidů, přičemž reakce probíhá vždy v alkalickém prostředí, protože se v reakčním prostředí uvolňuje kyselina chlorovodíková a ta by se vážala na původní amin. Jako bazická činidla se používají pyridin, hydroxid sodný nebo triethylamin.

Mezi nejpreferovanější z této skupiny činidel pro diaminy i polyaminy patří *benzoylchlorid*.

**Arylsulfonylchloridy** reagují s primárními i sekundárními aminy za vzniku sulfonamidů, reakční podmínky jsou obdobné jako při reakci acylchloridů. *Dimethylaminoazobenzensulfonylchlorid* je jedno z derivatizačních činidel používaných ke stanovení aminokyselin. Deriváty sulfonamidů mají absorpční maximum při 420 až

450 nm a dovolují tak detekci při vyšších vlnových délkách a nedochází tak k interferencím na chromatografické koloně.

Ze skupiny **nitrobenzenů** se k derivatizaci aminů a aminokyselin používá činidlo *2,4-dinitro-1-fluorbenzen* (DNFB - též Sangerovo činidlo) a *trinitrobenzensulfonová kyselina* (TNBSA) pro stanovení aminoglykosidů v biologických materiálech.

## **2.1.6 LITERÁRNÍ REŠERŠE DERIVATIZACE AMINŮ V HPLC**

**Bahrami G., et al.** <sup>[10]</sup>: HPLC senzitivní mikroanalýza gabapentinu po derivatizaci s 4-chloro-7-nitrobenzofurazonem

Ke 100 µl vzorku bylo přidáno 400 µl acetonitrilu, krátce promícháno (10s) a centrifugováno. Kapalina po odstředění byla vysušena proudem dusíku při 50°C. Odparek byl rozpuštěn ve 100 µl roztoku derivatizačního činidla, pak se přidalo 25 µl fosfátového pufru, krátce promíchalo (10s) a vzorky se po 10min zahřívaly při 60°C. Reakce byla zastavena přidáním 40 µl glycinu. Detekce probíhala fluorimetricky.

**Tsuji K., et al.** <sup>[11]</sup>: Derivatizace sekundárních aminů s 2-naftalensulfonylchloridem u spektinomycinu

Derivatizace sekundárních aminů u spektinomycinu probíhala s činidlem 2-naftalensulfonyl-chlorid za současné přítomnosti linkomycinu, 1-methylpyrrolu, 2-acetyl-1-methylpyrrolu a 2-acetyl-pyrrolu jako katalyzátorů, jinak by derivatizační reakcí vznikla značná část aktinospektinové kyseliny – rozkladného produktu spektinomycinu. Chromatografie probíhala v koloně s normální fází a UV detekce byla při 254 nm.

**Herraez-Hernandez R., et al.** <sup>[12]</sup>: Analýza amfetaminu v moči kapalinovou chromatografií užitím extrakce na pevné fázi a derivatizace s 3,5-dinitrobenzoylchloridem

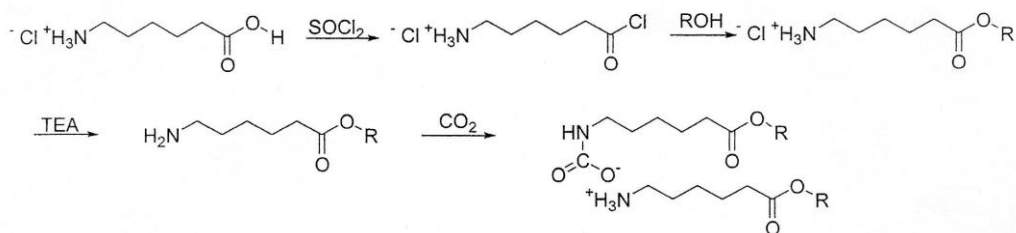
Extrakce a derivatizace na pevné fázi C-18 byla shledána jako nejlepší varianta pro analýzu vzorků v moči. Oproti normální derivatizaci roztoku poskytuje tato metoda výtěžnost 85-102%.

**Heimbecher S., et al.** <sup>[13]</sup>: Derivatizace a HPLC analýza pentahydrochloridu pentaazapentakosanů

Derivatizace pentaazapen-tacosan (PAPC) pentahydrochloridu s činidlem dansylchlorid byla optimalizována při pH 11.0 a dvacetinásobném nadbytku činidla. Analýza probíhala na koloně s reverzní fází C8, s mobilní fází složenou z acetátového pufru a acetonitrilu a s UV detekcí.

## 2.2 TRANSKARBAMY

Transkarbamy patří do skupiny akceleračních transdermálních permeací, neboli urychlovačů průniku léčiv přes bariéru kůže. Chemickou strukturou jsou to symetrické amoniové soli kyseliny karbámové. Vznikají reakcí esterů 6-aminohexanové kyseliny s oxidem uhličitým dle následujícího schématu:



R = - C<sub>8</sub>H<sub>17</sub> transkarbam 8

R = - C<sub>9</sub>H<sub>19</sub> transkarbam 9

R = - C<sub>10</sub>H<sub>21</sub> transkarbam 10

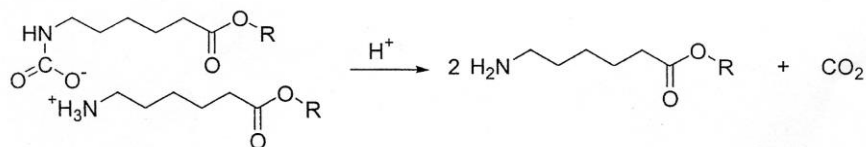
R = - C<sub>11</sub>H<sub>23</sub> transkarbam 11

R = - C<sub>12</sub>H<sub>25</sub> transkarbam 12

### *Fyzikální vlastnosti:*

Transkarbamy jsou bezbarvé nebo mírně nažloutlé mikrokrytalické látky, velmi málo rozpustné ve vodě a nerozpustné ve většině organických rozpouštědel. pH jejich suspenze ve vodě může vystoupat během několika dní (při t = 35°C) až na hodnotu 8,2, což by svědčilo o jejich velmi pomalém rozpouštění.

Dobře se rozpouštějí v toluenu (t = 45°C), aniž by byla narušena jejich struktura, a z něho se je též daří krystalovat. Výborně se rozpouštějí v chloroformu, ale dochází tímto k rozkladu soli karbámové kyseliny a uvolnění oxidu uhličitého, způsobené patrně přítomností HCl, byť jen ve stopovém množství.

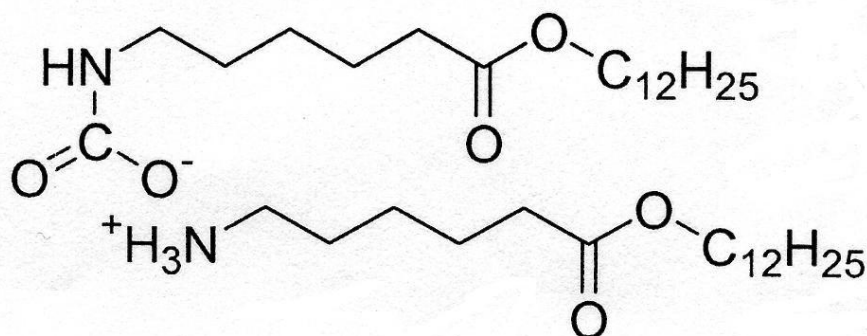


K rozkladu karbamátu dochází také vlivem velmi slabých kyselin v bezvodém prostředí, např. kyseliny palmitové, či působením tepla nebo ultrazvuku.

### 2.2.1 Transkarbam 12 <sup>[14, 15, 16]</sup>

Transkarbam 12 (T 12) je nejperspektivnější látka z této skupiny, která byla syntetizována již počátkem 90.let na Katedře anorganické a organické chemie Farmaceutické fakulty UK <sup>[15]</sup>. Transkarbam 12 dokáže urychlit průnik léčiv přes kůži až 40krát a je výrazně účinnější než většina urychlovačů. Principem účinku těchto sloučenin je interakce s komplexem lipidů v mezibuněčných prostorech rohové vrstvy, která představuje hlavní kožní bariéru. Tyto lipidy jsou v této části kůže velmi dobře a pevně seskupeny v organizované lamely. Složením se jedná o směs mastných kyselin, cholesterolu a jeho esterů, ale hlavní zastoupení zde mají ceramidy. Jsou to sloučeniny sfingosinu (popř. jeho strukturních obměn) s mastnými kyselinami s počtem uhlíků asi 22 – 34. Díky podobným vlastnostem transkarbamu 12 s ceramidy se podařilo tyto struktury specificky zasáhnout. Jeho působením jsou lamely reversibilně rozvolněny a vzniklé nepravidelnosti pak představují cestu, kterou může léčivo proniknout do kůže.

*Charakteristika transkarbamu 12:*



Sumární vzorec:	C <sub>37</sub> H <sub>74</sub> N <sub>2</sub> O <sub>6</sub>
Molární hmotnost:	643,0
Teplota tání:	61 – 64°C
Rozpustnost:	toluen, špatně ethanol a vyšší alkoholy, nerozpustný v etherech, uhlovodících a halogenovaných uhlovodících



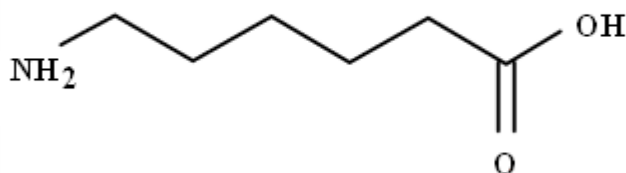
Zvláštní vlastností transkarbamu je uvolňování CO<sub>2</sub> při zahřátí nad 50°C, který však zůstává na svém „původním místě“ mezi řetězci vzniklého aminoesteru a při poklesu teploty vytváří opět stabilní sůl. Oxid uhličitý zřetelně neuniká ani při teplotě tání transkarbamů (únik není pozorován pod mikroskopem). Pokud se však roztok zahřeje, CO<sub>2</sub> unikne a vznikne odpovídající dodecylester 6-aminohexanové kyseliny <sup>[16]</sup>.

### **2.2.2 Kyselina 6-aminohexanová**<sup>[17, 18, 19]</sup>

Estery kyseliny 6-aminohexanové jsou výchozími látkami pro syntézu transkarbamů. Lze tedy předpokládat, a ze struktury transkarbamu 12 odvodit, že kyselina 6-aminohexanová bude též jedním z hlavních rozkladných produktů hydrolytického štěpení.

Kyselina 6-aminohexanová je analogem esenciální aminokyseliny lysinu. V lidském organismu působí jako antifibrinolytický faktor, který podporuje rychlou disociaci plasminu a tím inhibuje aktivátory plasminogenu a následnou fibrinolýzu.

*Struktura a vlastnosti:*



Sumární vzorec:	C <sub>6</sub> H <sub>13</sub> NO <sub>2</sub>
Molární hmotnost:	131,173 g/mol
Teplota tání:	205 – 212°C
Rozpustnost:	bílý mikrokrytalický prášek rozpustný ve vodě (50 mg/ml), methanolu

### 3. CÍL PRÁCE

Cílem práce bylo HPLC stanovení kyseliny 6-aminohexanové, rozkladného produktu transkarbamu 12, v topickém přípravku s následnou validací metody. Kyselina 6-aminohexanová se hodnotila po derivatizaci v mast'ovém základu, a proto bylo nejprve nutné optimalizovat chromatografické podmínky analýzy. Po výběru vhodných podmínek gradientové eluce byla sestrojena kalibrační křivka pro kvantifikaci kyseliny 6-aminohexanové za použití vnitřního standardu. Následně byla provedena validace s ověřováním jednotlivých parametrů jako linearita, selektivita, přesnost a správnost, robustnost metody a detekční a kvantitativní limit.

## 4. PRAKTICKÁ ČÁST

### 4.1 Použitý materiál

#### 4.1.1 Chemikálie

Octan sodný, trihydrát, p.a.	Lach-Ner, s.r.o., Neratovice ČR
Acetonitril, p.a.	Balex, Pardubice – Rosice nad Labem
Methanol, p.a.	Sigma-Aldrich, Germany
Triethylamin, č.	Fluka, Germany
3,5-dinitrobenzoylchlorid, 98% č.	Fluka, Germany
Mast'ový základ (placebo)	KFT, FaF UK, Hradec Králové ČR
Octová kyselina, 99,8% p.a.	Fluka, Germany
7-aminoheptanová kyselina, 98%	Aldrich, Germany
6-aminohexanová kyselina, p.a.	KAOCH, FaF UK, Hradec Králové ČR
Transkarbam 12	KAOCH, FaF UK, Hradec Králové ČR
DNBD transkarbamu 12	KAOCH, FaF UK, Hradec Králové ČR
DNBD dodecylalkoholu	KAOCH, FaF UK, Hradec Králové ČR
DNBD aminohexanové kyseliny	KAOCH, FaF UK, Hradec Králové ČR

#### 4.1.2 Chromatografický materiál

skleněná analytická kolona pro HPLC	
Separon SGX C <sub>18</sub> (150 × 3,0 mm I.D., 5 μm)	Tessek Ltd., Praha, ČR

### **4.1.3 Přístroje**

Chromatografický systém HP 1100

Agilent Technologies, Palo Alto, USA

- binární čerpadlový systém

- vakuový degaser

- termostatovaná kolona

- detektor s proměnlivou vlnovou délkou

- autosampler

Program na hodnocení chromatografických dat

Agilent Technologies, Palo Alto, USA

HP Chemstation

Analytické váhy

Sartorius analytic, NSR

Centrifuga T 51

Zentrifugbau, Angersdorf, NDR

pH metr SCHOTT

SCHOTT, Hofheim, Germany

Aparatura pro zahřívání pod zpětným chladičem

### **4.1.4 Pomůcky**

Mikrostríkačka 25  $\mu$ l

Hamilton, Švýcarsko

Teflonový mikrofiltr

Tessek Ltd., Praha, ČR

## **4.2 Příprava pufru**

Octanový pufr o koncentraci 20 mM a pH 4,5 tvořil hlavní složku mobilní fáze a byl připravován dle následujícího postupu:

*Příprava 1000 ml 20 mM octanového pufru o pH 4,5:*

Navážka přibližně 2,7216g octanu sodného byla rozpuštěna asi v 900ml destilované vody. Za stálého míchání na magnetickém míchadle bylo měřeno pH a zásobní roztok byl postupně okyselován 10% roztokem kyseliny octové až do dosažení požadovaného pH. Zásobní roztok byl nakonec v odměrné baňce doplněn vodou na 1000ml.

## **4.3 Příprava vzorků pro HPLC analýzu**

*Postup derivatizace pro hodnocení kyseliny 6-aminohexanové v mastovém základu:*

K navážce vzorku (asi 0,1 g placebo) byly do baňky přidány 3 ml methanolu, 0,2 ml triethylaminu (TEA) a 20 mg 3,5-dinitrobenzoylchloridu (DNBC). Směs v baňce byla zahřívána pod zpětným chladičem po dobu 30 minut při 65°C. Poté byl obsah baňky zahuštěn do sucha proudem dusíku. K odparku byl přidán 1 ml mobilní fáze a po rozpuštění byl vzorek centrifugován 5 minut při 3600 ot/min. Mírně zakalená kapalina byla odebrána injekční stříkačkou a přefiltrována přes teflonový mikrofiltr, aby byl vzorek pro HPLC analýzu čirý.

#### **4.4 Chromatografické podmínky analýzy**

HPLC podmínky použité při kvantifikaci kyseliny 6-aminohexanové v masťovém základu:

- Kolona Separon SGX C-18 (150 x 3 mm I.D., 5  $\mu$ m), Tessek, Praha
- Složení mobilní fáze: směs acetonitrilu a 20mM octanového pufru o pH 4,5; gradientová eluce dle následující tabulky:

**Tab. 4 Použitý gradient eluce**

čas (min)	acetonitril (%v/v)	octanový pufr 20mM pH 4,5 (%v/v)
0 - 4	32,5	67,5
4 - 10	32,5 $\rightarrow$ 80	67,5 $\rightarrow$ 20
10 - 23	80	20
23 - 30	32,5	67,5

- Průtok mobilní fáze: 1 ml/min
- UV detekce při 230 nm
- Nástřik 20  $\mu$ l vzorku

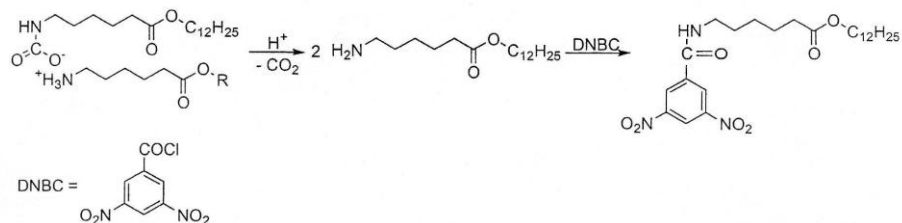
## 5. VÝSLEDKY A DISKUSE

### 5.1 Optimalizace podmínek HPLC analýzy

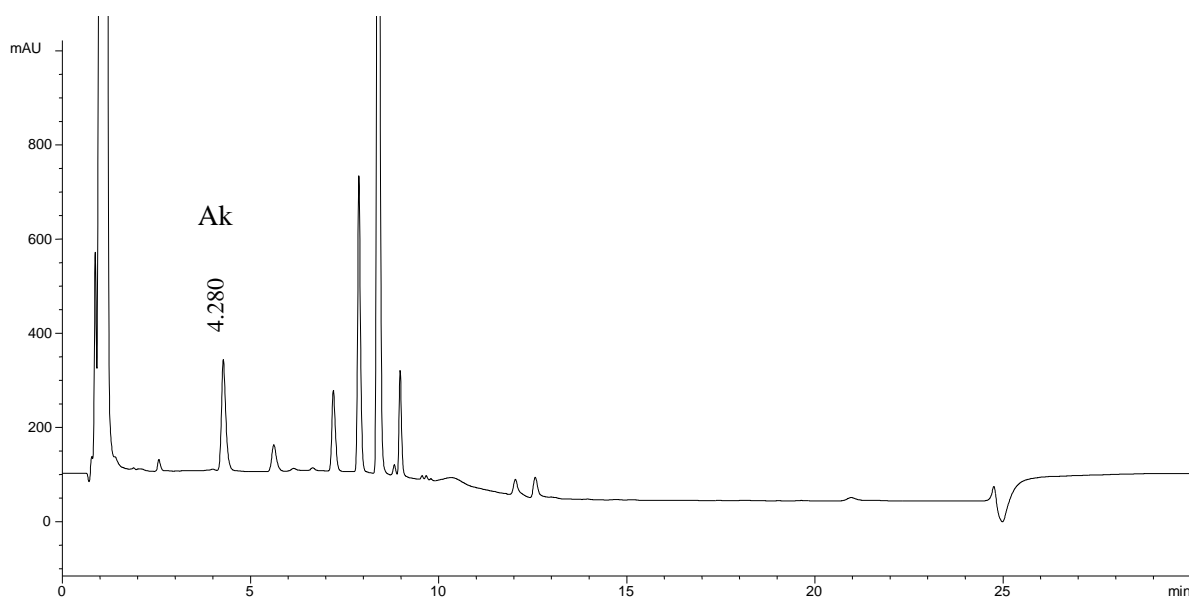
Před vlastní HPLC analýzou bylo nutné vzorky upravit tak, aby se daly nastříknout na kolonu a zároveň byly dobře detekovatelné. Pracovalo se jak s čistými vzorky transkarbamu (T) a jeho rozkladných produktů kyseliny  $\omega$ -aminohexanové (Ak) a dodecylalkoholu (D), tak i s jejich derivatizovanými standardy.

Jelikož transkarbam 12 neobsahuje ve své molekule žádné chromofory, které by způsobily žádanou absorpci světla v UV oblasti, musela být jeho molekula před HPLC analýzou derivována. Jako derivační činidlo byl použit 3,5-dinitrobenzoylchlorid (DNBC). Produktem derivatizace pak byl 3,5-dinitrobenzoylderivát transkarbamu 12 (DNBD-T), který již vykazuje zvýšenou absorpci v UV oblasti. Stejným způsobem byly derivovány i ostatní použité vzorky.

Derivatizační reakce:



Převážná část analytického postupu včetně činidla byla převzata z předcházejících prací<sup>[20, 21]</sup>, v nichž bylo zjištěno, že hodnotit transkarbam 12 a obě jeho nečistoty (Ak i D) současně po jejich derivatizaci nelze, a to z důvodu rozdílné rozpustnosti. Transkarbam 12 i dodecylalkohol se rozpouští v chloroformu (v němž oba lze derivatizovat a analyzovat), zato kyselina 6-aminohexanová je v chloroformu nerozpustná, ale rozpouští se v metanolu. V tomto prostředí ji lze snadno derivatizovat, zatímco transkarbam ani dodecylalkohol se v metanolu téměř nerozpouští a deriváty netvoří<sup>[22]</sup>. Experimentálně bylo ověřeno, že když je přidána ke vzorku masti Ak, T a D, derivatizuje se pouze Ak, jak dokládá následující chromatogram:



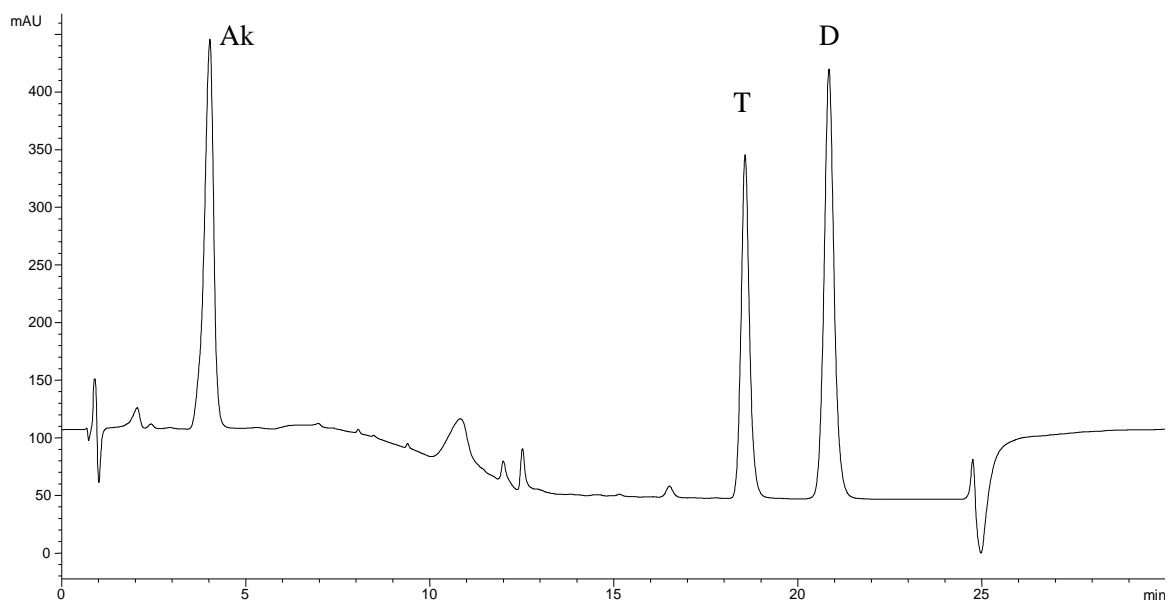
**Obr. 6** Placebo a jednotlivé látky Ak, T a D o c = 0,1 mg/ml derivatizované dohromady, chromatografické podmínky v kap. 4.4



Tato práce je zaměřena na kvantifikaci kyseliny 6-aminohexanové ve vzorku masti s derivatizací prováděnou v metanolu. Z toho důvodu byla při vypracování přidávána k placebo pouze kyselina 6-aminohexanová, nikoliv již transkarbam ani dodecylalkohol. Na závěr byla upravena poslední fáze derivatizačního postupu. Aby byl nastříkovaný vzorek čistý, musel být supernatant přefiltrován přes teflonový mikrofiltr.

Při vlastní HPLC analýze byl z převzatých chromatografických podmínek <sup>[22]</sup> upraven pouze gradient eluce. Pro dosažení optimálních podmínek separace všech složek (Ak, IS, T a D) musely být gradient eluce a délka analýzy prodlouženy, jelikož doba eluce byla krátká a píky transkarbamu a dodecylalkoholu se vymývaly až v následující analýze.

K tomuto ověření byl použit roztok směsi standardů dinitribenzoylderivátů transkarbamu (DNBD-T), kyseliny 6-aminohexanové (DNBD-Ak) a dodecylalkoholu (DNBD-D) bez masťového základu. Analýza probíhala za optimalizovaných chromatografických podmínek uvedených v kap. 4.4. Výsledky analýzy po úpravě podmínek uvádí následující obrázek:



**Obr. 7** Směs derivovaných standardů ( $c = 0,1 \text{ mg/ml}$ ) separovaných za chromatografických podmínek uvedených v kap. 4.4.

## **5.2 Kvantitativní hodnocení 6-aminohexanové kyseliny**

Kvantitativní hodnocení kyseliny 6-aminohexanové bylo prováděno jak se vzorkem již derivovaného standardu DNBD-Ak, tak i se vzorkem získaným následnou derivatizací, oba s použitím kyseliny 6-aminoheptanové jako vnitřního standardu (IS). Analýza probíhala dle chromatografických podmínek uvedených v kap. 4.4. Výsledky byly vyhodnoceny pomocí kalibrační křivky, a to:

- I. kalibrací roztoků získaných přidáním derivovaného standardu 6-aminohexanové kyseliny DNBD-Ak k již derivovanému mast'ovému základu a přidáním již derivovaného vnitřního standardu
- II. kalibrací roztoků získaných derivatizací kyseliny 6-aminohexanové (Ak) s mast'ovým základem a vnitřním standardem dohromady

*ad I) Kalibrace roztoků derivovaného standardu v derivovaném mast'ovém základu s již derivovaným vnitřním standardem*

### **Příprava vzorků:**

Základní roztok DNBD-Ak byl připraven rozpuštěním 10,0 mg derivovaného standardu 6-aminohexanové kyseliny v 10 ml mobilní fáze ( $c = 1 \text{ mg/ml}$ ).

Roztok placebo byl připraven navážením 0,1 g čistého mast'ového základu, který byl rozpuštěn ve 3 ml methanolu a 0,2 ml TEA. K tomu bylo přidáno 20 mg derivatizačního činidla DNBC a zahříváno na vodní lázni při 65°C pod zpětným chladičem po dobu 30 minut. Poté byl roztok odfoukán dusíkem do sucha. Odparek byl rozpuštěn v 1 ml mobilní fáze a centrifugován 5 minut při 3600 ot/min. Mírně zkalený supernatant byl přefiltrován přes teflonový filtr.

Roztok vnitřního standardu byl připraven analogicky jako roztok placebo, s tím rozdílem, že navážka kyseliny 6-aminoheptanové byla 1,0 mg (výsledná  $c = 1 \text{ mg/ml}$ ) a vzorek po centrifugaci nemusel být filtrován.

Pro sestavení kalibrační křivky byla použita řada pěti roztoků se vzrůstající koncentrací od 0,1; 0,15; 0,25; 0,3; do 0,4 mg DNBD-Ak/ml o objemu 200 $\mu$ l, který postačí pro čtyři nástřiky. Roztok vnitřního standardu byl přidáván v konstantním množství o cílové koncentraci 0,2 mg/ml. Vzorky byly připraveny následujícím způsobem:

**0,1 mg/ml:** 20  $\mu$ l základního roztoku DNBD-Ak + 40  $\mu$ l roztoku IS + 140  $\mu$ l roztoku placebo

**0,15 mg/ml:** 30  $\mu$ l základního roztoku DNBD-Ak + 40  $\mu$ l roztoku IS + 130  $\mu$ l roztoku placebo

**0,25 mg/ml:** 50  $\mu$ l základního roztoku DNBD-Ak + 40  $\mu$ l roztoku IS + 110  $\mu$ l roztoku placebo

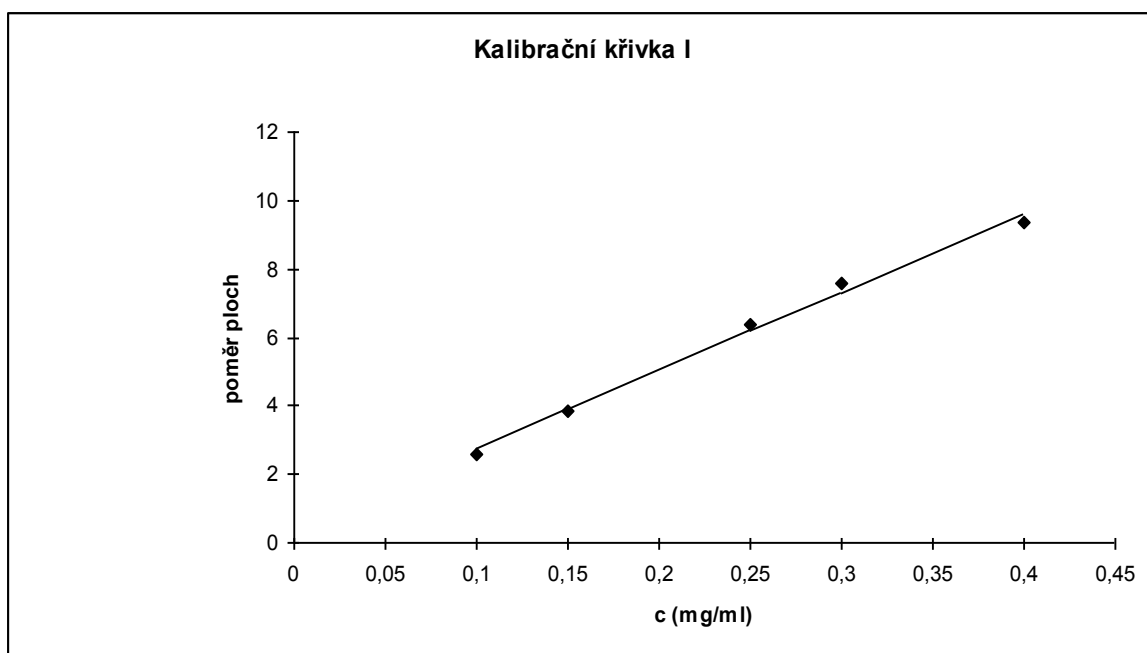
**0,3 mg/ml:** 60  $\mu$ l základního roztoku DNBD-Ak + 40  $\mu$ l roztoku IS + 100  $\mu$ l roztoku placebo

**0,4 mg/ml:** 80  $\mu$ l základního roztoku DNBD-Ak + 40  $\mu$ l roztoku IS + 80  $\mu$ l roztoku placebo

Kalibrační křivka I byla sestavena jako graf závislosti poměru plochy píku Ak ku ploše píku IS na koncentraci vzorku. Hodnoty pro sestavení kalibrační křivky I uvádí tab. 5, kde *c* je odpovídající koncentrace vzorku,  $\bar{a}$  je průměrná hodnota poměrů plochy píku Ak a plochy IS ze čtyř stanovení a *s* je směrodatná odchylka vypočítaná pro jednotlivé koncentrace.

**Tab. 5** Hodnoty pro sestavení kalibrační křivky I

<b>c (mg/ml)</b>	<b>0,1</b>	<b>0,15</b>	<b>0,25</b>	<b>0,3</b>	<b>0,4</b>
1.	2,582372	3,899953	6,398612	7,480936	9,347771
2.	2,640426	3,855309	6,457826	7,411716	9,331561
3.	2,603706	3,798887	6,324754	7,424963	9,272387
4.	2,58954	3,884551	6,323276	7,938399	9,382398
<b><math>\bar{a}</math></b>	<b>2,604011</b>	<b>3,859675</b>	<b>6,376117</b>	<b>7,564004</b>	<b>9,33353</b>
<b>s</b>	$\pm 0,022382$	$\pm 0,038586$	$\pm 0,056153$	$\pm 0,217713$	$\pm 0,039791$



**Obr. 8 Kalibrační křivka I**

Následující tabulka uvádí parametry kalibrační křivky a odhady jejich směrodatných odchylek.

**Tab. 6 Parametry kalibrační křivky I**

Regresní funkce:  $y = kx + q$

počet bodů  $n = 5$       počet stupňů volnosti:  $v = 3$

Parametry regresní přímky a odhady jejich směrodatných odchylek	
směrnice	$k = 22,8 \pm 1,1$
absolutní člen	$q = 0,48 \pm 0,28$

koeficient korelace	$R = 0,9967$
reziduální odchylka	$s_{rez} = 0,255$

hodnota F-statistiky	$F = 456$
Závislost y na x	byla prokázána se spolehlivostí 99,9 % .

*Ad II) Kalibrace kyseliny 6-aminohexanové derivované s mastovým základem a s vnitřním standardem*

Příprava vzorků:

Výchozí základní roztok kyseliny 6-aminohexanové byl připraven rozpuštěním 10 mg látky v 10 ml methanolu ( $c = 1 \text{ mg/ml}$ ). Stejně tak byl připraven výchozí základní roztok kyseliny 6-aminoheptanové jako vnitřního standardu, tj. rozpuštěním 10 mg látky v 10 ml methanolu ( $c = 1 \text{ mg/ml}$ ).

Pro sestavení kalibrační křivky II byla použita řada pěti vzorků se vzrůstající koncentrací 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5 mg Ak/ml. Vzorky byly připraveny odpipetováním odpovídajícího objemu základního výchozího roztoku Ak k navážce 0,1 g placebo, k tomu bylo přidáno 200  $\mu\text{l}$  základního roztoku IS o koncentraci odpovídající 0,2 mg/ml a celé doplněno methanolem na objem 3 ml, jak dokládá následující schéma:

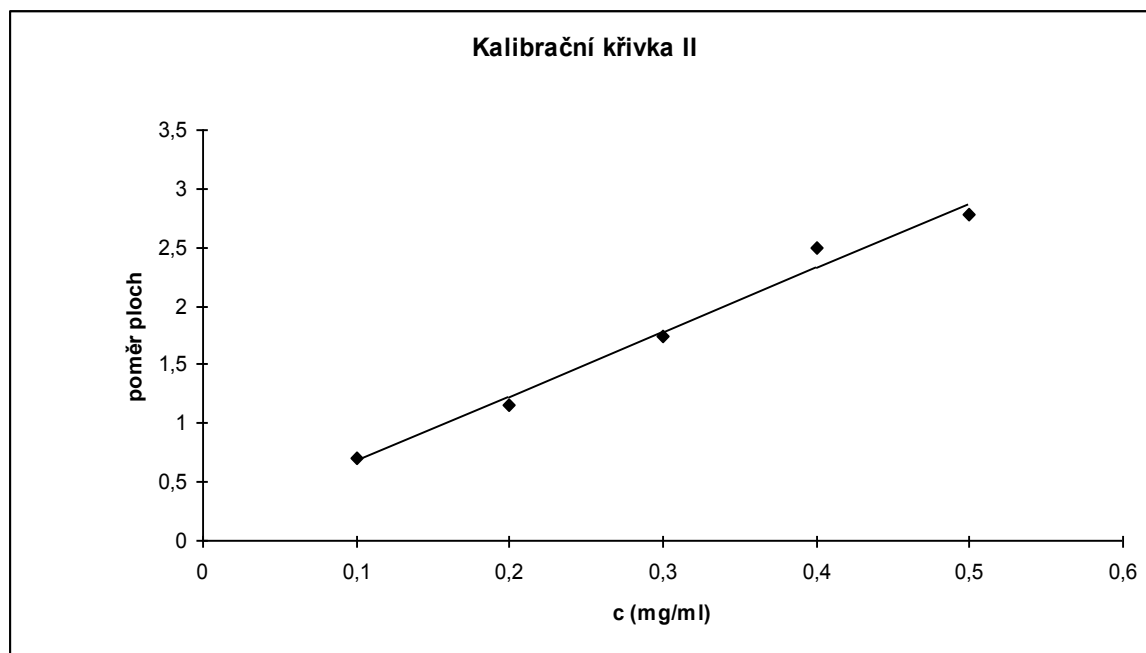
- 0,1 mg/ml:** 100  $\mu\text{l}$  základního roztoku Ak + 0,1 g placebo + 200  $\mu\text{l}$  základního roztoku IS + 2,7 ml methanolu
- 0,2 mg/ml:** 200  $\mu\text{l}$  základního roztoku Ak + 0,1 g placebo + 200  $\mu\text{l}$  základního roztoku IS + 2,6 ml methanolu
- 0,3 mg/ml:** 300  $\mu\text{l}$  základního roztoku Ak + 0,1 g placebo + 200  $\mu\text{l}$  základního roztoku IS + 2,5 ml methanolu
- 0,4 mg/ml:** 400  $\mu\text{l}$  základního roztoku Ak + 0,1 g placebo + 200  $\mu\text{l}$  základního roztoku IS + 2,4 ml methanolu
- 0,5 mg/ml:** 500  $\mu\text{l}$  základního roztoku Ak + 0,1 g placebo + 200  $\mu\text{l}$  základního roztoku IS + 2,3 ml methanolu

Ke každému vzorku bylo do varné baňky přidáno 0,2 ml TEA a 20 mg DNBC a pokračovalo se dle postupu uvedeného v kap. 4.3.

Kalibrační křivka II byla sestavena jako graf závislosti poměru plochy píku Ak a IS na koncentraci 6-aminohexanové kyseliny ve vzorku. Hodnoty pro sestavení kalibrační křivky II uvádí následující tabulka

**Tab. 7** Hodnoty pro sestavení kalibrační křivky II

<b>c (mg/ml)</b>	<b>0,1</b>	<b>0,2</b>	<b>0,3</b>	<b>0,4</b>	<b>0,5</b>
1.	0,687009	1,201523	1,79513	2,455658	2,736659
2.	0,697159	1,155237	1,728559	2,37623	2,795417
3.	0,774743	1,124663	1,736398	2,537872	2,786743
4.	0,685548	1,148752	1,725504	2,583126	2,80684
<b>ā</b>	<b>0,711115</b>	<b>1,157544</b>	<b>1,746398</b>	<b>2,488221</b>	<b>2,781415</b>
s	±0,037007	±0,02783	±0,028415	±0,079175	±0,026805



**Obr. 9** Kalibrační křivka II

V následující tabulce jsou uvedeny parametry kalibrační křivky II a jejich směrodatných odchylek.

**Tab. 8 Parametry kalibrační křivky II**

Regresní funkce: $y = kx + q$
-------------------------------

počet bodů $n = 5$	počet stupňů volnosti: $= 3$
--------------------	------------------------------

Parametry regresní přímky a odhady jejich směrodatných odchylek	
směrnice	$k = 5,47 \pm 0,37$
absolutní člen	$q = 0,14 \pm 0,12$

koeficient korelace	$R = 0,9931$
reziduální odchylka	$s_{rez} = 0,118$

hodnota F-statistiky	$F = 214$
Závislost y na x	byla prokázána se spolehlivostí 99.9 % .

Z porovnání kalibrační křivky I a II vyplývá, že poměry ploch jsou 3,5 až 4 násobně vyšší u kalibrační křivky I, kdy byl přidáván přímo standard DNBD-AK k derivovanému placebo a derivovanému IS. Avšak přídavek většího množství činidla DNBC neměl vliv na průběh derivatizace Ak v masťovém základu a výsledné píky se od sebe výrazně nelišily.

### 5.3 Modelové vzorky

Pro ověření kalibrační křivky II byly použity dva modelové vzorky o koncentracích Ak 0,25 a 0,45 mg/ml, které byly připraveny stejným způsobem jako vzorky pro sestavení kalibrační křivky II. K 0,1 g placebo bylo přidáno:

**0,25 mg/ml:** 250  $\mu$ l základního roztoku Ak + 200  $\mu$ l základního roztoku IS + 2,55 ml methanolu

**0,45 mg/ml:** 450  $\mu$ l základního roztoku Ak + 200  $\mu$ l základního roztoku IS + 2,35 ml methanolu

Ke vzorkům bylo přidáno 0,2 ml TEA a 20 mg DNBC a dále se pokračovalo již zavedeným postupem dle kap. 4.3.

Vzorky byly analyzovány stejným způsobem a za stejných podmínek jako u kalibrační křivky. V následující tabulce jsou uvedeny hodnoty poměrů plochy píku Ak a plochy píku IS, jejich průměr  $\bar{a}$  a směrodatná odchylka s.

**Tab. 9** Hodnocení modelových vzorků

<b>c (mg/ml)</b>	<b>0.25</b>	<b>0.45</b>
1.	1.71	2.82
2.	1.65	3.22
3.	1.68	3.23
4.	1.79	3.11
<b><math>\bar{a}</math></b>	<b>1.71</b>	<b>3.1</b>
<b>s</b>	0.06	0.19

Dosazením hodnot  $\bar{a}$  do rovnice regresní funkce  $y = 5,47x + 0,14$  byla zjištěna koncentrace vzorků  $c_1 = 0,29$  mg/ml a  $c_2 = 0,54$  mg/ml.



## 5.4 Validace chromatografické metody

Teorie k validaci chromatografických metod byla popsána v kap. 2.1.4, zde jsou uvedeny výsledky jednotlivých validačních parametrů metody použité pro kalibrační křivku II.

### Linearita

Hodnocení linearity bylo provedeno se vzorky v koncentračním rozmezí od 0,1mg/ml do 0,5 mg/ml. Linearita byla ověřena kalibrační křivkou. Rovnice regresní přímky je  $y = 5,47x + 0,14$  s hodnotou korelačního koeficientu  $R = 0,9931$ .

### Správnost metody

Pro hodnocení správnosti metody byla připravena řada šesti vzorků o stejné koncentraci 0,3 mg/ml Ak opět stejným postupem. K 0,1g placebo bylo přidáno 300  $\mu$ l zásobního roztoku Ak ( $c = 1$  mg/ml), 200  $\mu$ l zásobního roztoku IS ( $c = 1$  mg/ml) a 2,5 ml methanolu. Vzorek byl derivatizován dle postupu v kap. 4.3. Těchto šest vzorků bylo analyzováno za chromatografických podmínek uvedených v kap. 4.4 a každý roztok byl nastříkovan čtyřikrát.

Následující tabulka uvádí jednotlivé poměry ploch píků Ak ku plochám píků IS zjištěných z chromatogramů jednotlivých vzorků (1-6) a jejich výsledný průměr  $\bar{a}$  ze čtyř stanovení.

**Tab. 10 Poměry plochy píku Ak a plochy píku IS pro hodnocení přesnosti metody**

vzorek	č.1	č.2	č.3	č.4	č.5	č.6
1.	1,548484	1,633726	1,583782	1,573177	1,691699	1,690105
2.	1,51498	1,634663	1,579179	1,568753	1,692783	1,676316
3.	1,4802	1,622944	1,589895	1,57217	1,696406	1,674926
4.	1,50723	1,632677	1,592838	1,578931	1,705119	1,677983
$\bar{a}$	<b>1,512723</b>	<b>1,631003</b>	<b>1,586424</b>	<b>1,573258</b>	<b>1,696502</b>	<b>1,679833</b>

Správnost metody byla hodnocena jako těsnost shody mezi výsledkem analýzy a známou koncentrací látky ve vzorku. Z regresní funkce kalibrační křivky II (rovnice odečtena z tab. 9;  $y = 5,47x + 0,14$ ) byla pro jednotlivé vzorky vypočtena koncentrace odpovídající průměrnému poměru ploch  $A_k$  a  $I_S$ . Ze zjištěné koncentrace pak byla přímou úměrou zjištěna výtěžnost  $R_i$  v %.

**Tab. 11 Recovery (%)**

vzorek	č.1	č.2	č.3	č.4	č.5	č.6
c(mg/ml)	0,251759	0,273383	0,265233	0,262826	0,285357	0,282309
$R_i$ [%]	83,92	91,13	88,41	87,61	95,12	94,10

Výsledná průměrná hodnota  $R_i = 90,05\%$ .

#### Přesnost metody

Pro hodnocení přesnosti metody se vycházelo z výsledků analýzy vzorků připravených pro správnost, jelikož by správná příprava vzorku byla náročná a nedokonalá. Musel by se připravit krém s již daným množstvím zamíchané kyseliny 6-aminohexanové a vnitřního standardu, šestkrát odvážit 0,1 g a derivatizovat dle daného postupu.

Dle vzorců pro přesnost byl vypočten průměr ( $\bar{a}$ ) z výsledků všech šesti vzorků uvedených v tab. 10, směrodatná odchylka ( $s$ ) a relativní směrodatná odchylka (**RSD**) v %. Výsledky jsou shrnuty v tabulce 12.

$$\bar{a} = (a_i) / n$$

$$s = (a_i - \bar{a})^2 / (n-1)$$

$$\mathbf{RSD} (\%) = 100 s / \bar{a}$$

**Tab. 12 Hodnocení přesnosti metody**

$\bar{a}$	1,613291
$s$	0,06943
<b>RSD (%)</b>	4,31

### Robustnost metody

Pro zjištění robustnosti metody byla prováděna analýza s jedním vzorkem z řady vzorků, které byly použity pro stanovení přesnosti a správnosti. Tyto záznamy byly použity ke srovnání s nově získanými za změněných chromatografických podmínek. Postupně byly měněny tyto parametry:

- Časový posun gradientu
- Průtok mobilní fáze
- Poměr jednotlivých složek mobilní fáze
- pH octanového pufru jako vodné složky mobilní fáze

Vzorek byl pro daný parametr nastřikován vždy čtyřikrát. V následující tabulce jsou uvedeny změněné podmínky a k nim vždy odpovídající výsledky, tj. poměry plochy píku Ak a plochy píku IS,  $\bar{a}$  je pak průměr jednotlivých poměrů,  $t_R$  (Ak) je retenční čas kyseliny 6-aminohexanové a  $t_R$  (IS) odpovídá retenčnímu času vnitřního standardu.

**Tab. 13 Poměry plochy píku Ak a plochy píku IS za různých chromatografických podmínek**

	Gradient		Poměr fází	
	<i>od 3,5 min</i>	<i>od 4,5 min</i>	<i>65/35</i>	<i>70/30</i>
$\bar{a}$	<b>1,717518</b>	<b>1,716914</b>	<b>1,684949</b>	<b>1,681269</b>
tR - Ak	4,126	4,306	4	4,455
tR - IS	6,27	6,821	6,429	6,725
	Průtoková rychlost		pH pufru	
	<i>0,8 ml/min</i>	<i>1,2 ml/min</i>	<i>4,3</i>	<i>4,7</i>
$\bar{a}$	<b>1,676321</b>	<b>1,645855</b>		<b>1,847176</b>
tR - Ak	4,411	4,162	4,62	3,783
tR - IS	6,753	6,528	6,883	6,049

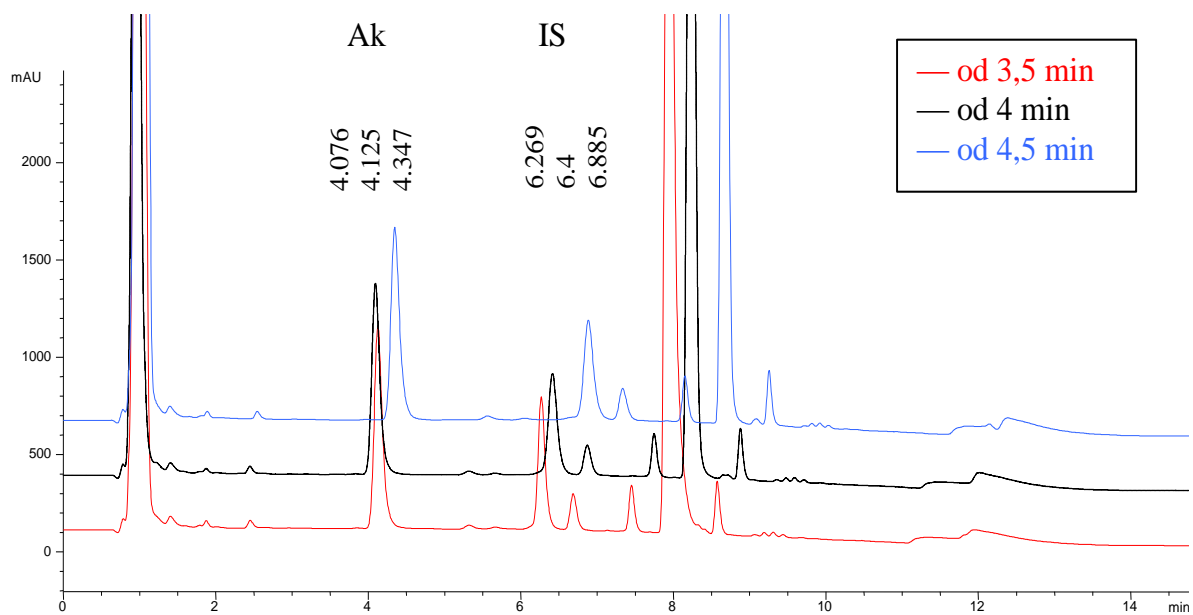
Časová změna gradientu, kdy byl počátek gradientu od 3,5 minuty, ovlivnila retenční časy Ak i IS pouze nepatrně, zatímco počátek gradientu od 4,5 minuty způsobil vymytí Ak o 0,22 min a IS o 0,48 min později. Kvalita separace ovlivněna nebyla.

Změna poměru složek v mobilní fázi ve smyslu zvýšení organické fáze měla opět velmi nepatrný vliv na retenční časy obou látek, ale způsobila výraznější rozlišení píku vnitřního standardu a píku z placebo. Naopak změna ve smyslu zvýšení vodné fáze způsobila menší rozlišení mezi těmito dvěma píky a také o něco výrazněji posunula retenční časy Ak a IS.

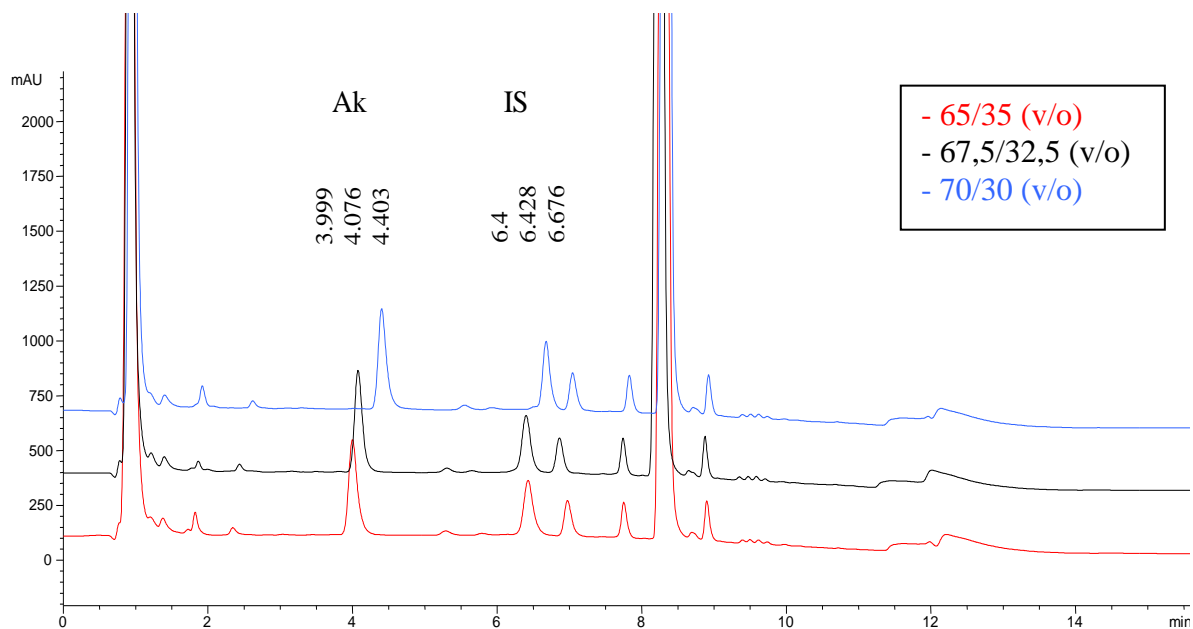
Rychlost průtoku mobilní fáze neovlivnila kvalitu separace ani jejím snížením ani jejím zvýšením. Očekávalo by se spíše zpomalení, resp. zrychlení eluce, avšak jak z chromatogramů vyplývá, zvýšení rychlosti průtoku se neprojevilo rychlejší elucí, naopak retenční časy jsou nepatrně vyšší oproti těm, které byly naměřeny za standardních podmínek. Snížení rychlosti průtoku eluci zpomalilo, což se projevilo i na retenčních časech.

Největší a nejpatrnější vliv na kvalitu separace i dobu eluce měla změna pH octanového pufru. Snížení pH na 4,3 zpomalilo eluci, což zavinilo interferenci píku IS s píkem z placebo. Plocha píku IS nemohla být hodnocena a tedy ani poměr ploch Ak a IS, proto není výsledný průměr v tab. 13 uveden. Naopak zvýšení pH na 4,7 eluci urychlilo, retenční časy jsou kratší a rozlišení píku IS a píku z placebo je mnohem výraznější.

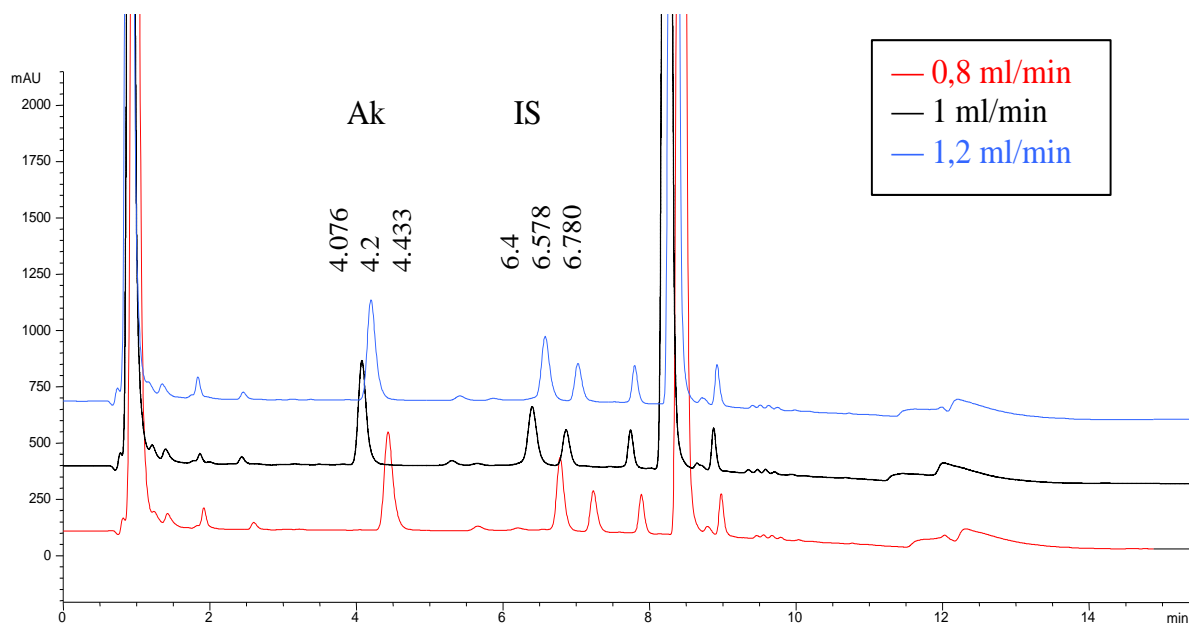
Následující chromatografické záznamy (obr. 10 – 13) porovnávají vliv jednotlivých změn na kvalitu separace a dobu eluce:



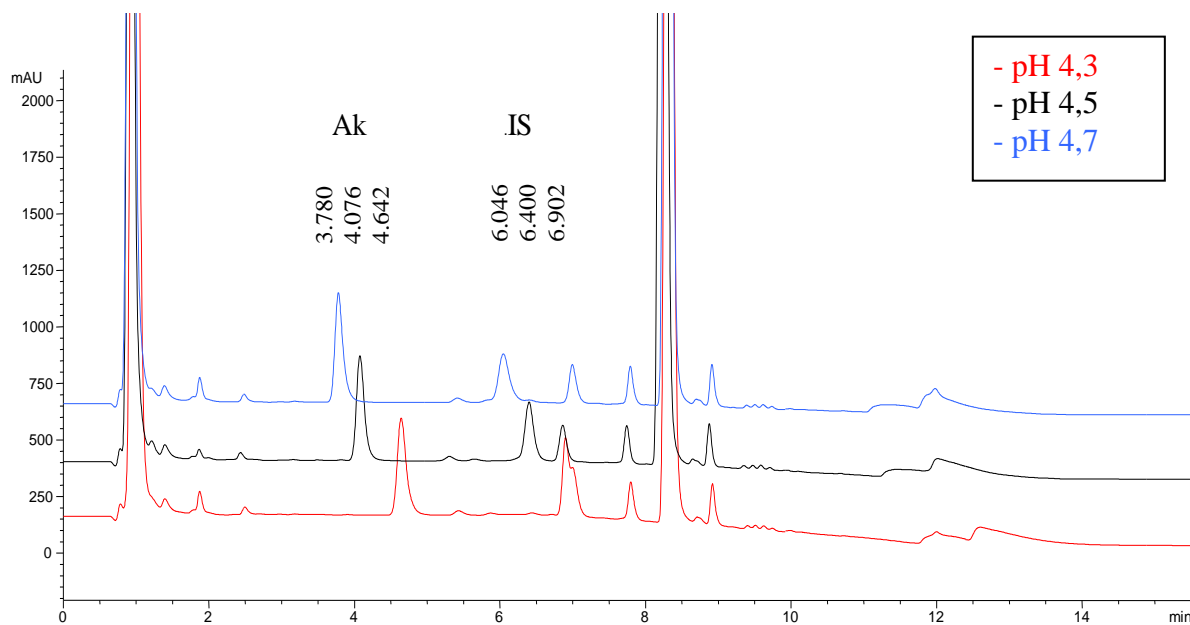
**Obr. 10** Chromatografické záznamy při časové změně gradientu, ostatní chromatografické podmínky v kap. 4.4



**Obr. 11** Chromatografické záznamy při změně poměru jednotlivých složek MF ; v = vodná fáze (octanový pufr), o = organická fáze (acetonitril), ostatní chromatografické podmínky v kap. 4.4



**Obr. 12** Chromatografické záznamy při změně průtoku mobilní fáze, ostatní chromatografické podmínky v kap. 4.4



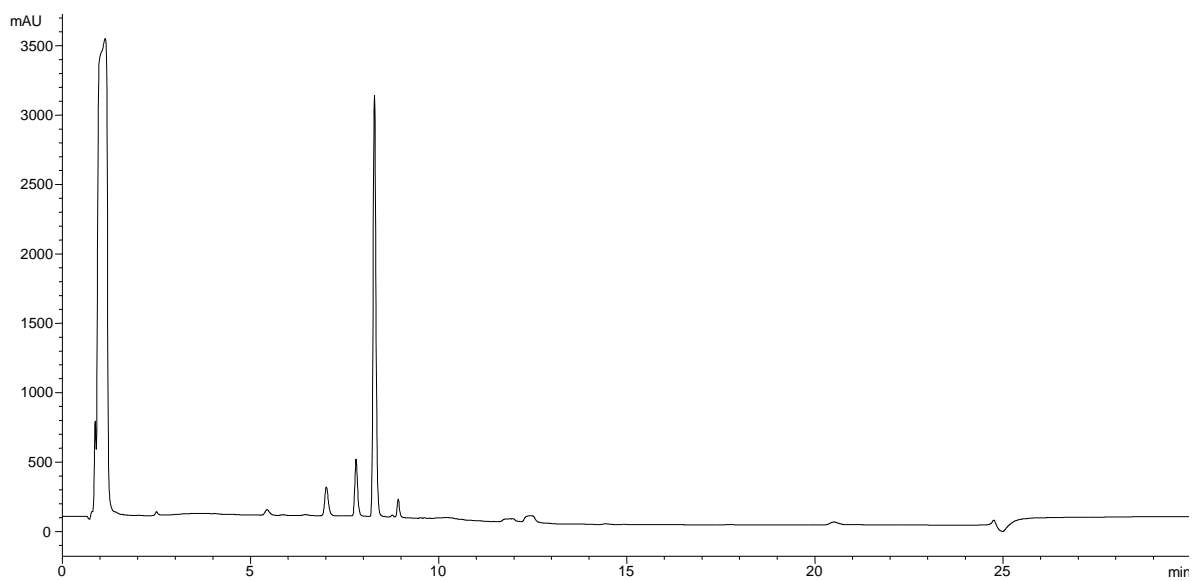
**Obr. 13** Chromatografické záznamy při změně pH octanového pufru jako jedné složky MF, ostatní chromatografické podmínky v kap. 4.4

## Selektivita metody

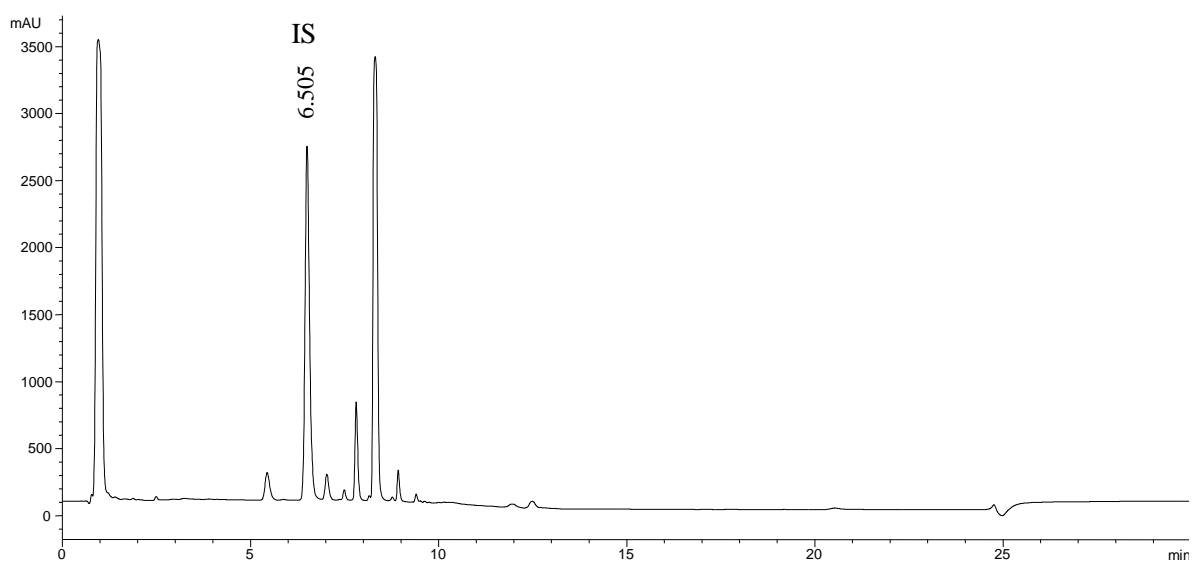
Pro ověření, zda je metoda dostatečně selektivní, byly připraveny následující vzorky, které byly analyzovány za chromatografických podmínek uvedených v kap. 4.4 a jejichž chromatogramy byly porovnávány:

1. *Derivované placebo (mast'ový základ) (Obr. 14)*
  - vzorek byl připraven dle derivatizačního postupu v kap. 2.4
2. *Placebo + IS o c = 1 mg/ml derivatizované dohromady (Obr. 15)*
  - k navážce 0,1g masti byla navážen 1 mg vnitřního standardu, rozpuštěno v 3 ml methanolu a derivatizováno dle postupu v kap. 4.3
3. *Placebo + Ak + IS o c = 0,1 mg/ml derivatizované společně (Obr. 16)*
  - byl připraven zásobní roztok Ak a IS v methanolu o c = 1 mg/ml, z něhož bylo odpipetováno 100 $\mu$ l k navážce 0,1 g placebo a doplněno 2,9 ml methanolu. Další postup viz kap. 4.3
4. *Derivované placebo + roztok již derivovaných standardů Ak, T, D o c = 0,05 mg/ml (Obr. 17)*
  - zásobní roztok derivovaných standardů byl připraven navážením 1 mg látky a rozpuštěním v 10ml 70% acetonitrilu. 1 ml vzorku byl připraven odpipetováním 0,5 ml roztoku standardů a 0,5 ml roztoku derivovaného placebo ze vzorku č. 1

Jednotlivé chromatogramy:

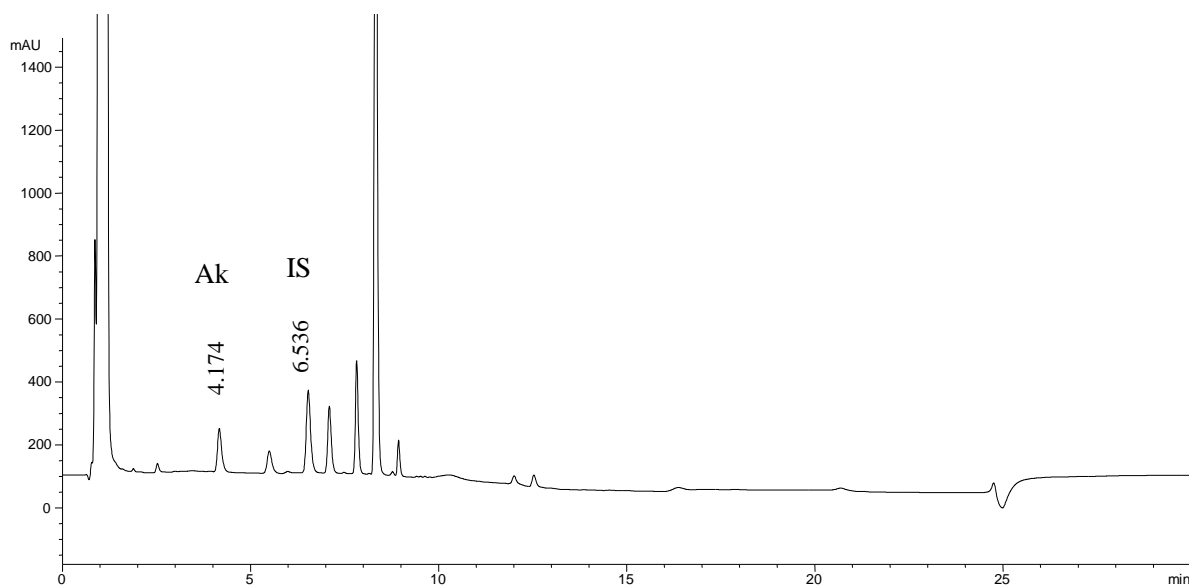


**Obr. 14** Derivatizované placebo, chromatografické podmínky v kap. 4.4

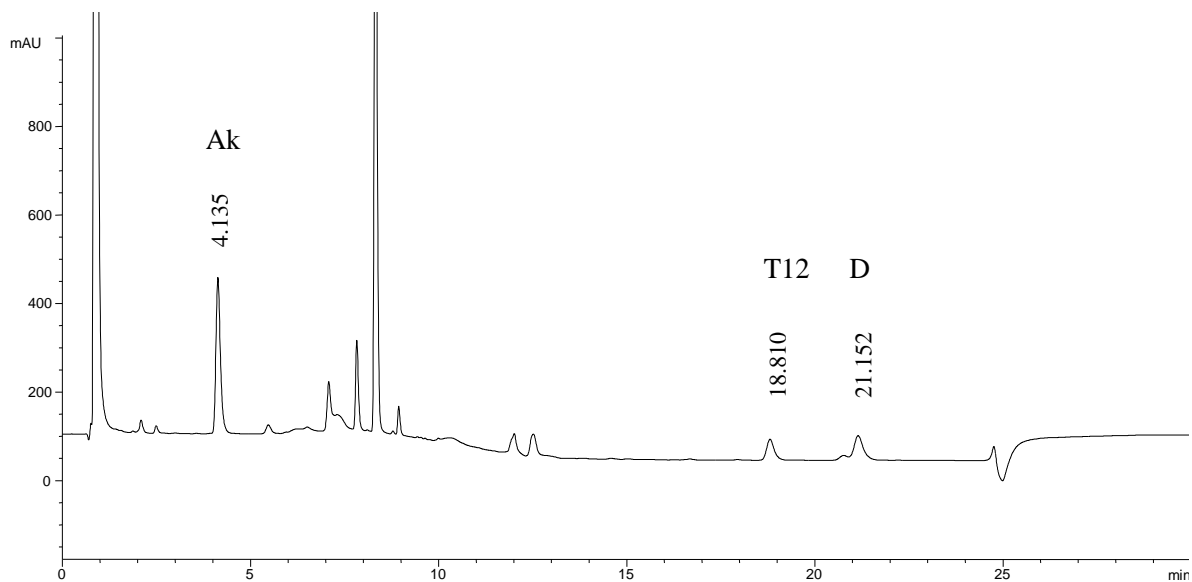


**Obr. 15** Placebo s vnitřním standardem o  $c = 1$  mg/ml společně zderivatizované, chromatografické podmínky v kap. 4.4





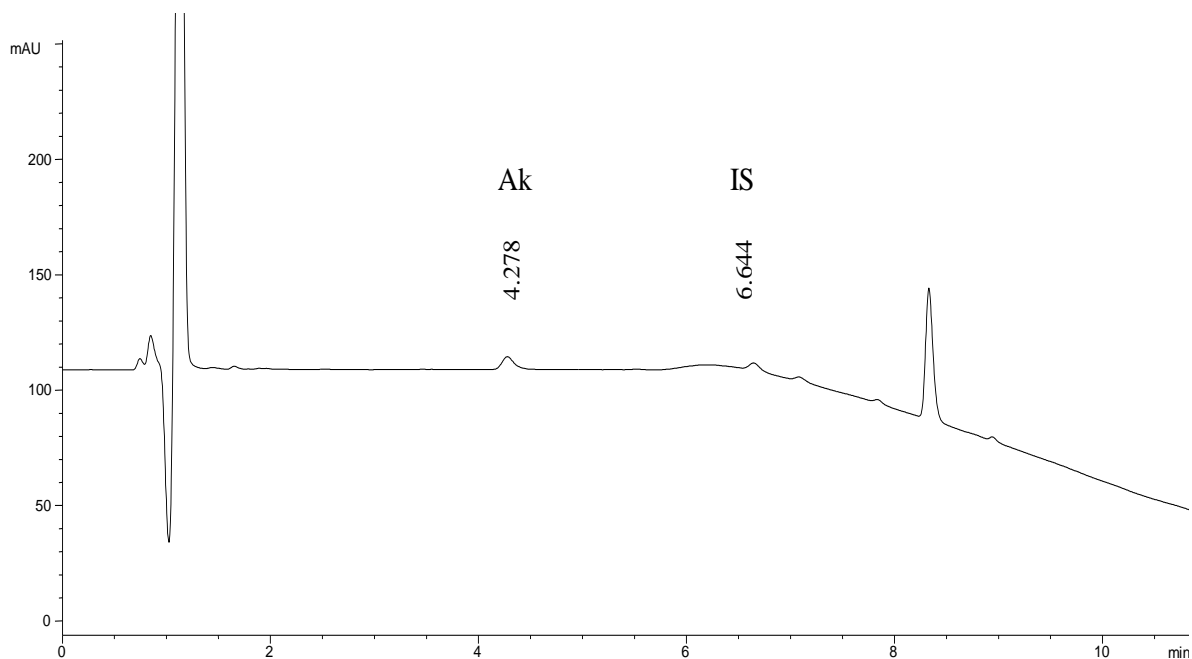
**Obr. 16** Placebo s vnitřním standardem a s kyselinou 6-aminohexanovou o  $c = 0,1$  mg/ml derivatizovaných dohromady, chromatografické podmínky v kap. 4.4



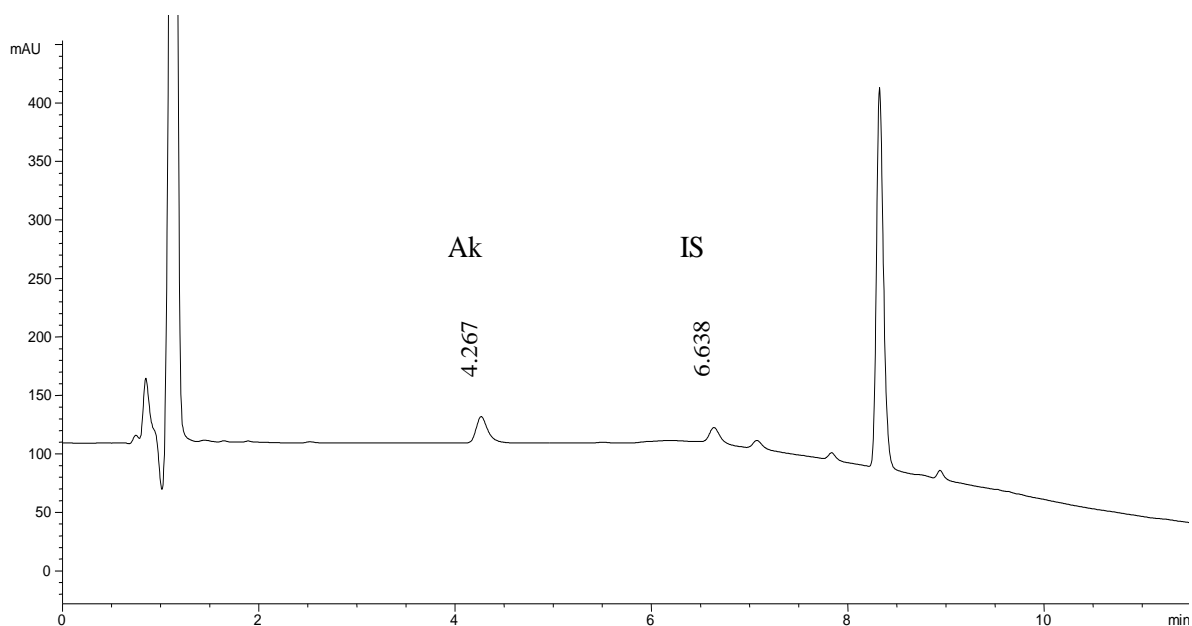
**Obr. 17** Derivatizované placebo s roztokem již derivovaných standardů DNBD-Ak, DNBD-T a DNBD-D o  $c = 0,05$  mg/ml, chromatografické podmínky v kap. 4.4

### Detekční a kvantitativní limit

Limit detekce (LOD) i limit kvantifikace (LOQ) byl ověřován experimentálně, postupným ředěním vzorku placebo, Ak a IS o koncentraci  $c = 0,1 \text{ mg/ml}$  (zderivatizovaných dohromady) až na koncentraci  $c = 2,5 \text{ } \mu\text{g/ml}$  (LOD) a  $c = 10 \text{ } \mu\text{g/ml}$  (LOQ).



**Obr. 18** Detekční limit Ak a IS o  $c = 0,0025 \text{ mg/ml}$ , chromatografické podmínky v kap. 4.4



**Obr. 19** Kvantitativní limit Ak a IS o  $c = 0,01 \text{ mg/ml}$ , chromatografické podmínky v kap. 4.4

## 6. ZÁVĚR

Tato rigorózní práce se zabývala kvantitativním hodnocením kyseliny 6-aminohexanové v masťovém základu s použitím metody vnitřního standardu a s následnou validací chromatografických podmínek.

Pro lepší detekci byla vždy provedena předkolonová derivatizace s činidlem dinitrobenzoylchlorid za vzniku jednotlivých dinitrobenzoylderivátů. Vlastní derivatizační postup byl převzat z předchozích prací bez výraznějších úprav, pouze na závěr byla přidána filtrace supernatantu přes teflonový mikrofiltr, aby byl roztok vzorku pro nástřik na kolonu čirý.

Vlastní HPLC analýza probíhala na koloně Separon SGX C 18 gradientovou elucí s mobilní fází tvořenou směsí acetonitrilu a 20mM octanového pufru s průtokovou rychlostí 1 ml/min a UV detekcí při 230 nm. Aby rozlišení píků všech separovaných složek (kyseliny 6-aminohexanové, vnitřního standardu, transkarbamu a dodecylalkoholu) proběhlo na základní linii, musely být nejprve upraveny podmínky gradientové eluce. Poměr vodné a organické fáze zůstal zachován, upraven byl gradient eluce a délka analýzy.

Vlastní kvantitativní hodnocení kyseliny 6-aminohexanové v masťovém základu s vnitřním standardem bylo hodnoceno pomocí kalibrační křivky s rovnicí regresní přímky  $y = 5,47x + 0,14$ . Kalibrační křivka byla následně ověřena dvěma modelovými vzorky.

Chromatografické podmínky a nejdůležitější charakteristiky metody byly ověřeny pomocí jednotlivých validačních parametrů.

Linearita byla ověřena kalibrační křivkou při kvantitativním hodnocení kyseliny 6-aminohexanové a rovnicí regresní přímky s hodnotou korelačního koeficientu  $R = 0,993$ .

Hodnocení přesnosti metody bylo stanoveno s relativní směrodatnou odchylkou 4,31 % a správnost metody byla vyhodnocena jako výtěžnost s výslednou průměrnou hodnotou 90,05 %.

Robustnost metody byla ověřována za mírně změněných pracovních podmínek. Těmito změnami byly úprava časového gradientu, změna rychlosti průtoku mobilní fáze, změna poměru složek mobilní fáze a úprava pH octanového pufru jako vodné složky mobilní fáze. Ze vzájemného porovnání chromatogramů vyplývá, že metoda je dostatečně robustní pro malé změny pracovních podmínek, kromě pH octanového pufru. Jeho snížení projevilo jako nežádoucí, neboť způsobilo interferenci píků vnitřního standardu a placebo.

Selektivita metody byla hodnocena porovnáním chromatografických záznamů. Bylo ověřeno, že žádný pík neinterferuje se stanovovanou kyselinou 6-aminohexanovou ani s vnitřním standardem.

Detekční a kvantitativní limit byl ověřen experimentálně s hodnotami LOD = 0,0025 mg/ml a LOQ = 0,01 mg/ml.

## 7. LITERATURA

- [1] Otakar Mikeš a kol.: **Laboratorní chromatografické metody**, *SNTL*, Praha, 1980
- [2] Šaršůnová, M.; Hanč, O. a kol.: **Vysokoučinná kvapalinová chromatografie vo farmácii a biochémii**, *Osveta*, Martin 1985
- [3] Churáček, J.; Jandera, P.: **Úvod do vysokoučinné kapalinové chromatografie**, *SNTL*, Praha 1984
- [4] Klimeš, J. a kol.; **Kontrola léčiv I**, *Nakladatelství Karolinum*, Praha 2004
- [5] Klimeš, J. a kol.: **Kontrola léčiv II**, *Nakladatelství Karolinum*, Praha 2004
- [6] **Český lékopis 2005 (ČL 2005), 1.díl**, *Grada Publishing, a.s.*, Praha 2005
- [7] Holík, M.: **Validace analytických metod**, *PřFk Masarykovy univerzity*, Brno 1995
- [8] Holčapek, M.; Jandera, P.: **Spojení kapalinové chromatografie a hmotnostní spektrometrie (HPLC/MS)**, *Chem. Listy* 1998, **92**, 278 - 286
- [9] <http://www.sweb.cz/hplc/Der/index.html>, 11/2006
- [10] Bahrami, G; Mohammadi, B.: **Sensitive microanalysis of gabapentin by high-performance liquid chromatography in human serum using pre-column derivatization with 4-chloro-7-nitrobenzofurazan: Application to a bioequivalence study**, *J. Chromatogr. B*, 2006, **837**, 24-28
- [11] Tsuji K., Jenkins K. M.: **Derivatization of secondary amines with 2-naphthalene-sulfonyl chloride for high-performance liquid chromatographic analysis of spectinomycin**, *J. Chromatogr.*, 1985, **333**, 365-380

- [12] Herraéz-Hernandez R., Campins-Falco P., Sevillano-Cabeza A.: **Liquid chromatographic analysis of amphetamine and related compounds in urine using solid-phase extraction and 3,5-dinitrobenzoyl chloride for derivatization**, *J. Chromatogr. Sci.*, 1997, **35**, 169-175
- [13] Heimbecher S., Lee Y. C., Tabibi S.E., Yalkowsky S.H.: **Derivatization and high-performance liquid chromatographic analysis of pentaazapentacosane pentahydrochloride**, *J. Chromatogr. B.*, 1997, **691**, 173-178.
- [14] <http://iforum.cuni.cz/IFORUM-3022.html>, 11/2006
- [15] Hrabálek A., Doležal P., Farsa O., Krebs A., Kroutil A., Roman M., Škubalová Z.:  **$\omega$ -amino acids derivatives, processes of their preparation and their use**, US patent 6, 2001, **187**, 983
- [16] Zbytovská J., Raudenkolb S., Wartewig S., Hübner W., Rettig W., Pissis P., Hrabálek A., Doležal P., Neubert R.H.H.: **Phase behaviour of transkarbam 12**. *Chem. Phys. Lipids* 2004, **129**, 97-109
- [17] <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/search/ProductDetail/SIGMA/A2504>, 1/2007
- [18] <http://www.chemexper.com/index.shtml?main=http://www.chemexper.com/search/cas/60-32-2.html>, 1/2007
- [19] <http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/summary/summary.cgi?cid=564>, 1/2007
- [20] Pošelužná M.: **Validace HPLC metodiky pro hodnocení transkarbam 12 v lékovém přípravku**. Rigorózní práce, Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Hradec Králové 2003
- [21] Matyášová I., **Hodnocení transkarbam 12 a jeho nečistot pomocí HPLC**. Rigorózní práce, Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Hradec Králové 2005

- [22] Pasáková I., Klimeš J., Sochor J., Hrabálek A.: **Optimization of HPLC chromatographic conditions for determination of Transkarbam 12 and its degradation products**, J. Pharm. Biomed. Anal. 2006, **42**, 136-142

## ABSTRAKT

# HODNOCENÍ TRANSKARBAMU A JEHO NEČISTOT POMOCÍ HPLC II

Rigorózní práce

**Mgr. Kateřina Stražilová**

Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Katedra farmaceutické chemie a kontroly léčiv, Heyrovského 1203, Hradec Králové

Tato práce se zabývá hodnocením kyseliny 6-aminohexanové v mast'ovém základu pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC) s následnou validací chromatografických podmínek. Kyselina 6-aminohexanová je jedním ze dvou hlavních předpokládaných rozkladných produktů transkarbamu 12, jehož funkcí je urychlování transdermální penetrace. Kvantifikaci kyseliny 6-aminohexanové předcházela předkolonová derivatizace s 3,5-dinitrobenzoylchloridem (DNBC) za vzniku dinitrobenzoylderivátů (DNBD-Ak). Analýza probíhala gradientovou elucí na koloně Separon SGX C-18 (150 x 3 mm I.D., 5 μm), s mobilní fází složenou ze směsi acetonitrilu a octanového pufru (20 mM, pH 4,5) a průtokovou rychlostí 1 ml/min. UV detekce probíhala při 230 nm. Byly validovány základní chromatografické parametry jako je přesnost a správnost metody, linearita, selektivita, robustnost a detekční a kvantitativní limit.



## ABSTRACT

# HPLC EVALUATION OF TRANSKARBAM AND ITS IMPURITIES II

Rigorózní práce

**Mgr. Kateřina Stražilová**

Charles University in Prague, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové, Department of  
Pharmaceutical Chemistry and Drug Control, Heyrovského 1203, Hradec Králové

This work deals with determination of 6-aminohexanoic acid in ointment-base by high performance liquid chromatography with subsequent validation of chromatographic conditions. 6-aminohexanoic acid is one of two main predicted degradation products of transkarbam 12, functioning as an enhancer of transdermal penetration. A pre-column derivatization with 3,5-dinitrobenzoylchloride forerun the quantification of 6-aminohexanoic acid. The analysis was run on the reversed-phase column Separon SGX C-18 (150 x 3 mm I.D., 5 µm) with gradient elution of mobile phase composed of acetonitrile and sodium acetate buffer (20 mM, pH 4,5) with the flow rate 1 ml/min. UV detection was performed at 230 nm. The validation parametres such as precision and accuracy, linearity, selectivity, robustness and limit of detection and limit of quantification were evaluated.