

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
FARMACEUTICKÁ FAKULTA
V HRADCI KRÁLOVÉ

Katedra farmaceutické chemie

a

kontroly léčiv

DIPLOMOVÁ PRÁCE

**Analytické hodnocení léčiv s využitím
chromatografických metod III.**



Hradec Králové 2008

Kristýna Strýčková

Tímto bych chtěla poděkovat vedoucímu mé diplomové práce RNDr. Milanovi Mokrému, CSc. za všestrannou pomoc, trpělivost, neocenitelné rady a odborné vedení při vypracovávání diplomové práce.

OBSAH	3
1. ÚVOD	4
2. TEORETICKÁ ČÁST	7
2.1. <i>Definice a rozdělení chromatografických metod</i>	8
2.2. <i>Teoretické základy chromatografického procesu</i>	13
2.3. <i>Vysokoučinná kapalinová chromatografie</i>	17
2.3.1. Instrumentace v HPLC	18
2.3.1.1. Zásobníky mobilní fáze	18
2.3.1.2. Čerpadla mobilní fáze	19
2.3.1.3. Dávkovací zařízení	19
2.3.1.4. Chromatografické kolony a jejich náplně	19
2.3.1.5. Detektory	21
2.3.1.6. Zařízení pro zpracování dat	23
2.3.2. Kvalitativní a kvantitativní analýza pomocí HPLC chromatogramu	24
2.4. <i>Validace analytických metod</i>	25
2.5. <i>Vlastnosti fumagillinu</i>	27
2.5.1. Fyzikálně-chemické vlastnosti fumagillinu	28
2.5.2. Farmakologické vlastnosti fumagillinu	28
2.5.3. Přehled prací zabývajících se analýzou fumagillinu	29
2.6. Med	30
2.6.1. Chemické vlastnosti medu	30
2.6.2. Fyzikální vlastnosti medu	31
3. CÍL PRÁCE	33
4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	35
4.1. <i>Použitý chromatografický materiál, přístroje, pomůcky a chemikálie</i>	36
4.2. <i>Vývoj chromatografických podmínek pro stanovení fumagillinu</i>	38
4.2.1. Validace analytických metod	42
5. VÝSLEDKY A DISKUZE	43
5.1. <i>Vývoj chromatografických podmínek pro HPLC analýzu fumagillinu</i>	44
6. ZÁVĚR	51
7. LITERATURA	53
SOUHRN	57
ABSTRACT	58

1. ÚVOD

„Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem, které jsem vypracovala samostatně. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány.“

Vysokoučinná kapalinová chromatografie – High Performance Liquid Chromatography (HPLC) je v současné době jedna z nejprogresivnějších, nejmodernějších a nejvíce používaných analytických metod. Jedná se o separační metodu, která umožňuje kvalitativní i kvantitativní hodnocení analyzovaných látek. Hlavní přednosti HPLC spočívají v citlivosti stanovení, rychlosti analýzy, použití minimálního množství vzorku. Další velkou předností je možnost automatizace. Současné nejmodernější HPLC chromatografy jsou vybavené automatickými dávkovači, které mohou po nastavení příslušných parametrů provádět analýzu bez obsluhy operátora. Umožňují analyzovat širokou škálu sloučenin od anorganických iontů až po polymerní sloučeniny a také termolabilní a netěkavé sloučeniny. Z tohoto důvodu je využití HPLC velmi široké. Je srovnatelná s GC, avšak má větší využití, protože řada léčiv je netěkavá.

Fumagillin je antibiotikum, které se používá pro léčbu nosemové nákazy včel, jejímž původcem je *Nosema apis*. V ČR byla ukončena registrace 29.11.1999, avšak uvažuje se o celoevropské registraci za nově stanovených podmínek.

2. TEORETICKÁ ČÁST

2.1. Definice a rozdělení základních chromatografických metod

Chromatografické metody jsou vysoce účinné separační metody, umožňující oddělení jednotlivých složek analyzované směsi a zároveň jejich kvalitativní i kvantitativní hodnocení. Jejich přednosti vyniknou především při analýzách směsí látek, kdy ostatní analytické metody, jako např. spektrofotometrické, nelze principiálně použít. Jelikož veškeré technické produkty a velká většina přírodních látek jsou složité směsi, mají chromatografické metody analýzy prvořadý význam.⁽¹⁾

Základním obecným principem chromatografických metod je nestejněměrné rozdělování složek směsi mezi stacionární a mobilní fázi. Předpokladem nestejněměrného rozdělení je různá afinita jednotlivých složek k uvedeným fázím nebo jejich nestejná schopnost difundovat do nich.⁽²⁾

V současné době se používá mnoho typů chromatografických metod, které se liší z hlediska povahy

- Separačního děje
- Použité techniky
- Způsobu vyvíjení
- Skupenství pohyblivé a nepohyblivé fáze⁽¹⁾

DĚLENÍ PODLE POVAHY SEPARAČNÍHO PROCESU

Název chromatografické metody	Povaha hlavního (určujícího) procesu
adsorpční	adsorpce
rozdělovací	extrakce, rozpouštění
iontově výměnná	elektrolytická interakce a difúze
gelová	difúze
afinitní	specifická interakce s afinantem

- **ADSORPČNÍ**

Podstatou separace je rozdílná adsorbovatelnost dělených látek na aktivní povrch sorbentu. Způsob a síla adsorpce značně závisí na povaze adsorbentu, na chemickém složení adsorbované látky a také na složení mobilní fáze. Podle fyzikálně chemické povahy se adsorbenty dělí na polární a nepolární. Mezi polární patří: oxidy a soli a nepolární: aktivní uhlí, silikagel s chemicky vázanou nepolární fází.⁽³⁾

Závislost mezi množstvím neadsorbované látky a její koncentrací v roztoku vyjadřuje adsorpční izoterma. K rozdělení látek ze směsi dojde, jestliže jsou různě silně adsorbovány, tj. jejich adsorpční izotermy mají různé směrnice.⁽¹⁾

- **ROZDĚLOVACÍ**

Směs složek, rozpuštěná v soustavě dvou nemísitelných nebo omezeně mísitelných kapalných fází, se mezi ně dělí podle rozpustnosti jednotlivých složek v jednotlivých fázích. Distribuce složek je určována rozdělovací konstantou. Účinnost dělení složek je tedy úměrná velikosti rozdílu v jejich rozdělovacích konstantách. Jedna fáze je stacionární (zakotvená). Druhá fáze se po jejím povrchu zvolna pohybuje, a proto se nazývá fáze mobilní neboli pohyblivá. Tyto dvě fáze musí být vzájemně nasyceny, tj.

musí být v rovnováze, aby během chromatografického procesu nedocházelo ke koncentračním změnám použitého rozpouštědlového systému.⁽²⁾

Při rozdělovací chromatografii se zpravidla užívá dvoufázový systém, přičemž jedna fáze bývá bohatší na organická rozpouštědla a druhá na vodu. Zakotvená bývá fáze vodná, a to na pevných hydrofilních nosičích jako je silikagel, křemelina, škrob, hydrofilní gely, prášková celulóza nebo filtrační papír. Fáze organická bývá zpravidla mobilní. V některých případech je však výhodnější nasytit hydrofobně impregnovaný nosič organickou fází a fází vodnou volit jako mobilní. Jedná se o tzv. systém obrácených fází (RP-reversed phase), kdy organické hydrofilní rozpouštědlo slouží jako zakotvená fáze a mobilní fází je hydrofilní rozpouštědlo. Tento systém se používá v kapalinové chromatografii nejčastěji a je vhodný k dělení méně polárních látek.^(1,2)

- **IONTOVĚ VÝMĚNNÁ**

Iontově výměnná chromatografie probíhá na iontoměničích. Ion iontoměniče je vyměněn za ion obsažený v mobilní fázi nebo ve vzorku. Separace probíhá na principu soutěžení ionexu o tyto ionty.

Při technice iontové výměny jde o separaci iontů, proto je vždy používána vodná mobilní fáze. Stacionární fáze- (iontoměnič, ionex) je zpravidla makromolekulární matrice obsahující kyselou nebo bazickou funkční skupinu. Katexy jsou iontoměniče s kyselou funkční skupinou (sulfo-kyselina, karboxylová kyselina) nesoucí záporný náboj, anex obsahuje bazickou funkční skupinu (aminoskupinu) a je nositelem kladného náboje. Ion obsažený v ionexu bývá vyměněn za ion obsažený v mobilní fázi nebo ve vzorku a na principu soutěžení ionexu o tyto ionty dochází k separaci. Podobně probíhá také ligandová výměna, kdy na iontoměniči, obvykle katexu, je zachycen iontovou výměnou vhodný kov, na takto upravenou kolonu se přivádí mobilní fáze obsahující látku schopnou vytvářet s vázaným kovem komplex (ligand). Iontoměničová technika se využívá, jak při přípravě vzorků pro chromatografické analýzy (SPE), tak v HPLC, zřídka v plošném uspořádání kapalinové chromatografie.⁽⁴⁾

- **GELOVÁ**

Gelovou chromatografií se dělí látky podle velikosti molekul. Stacionární fáze je tvořena speciálním gelem s póry. Prochází-li kolonou s gelem směs molekul o různé velikosti, jsou menší molekuly zpoždovány více oproti větším tím, že zapadají do

lutinek gelu. Jednotlivé komponenty jsou eluovány v pořadí odpovídajícím klesající molekulové hmotnosti.⁽⁵⁾

- **AFINITNÍ**

Afinitní chromatografie využívá biologických schopností látek specificky a vratně vázat jiné látky. Hlavní specificky působící složkou je afinitní ligand kovalentně vázaný na pevný nosič. Při prolití kolony roztokem obsahujícím biologicky aktivní látku určenou k izolaci se zachytí pouze tato biologicky aktivní složka. Specificky sorbovaná látka je eluována pomocí rozpustného afinantu nebo změnou složení mobilní fáze. Jako afinanty se nejčastěji používají různé peptidy, aminokyseliny, enzymy, antigeny, protilátky.⁽⁶⁾

DĚLENÍ PODLE POUŽITÉ TECHNIKY

- **FRONTÁLNÍ**

Tato technika spočívá ve stálém přivádění roztoku dělené směsi na kolonu až do konce chromatografického procesu. Například u tříložkové směsi z kolony zprvu vychází jen čistá mobilní fáze. Pak se objeví a trvale vytéká složka A, která má nejmenší afinitu ke stacionární fázi, a je proto nejméně bržděna. Později začne vytékat směs A+B, jestliže složka B má středně velkou afinitu, a nakonec po nasycení stacionární fáze složkou C, která má největší afinitu, vytéká roztok obsahující složky A+B+C ve stejném složení, v jakém byl přiváděn na kolonu. Tato metoda byla vyvinuta k účelům analytickým.⁽²⁾

- **ELUČNÍ**

Na kolonu se vnese jen malá část roztoku směsi (např. A,B,C) a kolona se eluuje mobilní fází (rozpuštědlem) E, která má ke stacionární fázi menší afinitu než kterákoliv ze složek. Každá složka se může vymývat nezávisle na druhých, nemusí jedna druhou vytěsňovat. Složky vytékají také v pořadí podle afinit. Jejich zóny jsou proto při postupu kolonou velmi často odděleny zónou čisté mobilní fáze, nedotýkají se. Složky opouštějí kolonu ve formě zcela oddělených píků.⁽²⁾

Eluční chromatografie může být ve 3 variantách

1. **prostá (izokratická)** - k eluci se používá stále stejná mobilní fáze. Tato metoda je vhodná pro případy, kdy se dělené látky od sebe příliš neliší v afinitě ke stacionární fázi, takže jejich zóny se eluují v nepříliš dlouhých intervalech.⁽²⁾
2. **vícestupňová** - při eluci méně polárním rozpouštědlem se eluují dobře některé složky, jiné jsou příliš sorbovány a pro jejich eluci se zvolí polárnější rozpouštědlo
3. **gradientová** - při eluci se postupně plynule mění koncentrace polárnější složky v mobilní fázi nebo pH mobilní fáze. Tento způsob se používá hlavně při dělení komplikovanějších směsí a jeho cílem je zkrácení doby analýzy a získání ostřejšího rozdělení látek⁽¹⁾

- **VYTĚŠŇOVACÍ**

Princip této metody spočívá v tom, že se na chromatografickou kolonu jednorázově vnese jen část chromatografické směsi (např. obsahující v roztoku složky A,B,C), potom se až do konce chromatografování kontinuálně přivádí roztok látky D, která má ke stacionární fázi větší afinitu. Proto tato látka (vytěšňovadlo) uvolňuje ze stacionární fáze všechny předem zadržené složky. Složka A, která má nejmenší afinitu, opouští kolonu první. Jako poslední vytéká vytěšňovadlo D.⁽²⁾

DĚLENÍ PODLE ZPŮSOBU VYVÍJENÍ

- Chromatografie sloupcová
- Chromatografie v plošném uspořádání - tenkovrstvá
- na papíře⁽²⁾

DĚLENÍ PODLE SKUPENSTVÍ POHYBLIVÉ FÁZE

- Chromatografie kapalinová – mobilní fází je kapalina a stacionární fází je nemísitelná kapalina nebo pevná látka
- Chromatografie plynová – mobilní fází je plyn a stacionární fází je kapalina nebo pevná látka^(1,12)

2.2. Teorie základního chromatografického procesu

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

$$V_R = t_R \cdot F_M$$

kde F_m je objem mobilní fáze proteklé kolonou za jednotku času (objemová rychlost toku).

Retenční objem V_R je dán součtem dvou objemových veličin

$$V_R = V'_R + V_M$$

kde V'_R je redukovaný retenční objem (někdy bývá označován jako skutečný retenční objem) a V_M - mrtvý objem představující celkový objem, který zaujímá mobilní fáze od místa nástřiku přes kolonu až po detektor. V_R můžeme také nazývat zdánlivým elučním objemem. Mrtvý objem se zjistí experimentálně jako retenční objem nesorbující se látky.

Analogicky platí tento vztah i pro retenční čas:

$$t_R = t'_R + t_M$$

kde t'_R je skutečný retenční čas a t_M je mrtvý čas kolony, tj. čas látky, která se v koloně nezadržuje.

V literatuře se často uvádějí tzv. eluční (retenční) poměry. Je to v podstatě poměr redukovaného elučního objemu látky 2 k redukovatelnému retenčnímu objemu látky 1.⁽⁷⁾

$$r_{1,2} = \frac{V_{R2}'}{V_{R1}'}$$

K charakterizaci retence se používá bezrozměrná veličina K označovaná jako kapacitní poměr, pro niž platí následující vztahy:

$$K = \frac{V_R - V_M}{V_M} = \frac{V'_R}{V_M} = \frac{t'_R - t_M}{t_r} = \frac{t'_R}{t_M}$$

Kapacitní poměr je veličina, která vyjadřuje poměr celkového množství chromatografované látky ve stacionární fázi k celkovému množství látky ve fázi

mobilní a je přímo úměrná konstantě K_D , která je vyjádřením poměru koncentrací chromatografované látky v obou fázích. Pro kapacitní poměr platí :

$$K = K_D \cdot \frac{V_S}{V_M} = K_D \cdot S$$

V_S je objem stacionární fáze, V_M je objem mobilní fáze v koloně a S je označení pro fázový poměr v koloně.⁽⁸⁾

K popisu účinnosti separace látek se používá veličina rozlišení R_S :

$$R_S = \frac{1,18(t_{R2} - t_{R1})}{w_{h1} + w_{h2}} \quad (t_2 > t_1)$$

t_{R1} a t_{R2} – retenční časy nebo vzdálenosti podél základní linie od bodu nástřiku ke kolmicím spuštěným z vrcholů dvou sousedních píků, w_{h1} a w_{h2} – šířka píku v poloviční výšce. Rozlišení větší než 1,5 odpovídá rozdělení píků na základní linii.

K hodnocení účinnosti kolony se používá zdánlivý počet teoretického patra N . Při výpočtu množství teoretických pater se vychází z retenčního času t_R testované látky a ze šířky píku w_h při jeho bázi.

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

Ke srovnání účinnosti různých kolon se užívá parametru výškový ekvivalent teoretického patra H , který se vypočítá z délky kolony L vyjádřené v metrech a z počtu teoretických pater N :

$$H = \frac{L}{N}$$

Výškový ekvivalent teoretického patra je určován řadou parametrů jako je např. teplota, viskozita, mobilní fáze, vlastnosti chromatografované látky, přičemž nejdůležitějším parametrem je průtoková rychlost mobilní fáze kolonou. Průtoková rychlost U je charakterizována známou Van DEEMTEROVOU rovnicí :

$$H = A + \frac{B}{U} + CU$$

kde A je příspěvek turbulentní difúze, B je příspěvek molekulární difúze, C je příspěvek odporu vůči převodu hmoty k výškovému ekvivalentu teoretického patra. Aby separace byla účinná, hodnoty H by měly být v rozmezí 0,01-1,00 mm. Dalšími faktory ovlivňujícími tuto veličinu je mimokolonový mrtvý objem a objem analyzovaného vzorku.

Dosažením výše uvedených rovnic do vztahu pro parametr rozlišení dvou píků je možné odvodit a popsat tři faktory, na kterých je rozlišení závislé. Je to účinnost, selektivita a kapacita:

$$R_s = \left[\frac{\sqrt{N}}{4} \right] \cdot \left[\frac{r-1}{r} \right] \cdot \left[\frac{D_m}{1+D_m} \right]$$

Dalším důležitým faktorem je selektivita kolony, která je vyjádřena relativní retencí r . Je mírou relativní separace 2 složek směsi.

$$r = \frac{t_{R2} - t_M}{t_{R1} - t_M} = \frac{t'_{R2}}{t'_{R1}}$$

t_{R2} retenční čas sledovaného píku, t_{R1} retenční čas referenčního píku (obvykle pík odpovídající zkoušené látce), t_M mrtvý čas nebo vzdálenost podél základní linie od bodu nástřiku ke kolmici spuštěné z vrcholu píku odpovídajícího nezadržované složce.

Faktor symetrie píku A_s se vypočítá ze vzorce:

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

$w_{0,05}$ je šířka píku v jedné dvacetině jeho výšky, d je vzdálenost mezi kolmicí spuštěnou z vrcholu píku a vzestupnou částí píku v jedné dvacetině jeho výšky. Hodnota faktoru symetrie 1,0 značí úplnou (ideální) symetrii píku.^(7,8,9,10)

Poměr signálu k šumu (S/N), který ovlivňuje přesnost stanovení obsahu složek, se vypočítá ze vzorce:

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

H je výška píku odpovídajícího dané látce na chromatogramu předepsaného porovnávacího roztoku měřenou od vrcholu píku k extrapolované základní linii signálu, který se sleduje na vzdálenosti rovné dvacetinásobku šířky píku v polovině jeho výšky, h je rozpětí šumu pozadí na chromatogramu získaného při slepé zkoušce a zaznamenávaného na vzdálenosti rovné dvacetinásobku šířky píku v polovině jeho výšky na chromatogramu předepsaného porovnávacího roztoku, a to pokud možno rovnoměrně na obě strany od místa, kde by se měl nacházet sledovaný pík.⁽¹¹⁾

Opakovatelnost odezvy se vyjadřuje jako odhad relativní směrodatné odchylky ($RSD\%$) v procentech pro řadu následných měření porovnávacího roztoku a vypočítá se ze vzorce:

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

y_i jsou jednotlivé hodnoty vyjádřené jako plocha píku, výška píku nebo poměr ploch u metody vnitřního standardu; \bar{y} - průměr jednotlivých hodnot; n - počet jednotlivých hodnot.

Test způsobilosti systému představuje nedílnou součást metody a slouží k zajištění přiměřené účinnosti chromatografického systému. Pro hodnocení účinnosti kolony se používají následující parametry: zdánlivá účinnost, kapacitní faktor, rozlišení, relativní retence a faktor symetrie. Faktory, které mohou ovlivnit chromatografické chování, zahrnují složení mobilní fáze, její iontovou sílu, teplotu a zdánlivé pH, průtokovou rychlost, délku kolony, teplotu a tlak, charakteristiku stacionární fáze, včetně porozity, velikosti a typu částic, specifického povrchu a u nosičů používaných v chromatografii s obrácenými fázemi rozsah chemické modifikace (odstranění povrchových silanolových skupin, obsah vázaného uhlíku atd.).^(10,11)

2.3. Vysokoúčinná kapalinová chromatografie

Vysokoúčinná kapalinová chromatografie-High Performance Liquid Chromatography (HPLC) je v současné době jedna z nejprogresivnějších analytických metodik, která nachází stále větší uplatnění ve všech oblastech analýzy léčiv. HPLC je široce využívána ve všech moderních lékopisných monografiích. Umožňuje analýzu tepelně nestálých nebo netěkavých látek a polymerů a odstraňuje tak hlavní nedostatek plynové chromatografie.^(1,12)

Chromatografie využívá dělení analyzovaných látek mezi dvěma fázemi, z nichž jedna je stacionární - nepohyblivá a druhá je mobilní - pohyblivá. V průběhu chromatografického procesu dochází k postupnému, mnohokrát opakovanému vytváření rovnovážných stavů dělených látek mezi stacionární fází, která je v koloně nebo plošné vrstvě, a mobilní fází, která unáší separované látky. Při styku stacionární i mobilní fáze s dělenými látkami dochází k vzájemným interakcím, které jsou základním předpokladem separace.⁽¹²⁾

Vývoj

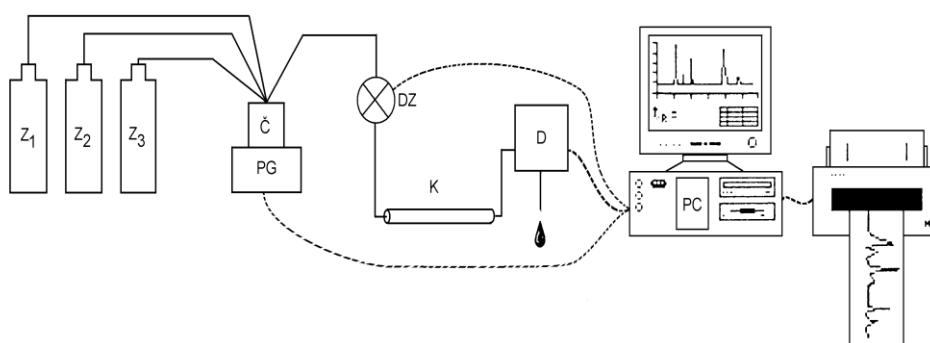
Základy vlastní chromatografie položil ruský botanik, fyziolog a biochemik M.S. Cvet v roce 1906, který jako první rozdělil na sloupci sorbentu chlorofyl na jeho složky: chlorofyl a, chlorofyl b a karotenoidy. Na jeho pracích jsou založeny všechny pozdější chromatografické techniky.

Teprve začátkem čtyřicátých let, po objevení rozdělovací chromatografie, se kolonová kapalinová chromatografie rozvinula ve své klasické podobě. V roce 1952 dokonce Martin a Synge dostali za své práce v oboru chromatografie Nobelovu cenu za chemii. Používaly se kolony s náplní tvořenou hrubými částicemi (o průměru 100 až 200 μm i více), mobilní fáze kolonou protékala jen působením gravitační síly a eluát se musel odebírat po frakcích. Začátkem padesátých let byly prvními kapalinovými chromatografy analyzovány aminokyseliny. V polovině šedesátých let se objevily první gelové chromatografy. Koncem šedesátých let, začátkem sedmdesátých let došlo k prudkému rozvoji teorie a instrumentace kapalinové chromatografie a na trh byly uvedeny komerční přístroje, které umožnily práci při zvýšených tlacích. Rozvoj mikroelektroniky umožnil detekci na podkladě kontinuálního měření absorpce záření v UV, či VIS oblasti. Mohutné zvýšení separační účinnosti analytických kolon bylo

uskutečněno v první polovině sedmdesátých let za použití techniky plnění kolon tříděnými mikroparticulárními sorbety o velikosti částic 5-10 μm .^(2,7,9)

2.3.1 Instrumentace v HPLC

Kapalinový chromatograf se skládá z částí, které zabezpečují transport mobilní fáze (zásobníky mobilní fáze, vysokotlaké čerpadlo s čidlem pro měření tlaku), dávkování vzorku (manuální či automatické), separaci látek (chromatografická kolona), detekci, registraci signálu a vyhodnocování chromatografického záznamu (průtočný detektor, zapisovač, integrátor, případně počítač a tiskárnu).⁽¹³⁾



Z₁₋₃: zásobníky mobilní fáze, Č: čerpadlo, PG: programátor gradientu, DZ: dávkovací zařízení, K: kolona, D: detektor, PC: počítač

2.3.1.1. Zásobníky mobilní fáze

Při izokratické eluci je mobilní fáze vedena z jednoho ze zásobníků do vysokotlakého čerpadla. Při gradientové eluci se přiváděná mobilní fáze z obou (nebo i většího počtu) zásobníků mísí podle programu ve směšovači zařízeném buď před a nebo za vysokotlakým čerpadlem.⁽⁷⁾

Konstrukčním materiálem zásobníků bývá nejčastěji sklo, plasty (polyethylen, polypropylen) nebo nerezová ocel. Mobilní fázi je třeba zbavit pohlčených plynů a zároveň zabránit odpařování rozpouštědel, a proto jsou zásobníky opatřeny víčky s několika otvory jimiž procházejí kapiláry vedoucí mobilní fázi a eventuálně přivádějí helium používané pro odplynění mobilní fáze. Mezi další metody používané k

odplynění patří ultrazvuk a vakuum. U moderních chromatografů je degaser většinou součástí HPLC sestavy.^(10,14)

2.3.1.2. Čerpadla mobilní fáze

Obecným požadavkem na funkci čerpadel je, aby dávkování bylo plynulé, tj. bez pulsů, které by mohly způsobit výkyvy v detektoru. Dále musí čerpadlo zajistit konstantní průtok, umožňující kvalitativní i kvantitativní analýzu. Zároveň je třeba, aby konstrukční materiál byl chemicky odolný proti korozivním účinkům. Moderní HPLC vyžaduje, aby výstupní tlaky na čerpadlech se pohybovaly v rozmezí od 1 do 60 MPa. Důležitá je velká přesnost a dobrá reprodukovatelnost průtoků v celém rozsahu pracovních tlaků.^(7,10,14)

Z praktického hlediska bývají čerpadla rozdělována na pulsní a bezpulsní. Pulsní čerpadla mají objem pracovní komory poměrně malý a potřebného průtoku se dosahuje mnohokrát opakovaným stlačením a vypuzením mobilní fáze z pracovní komory čerpadla. Bezpulsní pracují s objemem pracovní komory daleko větším, 100 až 500 ml, což umožňuje provést bez opětovného plnění čerpadla řadu analýz.⁽⁷⁾

2.3.1.3. Dávkovací zařízení

Kvalita separace látek na chromatografické koloně závisí od kvality dávkování vzorky. Krátké a rychlé dávkování zvyšuje předpoklad dosažení úzkých, ostrých elučních vln. Na dávkování vzorku se používají manuální a automatická dávkovací zařízení.

Manuální dávkovací zařízení jsou jednoduchá, nenákladná, přesná. Pracují na principu dávkovací smyčky se známým objemem, která je součástí dvoupolohového ventilu umožňujícího změnu toku mobilní fáze do kolony .

Automatické dávkovací zařízení výrazně zvyšuje produktivitu práce. Jeho součástí je zásobník často na několik desítek vzorků a dávkování je řízeno programem.⁽¹⁵⁾

2.3.1.4. Chromatografické kolony a jejich náplně

Kolony pro HPLC jsou z materiálu, který musí odolávat relativně vysokým pracovním tlakům a zároveň chemickému působení mobilních fází a separovaných složek. Materiálem chromatografických kolon je většinou antikorozi ocel nebo speciálně tvrzené borosilikátové sklo, lze použít i kombinaci obou materiálů. Pro analytické aplikace se převážně používají kolony plněné pórovitými náplněmi o

průměru 3-10 μm o délce 5-30 cm a vnitřním průměrem 3-4 mm. Účinnost separace, doba analýzy a pracovní tlak se zvyšují s rostoucí délkou kolony a naopak klesají s rostoucím průměrem částic náplně. Při práci s kolonami o průměru menším než 2 mm se jedná o tzv. mikrokolonovou kapalinovou chromatografii, jejíž výhodou je hlavně snížení spotřeby mobilní fáze i vzorku a zvýšení citlivosti detekce. Materiály pro plnění kolon jsou většinou založeny na anorganické matici (silikagel, oxid hlinitý, pórovité sklo), na níž mohou být chemicky vázány nebo zakotveny různé stacionární fáze, méně často se používá organických gelů různé struktury, které mohou být rovněž chemicky modifikovány. Charakter stacionární fáze závisí na chromatografickém systému. V HPLC se vyskytuje "normální fáze" a "obrácená fáze". U normálních fází je stacionární fáze polární, mobilní fází bývá nepolární rozpouštědlo (pentan, hexan). U obrácených fází je stacionární fáze nepolární a mobilní fáze polárnější. Jedná se o RP-reversed-phase (systém s obrácenými fázemi). V HPLC je využíván asi v 80 %.^(7,16,17,18)

Kolony obsahující chemicky vázané stacionární fáze. Na hydroxylové skupiny na povrchu silikagelových částic jsou vhodnou chemickou reakcí navázány různé radikály. Zpravidla se jedná o uhlovodíkové řetězce obsahující 18, popřípadě 8 uhlíkových atomů - nepolární chemicky vázané fáze, nebo radikál obsahuje tříuhlíkatý řetězec zakončený skupinami $-\text{NH}_2$, $-\text{CN}$ aj. - středně polární fáze. Tyto kolony jsou stabilní jen v rozmezí pH 3-7,5, u moderních kolon po dalších úpravách nosiče v rozmezí pH 2-10. Při nízkém pH dochází k hydrolýze chemicky vázaného organického ligandu, při vyšším pH dochází k rozpouštění silikagelové matrice, což vede ke ztrátě separačních vlastností kolony. Také tepelná stabilita silikagelových částic je omezená, teplotní hranice je do 60 $^{\circ}\text{C}$. Tyto nedostatky odstraňují **zirkoniové kolony**. Jedná se o kolony s nosičem ZrO_2 . Částice sorbentu jsou mechanicky velmi stabilní, nezávislé na iontové síle mobilní fáze, nebobtnají ani nedochází k jejich kompresi. Na rozdíl od silikagelových nosičů jsou stabilní v celém rozsahu hodnot pH (0-13, 14). Kolony jsou tepelně stabilní až do 100 $^{\circ}\text{C}$ a při speciální úpravě dokonce až do 150 $^{\circ}\text{C}$ popř. 200 $^{\circ}\text{C}$.⁽¹⁸⁾

Monolitické kolony tvoří jediný kus pórovitého materiálu, který vzniká zesítním polymerní směsi. Monolit vzniká jednokrokovou radikálovou polymerací směsi monomerů v přítomnosti porogeního roztoku. Největší výhodou monolitických kolon jsou jejich hydrodynamické vlastnosti. Podle chemické podstaty a způsobu přípravy se mohou monolitické stacionární fáze rozdělit na fáze s modifikovaným silikagelem a na

fáze na bázi organických polymerů (polyakrylamidu, akrylamidu nebo polystyrenu). Výhodou je, že se mohou používat vyšší průtoky mobilní fáze.

Chirální stacionární fáze se používají při hodnocení opticky aktivních léčiv.⁽¹⁹⁾

2.3.1.5. Detektory

Detektory slouží k indikaci látek vycházejících z chromatografické kolony. Sledují pomocí vhodného snímače některou z vlastností eluátu a signál se po zesílení přivádí do zapisovače, který poskytuje záznam závislosti intenzity daného signálu na čase. K detekci separovaných látek se zpravidla využívá určitých jejich vlastností, jimiž se tyto látky liší od složek mobilní fáze.

Na detektor se kladou zejména tyto požadavky:

- linearita odezvy v co nejširším rozmezí koncentrací
- dostatečně velký poměr mezi šumem a měřenou hodnotou
- vysoká citlivost
- reprodukovatelnost odezvy na změně složení mobilní fáze při gradientové eluci
- malá citlivost ke změnám průtoku a tlaku
- univerzálnost - detekce všech oddělených složek vzorku^(1,7)

Detektory můžeme rozdělit do dvou základních skupin :

a) selektivní detektory, jejichž signál je úměrný koncentraci samotné detegované látky v eluátu

b) univerzální (nespecifické) detektory, jejichž odezva je úměrná určité celkové vlastnosti fluátu, tj. jak solutu, tak i složek mobilní fáze.

Nejpoužívanější jsou spektrofotometrické detektory pracující v ultrafialové (a popř. viditelné) oblasti, následují detektory fluorimetrické a elektrochemické (všechny selektivní) a refraktometrické (univerzální). V dnešní době je relativně časté spojení HPLC/MS. Toto spojení je však finančně nákladné.

Spektrofotometrické detektory

Proměřují absorpci elektromagnetického záření určité vlnové délky složkami fluátu protékající celou detektorem. K detekci léčiv se využívá především UV oblast spektra, mnohem méně oblast viditelná a minimálně infračervená oblast spektra – v praxi se uplatňují především UV detektory, even. UV-VIS detektory.

Lze je dělit do čtyř základních typů:

1. UV detektor s fixní vlnovou délkou (nejčastěji 254 nm a nebo 280 nm, při nichž absorbuje většina léčiv). Uspořádání je zpravidla dvoupaprskové a měří rozdíl absorbance mezi měrnou a srovnávací celou, v níž může být buď vzduch, nebo mobilní fáze. Tyto detektory jsou nejlevnější a dosahují poměrně vysoké citlivosti.

2. UV detektor s proměnou vlnovou délkou - libovolně měnitelná dle potřeb

3. Scanning UV detektor - snímají během několika sekund absorpční spektrum v maximu píku hodnoceného léčiva. Umožňují volit libovolnou vlnovou délku záření pro detekci, většinou v rozmezí 190 nm do 400 nm až 600 nm.

4. Photodiode-array detektor - umožňují rychlý záznam spektra bez přerušení chromatografické separace. Jsou založeny na současném měření signálu velkého počtu miniaturních plošných fotodiód. Hodnotí léčivo současně při několika vlnových délkách.

Spektrofotometrické detektory jsou v analýze léčiv používány nejčastěji, vyznačují se značnou citlivostí (10^{-9} až 10^{-10} g/ml) a lze je použít při gradientové eluci.^(12,13)

Fluorimetrické detektory

Fluorimetrické detektory jsou založeny na principu fluorescence a měření sekundárního záření (emisního), které látka vydá po absorpci primárního elektromagnetického záření (excitačního). Látky, které nefluoreskují, lze mnohdy derivatizací s vhodnými činidly převést na fluoreskující deriváty. Tyto detektory jsou méně univerzální než UV detektory, ale citlivější (min. detek. množ. až 10^{-10} g/ml), selektivnější a jsou rovněž použitelné při gradientové eluci.^(12,20)

Elektrochemické detektory

Jsou třetím nejčastěji používaným typem selektivních detektorů a slouží k detekci látek schopných elektrochemické reakce tj. oxidačně - redukčních změn, jež probíhají na fázovém rozhraní roztok – elektroda.

Ampérometrické detektory měří proud vyvolaný průchodem redukovatelné nebo oxidovatelné látky průtokovou celou, v níž jsou umístěny elektrody s vloženým pracovním napětím. Používá se dvoelektrodových nebo častěji tříelektrodových systémů (skládající se z měrné, srovnávací a pomocné elektrody). Proměřují elektrochemickou veličinu, jejichž hodnota je závislá na koncentraci analyzovaného

léčiva. Jsou značně citlivé (10^{-9} až 10^{-12} g/ml), ale většina z nich nelze použít při gradientové eluci. Ampérometrické detektory používají tuhých, měrných elektrod, zhotovených nejčastěji ze skelného uhlíku, grafitových vláken, grafitové pasty, platiny, zlata. Jejich nevýhodou je zanášení, postupná dezaktivace jejich povrchu produkty oxidace a redukce a nečistotami z mobilní fáze, což vyžaduje častou recalibraci detektoru.

Polarografické detektory pracují s rtuťovou kapkovou elektrodou, u níž se na rozdíl od tuhých elektrod pravidelně obnovuje povrch.

Elektrochemické detektory umožňují dosáhnout velmi vysoké citlivosti při nízké ceně. Kladou však vysoké nároky na čistotu a dokonalé odplynění mobilní fáze. Mobilní fáze musí být vodivá, proto nelze použít v systémech s normálními fázemi.

Coulometrické detektory měří náboj potřebný k oxidaci či redukci celkového množství látky při jejím průtoku měrnou celou, což umožňuje dosáhnout vyšší citlivosti detekce než u ampérometrických detektorů.^(12,13)

Refraktometrické detektory

Tyto detektory jsou stále nejčastěji užívanými nescifickými (univerzálními) detektory. Poskytují odezvu úměrnou rozdílu indexů lomu eluátu v měrné cele a srovnávací kapaliny (mobilní fáze) v referenční cele. Při analytickém hodnocení léčiv se používají ojedinele pro poměrně velké nevýhody – především výrazně menší citlivost (10^{-6} g/ml), nutnost termostatování a nelze použít při gradientové eluci.^(12,13)

Spojení HPLC a MS představuje atraktivní a velmi účinnou analytickou techniku, která uspokojuje požadavky kladené na analýzu složitých organických látek. Výhody hmotnostního spektrometru oproti ostatním detektorům jsou dány jednak jeho citlivostí, selektivitou a univerzálností, a jednak množstvím informací o struktuře analyzované látky. Umožňuje analyzovat látky s relativní molekulovou hmotností nad 20 tisíc.⁽¹³⁾

2.3.1.6. Zařízení pro zpracování dat (vyhodnocovací zařízení)

Vyhodnocovací zařízení slouží k vyhodnocování výsledků získaných z odezvy detektoru. Jsou vybavené mikroprocesorem, stále běžnější je používání počítačů s obrazovkou, tiskárnou. Hlavní výhodou počítačů je, že automaticky kontrolují, zda přístroj dodržuje nastavené parametry a jsou schopné zasahovat do jeho režimu a vést analýzu v optimálních, předem určených podmínkách.^(7,13)

2.3.2. Kvalitativní a kvantitativní analýza v HPLC chromatogramu

Ke kvalitativní a kvantitativní analýze slouží chromatografická křivka. Stanovení léčiv metodou HPLC je v řadě lékopisných článků spojeno se zkouškami na čistotu.

Základní kvalitativní charakteristikou je **retenční čas t_R** , což je čas od nástřiku vzorku na kolonu k maximu chromatografického píku. Nejčastějším důkazem totožnosti je shoda retenčního času chromatografického píku léčiva v analyzovaném vzorku s retenčním časem píku standardu. Některé UV detektory umožňují v maximu chromatografického píku sejmout UV spektrum, shoda UV spekter vzorku a standardu je další identifikační charakteristikou.

Základní kvantitativní charakteristikou je **plocha píku**, případně výška píku. Na základě zjištěných ploch píků se obsah látky ve vzorku určuje pomocí standardu. Používá se buď metoda vnějšího nebo vnitřního standardu.^(1,12)

Metoda vnějšího standardu

Při této metodě se porovnává plocha píku stanovované složky s plochou píku standardu, chromatografovaného za stejných podmínek. Jako vnější standard se používá u substancí tzv. chemická referenční látka, nebo u složených lékových přípravků jedna z analyzovaných složek směsi. Koncentrace stanovovaných složek směsi se pak vypočítá z poměru ploch (výšek) píků jednotlivých stanovovaných látek a plochy píku vnějšího standardu.^(12,21)

Metoda vnitřního standardu

Při této metodě se přidává přesně známé množství standardní látky (jiná látka s podobnou chemickou strukturou a podobnými fyz.-chem. vlastnostmi) do analyzované směsi před vlastní analýzou. Po důkladném promíchání se vzorek nastříkuje na kolonu. Koncentrace stanovovaných složek se vypočítá z poměru ploch (výše) píků jednotlivých separovaných složek a plochy píku vnitřního standardu. Protože standard a vzorek jsou při současném chromatografování vystaveny stejným vlivům, dochází tím k jejich eliminaci. Metoda vnitřního standardu je méně časově náročná a hlavně přesnější, protože není zatížena chybou dvojího nástřiku. Vnitřní standard však musí být eluován v blízkosti píků, které budou vyhodnocovány, musí mít podobnou koncentraci jako hodnocené látky a musí být chemicky inertní. Po vyhodnocení ploch píků vypočítáme poměr ploch a sestrojíme kalibrační křivku jako závislost poměru ploch na koncentraci.^(1,12,21)

2.4. Validace analytických metod

Analytické metody používané pro monitorování kvality léčiv musí být vhodné, přesné a spolehlivé. Vhodnost, přesnost a spolehlivost musí být experimentálně ověřena, doložena a tento proces se nazývá validace analytické metody. Jedná se o sérii experimentů, kterými se zjistí nejdůležitější charakteristiky metody, potvrdí se, že dává reprodukovatelné a spolehlivé výsledky. Cílem validace je dát praktické hranice, ve kterých je zkušební postup použitelný, a zajistit, aby při opakovaném postupu dával stejné výsledky. Validace je oddělený akt. Obecně se nejprve definují požadavky na zkušební metodu. Vyvine se metoda, najdou se optimální podmínky a třetím bodem je validace, tj. pomocí experimentálních dat se prokáže, že je metoda vhodná pro daný účel, že splňuje na začátku definované požadavky.

Obecné analytické parametry, ověřované při validaci metod, jsou:

- přesnost (opakovatelnost, reprodukovatelnost)
- linearita, rozsah
- správnost
- detekční a kvantitativní limit
- selektivita
- robustnost

PŘESNOST

Je to míra shody mezi jednotlivými výsledky metody opakovaně prováděné s homogenním vzorkem. Podle podmínek opakování metody se rozlišuje opakovatelnost a reprodukovatelnost. Při stanovení opakovatelnosti se metoda provádí jedním analytikem na tomtéž přístroji, se stejnými činidly, na jednom homogenizovaném vzorku. Reprodukovatelnost se provádí v různých laboratořích na jednom homogenizovaném vzorku. Přesnost se vyjádří jako relativní směrodatná odchylka z minimálně 6 nezávislých analýz.

LINEARITA

Schopnost metody dávat výsledky přímo úměrné koncentraci stanovované látky ve vzorku. ROZSAH je interval mezi dvěma hladinami koncentrace stanovované látky.

SPRÁVNOST

Je odchylka výsledku metody od správné hodnoty. Správná hodnota se zjistí

1. buď jinou, nezávislou metodou, jejíž správnost je ověřena
2. analýzou modelového vzorku tj. placebo
3. analýzou vzorku s přídavkem standardní látky.

Vyjadřuje se jako rozdíl hodnot nebo jako výtěžnost (recovery):

$$\text{nalezená hodnota} * 100 / \text{skutečná hodnota}$$

DETEKČNÍ A KVANTITATIVNÍ LIMIT

Jedná se o citlivost metody, jsou to parametry, které je nutné doložit u metod pro stanovení nečistot. Detekční limit je pouze pro limitní testy, tj. test zjišťující jen je-li látka nad nebo pod určitou hranicí. Je to nejnížší detekovatelná koncentrace látky, nestanovovaná kvantitativně. Kvantitativní limit je pro kvantitativní stanovení obsahu nečistot. Je to nejnížší koncentrace látky, stanovitelná s přijatelnou přesností a správností.

SELEKTIVITA

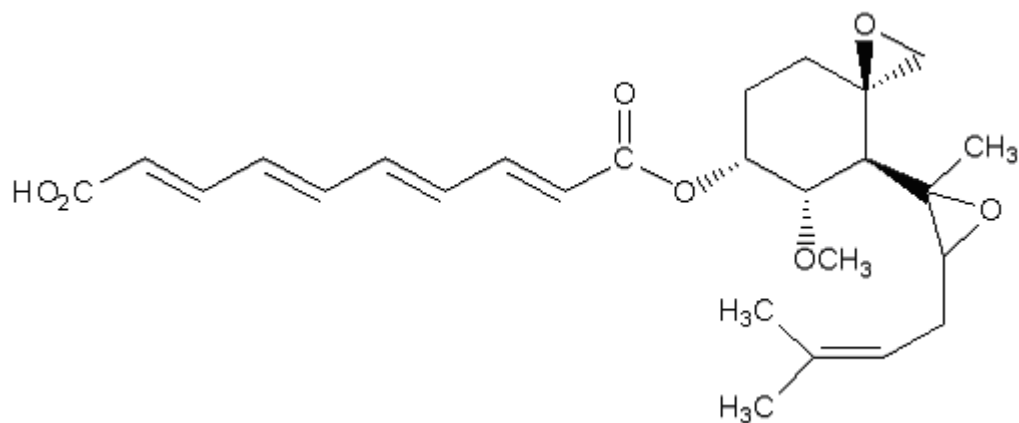
Schopnost metody změřit správně a specificky stanovovanou látku v přítomnosti jiných látek. Selektivita se vyjadřuje jako rozdíl mezi výsledky analýzy vzorku bez nečistot a vzorku s přidanými rozkladnými produkty, složkami placebo nebo různými nečistotami.

ROBUSTNOST

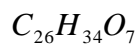
Míra reprodukovatelnosti výsledků získaných analýzou jednoho homogenního vzorku v různých laboratořích, různými analytiky, na různých přístrojích a s různými činidly. Jedná se o míru schopnosti metody dávat správné a přesné výsledky i při menších změnách pracovních podmínek, ke kterým dochází při provádění metody v jiné laboratoři, i když popsany postup zůstává zachován.⁽²²⁾

2.5 VLASTNOSTI FUMAGILLINU

Strukturní vzorec



Sumární vzorec



Chemický název

5-Methoxy-4-(1,5-dimethyl-1,2-epoxy-4-hexenyl)-1-oxaspiro[2.5]oct-6-yl
hydrogen(all-E)-2,4,6,8-dekatetraendioat

M_r 458,53

Používá se ve formě báze a nebo bicyklohexylamoniové soli, která má:

- **chemický název** Fumagillin(1,1'-Bicyklohexyl)-4-amoniová sůl

- **sumární vzorec** $C_{38}H_{57}NO_7$

- M_r 639,87

2.5.1. Fyzikálně-chemické vlastnosti fumagillinu

Vzhled: bleděžlutý prášek

Rozpustnost: prakticky nerozpustný ve vodě (naopak sůl je ve vodě rozpustná), zředěných kyselinách, nasycených uhlovodících, rozpustný ve většině jiných rozpouštědel, ve vodném roztoku Na_2CO_3 a alkalického hydroxidu

Uskladnění: při teplotě 15-25 °C, chránit před světlem

UVmax: 335 nm, 351 nm^(23,24)

2.5.2. Farmakologické vlastnosti fumagillinu

Charakteristika: Fumagillin je antibiotické léčivo, produkováno houbou *Aspergillus fumigatus*, které je specifickým lékem nosemové nákazy včel, jejímž původcem je prvok *Nosema apis*. Podává se na jaře včelstvům, u nichž neprobíhá normální vývoj. Preventivně se přidává do potravy na jaře, příp. na konci léta.

Indikace: nosemová nákaza včel, účinkuje také na rod *Entamoeba* u šimpanzů a psů

Kontraindikace: Přípravek se nesmí používat v době snůšky medu, jmenovitě od 15.dubna do 30.srpna.

Dávkování: K přípravě léčivého pokrmu se nejprve rozpustí obsah jedné lahvičky v malém množství vody a poté se přilije za stálého míchání k 25 l ochlazeného cukrového roztoku. Takto připravený sirup se zkrmuje po důkladném protřepání a promíslení, během 2-3 týdnů, vždy večer. V případech, kdy včely zesláblé nosematózou nepřijímají léčivý sirup, nanáší se na včelami pokrytý plát. Celkové množství 5 l léčivého sirupu, potřebné k léčbě jednoho včelího roje, se podává v denních dávkách 0,25-0,5 l. V případě silného napadení je třeba celý postup zopakovat po 48 hodinách. Jedno balení postačí k léčbě pěti včelstev.

Mechanismus účinku: Blokuje uskupení krevních cév, tím že se váže na enzym methioninaminopeptidasu. Nepůsobí na spóry.^(24,25)

2.5.3. Přehled prací zabývajících se analýzou fumagillinu

Pro analýzu fumagillinu byly vypracovány studie využívající nejrůznější metodiky. Analytické hodnocení bylo nejčastěji prováděno pomocí HPLC, event. spektrofotometrie nebo tenkovrstvé chromatografie.

- Laboratory studies on the photostability of fumagillin, the active ingredient of Fumidil B^{1 26)}
stacionární fáze : C₁₈ , mobilní fáze: acetonitril : voda : kyselina octová (500:500:1,5), $\lambda=350$ nm
- Trace analysis of fumagillin in honey by liquid chromatography-diode array-electrospray ionization mass spectrometry²⁷⁾
stacionární fáze: C₁₈ , mobilní fáze: vodný roztok octanu amonného (20 mM): acetonitril v poměru 61:39, v/v
- Elisa and HPLC methods analysis of fumagillin its decomposition products in honey²⁸⁾
stacionární fáze: C₁₈ , mobilní fáze: acetonitril : voda : ledová kyselina octová (500:500:1,5)
- Monitoring of selected metabolites and biotransformation products from fermentation broths by high-performance liquid chromatography²⁹⁾
stacionární fáze: C₁₈ , mobilní fáze: acetonitril : vodný roztok kyseliny fosforečné nebo acetonitril : kyselý fosfátový pufr
- Determination of fumagillin by high performance liquid chromatography³⁰⁾
stacionární fáze: C₁₈ , mobilní fáze: acetonitril : voda: ledová kyselina octová (500:500:1,5), v/v/v, $\lambda=351$ nm

2.6. Med

Včelí med je nejznámější a nejdůležitější včelí produkt. Med definujeme jako sladkou hmotu vytvářenou včelami z nektaru nebo z medovice, které včely sbírají, přetvářejí pomocí výměšků hltanových žláz a zralý uskladňují v plástech. Účelem zrání je přetvoření řídkých, a tedy i mikrobiálně nestálých přírodních šťáv na hutné a mikrobiálně stálé zimní zásoby - med. Při zrání se mění i chemické složení původních surovin. Především se štěpí sacharóza na inertní cukr a současně z jednoduchých cukrů vznikají cukry složitější.

Existují různé druhy medu: květový, lesní, listový.^(31,32)

2.6.1. Chemické vlastnosti medu

Voda je v medech obsažena v množství 15-21 %. Nevyzrálé medy mají i více vody a jsou náchylné ke kvašení.

Sušina medu je tvořena z více než 95 % různými cukry. Z ostatních látek jsou v medu obsaženy bílkoviny, aminokyseliny, organické kyseliny, minerální látky, vitamíny, barviva, aromatické látky, hormony a další stovky přírodních látek.

Cukry Většinu cukerné sušiny medů tvoří fruktóza (ovocný cukr) a glukóza (hroznový cukr). Sacharóza je přirozenou součástí nektaru a medovice, ale enzymaticky se štěpí. Enzym invertáza obsažený v hltanových žlázách včel štěpí sacharózu přítomnou v nektaru na směs rovných dílů glukózy a fruktózy. Složitější, tzv. vyšší cukry (oligosacharidy, dextriny) jsou přítomny zejména v medovicových medech. Z oligosacharidů hlavně maltóza.

Kyseliny jsou obsaženy ve všech druzích medů a způsobují kyselou reakci a chuť. Základní kyselinou je kyselina glukonová, obsažena spíše ve formě laktonu. Dále je to kyselina citronová, jablečná, jantarová a v malém množství kyselina octová, mravenčí, máselná, mléčná, šťavelová, glykolová a alfa-ketoglutarová.

Aminokyseliny se výrazně podílejí na chuťových vlastnostech. Převažující aminokyselinou je prolin.

Bílkoviny a peptidy Molekulová hmotnost bílkovin se pohybuje od 40 do 400 000. Jedná se o nízkomolekulární látky, peptidy. Ostatní jsou vysokomolekulární tzn. enzymy, jako např. invertáza, diastáza, glukózooxidáza.

Minerální látky jsou v medech přítomny až do koncentrace 1 %, většinou jsou rostlinného původu. Z makrobiogenních prvků absolutně převažuje draslík. Po něm následují sodík, vápník, hořčík. Ze stopových prvků jsou významně zastoupeny: železo, měď, zinek a mangan.

Látky hormonálního charakteru Acetylcholin je přirozeným přenašečem vzruchů v periferním nervovém systému.

Barviva Z flavonoidních rostlinných barviv byl prokázán kvercetin a rutin. V medech lze zjistit 11-13 různých barviv, patřících mezi flavonoidy, antokyany a produkty degradace cukrů.

Vitamíny Med obsahuje především thiamin, riboflavin a kyselinu pantotenovou.

Aromatické látky Je obsaženo velké množství aromatických látek a dalších biologicky aktivních látek. Jejich výzkum není zcela dokončen.

Přírodní toxické látky Hlavním zdrojem toxických látek jsou vřesovité rostliny.

Mikroorganismy Nejsou s výjimkou kvasinek schopné růstu.

Tukové látky Med obsahuje asi 0,015 % různých lipidů např.: estery cholesterolu, triglyceridy, volné kyseliny a volný cholesterol.⁽³¹⁾

2.6.2 Fyzikální vlastnosti medu

Závislosti fyzikálně-chemických vlastností medu na složení se využívá ke kontrole kvality medu.

Specifická hmotnost je závislá na obsahu vody. Měří se pyknometricky.

Viskozita je závislá především na obsahu vody v medu, teplotě a chemickém složení.

Index lomu světla n^D je závislý především na obsahu vody a teplotě.

Optická otáčivost Medy stáčejí rovinu polarizovaného světla zpravidla doleva, protože ve většině medů převažuje fruktóza. Výjimečně se vyskytují pravotočivé medy.

Barva je závislá především na botanickém původu medu, způsobu zpracování a délce skladování. Z rostlinných barviv ovlivňují barvu medu flavonoidy, antokyany, karotenoidy, xantofyly a chlorofyly.

Hygroskopicitá Jestliže ponecháme med v otevřené nádobě ve vlhkém prostředí, řídne, protože přijímá vodu z okolí. V suchém prostředí naopak obsah vody v medu klesá.

Krystalizace je dána tím, že med je přesyceným roztokem cukrů. Vzhledem k tomu, že z cukrů přítomných v medu je ve vodě nejméně rozpustná glukóza, je i stupeň přesycení nejvíce závislý na tomto cukru.⁽³¹⁾

3. CÍL PRÁCE

Cílem práce bylo vypracování optimálních chromatografických podmínek pro HPLC analýzu fumagillinu a vypracování metodiky izolace z medu.

4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1. Použitý chromatografický materiál, přístroje, pomůcky a chemikálie

Chromatografický materiál

- Chromatografická kolona 4x150 mm I.D. s náplní Separon SGX C18, 7 µm, Tessek, Praha, Česká Republika
- Chromatografická kolona 4x150 mm I.D. s náplní Separon SGX C8, 7 µm, Tessek, Praha, Česká Republika
- Chromatografická kolona 3x150 mm I.D. s náplní Separon SGX NH₂, 7 µm, Tessek, Praha, Česká Republika
- Chromatografická kolona 4x150 mm I.D. s náplní Separon SGX CN, 7 µm, Tessek, Praha, Česká Republika
- Chromatografická kolona 250×4 mm I.D. s náplní Lichrosorb RP-18C, 5 µm, Merck, Německo
- Chromatografická kolona 250 × 4 mm I.D. s náplní Lichrosorb DIOL, 10 µm, Merck, Německo
- Separační kolonka 9x20 mm s náplní Separon SGX C18, 60 µm, Tessek, Praha, Česká Republika

Přístroje

Kapalinový chromatograf HP1000 (Hewlett-Packard)

Analytické váhy, Helago, Česká Republika

Acidimetr 333, Druopta, Praha, Česká Republika

Spektrofotometr Shimadzu, UV-2401 PC, Shimadzu, Japonsko

Ultrazvuková lázeň K10, Kraitex, Slovensko

Zařízení na SPE, Supelco, Německo

Nylonový filtr 0,45 µm

Dusík (Linde Pardubice, ČR)

Pomůcky

Mikrostříkačka - 100 µl, Hamilton, Švýcarsko

Laboratorní sklo

Chemikálie

Fumagillin, Chinoin Budapešť, Maďarsko

Octan amonný p.a., Balex - Pardubice, Česká republika

Fosforečnan draselný kyselý p.a., Lachema-Brno, Česká republika

Methylalkohol p.a., Penta, Praha, Česká republika

Acetonitril PhEur, Merck, Německo

Tetrabutyl-ammonium bromid p.a., Lachema-Brno, Česká republika

Síran sodný krystalický p.a., Lachema-Brno, Česká republika

Kyselina fosforečná 85% p.a., Lachema-Brno, Česká republika

Hydroxid sodný p.a., Lachema-Brno, Česká republika

Ledová kyselina octová p.a., Lachema-Brno, Česká republika

Dichlormethan p.a., Balex-Pardubice, Česká republika

Octan ethylnatý p.a., Lachema-Brno, Česká republika

Chloramphenicolum, Galenická laboratoř Ostrava

Sulpirid, Sigma-Aldrich, Německo

4-Chloroacetanilid 97%, Sigma-Aldrich , Německo

Nimesulid , Sigma-Aldrich, Německo

Voda čištěná reverzní osmózou

Med

4.2. Vývoj chromatografických podmínek pro stanovení fumagillinu

Pro stanovení fumagillinu bylo nutné najít vhodné základní chromatografické podmínky, které zahrnují volbu optimální stacionární fáze, mobilní fáze, průtokové rychlosti a vhodné vlnové délky pro UV detekci. Následně pro zjištění eventuálního obsahu fumagillinu v medu bylo zapotřebí najít vhodnou izolační metodu.

Výběr stacionární a mobilní fáze

Jako stacionární fáze byla nejprve použita chromatografická kolona s náplní Separon SGX C18 (7 μm), 4x150 mm (číslo 1). Dále chromatografická kolona s náplní Separon SGX C8, (7 μm), 4x150 mm (číslo 2). Poté chromatografická kolona s náplní Lichrosorb DIOL, 10 μm , (číslo 3). Další chromatografická kolona s náplní Lichrosorb RP-18C (5 μm), 250x4 mm (číslo 4). Pátá chromatografická kolona byla s náplní nitrilovou (7 μm) 4x150 mm. Šestá chromatografická kolona byla aminová kolona (7 μm), 3x150 mm. K přípravě vzorku byla použita separační kolonka s náplní Separon SGX C18 (60 μm), 9x20 mm.

Na jednotlivých kolonách byly zkoušeny tyto mobilní fáze:

na koloně č.1:

- methanol : voda 60:40 (v/v)
- methanol : okyselená voda na pH 3,20 upraveno 10% H_3PO_4 ; 60:40 (v/v)
- methanol : fosforečnanový pufr (KH_2PO_4 0,05 mol/l; pH 4,8) 60:40 (v/v)
- methanol : fosforečnanový pufr (KH_2PO_4 0,05 mol/l; pH 3,08 - upraveno 10% H_3PO_4) 60:40 (v/v)
- acetonitril : fosforečnan amonný 70:30 (v/v)
- methanol : octan amonný (0,05 mol/l) 60:40
- methanol : octan amonný (0,005 mol/l) 60:40

na koloně č.2:

- methanol : voda (pH 3,1- upraveno 10% H_3PO_4) 60:40 (v/v)
- methanol : fosforečnan draselný 60:40 (v/v)
- acetonitril : voda : ledová kyselina octová 50:50:0,15 (v/v/v)

- methanol : fosforečnanový pufr (KH_2PO_4 0,05 mol/l; pH 4,8) 60:40 (v/v)
- acetonitril : fosforečnanový pufr (KH_2PO_4 0,05 mol/l; pH 4,8) 60:40 (v/v)
- methanol : síran sodný (0,02 mol) 60:40 (v/v)
- methanol : octan amonný (0,005 mol) 60:40 (v/v)

na koloně č.3:

- methanol : fosforečnanový pufr (KH_2PO_4 0,05 mol/l) 60:40 (v/v)
- acetonitril : voda : ledová kyselina octová 50:50:1,5 (v/v/v)
- acetonitril : fosforečnanový pufr (KH_2PO_4 0,05 mol/l; pH 3,04 - upraveno 10% H_3PO_4) 60:40 (v/v)

na koloně č.4:

- methanol : fosforečnanový pufr (KH_2PO_4 0,05 mol/l) 60:40 (v/v)

na koloně č. 5:

- methanol : fosforečnanový pufr (KH_2PO_4 0,05 mol/l) 60:40 (v/v)
- acetonitril : fosforečnanový pufr (KH_2PO_4 0,05 mol/l; pH 3,08 - upraveno 10% H_3PO_4) 60:40 (v/v)
- methanol : fosforečnanový pufr (KH_2PO_4 0,05 mol/l; pH 3,08 - upraveno 10% H_3PO_4) 60:40 (v/v)
- methanol : fosforečnanový pufr (KH_2PO_4 0,05 mol/l; pH 6,02 - upraveno 10% NaOH + 10 mg tetrabutylammonium bromid) 60:40 (v/v)
- acetonitril : fosforečnanový pufr (KH_2PO_4 0,05 mol/l; pH 3,06 - upraveno 10% H_3PO_4) 40:60 (v/v)
- acetonitril : fosforečnanový pufr (KH_2PO_4 0,05 mol/l; pH 3,60 - upraveno 10% H_3PO_4) 50:50 (v/v)
- acetonitril : fosforečnanový pufr (KH_2PO_4 0,05 mol/l; pH 3,60 - upraveno 10% H_3PO_4) 55:45 (v/v)
- acetonitril : fosforečnanový pufr (KH_2PO_4 0,05 mol/l; pH 3,08 - upraveno 10% H_3PO_4) 50:50 (v/v)

- acetonitril : fosforečnanový pufr (KH_2PO_4 0,05 mol/l; pH 3,08 - upraveno 10% H_3PO_4) 55:45 (v/v)
- aceton : fosforečnanový pufr (KH_2PO_4 0,05 mol/l; pH 3,64 - upraveno 10% H_3PO_4) 60:40 (v/v)
- methanol : octan amonný (0,005 mol) 60:40 (v/v)
- methanol : síran sodný (0,02 mol) 60:40 (v/v)

na koloně č.6:

- methanol : octan amonný (0,005 mol/l) 60:40 (v/v)

Vlnová délka byla vybrána na základě změření spektra fumagillinu. Ten vykazoval 4 maxima vlnových délek (202 nm, 241 nm, 335 nm a 349 nm). Pro analýzu byla zvolena vlnová délka s nejvýraznější absorbancí, což bylo 335 nm.

Analýza probíhala při **průtokových rychlostech** od 0,4 – 1,0 ml/min.

Výběr vnitřního standardu

Pro kvantitativní analýzu byla zvolena metoda vnitřního standardu. Při výběru vhodného standardu byly zkoumány tyto látky.

- chloramfenikol
- sulpirid
- 4–chloracetanilid
- nimesulid
- tetracyklin

Z vytipovaných léčiv - chloramfenikol, sulpirid a 4-chloracetanilid neabsorbovaly při vlnové délce 335 nm. Tetracyklin nevyhovoval z důvodu krátkého retenčního času.

Nimesulid byl při výběru vnitřního standardu nejvhodnější, jeho pík byl symetrický a oba píky se dělily až na základní linii.

Příprava mobilní fáze

Ke stanovení fumagillinu byla použita mobilní fáze methanol : octan amonný (0,005 mol/l) v poměru 60:40. Nejdříve byl připraven vodný roztok octanu amonného, který byl přefiltrován přes nylonový filtr- 0,45 μ m. Takto připravený roztok se smíchá s methanolem v uvedeném poměru.

Příprava modelového vzorku pro analýzu

Bylo naváženo 10,0 g medu, přidáno 10,0 ml methanolu, 300 μ l roztoku fumagillinu (vodný roztok o koncentraci 0,05 mol/l). Vzorek byl následně homogenizován a 10 min třepán na třepačce. Pak zfiltrován a 5,0 ml filtrátu bylo podrobena solid-phase extrakci. Nejprve byla separační kolonka aktivována pomocí 5,0 ml vody a 5,0 ml methanolu. Poté byl aplikován vzorek, balastní látky vymyty 5,0 ml vody a analyzovaná látka eluována 2,0 ml methanolu. Takto připravený vzorek byl vysušen dusíkem do sucha a sušina rozpuštěna v 0,5 ml methanolu. Výsledný vzorek byl nastříkovan na kolonu (20 μ l).

Příprava vnitřního standardu

0,125 g nimesulidu bylo rozpuštěno v 25,0 ml methanolu, z tohoto roztoku byl odebrán 1,0 ml, který byl dán do 10 ml odměrné baňky a doplněn methanolem po rysku.

Příprava zásobního roztoku

Zásobní roztok používaný pro přípravu kalibračních roztoků a vzorku pro samostatnou analýzu fumagillinu byl připraven následujícím způsobem: 0,1 g fumagillinu bylo naváženo do 100 ml odměrné baňky a doplněno methanolem po značku (1 mg/ml).

Příprava vzorku medu (placebo)

Bylo naváženo 10g medu, přidáno 10,0 ml methanolu. Vzorek byl homogenizován a 10 min. třepán na třepačce a následně zfiltrován. 5,0 ml filtrátu bylo podrobena solid – phase extrakci. Poté byl vzorek vysušen dusíkem do sucha a sušina rozpuštěna v 0,5 ml methanolu. Výsledný vzorek byl nastříkovan na kolonu.

4.2.1. Validace metody

Z validačních parametrů byla ověřena linearita a extrakční účinnost.

Linearita

Linearita metody byla ověřena na základě kalibrační křivky. Kalibrační křivka byla sestrojena jako závislost poměru ploch fumagillinu ku nimesulidu na příslušných koncentracích. Pro její sestavení byly použity roztoky o 4 různých koncentracích fumagillinu (6,8 µg/ml; 8,5 µg/ml; 11,9 µg/ml; 14 µg/ml), kdy každý vzorek obsahuje 1,0 ml zásobního roztoku nimesulidu . Kalibrační roztoky byly připraveny naředěním příslušného množství zásobního roztoku fumagillinu methanolem na objem 10,0 ml a nastříkovány na kolonu. Měření bylo provedeno třikrát u každé koncentrace vzorku. Získané údaje byly vyhodnoceny, zpracovány do tabulky a na jejich základě sestrojena kalibrační křivka, která byla následně použita i pro stanovení fumagillinu.

Extrakční účinnost

Extrakční účinnost byla ověřena pomocí ploch píku fumagillinu ve vzorku a plochy píku standardního roztoku fumagillinu.

5. VÝSLEDKY A DISKUZE

5.1. Vývoj chromatografických podmínek pro HPLC analýzu fumagillinu

STACIONÁRNÍ FÁZE

Při vývoji optimálních chromatografických podmínek pro hodnocení fumagillinu byly vyzkoušeny různé stacionární fáze. Jako nejvhodnější stacionární fáze byla vybrána chromatografická kolona 3x150 mm I.D. s náplní Separon SGX NH₂, 7 μm, od firmy Tessek.

MOBILNÍ FÁZE

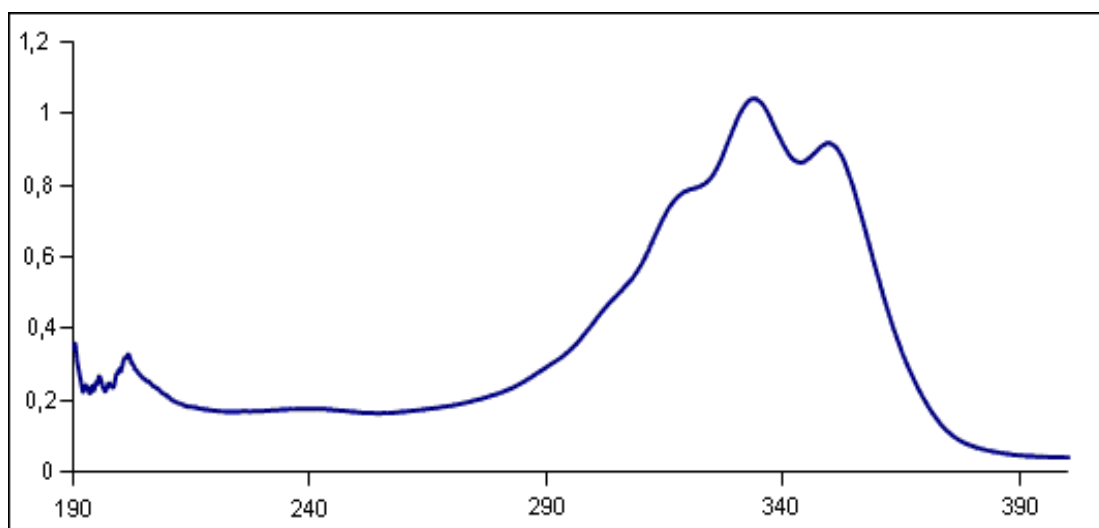
Byly vyzkoušeny různé mobilní fáze v různých poměrech. Nejvhodnější mobilní fáze byla směs methanol : octan amonný (vodný roztok 0,005 mol/l) v poměru 60:40. Tato fáze poskytovala nejlepší záznamy. Při použití ostatních mobilních fází nedocházelo k úplnému rozdělení píků nebo retenční časy zkoumaných látek byly velmi blízké a tudíž se píky navzájem překrývaly a nebyly rozděleny na základní linii.

Průtoková rychlost byla zvolena 1,0 ml/min, **tlak** se pohyboval od 25 do 27 bar.

DETEKCE

Detekce byla prováděna v oblasti UV spektra, fumagillin měl 4 maxima, při 202 nm, 241 nm, 335 nm a 349 nm. Nejvhodnější vlnová délka byla při 335 nm, protože vykazovala nejvýraznější absorbanci.

Obr. č.1 : Absorpční spektrum fumagillinu



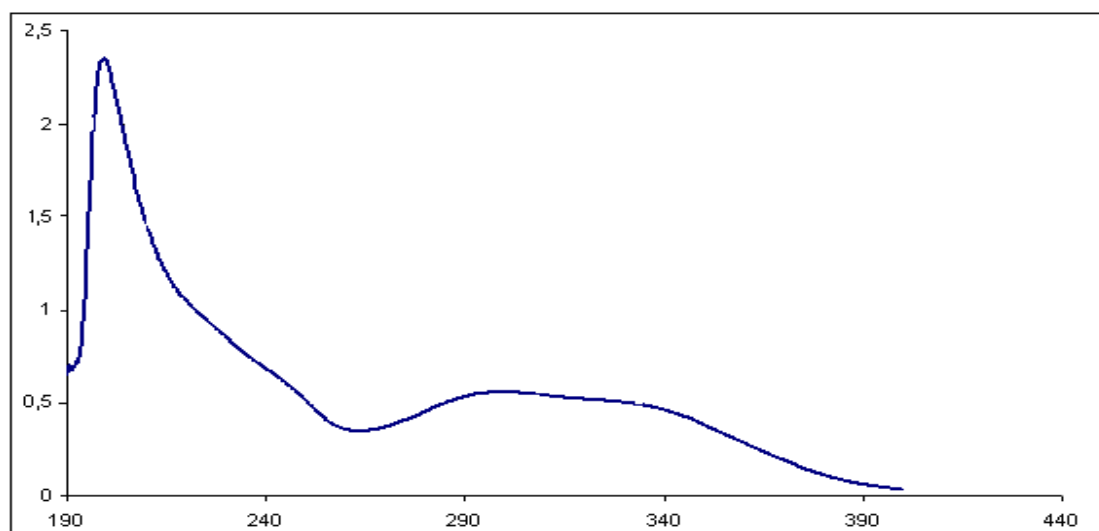
Absorpční maxima:

$\lambda = 349,20 \text{ nm}$	$A = 0,9165$
$\lambda = 334,00 \text{ nm}$	$A = 1,0408$
$\lambda = 241,40 \text{ nm}$	$A = 0,1738$
$\lambda = 201,80 \text{ nm}$	$A = 0,3259$

VNITŘNÍ STANDARD

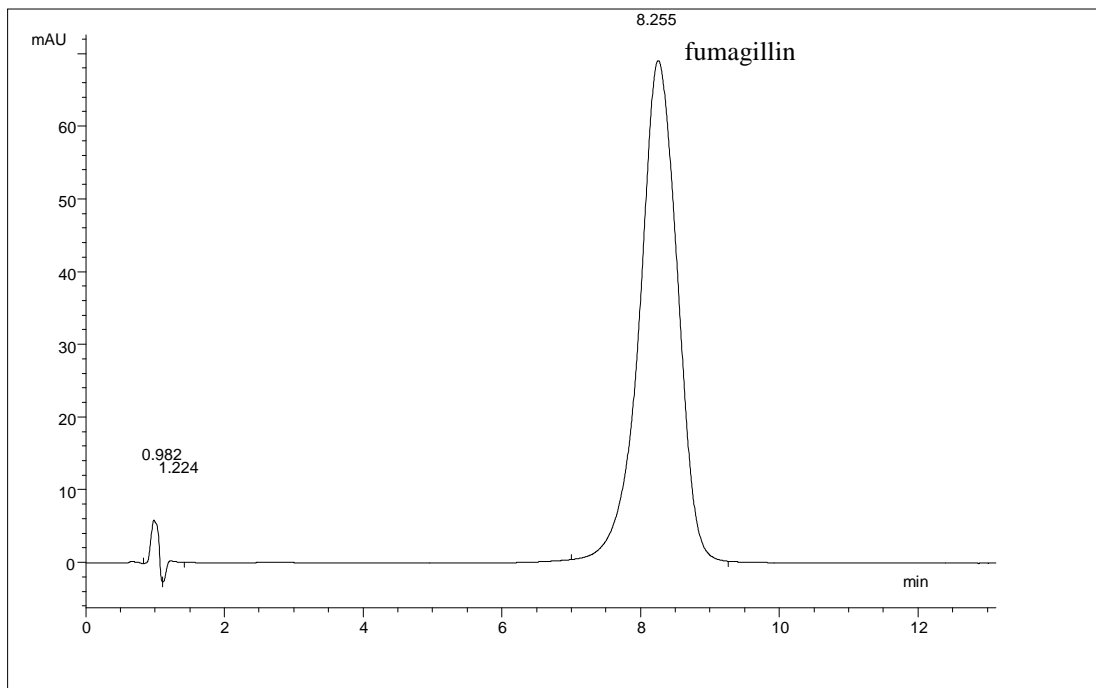
Nimesulid byl při výběru vnitřního standardu nejvhodnější, jeho pík byl symetrický a oba píky se dělily až na základní linii.

Obr. č.2 : Absorpční spektrum nimesulidu



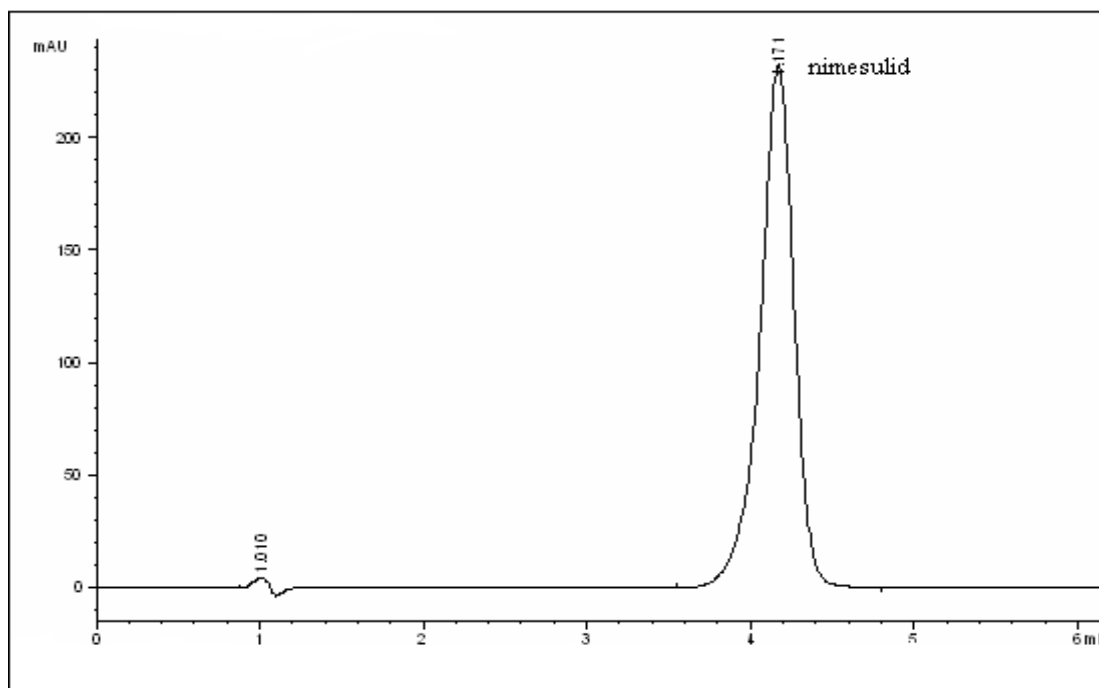
Absorpční maxima:

$\lambda = 194,60 \text{ nm}$	$A = 0,3166$
$\lambda = 201,60 \text{ nm}$	$A = 0,9557$
$\lambda = 298,20 \text{ nm}$	$A = 0,2548$
$\lambda = 323,40 \text{ nm}$	$A = 0,2426$

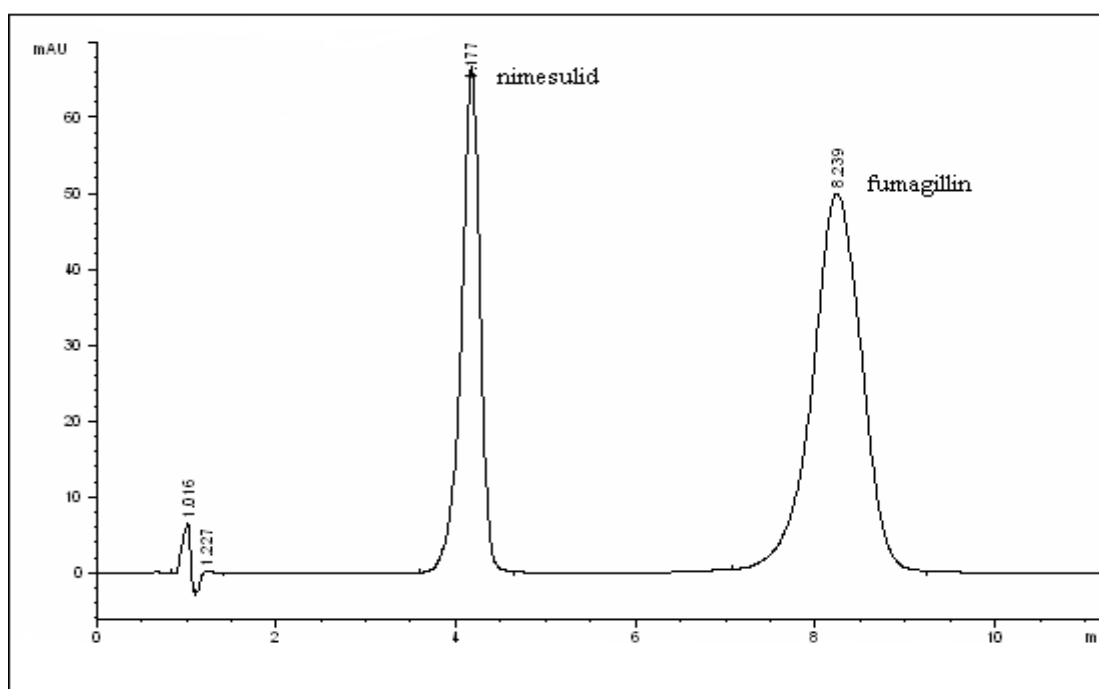


Obr. č. 3 : Chromatografický záznam fumagillinu (methanolický roztok 1mg/ml)

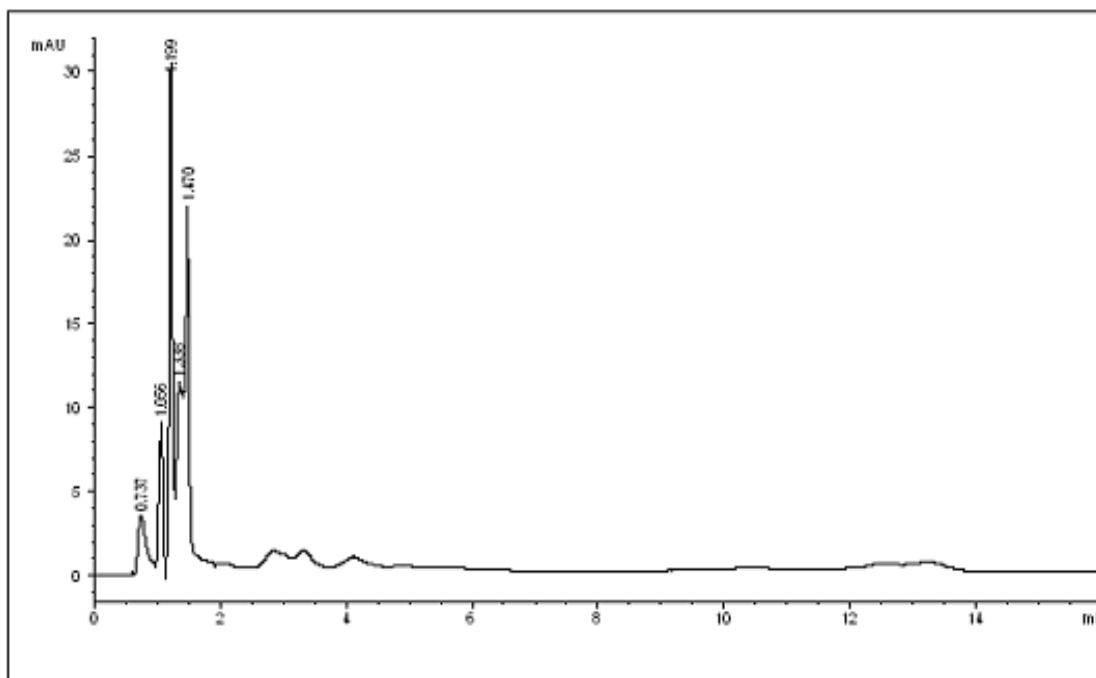
Chromatografické podmínky: kolona 3x150 nm I.D. s náplní Separon SGX NH₂, 7 μm; **mobilní fáze** : methanol : octan amonný (vodný roztok 0,005 mol/l, v/v) v poměru 60 : 40, **průtoková rychlost** 1 ml/min, $\lambda = 335$ nm, **nástřik**: 20 μl



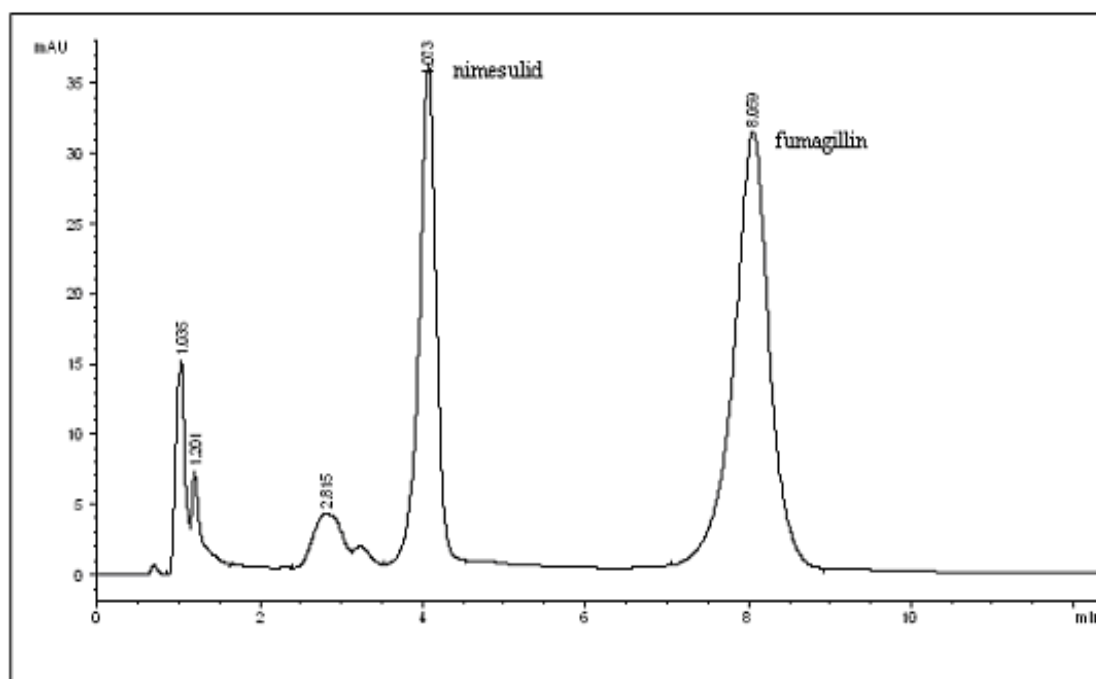
Obr. č. 4 : Chromatografický záznam vnitřního standardu (nimesulid 1mg/ml v methanolu), chromatografické podmínky viz obr.č.1



Obr. č. 5 : Chromatografický záznam fumagillinu a vnitřního standardu, chromatografické podmínky viz obr. č. 1



Obr. č. 6 : Chromatografický záznam extraktu medu, chromatografické podmínky viz obr. č. 1

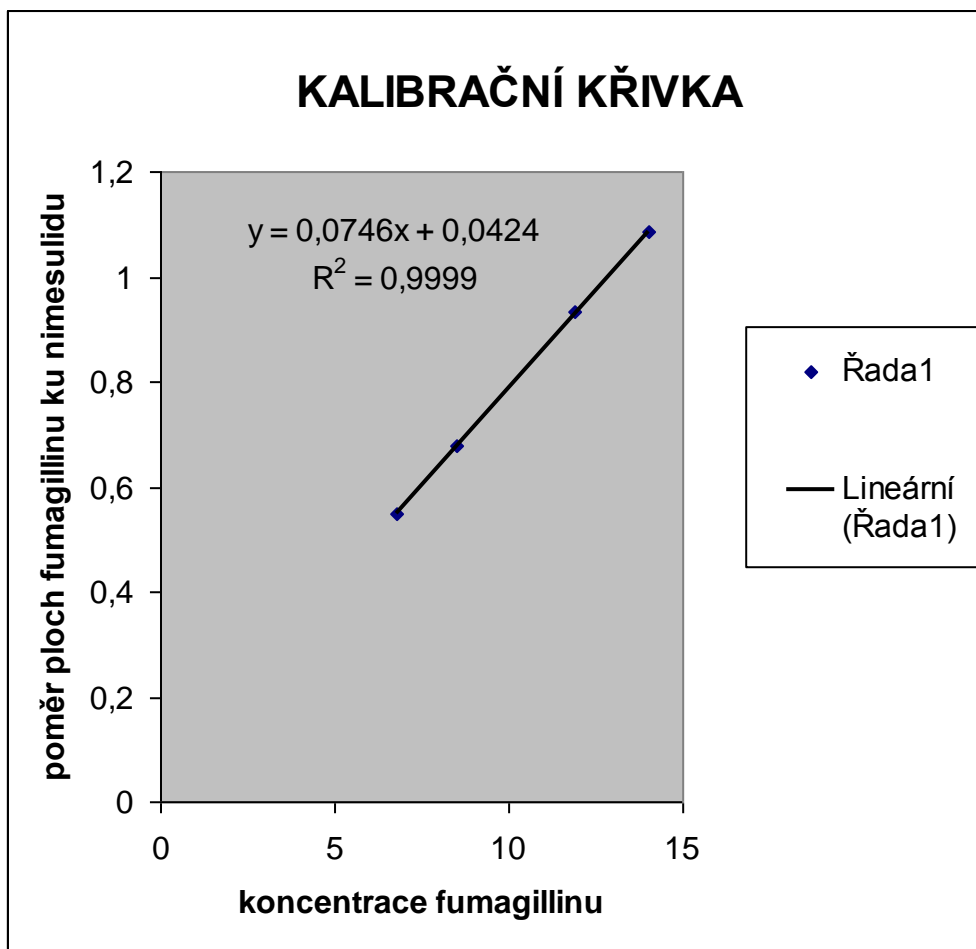


Obr. č. 7 : Chromatografický záznam medu s přidáním fumagillinem a vnitřním standardem, chromatografické podmínky viz obr. č. 1

Z validačních parametrů byla ověřena linearita fumagillinu, kde byla použita metoda kalibrační křivky. K jejímu sestrojení byly použity čtyři koncentrace fumagillinu (viz. Kapitola 4.2.1)

Tabulka č.1: Hodnoty pro koncentraci kalibrační křivky

vzorek	Plocha		Poměr ploch fum/nimesulid	průměr
	Fumagillin	nimesulid		
1	510.6	904.5	0,566	0,548
	513.1	944.1	0,543	
	514.5	958.6	0,537	
2	653.1	965.1	0,677	0,677
	656.2	966.8	0,679	
	651.9	967.9	0,674	
3	931.2	999.3	0,932	0,933
	924.1	088.7	0,935	
	914.2	980	0,933	
4	1039.1	959.5	1,083	1,084
	1054	987.8	1,067	
	1067.6	969.6	1,101	



Pro vyhodnocení chromatografických záznamů byla sestrojena kalibrační křivka (závislost koncentrace fumagillinu na poměru ploch fumagillinu ku nimesulidu), která vykazuje lineární průběh v rozmezí daných koncentrací. Její parametry jsou:

Rovnice regresní přímky: $y = 0,076x + 0,0424$

Korelační koeficient: $R^2 = 0,9999$

6. ZÁVĚR

V diplomové práci byly vypracovány optimální chromatografické podmínky pro HPLC analýzu fumagillinu v medu a postup izolace tohoto léčiva z medu. Měření bylo prováděno na chromatografické koloně o rozměrech 3x150 mm I.D. s náplní Separon SGX NH₂, 5 μm. Byla použita mobilní fáze ve složení methanol : octan amonný (vodný roztok 0,005 mol/l, v/v) v poměru 60:40, průtoková rychlost 1 ml/min při tlaku 25 až 26 bar. Vzorby byly nastříkány v objemu 20 μl.

Pro stanovení fumagillinu v medu byla vypracovaná metoda vnitřního standardu. Při zvolených podmínkách nejvíce vyhovoval nimesulid. Z validačních parametrů byla ověřena linearita na základě kalibrační křivky, kde rovnice regresní přímky je $y = 13,408 x - 0,5671$ a korelační koeficient je $R^2 = 0,9999$. Bylo dosaženo extrakční účinnosti 56 %.

7. LITERATURA

- 1) Karlíček, R. a kol.: Analytická chemie pro farmaceuty, Karolinum, Praha 1998
- 2) Mikeš, O.: Základní typy chromatografie. In: Mikeš, O a kol.: Laboratorní chromatografické metody, SNTL, Praha 1980
- 3) Motl, O.; Novotný, L.: Adsorpční a rozdělovací kolonová chromatografie. In: Mikeš, O. a kol.: Laboratorní chromatografické metody, SNTL, Praha 1980
- 4) www.mzcr.cz/data/c764/lib/ajald.htm (9.12.07)
- 5) [http://rum.bf.jcu.cz/public/fyzikala/texty_opraveno/13Chromatografie\(opraveno\)r.doc](http://rum.bf.jcu.cz/public/fyzikala/texty_opraveno/13Chromatografie(opraveno)r.doc) (9.12.07)
- 6) www.mzcr.cz/data/c764/lib/ajayh.htm (9.12.07)
- 7) Churáček, J.; Jandera, P.: Úvod do vysokoúčinné kapalinové kolonové chromatografie, SNTL, Praha 1985
- 8) Klíma, J.; Grafnetterová, J.: Využití kapalinové a plynové chromatografie v klinické farmakologii. In: Pokroky ve farmacii 7, Avicenum, Praha 1987
- 9) Churáček, J.; Jandera, P.: Separace látek, Kapalinová vysokoúčinná kolonová chromatografie, SNTL, Praha 1986
- 10) Chromatografické metody, veličiny a výpočty, podklady pro seminář, katedra farmaceutické chemie a kontroly léčiv, Hradce Králové 2006
- 11) Český lékopis (ČL 2002), Grada, Praha 2002
- 12) Klimeš, J. a kol.: Kontrola léčiv I., Karolinum, Praha 2002
- 13) Churáček, J.: Advanced Instrumental Methods of Chemical Analysis, Academia, Praha 1993
- 14) Meloun, B.: Automatizace a mechanizace kolonových operací v kolonové chromatografii. In: Mikeš, O. a kol.: Laboratorní chromatografické metody, SNTL, Praha 1980
- 15) Bezáková a kol.: Základy farmaceutickej analýzy, Vaprint, Bratislava 2002
- 16) Szepezi, G.: How to use reverse phase HPLC, VCH Publishers Inc., USA 1992
- 17) <http://ciselniky.dasta.mzcr.cz/hypertext/200620/hypertext/BOAJALB.htm> (5.2.08)
- 18) Chemagazin 2003, č. 3, ročník XIII, 34-35
- 19) www.hplc.cz/Fag/monolithic_columns.htm (5.2.08)
- 20) www.hplc.cz/Teorie/FL_detector.html (5.2.08)
- 21) Holzbecher, Z.; Churáček, J. a kol.: Analytická chemie, SNTL ALFA, Praha 1987
- 22) Validace analytických metod v kontrole léčiv, Věstník SÚKL 1/94, SÚKL Praha 1994
- 23) Pharmazeutische Stoffliste, 8. Auflage, ENDBA, Frankfurt am Mai, 1992
- 24) Vodrážka a kol.: Veterinárská medicína a farmakológia, Osveta, Martin 1986

- 25) Kocman, J.; Čupera, Z. a kol.: Vademekum registrovaných veterinárních přípravků 1997, Strategie Praha
- 26) Kochansky, J. and Nasr, M.: Laboratory studies on the photostability of fumagillin, the aktive ingredient of Fumidil B¹, *Apidologie*, 2004, 35, 301-310
- 27) Nozala, Ma.J.; Bernala J.L.; Martínez, Ma.T.; Bernala, J.; Álvaroa, A.; Martínez, R. and Higesb, M.: Trace analysis of fumagillin in honey by liquid chromatography-diode array- electrospray ionization mass spectrometry, *J. Chromatogr. A*, 2008, 1190, 224-231
- 28) Assil Hanna I. and Sporns, P.: Elisa and HPLC methods analysis of fumagillin its decomposition products in honey, *J. Agric. Food Chem.*, 1991, 39, 2206-2213
- 29) Morovján, G.; Szakács, G. and Fekete, J.: Monitoring of selected metabolites and biotransformation products from fermentation broths by high-performance liquid chromatography, *J. Chromatogr. A*, 1997, 763, 165-172
- 30) Brackett, J.M.; Arguello, M.D.; Schaar, J.C.: Determination of fumagillin by high performance liquid chromatography, *J. Agric. Food Chem.*, 1988, 36, 762-764
- 31) Veselý a kol.: Včelařství, Brázda s.r.o., Praha 2003
- 32) Knollerová, R.: Knížka o medu, Granit s.r.o., Praha 1999
- 33) Opatrný, T.: *Advancis in chromatography and electrophoresis 2007*, Univerzita Olomouc, 2007
- 34) Holčapek, M.: *Spojení HPLC a hmotnostní spektrometrie*, Univerzita Pardubice 2001
- 35) Výroční práce za rok 2005, Výzkumný ústav včelařství, Libice nad Vltavou
- 36) Lopez, M.I.; Pettis, J.S.; Smith, I.B. and Pak-Sin Chu: Multiclass determination and confirmation of antibiotic residues in honey using LC-MS/MS, *J. Agric. Food Chem.*, 2008, 56(5), 1553-1559
- 37) Lefkove, B.; Govindarajan, B.; Arbiser, J.L.: Fumagillin: an anti-infective as a parent molecule for novel angiogenesis inhibitors, *Expert Rev. Anti-Infect. Ther.* 2007, 5(4), 573-579
- 38) Stanimirovica, Z.; Stevanovica, J.; Bajicb, V. and Radovicc, I.: Evaluation of genotoxic effects of fumagillin by cytogenetic tests in vivo, *Mutat. Res.-Gen. Tox. En.*, 2007, 628, 1-10
- 39) Chen, G-J.; Weylie,-B.; Hu, C.; Zhu, J.; Forough, R.: FGFR1/PI3K/AKT signaling pathway is a novel target for antiangiogenic effects of the cancer drug fumagillin (TNP-470), *J. Cell. Biochem.*, 2007, 101(6): 1492-504

- 40) Ciampini, M.; Perlmutterand, P.; Watson, K.: Enantioselective synthesis of a potential key intermediate for the total synthesis of fumagillin, *Tetrahedron-Asymmetr.*, 2007, 18, 243-250
- 41) Keller, N.; Bok, J.; Chung, D.; Perrin, R.M.; Keats-Shwab, E.; Lae, A.: A global regulator of *Aspergillus* toxins, *Med-Mycol.* 2006, 44, 83-85
- 42) Pyun Hyung-Jung; Fardis, M.; Tario, J.; Yang Cheng, Y.; Ruckman, J.; Henninger, D.; Jin, H. and Choung, U. Kim: Investigation of novel fumagillin analogues as angiogenesis inhibitors, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2004, 14, 91-94
- 43) Fardis, M.; Pyuna Hyung-Jung; Tarioa, J.; Jina, H.; Choung, U. Kima; Ruckmanb, J.; Linc, Y.; Greenc, L. and Hicked B.: Design, synthesis and evaluation of a series of novel fumagillin analogues, *Bioorgan. Med. Chem.*, 2003, 11, 5051-5058
- 44) Whittington R. and Winston M.L.: Effects of *Nosema bombi* and its treatment fumagillin on bumble bee (*Bombus occidentalis*) colonies, *J. Invertebr. Pathol.*, 2003, 84, 54-58
- 45) Molina, J-M.; Tourneur, M.; Sarfati, C.; Chevret, S.; de Gouvello, A.; Gobert, J-G.; Balkan, S.; Derouin, F.: Fumagillin Treatment of Intestinal Microsporidiosis, *New Engl. J. Med.*, 2002, 25, 346: 1936-1969
- 46) Source, B.A.: Fumagillin fights intestinal microsporidiosis, *Lancet Infect. Dis.*, 2002, 2, 513
- 47) Webster, T.C.: Fumagillin affects *Nosema apis* and honey bees, *J. Econ. Entomol.*, 1994, 87(3), 601-604
- 48) Katznelson, H. and Jamieson, C.A.: Control of *Nosema* Disease of Honeybees with Fumagillin, *Science*, 1952, 18, 70-71

SOUHRN

Analytické hodnocení léčiv s využitím chromatografických metod III.

Diplomová práce

Kristýna Strýčková

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

V této diplomové práci byly vypracovány optimální chromatografické podmínky pro HPLC analýzu fumagillinu v medu a postup izolace tohoto léčiva z medu. Optimální výsledky poskytovala analýza na koloně firmy Tessek s náplní Separon SGX NH₂, za použití mobilní fáze ve složení methanol : octan amonný (vodný roztok 0,005 mol/l, v/v) v poměru 60:40, při průtokové rychlosti 1 ml/min a tlaku 25 až 26 bar. Detekce byla prováděna při 335 nm pomocí UV detektoru.

Pro stanovení fumagillinu v medu byla vypracovaná metoda vnitřního standardu. Při zvolených podmínkách nejvíce vyhovoval nimesulid. Z validačních parametrů byla ověřena linearita na základě kalibrační křivky.

ABSTRACT

Analytical evaluation of drugs using Chromatographic Methods III.

Thesis

Kristýna Strýčková

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

The thesis draws up the optimum chromatographic conditions for the HPLC analysis of fumagillin in honey and the procedure of the isolation of the drug from honey. The optimum results were provided by the analysis on the Tessek column with the Separon SGX NH₂ filling, while using the mobile phase composed of methanol : ammonium acetate (aqueous solution 0.005 mol/l, v/v) in the ratio of 60:40, at a flow rate of 1 ml/min and pressure of 25 to 26 bar. The detection was performed at 335 nm using the UV detector.

The internal standard method was drawn up for the determination of fumagillin in honey. Nimesulid suited the selected conditions most. As far as the validation parameters are concerned, the linearity was verified on the basis of calibration curve.