

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
FARMACEUTICKÁ FAKULTA
V HRADCI KRÁLOVÉ

KATEDRA ANALYTICKÉ CHEMIE



OPTIMALIZACE A VALIDACE HPLC METODY PRO STANOVENÍ
DIKLOFENAKU SODNÉHO A JEHO DEGRADAČNÍHO PRODUKTU
V TABLETÁCH

Diplomová práce

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

Hradec Králové 2012

Agáta Birková

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

Agáta Birková

Na tomto místě bych ráda vyjádřila poděkování své školitelce PharmDr. Ludmile Matysové, Ph.D. za odborné vedení, pomoc a trpělivost při vypracování této práce.

Mé poděkování patří i ostatním pracovníkům Katedry analytické chemie za pomoc a vstřícnost při experimentální práci v laboratoři.

ABSTRAKT

Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra analytické chemie

Kandidát: Agáta Birková

Školitel: PharmDr. Ludmila Matysová, Ph.D.

Název diplomové práce: **Optimalizace a vývoj HPLC metody pro stanovení diklofenaku sodného a jeho degradačního produktu v tabletách**

V této diplomové práci byla optimalizována a validována HPLC metoda pro stanovení diklofenaku sodného (DF) a jeho degradačního produktu 1-(2,6-dichlorfenyl)indolin-2-onu (DPI) v tabletách. DF je nesteroidní antiflogistikum s analgetickými, protizánětlivými a antipyretickými účinky. Degradační produkt DPI vzniká v lékových formách při delším skladování, zejména po expozici světlem a teplem. Při vývoji metody se vycházelo z metody vyvinuté na Farmaceutické fakultě Univerzity Karlovy pro stanovení DF, jeho degradačního produktu a konzervačních látek v topickém emulgelu. Metoda byla optimalizována pro stanovení v tabletách. Byla zvolena monolitická kolona Chromolith® Performance RP-18e (100×3 mm, Merck) a vnitřní standard flurbiprofen. Mobilní fázi představovala směs methanolu a vodného roztoku kyseliny fosforečné o pH 2,5 v poměru 65:35 s průtokem 1 ml/min. Detekce probíhala při 254 nm UV detektorem. Byla testována účinnost chromatografického systému a metoda byla validována. Byly ověřeny tyto parametry: přesnost metody (relativní směrodatná odchylka RSD% pro DPI 0,96%, pro DF 0,46 %), linearita (lineární závislost pro DPI prokázána v koncentraci 0,05-0,5 mg/ 100 ml, rovnice regresní přímky $y = 0,4202x + 0,0019$, $R = 0,99978$, pro DF 10-35 mg/ 100 ml, $y = 0,2788x - 0,09$, $R = 0,99951$), správnost (pouze pro DF metodou standardního přídávku s RSD% 0,90% a hodnotou výtěžnosti v rozmezí 100,51 až 102,78), pro degradační produkt DPI byla stanovena nejnižší detekovatelná koncentrace 0,0028 mg.l⁻¹ a jako kvantitativní limit koncentrace 0,0095 mg.l⁻¹. Dále byla testována robustnost a selektivita. Dle výsledků validace lze usuzovat, že metoda poskytuje přesné a správné výsledky a je vhodná pro stanovení diklofenaku sodného a jeho degradačního produktu v přípravku Veral tablety. Využití monolitické kolony snížilo čas analýzy o 75 % (původní metoda < 17 min, nyní < 4 min).

ABSTRACT

Charles University in Prague, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Analytical Chemistry

Candidate: Agáta Birková

Supervisor: PharmDr. Ludmila Matysová, Ph.D.

Title of Diploma Thesis: **Optimization and validation of HPLC method for the determination of sodium diclofenac and its degradation product in tablets**

This diploma thesis deals with the optimisation and the validation of the HPLC method determination of sodium diclofenac (DF) and its degradation product 1-(2,6-dichlorophenyl)-indolin-2-on (DPI) in tablets. DF is a non-steroidal anti-inflammatory drug with analgesic, antipyretic and anti-inflammatory effects. The degradation product DPI has been produced in formulations after a long-term storage, especially after exposure to light or heat. The method development was based on a method created by the Pharmaceutical Faculty of Charles University for the determination of DF, its degradation product and preservatives in topical emulgel and the method was optimised for determination of DF and DPI in tablets. The monolithic column Chromolith® Performance RP-18e (100×3 mm, Merck) and flurbiprofen as an internal standard were chosen. The mobile phase was prepared of methanol and aqueous solution of phosphoric acid (pH 2,5) in the ratio of 65:35 and the flow rate of 1 ml/min. An UV detector at 254 nm was used. The suitability of chromatographic system was tested and the method was validated. The following parameters were verified: accuracy (relative standard derivation RSD_% 0,96% for DPI, 0,46% for DF), linearity (linear dependence for DPI was demonstrated in range of 0,05-0,5 mg/100 ml, regression line $y = 0,4202x + 0,0019$, $R = 0,99978$, for DF on 10-35 mg/100 ml, $y = 0,2788x - 0,09$, $R = 0,99951$), precision (only for DF, recovery in range of 100,51-102,78%, RSD_% 0,90%), the limit for detection (0,0028 mg.l⁻¹) and limit of quantitation (0,0095 mg.l⁻¹) was determined for the degradation product. The robustness and selectivity were also tested. According to the results of validation, the method provides precise and accurate results and it is suitable for the determination of sodium diclofenac and its degradation product in Veral tablets. The use of monolithic column reduced the time of analysis by 75% (the original method < 17 min, now < 4 min).

SEZNAM ZKRATEK

ACN	Acetonitril
APCI	Chemická ionizace za atmosférického tlaku
ATC	Anatomicko-terapeuticko-chemická klasifikace léčiv
COX	Cyklooxygenáza
CZE	Kapilární zónová elektroforéza
ČL	Český lékopis
ČSAV	Československá akademie věd
DAD	Diode array detector
DF	Diklofenak sodný
DPI	1-(2,6-dichlorfenyl)indolin-2-on
EME	Elektromembránová extrakce
ESI	Ionizace elektrosprejem
GC	Plynová chromatografie
GLC	Chromatografie (separace) kapalina – plyn
GPC	Gelová chromatografie
GSC	Chromatografie (separace) pevná látka – plyn
FoP	Fosforečnanový pufr
FTIR	Fourier transform infrared (spectroscopy)
HPLC	Vysokoučinná kapalinová chromatografie
HPTLC	Vysokoučinná tenkovrstvá chromatografie
IBU	Ibuprofen
IEC	Iontově výměnná chromatografie
IS	Vnitřní standard
LC	Kapalinová chromatografie
LLC	Chromatografie (separace) kapalina – kapalina
LSC	Chromatografie (separace) kapalina – pevná látka
MeOH	Methanol

MF	Mobilní fáze
MS	Hmotnostní spektrometrie
NK	Nukleová kyselina
NP	Systém normálních fází
NSAID	Nesteroidní antiflogistikum
ORL	Otorhinolaryngologie
PC	Papírová chromatografie
PEEK	Poly(ether-ether-ke-ton)
PTFE	Polytetrafluorethylen
RF	Systém reverzních fází
RSD%	Relativní směrodatná odchylka
SAC	Salicylová kyselina
SD	Směrodatná odchylka
SF	Stacionární fáze
SFC	Chromatografie s nadkritickými tekutinami
SPC	Souhrn údajů o přípravku
SSRI	Selektivní inhibitor zpětného vychytávání serotoninu
SÚKL	Státní ústav pro kontrolu léčiv
TEA	Triethylamin
THF	Tetrahydrofuran
TLC	Chromatografie na tenké vrstvě
UHPLC	Ultraúčinná kapalinová chromatografie
UV	Ultrafialová oblast spektra
α -CD	α -cyklodextrin

OBSAH

1	ÚVOD	11
2	CÍL A POPIS ZADÁNÍ PRÁCE	12
3	TEORETICKÁ ČÁST	13
3.1	CHROMATOGRAFICKÉ METODY	13
3.2	ROZDĚLENÍ CHROMATOGRAFICKÝCH METOD	13
3.2.1	ROZDĚLENÍ PODLE CHARAKTERU MOBILNÍ FÁZE	13
3.2.2	ROZDĚLENÍ PODLE USPOŘÁDÁNÍ STACIONÁRNÍ FÁZE	16
3.2.3	ROZDĚLENÍ PODLE USPOŘÁDÁNÍ FÁZÍ	19
3.2.4	ROZDĚLENÍ PODLE PODSTATY SEPARAČNÍHO PROCESU	20
3.2.5	ROZDĚLENÍ PODLE ZPŮSOBU VYVÍJENÍ CHROMATOGRAMU	23
3.3	VYSOKOÚČINNÁ KAPALINOVÁ CHROMATOGRAFIE	25
3.3.1	SOUČÁSTI CHROMATOGRAFU	25
3.3.2	KVALITATIVNÍ A KVANTITATIVNÍ HODNOCENÍ CHROMATOGRAFICKÝCH DAT	36
3.3.3	VYUŽITÍ HPLC	37
3.4	VALIDACE ANALYTICKÝCH METOD	37
3.4.1	TEST ZPŮSOBILOSTI CHROMATOGRAFICKÉHO SYSTÉMU	38
3.4.2	PŘESNOST	39
3.4.3	SPRÁVNOST	40
3.4.4	LINEARITA	40
3.4.5	ROBUSTNOST	40
3.4.6	SELEKTIVITA (SPECIFITA)	40
3.4.7	DETEKČNÍ LIMIT	40
3.4.8	KVANTITATIVNÍ LIMIT	40
3.4.9	ROZSAH	41
3.5	DIKLOFENAK SODNÝ	41

3.5.1	KLINICKÉ ÚDAJE	42
3.5.2	FARMAKOLOGICKÉ VLASTNOSTI.....	43
3.6	DEGRADAČNÍ PRODUKT 1-(2,6-DICHLORFENYL)INDOLIN-2-ON.....	43
3.7	PŘEHLED PRACÍ ZABÝVAJÍCÍCH SE STANOVENÍM DF A DPI.....	44
3.7.1	PRÁCE ZABÝVAJÍCÍ SE STANOVENÍM DF A DPI	44
3.7.2	PRÁCE ZABÝVAJÍCÍ SE STANOVENÍM DF METODOU HPLC.....	45
4	<u>EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST</u>	53
4.1	POUŽITÝ CHROMATOGRAFICKÝ MATERIÁL, PŘÍSTROJE, CHEMIKÁLIE, POMŮCKY	53
4.1.1	VZORKY LÉČIVÝCH PŘÍPRAVKŮ.....	53
4.1.2	CHEMIKÁLIE.....	53
4.1.3	HPLC SESTAVA A KOLONA	53
4.1.4	PŘÍSTROJE	53
4.1.5	POMŮCKY.....	54
4.2	ZPRACOVÁNÍ VZORKU.....	54
4.3	PŘÍPRAVA ROZTOKŮ.....	55
4.3.1	PŘÍPRAVA STANDARDNÍHO ROZTOKU.....	55
4.3.2	PŘÍPRAVA ROZTOKŮ PRO MĚŘENÍ PŘESNOSTI.....	55
4.3.3	PŘÍPRAVA ROZTOKŮ PRO MĚŘENÍ LINEARITY	55
4.3.4	PŘÍPRAVA ROZTOKŮ PRO MĚŘENÍ SPRÁVNOSTI	56
4.3.5	PŘÍPRAVA ROZTOKŮ PRO MĚŘENÍ DETEKČNÍHO A KVANTITATIVNÍHO LIMITU.....	56
4.4	PŘÍPRAVA MOBILNÍ FÁZE	56
5	<u>VÝSLEDKY A DISKUZE</u>	57
5.1	OPTIMALIZACE CHROMATOGRAFICKÝCH PODMÍNEK.....	57
5.1.1	VÝBĚR STACIONÁRNÍ FÁZE	57
5.1.2	VÝBĚR MOBILNÍ FÁZE	57
5.1.3	VÝBĚR STANDARDU	58
5.1.4	VÝBĚR VLNOVÉ DÉLKY PRO DETEKCI.....	58

5.2	CHROMATOGRAFICKÉ PODMÍNKY	58
5.3	TEST VHODNOSTI CHROMATOGRAFICKÉHO SYSTÉMU	60
5.3.1	POČET TEORETICKÝCH PATER	60
5.3.2	FAKTOR SYMETRIE PÍKU	60
5.3.3	ROZLIŠENÍ	60
5.3.4	OPAKOVATELNOST.....	60
5.4	VALIDACE METODY	62
5.4.1	PŘESNOST.....	62
5.4.2	LINEARITA.....	62
5.4.3	SPRÁVNOST	65
5.4.4	ROBUSTNOST.....	66
5.4.5	DETEKČNÍ A KVANTITATIVNÍ LIMIT	69
5.4.6	SELEKTIVITA	71
6	<u>ZÁVĚR</u>	73
7	<u>ZDROJE</u>	74

1 ÚVOD

Metoda vysokoučinné kapalinové chromatografie (HPLC) je, stejně jako ostatní chromatografické metody, založena na rozdílu v distribuci látek mezi dvě vzájemně nemísitelné fáze, z nichž mobilní fází je kapalina, která prostupuje stacionární fází tvořící náplň kolony [1].

HPLC a zejména pak její modifikace za použití reverzních fází je nejpoužívanější technikou, umožňující analýzu širokého spektra vzorků – od anorganických iontů přes polymerní sloučeniny až po složité směsi přírodních látek. Pro analýzu léčiv se používá velmi často především proto, že jako separační metoda umožňuje jak kvalitativní, tak kvantitativní hodnocení separovaných složek s vysokou selektivitou, citlivostí a v krátkém čase. Pro analýzu stačí velmi malé množství vzorku a celý proces je možné plně automatizovat [1, 2].

Diklofenak sodný (DF) je nesteroidní antiflogistikum, derivát kyseliny octové, inhibující obě formy cyklooxygenázy (COX-1 a COX-2), což způsobuje inhibici biosyntézy prostaglandinu a vyvolává tak analgetické, protizánětlivé a antipyretické účinky. Je silně účinný a je možno ho podávat v nízkých dávkách. Díky jeho širokému použití je známo, že nežádoucí účinky se projevují u 12 % pacientů, trávicí obtíže u 10 %, čímž se příznivě liší od jiných antiflogistických kyselin [3, 4].

Degradační produkt 1-(2,6-dichlorfenyl)indolin-2-on (DPI) se může vyskytnout ve farmaceutických formulacích při dlouhodobém skladování [5].

2 CÍL A POPIS ZADÁNÍ PRÁCE

Cílem mé diplomové práce bylo optimalizovat a validovat HPLC metodu pro stanovení diklofenaku sodného a jeho degradačního produktu 1-(2,6-dichlorfenyl)indolin-2-onu v tabletách. Z validačních parametrů byly testovány přesnost, správnost, linearita, robustnost a selektivita.

Teoretická část práce se zabývá teorií chromatografických metod, zejména pak HPLC, vlastnostmi diklofenaku sodného a poskytuje stručný přehled o metodách stanovení této látky.

3 TEORETICKÁ ČÁST

3.1 Chromatografické metody

Chromatografické metody jsou vysoce účinné separační metody, které slouží k oddělení stanovovaných látek ze směsi a zároveň k jejich kvalitativní i kvantitativní analýze [6].

Základní podmínkou úspěšné separace látek je odlišnost alespoň v některém fyzikálně-chemickém parametru, který určuje míru interakce dělených látek se stacionární nebo mobilní fází [7].

Separace látek je založena na různých fyzikálně-chemických principech, je jim však společné, že u nich dochází k mnohonásobnému ustavování rovnováhy součástí analyzované směsi mezi dvěma vzájemně nemísitelnými fázemi. Předpokladem nestejnoměrnosti rozdělení je nestejná afinita jednotlivých složek k uvedeným fázím nebo jejich nestejná schopnost difundovat do nich [6, 7, 8].

První fází je nepohyblivá, stacionární fáze, která různou mírou zadržuje jednotlivé součásti analyzované směsi. Může být kapalná nebo tuhá (sorbent). Druhá fáze je pohyblivá, mobilní fáze, která eluuje jednotlivé součásti ze stacionární fáze a odnáší je ve směru toku, přičemž dochází k dělení směsi. Může být kapalná nebo plynná – podle skupenství této fáze dělíme metody na plynovou a kapalinovou chromatografii [6].

Při styku mobilní a stacionární fáze s analyzovanými látkami dochází k interakcím, které jsou základním předpokladem separace. Hybnou silou v systému je tok mobilní fáze. Vlastní dělení je závislé na retenci (brzdící síle), která působí selektivně. Rychlost postupu látky je závislá na dynamické rovnováze, která se ustavuje mezi vratnou sorpcí na stacionární fázi a desorpcí zpět do mobilní fáze. Dochází k nestejnému rozdělování složek směsi mezi jednotlivé fáze. Čas, za který látka opustí kolonu je závislý na tom, jak pevně se látka sorbuje na stacionární fázi [6, 7 8].

Chromatografických metod je celá řada a lze je dělit podle různých kritérií.

3.2 Rozdělení chromatografických metod

3.2.1 Rozdělení podle charakteru mobilní fáze

Z hlediska charakteru mobilní fáze dělíme chromatografii na plynovou, kapalinovou a chromatografii s nadkritickou mobilní fází.

3.2.1.1 Plynová chromatografie

Plynová chromatografie (Gas Chromatography, GC) je separační metoda, při níž, stejně jako u ostatních typů chromatografie, dochází k dělení látky mezi dvě fáze – mobilní a stacionární, mobilní fází je v tomto případě vždy plyn [9].

Mobilní fází tvoří inertní plyn, který transportuje složky kolonou. Nosný plyn by se svými vlastnostmi měl blížit plynu ideálnímu, k čemuž se blíží helium, je však poměrně drahé. Často se užívá dusík, argon nebo vodík. Na čistotu plynů je kladen velký důraz, neboť nečistoty jako např. voda a kyslík mohou vyvolat nežádoucí interakce se sorbentem nebo analyzovanými látkami [10].

Stacionárními fázemi jsou tuhé sorbenty (GSC) a separace látek je v tomto případě založena na adsorpci nebo síťovém efektu, nebo kapalinové filmy zakotvené na inertních nosičích (GLC), kdy je rozdělování mezi obě fáze založeno na rozpouštění [10].

Jako pevné stacionární fáze se užívají grafitizované termické saze, porézní polymery, silikagel nebo aluminosilikáty. V praxi se však více uplatňují kapalně fáze na nosičích, např. polyethylenglykoly, polypropylenglykoly, polyestery nebo polysiloxany [10].

Vzorky pro GC je nutno do kolony vpravit co nejrychleji. Kapalně vzorky musí být zplyněny tak, aby na kolonu vstoupily v podobě par. Dávkování se provádí mikrostřikačkou, která propíchne septum, nebo autosamplerem. Dávkovat je možné i „do kolony“, což se využívá pro analýzu látek nestabilních nad bodem teploty varu [10].

Kolony se používají buď náplňové, široké 2-5 mm, dlouhé od desítek centimetrů po několik metrů, ze skla nebo z nerezové oceli, naplněné sorbenty nebo nosiči pokrytými kapalnou fází, nebo kapilární, kde je stacionární fáze rozprostřena na vnitřní stěně kapiláry (vnitřní stěna je nosičem stacionární fáze). Ty mají průměr 100-700 μm , dlouhé jsou 15-100 m, vyrábějí se z křemenu potaženého polyamidem nebo z kovu s vnitřní polyamidovou stěnou [10, 11].

Detektorů se užívá celá řada, jednotlivé typy se liší jak principem a konstrukcí, tak selektivitou, citlivostí, mezí detekce a lineárním dynamickým rozsahem. Nejpoužívanější je tepelně-vodivostní detektor, který je univerzální, další rozšířený je plamenový ionizační, vhodný pro stanovení většiny organických látek, případně jeho modifikace s alkalickým kovem (Rb_2SO_4 , CsBr, KCl), který se užívá zejména k stanovení organických látek s obsahem dusíku, síry nebo fosforu. Pro stanovení halogenů je vhodný detektor elektronového záchytu, dále se užívá heliový ionizační detektor a hmotnostně spektrometrický detektor, pro jehož vyhodnocení se užívají knihovny MS spekter [10].

K vyhodnocení kvality se užívají retenční charakteristiky – retenční čas, retenční objem nebo retenční index. Ke kvantitativnímu stanovení se jako parametr užívá plocha pod píkem [6].

Metoda je jednoduchá, vysoce citlivá, umožňuje stanovit stopové množství látek a to nejen u plynných vzorků, ale i u kapalin a pevných látek, které je možno bez rozkladu uvést do plynného stavu, z čehož vyplývá omezení této metody těkavostí a tepelnou stabilitou. Separace touto metodou je účinná, rychlá, postačuje malé množství vzorku, s použitím jednoduché aparatury [6, 10].

3.2.1.2 Kapalinová chromatografie

Kapalinová chromatografie (Liquid Chromatography, LC) umožňuje separaci většiny anorganických i organických látek. Na rozdíl od plynové chromatografie, kde je mobilní fáze inertní a její role je pasivní, hraje mobilní fáze v tomto typu chromatografie aktivní roli. Retence je tedy ovlivněna nejen vlastnostmi fáze stacionární, ale i mobilní fáze. Výhodou je i to, že ji lze užít i k separaci netěkavých nebo termicky labilních směsí látek. Nevýhodou ve srovnání s plynovou chromatografií je náročnější instrumentace a složitější mechanismus separace [10, 12].

3.2.1.3 Chromatografie s nadkritickými tekutinami

Chromatografie s nadkritickými kapalinami (Supercritical Fluid Chromatography, SFC) není příliš rozšířenou metodou, uplatnění nachází při analýze málo těkavých nebo tepelně labilních látek, které nelze stanovovat plynovou chromatografií a jejichž stanovení metodou HPLC by bylo zdlouhavé a s nízkou účinností, zejména vysokovroucí a vysokomolekulární látky jako vosky, oligomery, polyaromatické uhlovodíky, fosfolipidy, oleje [12].

Nadkritická tekutina vzniká zahřátím plynu nebo kapaliny na teplotu vyšší, než je teplota kritická T_k , a současným stlačením na hodnotu vyšší než je kritický tlak p_k . Vznikne tak zvláštní skupenský stav, který spojuje výhody jak plynů, tak kapalin: tyto tekutiny jsou stlačitelné, lze měnit jejich hustotu a tím i rozpustnost, viskozita bývá o jeden řád nižší než u kapalin, mají tudíž příznivější tokové charakteristiky, neexistuje v nich povrchové napětí a jeho absence a velká difuzivita umožňuje pronikání do pórů tuhé fáze. Základním omezením je však skutečnost, že jen velice málo látek má kritické parametry přijatelné pro použití v praxi. Tyto podmínky splňují oxid uhličitý, oxid dusný, amoniak, pentan, xenon nebo trifluormethan. Pro praxi je nejlépe použitelný oxid uhličitý, jehož hodnoty T_k a p_k jsou nízké a snadno dosažitelné, navíc je netoxický, nehořlavý, snadno se čistí a je kompatibilní s plamenovým ionizačním detektorem, spektrofotometrickým nebo FTIR detektorem. Je však nepolární, což omezuje aplikace pouze na nepolární látky. Zvýšit polaritu lze díky polárním modifikátorům, nejčastěji methanolu, acetonitrilu, vody nebo tetrahydrofuranu v koncentracích 1-20% [12].

Retence v SFC je závislá na hustotě, jelikož rozpustnost se zvyšuje s rostoucí hustotou. Čím vyšší je hustota nadkritické tekutiny, tím vyšší je rozpustnost látek v mobilní fázi a tím nižší je retence. Dále retence závisí na tlaku (s rostoucím tlakem klesá retenční faktor a na teplotě - s rostoucí teplotou nejprve roste a poté postupně klesá) [12].

Instrumentace je podobná jako v zařízeních pro HPLC, obsahuje navíc regulátor zpětného tlaku, který udržuje v celém systému nadkritický tlak. Kolony se užívají náplňové (podobně jako v HPLC porézní, polopropustné), monolitické se stejnými stacionárními fázemi nebo kapilární, které jsou obdobou kolon z oxidu křemičitého, užívaných pro plynovou chromatografii. Kapilární kolony mají oproti náplňovým nižší tlakový spád a vyšší účinnost separace. Detektory se užívají stejně jako v plynové chromatografii [12].

3.2.2 Rozdělení podle uspořádání stacionární fáze

Podle uspořádání stacionární fáze dělíme techniky na plošné a kolonové.

3.2.2.1 Plošné techniky

Plošné (planární) techniky patří mezi instrumentálně nejjednodušší metody kapalinové chromatografie. Složky na chromatogramu putují ve formě skvrn a jsou detekovány vhodnou chemickou nebo fyzikální metodou. Výhodou je současná analýza libovolného počtu standardů k potvrzení identity, není však možné nijak ovlivňovat průtok mobilní fáze [10].

Podle použité stacionární fáze lze plošné metody rozdělit na chromatografii papírovou a na chromatografii na tenké vrstvě.

Postup je stejný u obou plošných metod, roztoky směsi látek se nanesou na start v podobě skvrnky nebo proužku a po zaschnutí se papír nebo deska umístí do uzavřené nádoby nasycené mobilní fází. Po dostatečném vyvzlínání mobilní fáze od startu se papír vyjme a označí se, kam kapalina dosáhla (čelo). Poměr vzdálenosti středu skvrny od startu k vzdálenosti čela od startu se označuje jako retardační faktor R_f , hodnota tohoto faktoru je závislá na stacionární i mobilní fázi, na teplotě a na způsobu provedení. Pouhé porovnávání retardačních faktorů s tabulkovými hodnotami lze pokládat pouze za orientační, proto se současně za stejných podmínek vyvíjí chromatogram standardu [6].

Detekce je prováděna chemickou cestou (postřik univerzálním nebo pro určité skupiny specifickým činidlem za vzniku barevného produktu reakce) nebo fyzikální (záření určité vlnové délky dopadající na chromatogram a tvorba fluoreskujících skvrn nebo naopak zhasení, radioaktivní indikátory) [6].

Chromatogramy lze hodnotit i kvantitativně a to metodami přímými i nepřímými. Nepřímým postupem je extrakce látek z vrstvy a následně probíhá spektrofotometrické stanovení v UV, VIS nebo IČ, případně fluorimetricky, nejsou-li látky barevné, nechají se reagovat s vhodným barvotvorným činidlem. Přímé stanovení se provádí denzitometrickým měřením hustoty a plochy skvrny nebo přímou fluorimetrií skvrn na desce [10].

Chromatografie na papíře

Roku 1944 Cosden, Gordon, Martin a Synge objevili metodu, která umožnila detekci, identifikaci a separaci malých kvant látek. Poslední dva jmenovaní za její objev obdrželi v roce 1952 Nobelovu cenu [13, 14].

Chromatografie na papíře (Paper Chromatography, PC) využívá speciální velmi čistý a stejnorodý filtrační papír na bázi čisté celulosy s definovanou hustotou a délkou vláken, který obsahuje asi 5% vody, která je zde stacionární fází (pro práci v systému obrácených fází je nutné impregnovat směsí hydrofobních rozpouštědel). Provádí se buď ve vzestupném (mobilní fáze vzlíná po papíře do výšky působením kapilárních sil) nebo sestupném uspořádání (působením gravitační síly) v utěsněné komoře, která je nasycena parami mobilní fáze. V obou případech lze po dokončení chromatografie papír usušit a uskutečnit dělení ve směru kolmém na směr původní – jedná se o tzv. dvourozměrnou chromatografii [1, 6, 10].

Tato metoda je jednoduchá a instrumentálně nenáročná, doba vyvíjení je však dlouhá. Výhodnější v tomto ohledu je chromatografie na tenké vrstvě. Pro reprodukovatelnost výsledků je důležitá kvalita rozpouštědel [1, 14].

Chromatografie na tenké vrstvě

Druhou plošnou metodou je chromatografie na tenké vrstvě (Thin Layer Chromatography, TLC), která je ve srovnání s chromatografií na papíře podstatně rychlejší. Ve farmacii nachází široké uplatnění pro důkazy a pro identifikaci léčiv podle lékopisu [6, 15].

Jedná se o aplikaci adsorpční a rozdělovací chromatografie do plošného uspořádání. Stacionární fází je tenká vrstva sorbentu (silikagel, oxid uhličitý, prášková celulóza) na inertní podložce (hliníková folie, skleněná nebo plastová deska). Tyto tenké vrstvy lze vyrobit v laboratoři (ručním nanesením stacionární fáze na tenkou skleněnou destičku), ale povrch bývá nerovnoměrný a manipulace s nimi je dosti omezená, nebo jsou dodávány komerčně (Silufol[®] - silikagel, Lucefol[®] – prášková celulóza, Alufol[®] – oxid hlinitý na hliníkové folii, Silufol[®] UV 254 nebo 366 s přídavkem fluorescenčního indikátoru) a ty je pak možno stříhat na potřebné velikosti [1, 10, 15].

Vyvíjení probíhá podobně jako u papírové chromatografie v utěsněné komoře nasycené parami mobilní fáze, je rovněž možné použít dvourozměrnou chromatografii [1].

Metoda TLC umožňuje poměrně výkonné dělení (400 až 3000 teoretických pater), v krátké době a bez nároku na nákladná zařízení [16].

Vysokoúčinná tenkovrstvá chromatografie

Vysokoúčinná tenkovrstvá chromatografie (High Performance Thin Layer Chromatography, HPTLC) je metoda, která využívá chemicky modifikované sorbenty na bázi silikagelu s malou a přesně definovanou velikostí částic a mobilní fáze je dodávána na vrstvu pomocí mikročerpadel. Dosahuje se vyšší separační účinnosti než u TLC a PC a kromě identifikace umožňuje tato metoda i stanovení čistoty látek [6, 10].

3.2.2.2 Chromatografie kolonová

Při kolonové chromatografii je stacionární fáze v uzavřené trubici (koloně) [11].

Sloupcová chromatografie

Sloupcová neboli kapalinová kolonová chromatografie je metoda známá již celé jedno století a v klasickém provedení se běžně užívala až do poloviny 60. let. Užívají se skleněné kolony s vnitřním průměrem okolo 1 cm, dole opatřené kohoutem, naplněné stacionární fází s částicemi sorbentu o velikosti 0,05 až 1 mm (silikagel, oxid hlinitý, škrob, prášková celulóza). Pohyb mobilní fáze je zajišťován působící gravitační silou, průtok tak řádově dosahuje jednotek ml/min, z čehož vyplývá dlouhá doba analýzy (až několik hodin). Účinnost je malá (desítky teoretických pater) a je vyžadováno jímání jednotlivých frakcí a jejich analýza další metodou (např. spektrofotometricky). Tato metoda se stále užívá, např. pro oddělení rušivých složek před jinou metodou hodnocení, pro separaci komplikovanějších směsí se však nepoužívá [10, 12].

Vysokoúčinná kapalinová chromatografie

Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (High Performance Liquid Chromatography, HPLC) je metoda užívající kolony, které umožňují rychlé separace složitých směsí [10].

Více viz. kapitola 2.4 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie

Ultravysokotlaká kapalinová chromatografie

Ultravysokotlaká kapalinová chromatografie (Ultra High Pressure Liquid Chromatography, UHPLC) využívá sorbentů připravených patentovanou technologií “bridged hybrid particle“, které jsou mimořádně mechanicky pevné a účinné. Celý proces tak může probíhat i za velmi vysokých tlaků (100 MPa) a oproti klasické HPLC technice vyniká kratší dobou analýzy, menšími náklady (menší potřeba rozpouštědel), vyšší separační účinností, zvýšením citlivosti a je schopen podat více kvalitativních informací [10].

3.2.3 Rozdělení podle uspořádání fází

O kvalitě separace rozhoduje především použitý chromatografický systém – kombinace stacionární a mobilní fáze. Podle relativní polaritity těchto fází rozlišujeme chromatografii s normálními fázemi a s obrácenými fázemi. Toto rozdělení je platné jak pro kapalinovou chromatografii v kolonovém uspořádání, tak pro plošné techniky [17].

3.2.3.1 Chromatografie s normálními fázemi

Při klasickém provedení kapalinové chromatografie je stacionární fáze polárnější než fáze mobilní. Z historických důvodů je toto uspořádání označováno jako systém s normálními fázemi (Normal Phase, NP), ačkoli systémy s obrácenými fázemi se používají častěji [10, 17].

Jako absorbent se používají silně polární látky (silikagel, oxid hlinitý) a jako mobilní fáze se používá nepolární nebo slabě polární kapalina (n-heptan, izooktan, hexan, benzen, n-pentan). Silikagel je amorfni sušený gel kyseliny křemičité a jeho nevýhodou je rozklad při vyšších hodnotách pH. Naopak v kyselém prostředí je stálý. Modifikované silikagely se užívají i pro chromatografii na opačných fázích. Pro pH v rozmezí 8-11 lze použít oxid hlinitý. Jako stacionární fáze může být použita dále např. voda ukotvená na celulóse [6, 8, 10].

3.2.3.2 Chromatografie s obrácenými fázemi

Systémy s nízkou polaritou stacionární fáze a polární mobilní fází jsou označovány jako systémy s obrácenými fázemi (Reversed Phase, RP) [10].

Jako stacionární fáze se užívají nepolární uhlovodíkové fáze imobilizované na anorganických nosičích, dále čistý uhlík, organické polymery a silikagel, jehož polární silanolové skupiny jsou nahrazovány nepolárními nebo středně polárními funkčními skupinami. Nejčastěji se takto užívá náhrada skupinami $-C_{18}H_{37}$, $-C_8H_{17}$, $-C_2H_5$, $-CH_3$, $-NH_2$, $-CN$, fenylovou a jinými. Často užívané jsou i kolony vyráběné z oxidu zirkoničitého, většinou s povrchovou úpravou polybutadienem nebo uhlíkem, případně s modifikací C18 alkyly [10, 17].

Mobilní fází bývají vodné roztoky acetonitrilu, dioxanu, diethyletheru, tetrahydrofuranu nebo methanolu, obvykle stabilizované tlumičem o vhodném pH. Málo polární látky je možné separovat i pomocí čistě organických mobilních fází [10, 17].

Tento systém umožňuje separaci velkého množství organických látek, je vhodný i pro dělení méně polárních látek. V současné době představují tyto fázové systémy více než 80 % HPLC aplikací [18].

3.2.4 Rozdělení podle podstaty separačního procesu

Podle povahy separačního děje můžeme chromatografické metody rozdělit na absorpční, rozdělovací, iontovýměnné, gelové a afinitní. Nutno dodat, že toto rozdělení je platné zejména v rovině teoretické, ve skutečnosti se tyto mechanismy často navzájem prolínají [6, 10].

3.2.4.1 Adsorpční chromatografie

Adsorpční chromatografie, nejstarší z chromatografických metod, využívá jevu, kdy složky rozpuštěné v jedné fázi vykazují změny koncentrace na rozmezí s druhou fází – adsorpci. V důsledku toho dochází k naadsorbování složky z mobilní fáze na aktivní povrch fáze stacionární a hromadění této složky na mezifázi a tím k separaci. Způsob a síla adsorpce je závislá na povaze absorbentu, chemickém složení adsorbované látky a na složení mobilní fáze (povrch absorbentu je obsazen monovrstvou molekul mobilní fáze a molekuly analytu s nimi soutěží o aktivní místa) [8, 15, 12, 19].

Adsorpční interakce jsou poměrně složité, molekuly adsorbované látky (absorbátu) většinou interagují s více aktivními centry povrchu absorbentu. K fyzikální adsorpci dochází vlivem disperzních, orientačních a indukčních sil, vznikem vodíkových vazeb nebo specifickou interakcí absorbátů s periferními maximy elektronové hustoty a absorbenty obsahující koordinační centra nebo kationty. Může dojít ke vzniku koordinační sloučeniny, pak se jedná o chemisorpci, která však není příliš žádoucí [12].

Stacionární fází je obvykle pevný absorbent, který je schopen absorbovat látky z kapalného roztoku nebo z plynu (LSC, GSC). Nejčastěji se používá silikagel, dostupný za přijatelnou cenu, avšak stabilní pouze při pH v rozmezí 2-8, dále alumina (oxid hlinitý) ve formě porézních kuliček, stabilní až do pH 12, oxid hořečnatý nebo práškovaná celulóza [6, 8, 12].

Tento typ chromatografie je vhodný pro separaci látek s rozdílnými funkčními skupinami nebo izomerů [12].

3.2.4.2 Rozdělovací chromatografie

Rozdělovací chromatografie je založena na dělení látek v závislosti na jejich rozdělovacích koeficientech, což je poměr rovnovážné koncentrace jedné složky ve stacionární fázi ke koncentraci téže látky ve fázi mobilní za předpokladu, že se daná látka vyskytuje v obou fázích ve stejné formě. Děj probíhá v soustavě dvou nemísitelných nebo jen omezeně mísitelných kapalin (LLC) a k dělení dochází podle afinity k nim. Stacionární fáze je kapalina zakotvená na inertním nosiči (často křemelina, silikagel, celulóza). Při průchodu mobilní fáze dochází k opakovanému rozdělování součástí směsi mezi obě fáze. Účinnost tohoto dělení je úměrná velikosti rozdílu rozdělovacích konstant [6, 8].

Tento typ separace je použitelný i pro separaci v systému kapalina – plyn (GLC), podstatou je v tomto případě rozdílná rozpustnost dělených látek v kapalně stacionární fázi [15].

3.2.4.3 Iontovýměnná chromatografie

Iontovýměnná chromatografie (Ion Exchange Chromatography, IEC) je technika pro dělení elektrolytů schopných existence v iontové podobě, založená na elektrostatické interakci [6].

Stacionární fázi jsou iontoměniče, což jsou nerozpustné látky, které mají na svém povrchu specifické funkční skupiny, na nichž jsou navázány elektrostatickými silami protiionty, které ve styku s vodnými roztoky botnají a uvolňují je elektrolytickou disociací. Tyto uvolněné ionty jsou pak nahrazovány stejně nabitými ionty ze vzorku, které mají k měniči vyšší afinitu. Protiionty jsou shodné s jedním z iontů, obsaženým ve vzorku, jejich přebytek způsobí, že vytěsni ionty z měniče a ty jsou dále unášeny mobilní fází k další částici sorbentu, kde se postup opakuje. Proces je vratný a závisí nejen na afinitě iontů k měniči, ale především na jejich koncentraci. Více jsou zadržovány ionty s větším nábojem a hmotností [1, 20].

Základem stacionární fáze je nosič, tvořený syntetickým styrenovým polymerem nebo porézním silikagelem, na němž jsou chemicky navázána iontová místa, která nesou příslušný protiion [1, 20].

Iontoměniče, které uvolňují a vyměňují kationty, se označují jako katexy, na nosiči je vázána kyselá skupina (karboxylová, sulfonová), analogicky měniče aniontů označované jako anexy obsahující vázanou bazickou skupinu (kvartérní dusíkaté báze, primární nebo sekundární amin) uvolňují a vyměňují anionty. Amfoterní iontoměniče pak obsahují v matici jak katexové, tak anexové funkční skupiny. Částice neobsahující náboj prochází kolonou bez zadržení [1, 20].

Mobilní fázi jsou převážně vodné roztoky solí, kyselin nebo zásad a jsou charakterizované koncentrací iontů, nábojem a pH [1].

Tento typ separace se provádí pouze jako kapalinová chromatografie. K detekci se užívá ve většině případů vodivostní detektor, který registruje změny vodivosti eluentu [1, 15].

3.2.4.4 Gelová chromatografie

Tato metoda je v některých publikacích rovněž uváděna jako chromatografie na molekulových sítích, případně jako gelová permeační chromatografie (Gel Permeation Chromatography, GPC), a umožňuje separaci molekul na základě odlišností jejich rozměrů a představuje tak nejjednodušší princip separace [1, 10, 15].

Stacionární fázi je gel, který tvoří inertní zesítěná nerozpustná polymerní matrice nasycená kapalinou (většinou vodou), a dochází k permeaci molekul odlišných velikostí nesených

mobilní fázi do těchto pórů. K dělení dochází na základě velikosti molekul – malé molekuly pronikají do všech pórů, větší jsou omezeny velikostí pórů a molekuly, jejichž velikost překračuje velikost pórů, nepronikají do pórů vůbec a jsou bez retence vynášeny z kolony. Nejmenší molekuly tak vykonávají nejdelsí dráhu a eluují se s nejvyšším elučním časem [1, 10, 15, 21].

Nejrozšířenější stacionární fázi jsou gely na bázi zesíťovaného polystyrenu, které jsou odolné i při práci s většinou polárních rozpouštědel, jsou určeny pro dělení látek molekulových hmotností v rozmezí $10^2 - 10^8$. Pro práci s vodnými roztoky se používá zesíťovaný dextran (Sephadex[®]), použitelné pro dělení látek molekulových hmotností $10^3 - 10^6$. Dále se užívají se organické polymery (kopolymer styrenu a divinylbenzenu), porézní rigidní skla nebo silikagel. Mobilní fáze musí analyty rozpouštět, nesmí však s nimi reagovat a poskytovat reakci se stacionární fází, musí však smáčet její povrch. Často se užívá voda nebo vodné roztoky pufrů [1, 10].

Tato metoda nachází uplatnění zejména v biochemii při separaci polypeptidů a bílkovin [1].

3.2.4.5 Afinitní chromatografie

Afinitní chromatografie (označována rovněž jako bioafinitní nebo biospecifická afinitní chromatografie) je metoda k separaci, čištění a izolaci složek vzorku, využívá schopnosti biologicky aktivních látek specificky se vázat na určité látky (specifickou interakcí např. protilátka-antigen, enzym-substrát nebo lecitin-glykoprotein). Využívá matrice podobné gelům, do nichž jsou zabudovány funkční skupiny, které specificky reagují se separovanými látkami (ligandy). Stacionární fáze má velkou afinitu pro stanovenou substanci a ostatní látky odcházejí bez záchyty kolonou. Změnou experimentálních podmínek je pak možno rozrušit vazbu analyzované látky na stacionární fázi a látku vyplavit z kolony (např. změnou složení rozpouštědla) [10, 22].

Ligandy jsou navázány na inertní nosič kovalentní vazbou. Interakci ligand – dělená látka ovlivňuje vzdálenost ligandu od struktury nosiče, ohebnost skupiny mezi ligandem a matricí a účinky vazby na stereochemii ligandu, povaha a způsob připojení ligandu a jeho koncentrace [23].

Inertní nosič by měl být nerozpustný, volné pórovité struktury, se stejnorodými plnými částicemi kulovitého tvaru, chemicky a fyzikálně stálý, s dobrými chromatografickými vlastnostmi a s minimální nesespecifickou adsorpcí. Jako matrice se užívá celá řada materiálů, žádný z nich však není zcela ideální a má své specifické nevýhody. Vzhledem k rigiditě může být výhodné využití porézního skla a křemičitých materiálů, u nichž ale dochází k nesespecifické adsorpci bílkovin. Polyakrylamid bývá málo porézní nebo příliš měkký, vláknitá celulóza nemá

dobré chromatografické vlastnosti, navíc má nízkou permeabilitu, nízkou kapacitu pro makromolekuly a nespecificky adsorbuje nukleové kyseliny. Sephadex se s výhodou užívá tam, kde je žádoucí rozložitelná matrice. Pro obecné použití tento materiál není dostatečně porézní. Komerčně nejvíce užívaná je Sepharosa, které však příliš nevyvíká svou pevností. V roce 1976 byla vyvinuta Ústavem makromolekulární chemie ČSAV v Praze makroporézní perlová celulóza, připravována solidifikací xantogenátu celulózy v inertním rozpouštědle a následnou regenerací, jejíž perlové částice jsou velmi mechanicky stabilní [23, 24].

Metoda se dá využít k čištění proteinů (enzymů, protilátek, nukleových kyselin, kofaktorů, represorů nebo receptorových proteinů). Je takto možné koncentrovat zředěné roztoky proteinů, oddělovat denaturované proteiny od biologicky aktivních forem a dělit proteinové složky [23].

3.2.5 Rozdělení podle způsobu vyvíjení chromatogramu

3.2.5.1 Frontální chromatografie

Tato metoda je založena na kontinuálním přivádění vzorku rozpuštěného v mobilní fázi na kolonu až do konce chromatografického procesu [8, 25].

Kontinuální přívod analyzované látky v konstantní koncentraci s mobilní fází vede nejprve k frontální chromatografii a následně k nasycení sorbentu všemi složkami analyzovaného materiálu. Chromatogram se vyvíjí dvěma způsoby. Prvním je vývoj při pokračujícím přívodu směsi. Nejprve se vymyje fronta nejméně sorbované složky, po ní následně směs první (nejméně sorbované složky) se silněji sorbovanou složkou a tak dál, až nakonec z kolony odchází směs o stejném složení, jako směs přiváděná. V čistém stavu je tak možné získat pouze nejslaběji sorbovanou složku [12, 25, 26].

Při porušení přívodu směsi do nasycené kolony a připojení přívodu čisté mobilní fáze dochází k vývoji opačného – desorpčního frontálního chromatogramu. U tohoto postupu z kolony nejprve odchází směs všech složek, poté, co dojde k odeluování nejméně sorbované složky, kolonu opouští jen směs ochuzená o tuto složku, postupně je směs ochuzována o silněji sorbované složky (obsahuje čím dál tím méně jednotlivých složek), až nakonec odchází pouze čistá mobilní fáze [26].

Grafickým výstupem je pak schodovitý chromatogram, kde první stupeň odpovídá čisté nejméně sorbované složce, další stupně složkám s postupně rostoucími rozdělovacími poměry, vždy však kontaminovány látkami předchozími [12, 26].

Tato technika má velice řídké využití, občas se užívá pro měření adsorpčních izoterem [12].

3.2.5.2 *Eluční chromatografie*

Podstatně jednodušší a z hlediska separace směsi efektivnější je metoda eluční chromatografie. U tohoto způsobu je analyzovaná směs na kolonu přivedena jednorázově a promývá se mobilní fází. Dochází k sorpci a tvoří se eluční zóny, které za přívodu mobilní fáze migrují kolonou a dochází k jejich postupnému vymývání z kolony (postupně od nejméně sorbovaných složek až po složky sorbované nejvíce). Složky vzorku jsou na stacionární fázi sorbovány silněji, než molekuly mobilní fáze [25, 26].

Grafickým výstupem je série píků jednotlivých složek, z jejichž parametrů můžeme látky identifikovat a určit jejich množství [26].

Eluční technika je prováděna třemi způsoby:

Jednoduchá eluce (isokratická) – kolona je vymývána stále stejnou mobilní fází (složení mobilní fáze je konstantní), dokud nedojde k rozdělení. Metoda je vhodná pro směsi, jejichž složky se příliš neliší afinitou ke stacionární fázi. Tento způsob může být poněkud zdlouhavý a nezaručuje vymytí všech složek analyzované směsi, složky s vyšší afinitou je pak nutné z kolony odstranit jiným postupem [6, 8, 10].

Vícestupňová eluce – kolona se postupně vymývá několika eluenty, postupně s čím dál tím vyšší eluční schopností. Někdy však může dojít k tomu, že dva následující eluenty vymývají tutéž složku ve formě dvou píků a simulují tak dvě látky [8].

Gradientová eluce - dochází k plynulé změně koncentrace polárnější složky v mobilní fázi nebo se plynule mění pH – složení mobilní fáze se mění s časem. Výhodou je zrychlení analýzy [6, 10].

3.2.5.3 *Vytěšňovací chromatografie*

Třetí metoda se od předchozích dvou liší především tím, že se jako mobilní fáze použije látka, které se adsorbuje silněji než kterákoli složka analyzované směsi (u předchozích dvou metod se mobilní fáze nesorbují). Vzorek je pak zaváděn diskontinuálně. Stacionární fáze v tomto případě funguje jako adsorbent, na který se směs látek podle své afinity naadsorbují. Nejméně adsorbovaná složka je vytěšňována složkou silněji adsorbovanou, ta je zase vytěšňována složkou ještě silněji adsorbovanou. Nejsilněji adsorbovaná látka je pak vytěšňována mobilní fází. Zóny jednotlivých složek migrují jedna vedle druhé a při pokračování v přívodu mobilní fáze postupně opouštějí kolonu v pořadí od složky s nejnižší afinitou ke složce s afinitou nejvyšší [25, 26].

3.3 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie

Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (High Performance Liquid Chromatography, HPLC)) je separační metoda, jejíž počátky se datují v 70. letech minulého století a vycházejí z plynové chromatografie [6, 12].

U klasické kolonové chromatografie je mobilní fáze hnána samospádem, což má vcelku negativní dopad na délku separace. U HPLC se využívá čerpání mobilní fáze, která je většinou tvořena dvou nebo třísloužkovou směsí rozpouštědel, pomocí čerpadlového systému (tlakem od jednotek až po desítky MPa – odtud alternativní název High Pressure Liquid Chromatography – vysokotlaká kapalinová chromatografie), což značně zkracuje dobu analýzy. Užívané stacionární fáze jsou tvořeny malými částicemi pravidelného tvaru a jednotné velikosti, které homogenně vyplňují kolonu, čímž lze dosáhnout účinnosti řádově desítek tisíc pater na metr délky kolony [6, 12, 27].

Základem je, jako u všech chromatografických metod, dělení směsi látek mezi dvě vzájemně nemísitelné fáze, z nichž mobilní fází je kapalina, které jsou proti sobě v neustálém pohybu. Tato metoda může být založena na separačním mechanismu absorpčním, rozdělovacím, iontovýměnném nebo na stereochemických interakcích, proto je možné takto stanovovat prakticky všechny organické látky rozpustné ve vodě, zředěných kyselinách nebo v organických rozpouštědlech [1, 6, 27].

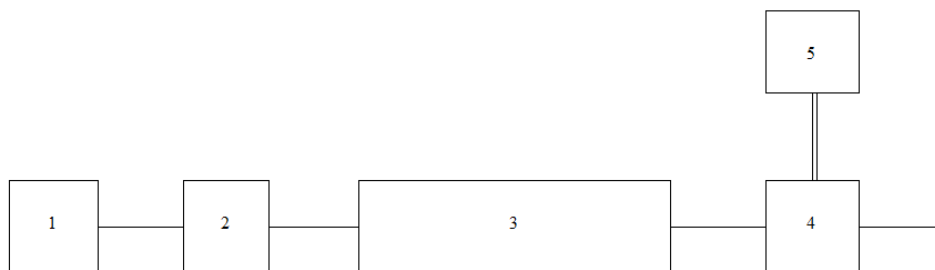
Cílem HPLC je rozdělit složky v přijatelném čase tak, aby se vstoupily do detektoru jako samostatné koncentrační zóny s gaussovským rozdělením koncentrace [27].

Předností HPLC je to, že umožňuje jak kvalitativní, tak kvantitativní hodnocení a to rychle, s vysokou citlivostí, s minimálním množstvím vzorku a na rozdíl od plynové chromatografie není limitována těkavostí a teplotní stabilitou látky, je použitelná pro velmi širokou oblast – lze analyzovat ionty, polární i nepolární látky, látky tepelně nestabilní, netěkavé, nízkomolekulární i makromolekulární, separaci lze na rozdíl od GC ovlivňovat složením mobilní fáze, nevýhodou oproti této metodě je však složitější instrumentace [12, 15].

3.3.1 Součásti chromatografu

Základní chromatografický systém sestává z částí zajišťujících transport mobilní fáze, dávkování vzorku, separaci jednotlivých látek, detekci a registraci signálu a vyhodnocování záznamu. K těmto základním částem (zásobníky mobilní fáze, vysokotlaké čerpadlo s kontrolou tlaku, dávkovač, kolona, detektor, zapisovač, integrátor a počítač) je možno doplnit další, například zařízení pro tvorbu koncentračního gradientu, termostátové skříně, umožňující práci

při konstantní teplotě nebo ochranné filtry a předkolony, které můžou prodloužit životnost analytické komory [28].



Obr. 1: Blokové schéma kapalinového chromatografu [12]: 1- zdroj mobilní fáze, 2 – zařízení pro nástřik vzorku, 3 – kolona, 4 – detektor, 5 – zařízení pro zpracování signálu detektoru

Odplyněná mobilní fáze je z jednoho nebo více zásobníků mobilní fáze vedena přes filtr, který odstraňuje mechanické nečistoty do čerpadla, odkud dále putuje do dávkovacího zařízení, kde se obohatí o vzorek a postupuje dále do kolony, kterou prochází zvolenou rychlostí a pod tlakem, který odpovídá rychlosti a vlastnostem sorbentu. V koloně probíhá samotná separace a z ní je eluát veden do detektoru, jehož signál je vyhodnocován počítačovým softwarem nebo jiným vyhodnocovacím zařízením [7, 12].

3.3.1.1 Zásobníky mobilní fáze

Materiálem pro zásobníky bývá sklo, plasty nebo nerezová ocel [29].

Mobilní fáze v HPLC není inertní jako u plynové chromatografie, ale aktivně se podílí na chromatografickém procesu. Změnou složení mobilní fáze tak můžeme modifikovat separaci, což je vždy jednodušší, než měnit fázi stacionární [12].

Mobilní fáze jsou charakterizovány polaritou, vyjadřující schopnost účasti na polárních interakcích, a selektivitou, která vyjadřuje relativní retenci dvou sousedních látek. Vlastnosti mobilní fáze jsou důležité jak z hlediska separačního, tak kvůli detekci – pro co nejcitlivější stanovení rozpuštěných látek by měla dávat v detektoru co možná nejmenší signál [1].

Mobilní fáze pro chromatografii s normálními fázemi jsou málo polární rozpouštědla, u kterých je nutné kontrolovat množství vody. Pro práci s reverzními fázemi se kromě polárních rozpouštědel užívají vodné roztoky pufrů, které se před použitím filtrují, aby se odstranily částice, které by mohly poškodit kolonu nebo zkreslovat měření. Všechny složky mobilní fáze musí být kvalitní, neobsahující stabilizátory nebo jiné přísady [1].

3.3.1.2 *Spojovací kapiláry*

Jednotlivé části chromatografu jsou propojeny kapilárami co nejmenšího vnitřního průměru (obvykle 0,2 mm a menší) a minimální délky. Materiál pro výrobu těchto kapilár musí být mechanicky a chemicky odolný a nesmí vykazovat povrchovou aktivitu. Užívá se nerezová ocel, sklo a některé plasty (PTFE, PEEK) [12].

3.3.1.3 *Čerpadla*

Vysokotlaké bezpulsní pumpy jsou nedílnou součástí moderního HPLC přístroje. Kolony jsou plněné stacionárními fázemi složenými z mikročástic, které kladou procházející mobilní fázi značný odpor, proto je nutné hnát mobilní fázi vysokým tlakem, aby mohla přes kolonu projít [10].

Materiály pro výrobu čerpadel musí být odolné proti korozi i při užití mnohdy dosti agresivních mobilních fází. Užívá se např. nerezová ocel, titan nebo některé keramické materiály. Těsnění bývají vyráběna z plného teflonu, kuličky a sedélka ventilů (někdy také písty) bývají ze safíru [28].

Čerpadla mají plynule dávkovat mobilní fázi bez kolísání průtoků v rozmezí 0,1 ml.min⁻¹ až 10 ml.min⁻¹ se směrodatnou odchylkou menší než 0,5-1 %, a to do tlaků 30-50 MPa. Vnitřní objem čerpadel má být co nejmenší, aby byla možná co nejrychlejší výměna mobilní fáze a práce s gradientem [28].

V současné době se již neuvžívají čerpadla hydraulická, kde je hnací silou kapalina, protože průtok závisí na hydraulickém tlaku v systému, který se časem může měnit vlivem změny teploty, mobilní fáze nebo zanášením kolony drobnými částicemi [28].

Stále se užívají čerpadla pneumatická, kde je zdrojem tlaku stlačený plyn. Moderní čerpadla využívají mechanického pohonu pístu v komoře, jehož zdrojem jsou elektromotory. Podle objemu je lze rozdělit na dva typy. Prvním jsou čerpadla na principu velkoobjemové injekční stříkačky (100-500 ml) neboli lineární dávkovače, jejichž výhodou je konstantní průtok a nepulzující tlak, po vyčerpání kapaliny se však musí znovu plnit. Od jejich užívání se dnes upouští, užívají se občas v kapalinové mikrokolonové chromatografii. Druhým typem jsou reciproční pístová čerpadla s malým objemem pístové komory (20-400 μl), které mívají zařazené další čerpací jednotky s posunutou fází k tlumení pulsů nebo mají elektricky regulovanou rychlost pohybu pístů podle změny tlaku. Výhodou je dlouhodobý nepřetržitý provoz a také rychlá výměna mobilní fáze. Navíc jsou vhodné pro práci s gradienty [10, 28].

Pro měření je důležité, aby byla kapalina přiváděna do systému dokonale odplyněná, jelikož bublinky plynu by v čerpadle mohly způsobit kolísání a snížení průtoku mobilní fáze, jejich

uvolnění v koloně nebo v cele detektoru pak může vést k nevyhodnotitelnému záznamu. Proto je vhodné případné bublinky plynu odstranit na ultrazvukové lázni, probubláváním heliem nebo průtokovými odplyňovači, obsahujícími membránu, jimiž plyn unikne ven. Moderní HPLC přístroje bývají vybaveny vestavěným degassery [28].

3.3.1.4 Systémy pro tvorbu gradientu mobilní fáze

Při gradientové eluci se složení mobilní fáze mění s časem. Kontinuálních změn se dosahuje mícháním několika složek (dvě až tři) mobilní fáze v poměru, který se řídí zvoleným časovým programem. Přístroje pro tvorbu gradientu se dělí podle toho, kde se uskutečňuje míchání složek, zda ve vysokotlaké nebo nízkotlaké části [28].

V případě, že k mísení složek dochází ve vysokotlaké části systému, dávkuje každé čerpadlo jednu složku mobilní fáze podle časového programu zadaného elektronickým programátorem nebo mikroprocesorovou řídicí jednotkou. Složky se mísí v nízkoobjemové vysokotlaké směšovací komůrce, jejíž obsah je promícháván. Takto lze smíchat i vícesložkové gradienty, v praxi se obvykle užívají dvě složky a dvě vysokotlaká čerpadla [28].

Dochází-li k mísení v nízkotlaké části systému, složky mobilní fáze se míchají při atmosférickém tlaku před vstupem do vysokotlakého čerpadla ve směšovací komůrce. Poměr složek se řídí buď poměrem doby, kdy jsou otevřeny ventily jednotlivých zásobníků, nebo poměrem průtoku pomocných podávajících nízkotlakých přesných mikročerpadel, které dávkují jednotlivé složky, což je přesnější. Tímto způsobem je možné připravovat i vícesložkové gradienty, v praxi se užívají dvou- až tříložkové [28].

3.3.1.5 Zařízení pro dávkování vzorků

Nezbytným prvkem kapalinového chromatografu je zařízení pro dávkování vzorku, které bývá zařazováno mezi čerpadla a kolonu, sloužící k přesnému vnesení určitého množství vzorku buď přímo na kolonu, nebo do chromatografického systému [27].

Dříve se dávkovaly vzorky injekční stříkačkou přes septum nebo při zastavení toku mobilní fáze, moderní přístroje užívají manuální smyčkové dávkovače na principu přepínacích ventilů nebo automatické dávkovače, umožňující dávkování do kolony bez přerušení toku mobilní fáze (autosamplery) [28].

Nejčastěji se užívá 6-cestný injekční ventil s vyměnitelnou smyčkou, jehož nástřiková smyčka daného objemu omezuje množství, které je možné v jedné dávce nastříknout. Tato zařízení dosahují vysoké reprodukovatelnosti nástřiku [10].

3.3.1.6 Kolony

„Konvenční“ analytické kolony jsou rovné trubice s hladkým vnitřním povrchem o délce 5-30 cm, vnitřního průměru 3-5 mm, naplněné homogenně a rovnoměrně pórovitými částicemi o průměru 3-10 μm . Musí být schopné odolávat tlakům a také chemickému působení mobilních fází a analyzovaných látek, na které nesmí působit katalyticky. Jako materiál pro výrobu kolon se používá nerezová ocel, nikl, pro práci při tlacích do 20 MPA i tvrzené sklo (tyto kolony se pak vkládají jako cartridge do vnějšího kovového pláště) [28].

Účinnost vyjadřuje schopnost kolon dosáhnout požadovaného rozlišení analyzovaných složek. Závisí na parametrech kolony (počet teoretických pater a výškový ekvivalent teoretického patra), náplni (velikost částic), způsobu plnění kolony, experimentálních podmínkách a na chování měřených látek v systému [27].

Při výběru kolony je vhodné mít na paměti závislosti doby separace a účinnosti na parametrech kolony. Množství vzorku, které se dá analyzovat, je dáno druhou mocninou vnitřního průměru kolony. Čím delší je kolona, tím je separace účinnější, ale také delší a je třeba vyšší tlak. Účinnost separace a pracovní tlak klesají s druhou mocninou průměru náplně kolony. Hmotnostní citlivost analýzy je nepřímo úměrná rozmytí eluční zóny a zlepšuje se s klesající délkou a průměrem kolony a klesajícím průměrem částic náplně. Na těchto skutečnostech je založena tzv. nízkodisperzní kapalinová chromatografie (s nízkým rozmytím elučních zón), při níž se pracuje buď s krátkými kolonami (2-5 cm) naplněnými malými částicemi (3 μm a menší), díky kterým se dosahuje urychlení analýzy a snížení spotřeby mobilní fáze, nebo s kolonami o malém vnitřním průměru (0,5-2 μm) [28].

Existují i kapilární kolony, např. silikagelové monolitické kapilární kolony připravované přímo v křemenných kapilárách, které dosahují průměrů menších než 0,3 μm . Podle ČL 2009 jsou kolony s vnitřním průměrem menším než 2 mm označovány jako mikrokolony [18, 30].

Náplňové kolony

Náplň kolony tvoří porézní částice o velikosti 3-10 μm , sférického nebo nepravidelného tvaru [28].

V současné době převládá chromatografie na obrácených fázích, kde se jako náplně užívají oktadecylsilikagel nebo oktylsilikagel, dále chemicky vázané fáze s alkyly o délkách C_2 - C_{40} , aryly nebo alkylaryly. Pro přípravu komerčních kolon pro HPLC se používají dva typy silikagelu. Silikagel typu sil-gel se připravuje gelací roztoku křemičitanů a je charakteristický vyšší pórovitostí s nepravidelným tvarem pórů. Druhý typ, sol-gel, je připravován shlukováním částic solu oxidu křemičitého při pyrolýze organokřemičitých látek a tento typ se vyznačuje menší pórovitostí s pravidelným uspořádáním pórů. Tyto náplně není vhodné užívat při pH

vyšším než 8,5, jelikož dochází k částečnému rozpouštění silikagelu a tím k poškození kolon (typ sol-gel podléhá tomuto rozpouštění pomaleji). Proto byly vyvinuty náplně na bázi organických gelů (polystyren-divinylbenzenové kopolymery, mající vynikající teplotní, mechanickou i chemickou stabilitu, porézní polymerní fluorovodíky) a porézního skelného uhlíku, které sice mají lepší odolnost a stabilitu, ale nejsou tolik účinné [18, 28].

Nesilikagelové kolony pro HPLC se připravují i na bázi oxidů hlinitého, titaničitého a zejména zirkoničitého. Oxid zirkoničitý lze připravit ve formě monodisperzních porézních kulových částic, které mohou vykazovat účinnost srovnatelnou se silikagelovými částicemi stejných rozměrů. Navíc mají vynikající stabilitu při vysokých pH (až 14) a jsou mechanicky i tepelně stabilní. Pro separace v systému s obrácenými fázemi se užívá s povrchem pokrytým polybutadienem nebo tenkou vrstvou pyrolyticky vyloučeného uhlíku, možno i s modifikací C18 alkyly. Tyto materiály mají odlišnou selektivitu oproti silikagelovým, umožňují lepší separování stereoizomerů a polárních látek [18].

V systémech s normálními fázemi se stále používá silikagel, dále např. oxid hlinitý, hydroxylapatit, grafit a nemodifikovaný oxid zirkoničitý [1, 28].

Pro oba typy systémů, jak pro reverzní, tak pro normální fáze, jsou použitelné středně polární náplně – aminové, nitrilové, nitro a jiné skupiny vázané na silikagelu. Pro separaci optických nebo geometrických izomerů je možno použít cyklodextrinové sorbenty, které jsou schopny vytvořit inkluzní sloučeniny s mnohými látkami [28].

Pro separace biopolymerů se mohou použít kolony naplněné částicemi s většími objemy pórů, aby se zlepšila difuze k povrchu stacionární fáze, snížil se odpor proti převodu hmoty a zvýšila se účinnost. Lze využít zcela neporézní částice silikagelu nebo organické polymerní náplně o malém průměru (1,5-2,5 μm). Menším odporem proti protékající mobilní fázi vynikají porézní náplně kolon se sférickými částicemi o průměru 5 μm s inertním neporézním jádrem, na kterém je ukotvena méně než 1 μm tenká porézní vrstvička aktivní stacionární fáze. U těchto kolon je nižší poměr stacionární a mobilní fáze v koloně ve srovnání s porézními náplněmi a při práci s nimi je třeba mít na paměti, že je vhodné dávkovat menší množství vzorku. Lepšího přístupu velkých molekul ke stacionární fázi lze dosáhnout i tzv. **perfuzními náplněmi**, které obsahují dva typy pórů – difuzní póry, které odpovídají pórům u běžných náplní a póry, které umožňují přímý průchod významnému podílu mobilní fáze částicemi (průtočné póry). Částice těchto náplní bývají větší než porézní náplně (cca 12 μm), přesto poskytují účinnější separace a jsou stabilní i při vysokých průtocích a vzhledem k vysoké sorpční kapacitě jsou vhodné pro separace a čištění proteinů, oligonukleotidů a jiných polymerů [18].

Monolitické kolony

Monolitické kolony jsou separační média tvořená jediným kusem pórovitého materiálu organického nebo anorganického původu, tvaru i objemu zcela zaplňujícího vnitřní objem kolony. Vytváří se vhodnou polymerační reakcí v roztoku. Oproti klasickým kolonám, jejichž náplň je tvořena drobnými částicemi, nemají mezičásticové prostory, proto je veškerý tok mobilní fáze nucen procházet monolitem, který obsahuje dva typy pórů – velké (makropóry), které zajišťují rychlý tok mobilní fáze skrz monolit a středně velké póry (mezopóry), které zajišťují monolitu dostatečně velký povrch a tím vysokou separační kapacitu. Konvektivní tok těmito póry zvyšuje rychlost přenosu hmoty v koloně a umožňuje značné zrychlení, zejména u separace velkých molekul [12, 31, 32].

Jedním z prvních monolitických separačních médií jsou **makroporézní polymerní disky**, vyvinuté Ústavem makromolekulární chemie ČSAV v Praze, které našly využití při separaci bílkovin a NK. Příprava těchto monolitů je jednoduchá – vytvářejí se radikálovou polymerací směsi s obsahem monovinylových monomerů s reaktivní skupinou (např. butyl- nebo glycydylmethakrylátu), síťovadla, monomeru se dvěma či více dvojnými vazbami (divinylbenzen, ethylendimethakrylát), iniciátoru a porogenního rozpouštědla, která se naplní do formy plochého nebo válcovitého tvaru, kde po zahřátí polymeruje. Následným mechanickým obráběním se vyrobí disky. Funkční skupiny vzniklého polymeru lze posléze modifikovat. I přes to, že je monolit sám o sobě dost mechanicky pevný, vkládají se disky do pouzder, která jej zpevňují a zabraňují odlamování hran. Celá jednotka je pak užívána k separacím [32].

Na počátku devadesátých let byla vyvinuta další forma, **makroporézní polymerní kolony**, jejichž příprava probíhá v kapiláře, která se naplní polymerační směsí. Velikost pórů v těchto monolitech činí 1 μm . Mimořádně nízký odpor vůči proudění kapaliny těmito póry je předpokladem pro rychlé separace. Modifikovat funkční skupiny lze reakcí původních funkčních skupin nebo tzv. roubováním, při kterém z každé povrchové struktury roste řetězec s obsahem mnoha nových funkčních skupin, které významně ovlivňují vazebnou kapacitu. Na povrch lze navázat azoiniciátor a pomocí něj roubovat např. *N*-isopropylakrylamid. Takto upravený monolit pak vykazuje změnu polaritu v závislosti na teplotě a gradientové eluce je tak možno dosahovat pouze změnou teploty bez použití gradientu mobilní fáze. Výhodou je pak možnost snadné recyklace mobilní fáze a tak i menší zátěž pro životní prostředí [32].

Rychlost separace, typická pro monolity, byla lákavá pro aplikaci těchto kolon v biotechnologických výrobcích, ale k tomu bylo třeba připravit monolity o větším objemu. Namísto plného monolitického bloku byly připraveny monolity ve tvaru trubic, které se teleskopicky mohou zasunovat do sebe a vytvářet tak velké objemy stacionární fáze, a daly tak

vzniknout **tubulárním kolonám s radiálním tokem** (tok mezi těmito kolonami je radiální, zpravidla zvnějšku do středu) [32].

Experimentálně zjištěný fakt, že při stlačení sloupce gelu použitím hydrostatického tlaku proudící kapaliny se významně zvýší jeho permeabilita, vedl k přípravám gelů polymerizací vodných roztoků *N,N'*-methylen-bis-akrylamidu a kyseliny akrylové v přítomnosti anorganické soli, stlačených na 10 % původního objemu, které byly použity pro iontovýměnnou separaci bílkovin. Tuto technologii převzala firma BioRoad v Kalifornii a použitím 1,4-dialkylpiperazinu jako síťovadla připravila kolony na bázi **komprimovaných gelů**, známé pod značkou UNO, do kterých jsou interaktivní skupiny zaváděny kopolymerací. Většina těchto monolitů se uplatňuje v iontově-výměnných separacích, monolity připravené z *N*-isopropylakrylamidu se užívají pro separace bílkovin [32].

Anorganické látky jsou častou náplní kolon v HPLC a jsou užívány i k přípravě kolon monolitických. Pro výrobu **monolitických kolon z anorganických materiálů** se užívají tyčinky z oxidu křemičitého nebo silikagelu, ty však nemohou být připravovány in situ, jelikož během tuhnutí ztrácí část objemu. Tyto náplně se vyrábějí odděleně a následně se umísťují do smršťivých trubic z PEEK, které vytvářejí tělo kolony. Silikové monolity jsou složeny z dobře uspořádaných, přibližně stejně velkých skeletů prostoupených 1 μm póry. Jednotlivé částice skeletu jsou porézní, takže propůjčují materiálu velký specifický povrch, což je ceněno zvláště při separaci malých molekul. V současné době jsou dostupné mimo jiné pod značkou Chromolith® německé firmy Merck a připravují se hydrolytickou polymerací tetramethoxysilanu nebo tetraethoxysilanu ve vodném roztoku kyseliny octové v přítomnosti polyetylglykolu [31, 32].

Monolitické kolony jsou mechanicky stabilní, odolávají v širokém rozsahu pH a umožňují účinnou separaci i při velkých průtocích. Se snižující se velikostí sorbentu se zvětšuje zpětný tlak a tím je omezena maximální rychlost průtoku [12, 31].

Kolony s vtištěnými polymery

Nový typ stacionární fáze představují vtištěné polymery (imprinted polymers), které jsou obdobou monolitických kolon, do jejichž náplně je navíc umístěn „otisk“ analytu, který chceme oddělit. Polymer se připravuje in situ přidáním analyzované látky do kolony, která se po ukončení polymerace vymyje z kolony a zanechá tak charakteristickou dutinu [12].

Tento typ polymerů se využívá pro separace obtížně dělitelných látek, např. chirálních [12].

3.3.1.7 Detektory

Detektory slouží k indikaci látek, které vycházejí z kolony, a poskytují odezvu úměrnou koncentraci stanovovaných látek v eluátu [25, 28].

Detektory je možno klasifikovat z různých hledisek. Rozlišujeme detektory univerzální, které jsou schopny detekovat celou škálu látek, zpravidla s nižší citlivostí, a selektivní, které mívají vysokou citlivost pro určité látky, práce s nimi však vyžaduje velmi čistá rozpouštědla, aby nedocházelo k interferenci signálu detektoru. Je výhodné, je-li přístroj vybaven oběma typy. Podle časové odezvy jsou užívány jak detektory diferenciální, které poskytují odezvu na okamžité množství analytu v cele, tak integrální, které zaznamenávají veškeré množství látky prošlé celou do daného okamžiku. Toto dělení však nemá praktický význam, jelikož komerčně dodávané detektory většinou poskytují diferenciální záznam, z něhož se lépe určují retenční charakteristiky a současně mají připojený integrátor, poskytující integrální údaje pro kvantitativní hodnocení. U detektorů destruktčního typu se analyzovaná látka rozloží a není tedy možnost ji izolovat, u detektorů nedestruktčního typu je umožněno jímání jednotlivých frakcí. Dále je možno detektory rozlišit na koncentrační typ, kde je okamžitá odezva detektoru závislá na rychlosti přívodu mobilní fáze, a na hmotnostní typ, kde odezva nezávisí na rychlosti ani změně přívodu mobilní fáze [25, 27].

Citlivost detektoru se vyjadřuje jako vzrůst odezvy, který vyvolá jednotková změna koncentrace nebo množství látky. Minimální detekovatelné množství určuje koncentrace látky, která vyvolá odezvu detektoru rovnou dohodnutému násobku šumu. Šum detektoru je dán změnami ve výstupním signálu, které nejsou způsobeny analyzovanými sloučeninami, ale kolísáním teploty, změnami průtoku nebo jinými vlivy [27].

Detektory by měly splňovat tyto požadavky:

- Vysoká citlivost
- Reprodukovatelnost a linearita odezvy
- Nezávislost odezvy na změně složení mobilní fáze při gradientové eluci
- Univerzálnost [6]

Detektor by měl mít co nejmenší vnitřní objem, co nejnižší mez detekce, signál by měl mít co nejnižší šum a neměl by obsahovat drift (pomalý únik nulové linie) [12].

Různé typy detektorů těmto požadavkům více či méně vyhovují, liší se principem funkce, konstrukcí, selektivitou, citlivostí, mezí detekce a lineárním dynamickým rozsahem. Nejčastěji užívané jsou fotometrické detektory [6, 10, 28].

Fotometrické detektory pracují v ultrafialové a viditelné oblasti. Nejjednodušší pracují s jednou pevně nastavenou vlnovou délkou (obvykle 253,7 nm), jako zdroj záření užívají

nízkotlakou rtuťovou výbojku a jsou opatřeny interferenčním filtrem. Jako zdroje monochromatického záření se dá využít i nízkotlaké zinkové nebo kadmiové výbojky. Takovéto detektory jsou levné a přesto poměrně citlivé. Pomocí různých interferenčních filtrů lze měřit při několika různých, předem daných vlnových délkách [28].

Detektory s polychromatickým zdrojem záření (deuteriová výbojka) a monochromátorem se dají využít pro měření při libovolné vlnové délce, v rozmezí 190-600 nm. Některé tyto detektory jsou schopny detekovat celé spektrum analyzované složky, ale při zastavení toku mobilní fáze [28].

Diode array detektory (DAD) obsahují velký počet miniaturních fotodiod, které jsou spojeny s kondenzátory, které jsou vybíjeny úměrně velikosti zářivého toku. Ty se následně nabíjejí a je zaznamenáván proud potřebný ke zpětnému nabití. Umožňují snímat celé absorpční spektrum eluátu každou sekundu, jejich výstupem je 3D chromatogram závislosti absorbance na vlnové délce a na čase [6, 28].

Fluorimetrické a fosforimetrické detektory jsou založeny na skutečnosti, že některé látky s určitými funkčními skupinami (lumifory) po absorpci budícího ultrafialového záření část pohlcené energie vyzáří v podobě luminiscenčního záření o nižší energii (vyšší vlnové délce) než záření excitační. Intenzita emitovaného záření je pro nízké koncentrace úměrná koncentraci látky a měří se fotonásobičem umístěným tak, aby na něj dopadalo pouze emitované záření. Častější jsou detektory fluorimetrické, protože více látek poskytuje přirozenou fluorescenci než fosforescenci. U některých látek, které tuto schopnost nemají, je možné derivatizací vytvořit fluoreskující deriváty. Fluorimetrické detektory se vyznačují vyšší citlivostí, než spektrofotometrické [28].

Elektrochemické detektory slouží k detekci látek schopných elektrochemické reakce. Ampérometrické (polarografické) detektory měří proud vyvolaný průchodem redukovatelné nebo oxidovatelné látky měrnou celou. Polarografické detektory využívají rtuťovou kapkovou elektrodu, ostatní ampérometrické detektory pevné měrné elektrody ze skelného uhlíku, grafitových vláken, platiny nebo jiného kovu. Tyto elektrody jsou vysoce citlivé (10^{-10}) za poměrně nízkou cenu, jsou však náročné na čistotu a odplynění mobilní fáze [28].

Coulometrické detektory měří náboj potřebný k oxidaci nebo redukci látky při průtoku měrnou celou. Jsou citlivější než ampérometrické [28].

Při iontovýměnné chromatografii lze využít potenciometrickou detekci separovaných iontů na iontově selektivních elektrodách [28].

Refraktometrické detektory jsou nejvíce používané nespecifické detektory, odezva je dána rozdílem indexů lomu eluátu a čisté mobilní fáze. Citlivost tohoto detektoru je nižší než u

specifických detektorů ($5 \cdot 10^{-7}$), neumožňuje gradientovou eluci a vyžaduje velmi pečlivé termostatování ($\pm 0,0001^\circ\text{C}$) [6, 28].

Vodivostní detektory jsou nespecifické detektory zaznamenávající elektrickou vodivost eluátu v průtokové cele mezi dvěma elektrodami. Ty bývají nejčastěji platinové a je na ně vkládáno střídavé napětí, aby nedošlo k jejich polarizaci. Tyto detektory jsou výhodné pro měření iontových látek. Mobilní fáze by měla být při detekci tímto typem detektoru pokud možno nevodivá [28].

Reakční detektory využívají reakce látek s reakčním činidlem v eluátu, který vystupuje z kolony. Reakce v mikroreaktoru musí být rychlá za tvorby derivátů analyzované látky, které absorbují záření, fluoreskují, oxidují se či redukují nebo jsou iontového charakteru. Výstup z mikroreaktoru je pak připojen k běžnému detektoru [28].

Fotochemické detektory nevyžadují přítomnost chemického reakčního činidla, k tvorbě derivátů k měření stačí ozáření UV světlem [28].

Chemiluminiscenční detektory měří fluorescenci nebo fosforescenci vyvolanou chemickou reakcí [28].

Reakční detektory jsou konstrukčně komplikované, užívají se většinou jen v případech, kdy je obtížné nebo nemožné měřit danou látku pomocí běžných detektorů [28].

Hmotnostní detektor umožňuje nejen kvantitativní stanovení analytu, ale také podává kvalitativní informace o jeho struktuře. Skládá se z iontového zdroje, hmotnostního analyzátoru a detektoru iontů. Často se užívá metoda ionizace elektrosprejem (ESI), kdy se při průchodu analytu silně polarizovanou kovovou kapilárou vytvoří mikrokapičky, nesoucí na svém povrchu náboj. Odpařováním rozpouštědla dochází při určité velikosti kapiček ke zvýšení povrchové hustoty náboje nad kritickou mez, dochází ke Coulombické explozi na další množství malých kapiček, na které se rozprostře náboj. Opakováním tohoto procesu dochází ke vzniku iontů samotných analytů. Ionty pak vstupují do analyzátoru (kvadrupólový, iontová past nebo průletový), kde se separují podle poměru molární hmotnosti a náboje a detekují se elektronovým násobičem nebo fotonásobičem. Další užívanou ionizační metodou je chemická ionizace za atmosférického tlaku (APCI) [10].

3.3.1.8 Zařízení pro zpracování dat

Činnost zařízení pro zpracování dat sestává ze získávání a zpracovávání dat z chromatografického systému [28].

Analogový signál detektoru je zesilován a převeden na číselný ekvivalent. Tento digitální údaj je ukládán do osmibitového registru, z něhož se data pravidelně ukládají do paměti počítače [28].

3.3.2 Kvalitativní a kvantitativní hodnocení chromatografických dat

Vyjadřování výsledků je obecně u všech kolonových chromatografických metod shodné. Po nástřiku vzorku na kolonu je směs unášena mobilní fází a na stacionární fázi dochází k dělení. Při výstupu jednotlivých složek indikuje detektor jejich přítomnost v eluátu a zaznamenává eluční píky [1].

Grafickým záznamem odezvy je chromatogram, který je v ideálním případě tvořen řadou symetrických piků rozdělených od sebe na základní linii. Tento záznam pak slouží pro kvantitativní i kvalitativní hodnocení [1].

3.3.2.1 Kvalitativní hodnocení

Cílem kvalitativní analýzy je určení počtu komponent dané směsi a identifikace významných složek. Pro identifikaci je důležitým parametrem retenční čas t_R , což je doba od nástřiku po maximum daného píku. Samotná identifikace je pak založena na porovnávání retenčního času látky se standardem [1, 27].

3.3.2.2 Kvantitativní hodnocení

Při kvantitativní analýze se řeší vztah mezi plochou píku a množstvím složky ve vzorku. Pro určení obsahu se užívají tyto metody [10]:

Metoda vnitřní normalizace se užívá pro určení obsahu látek ve směsích složených z nízkého počtu známých komponent. Všechny píky chromatogramu se integrují a poměry ploch jednotlivých piků jsou vztaženy k ploše všech. Množství určité složky se pak vyjádří jako relativní frakce z celku [1, 10].

Výhodou je, že pro analýzu stačí jediný nástřik, jehož objem není podstatný, takže výsledek není negativně ovlivněn nepřesností v dávkování [12].

Nevýhodou je celá řada omezení – všechny složky vzorku se musí eluovat, dávat odezvu v detektoru, musí být známy jejich korelační faktory nebo relativní molární odezvy a všechny plochy piků chromatogramu musí být vyhodnotitelné [10, 12].

Metoda absolutní kalibrace neboli metoda vnějšího standardu se provádí dávkováním známých množství zkoumaného vzorku a standardu za identických podmínek. Pracuje se buď metodou kalibrační křivky, nebo metodou přímého srovnání. Pro přímé srovnání se provedou

dva nástřiky – analyzované látky a standardní látky. Pro sériové analýzy se připravují kalibrační křivky – dávkováním stejných objemů standardů o různé koncentraci [10].

Metoda vnitřního standardu spočívá v přidávání známého množství látky, která se vzájemně neovlivňuje se složkami směsi. Dochází k eliminaci nepřesností v dávkování vzorku nebo ztrát při předúpravě. Metoda poskytuje přesnější výsledky než metoda absolutní kalibrace [10, 12].

Je důležité, aby vnitřní standard měl svůj pík dostatečně oddělený od ostatních píků jednotlivých složek vzorku [1].

Metoda standardního přídávku je založena na přidání definovaného množství standardu ke známému množství vzorku. Nejprve se provede nástřik samotného vzorku a následně se k definovanému vzorku přidá přesné množství standardu a provede se druhý nástřik. Tato metoda se užívá v případě, že chceme ve směsi stanovit jednu nebo jen několik málo složek. Nevýhodou je zatížení chybou způsobenou nepřesnostmi v dávkování [10, 12].

3.3.3 Využití HPLC

Využití HPLC v praxi je velmi rozsáhlé, jelikož je to metoda rychlá s možností automatizace. Využívá se pro dělení, identifikaci a kvantitativní analýzu látek ve směsích, ke kontrole meziproductů a productů syntéz a výroby, k čištění a mikropreparaci látek, kontrole životního prostředí, v potravinářství a v klinické praxi k monitoringu obsahu komponent v tělních tekutinách [25].

3.4 Validace analytických metod

Validace je série experimentů, při které se zjišťují nejdůležitější charakteristiky metody a jejím smyslem je demonstrovat, že vypracovaná metoda dává reprodukovatelné a opakovatelné výsledky a je pro daný účel vhodná. Cílem tohoto procesu je určit podmínky tak, aby byl postup opakovaně použitelný a spolehlivý i pro užití v jiných laboratořích [33, 34].

Validace se provádí jak u nových, tak u stávajících metod, u nichž byla upravována metodika, má-li být přenesena do jiné laboratoře nebo při průkazu rovnocennosti dvou metod. Hodnoty validačních parametrů se zpracovávají do validačních protokolů [33].

Aby byla zajištěna spolehlivost metody při každém další použití, je třeba definovat přesně podmínky jejího průběhu, což u instrumentálních metod není dost dobře možné. Proto jsou určena kritéria, která musí být splněna, aby mohl být systém použit. Při každém dalším užití validované metody se již neprovádí validace celá, jen se otestují výše zmíněná kritéria – test způsobilosti analytického systému [34].

3.4.1 Test způsobilosti chromatografického systému

Podle Evropského lékopisu se v tomto testu hodnotí počet teoretických pater, rozlišení a faktor symetrie [35].

Faktor symetrie píku A_S se vypočte:

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

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

dvzdálenost mezi kolmicí spuštěnou z vrcholu píku a vzestupnou částí píku v jedné dvacetině jeho výšky

Hodnota symetrie 1,0 značí úplnou symetrii, akceptovatelné jsou hodnoty faktoru symetrie v rozmezí 0,8 až 1,5 [30, 36].

Zdánlivý **počet teoretických pater N** se vypočte ze vztahu:

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

t_Rretenční čas

w_h šířka píku v polovině jeho výšky [30]

Rozlišení $R_{1,2}$ mezi dvěma píky lze vypočítat ze vzorce:

$$R_{1,2} = \frac{1,18(t_{R2} - t_{R1})}{w_{h1} + w_{h2}}$$

kde platí, že $t_{R1} < t_{R2}$

t_{R1}, t_{R2} retenční časy

w_{h1}, w_{h2} ..šířky píků v polovině výšky

Rozlišení větší než 1,5 odpovídá rozdělení píků na základní linii [30].

Opakovatelnost je vyjádřena odhadem směrodatné odchylka ($RSD_{\%}$) v procentech pro sadu měření standardního roztoku a vypočte se:

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

x_ijednotlivé hodnoty (plocha píku, výška píku nebo poměr ploch u metody vnitřního standardu)

\bar{x}průměr hodnot

n.....počet hodnot

Maximální povolená relativní směrodatná odchylka pro řadu nástřiků porovnávacího roztoku pro definované limity se vypočte ze vzorce:

$$RSD_{max} = \frac{KB\sqrt{n}}{t_{90\%,n-1}}$$

K..... konstanta získaná ze vztahu $K = \frac{0,6}{\sqrt{2}} \cdot \frac{t_{90\%,5}}{\sqrt{6}}$

B..... horní limit obsahu uvedeného v lékopisném článku minus 100%

n.....počet opakování nástřiků porovnávacího roztoku

$t_{90\%, n-1}$ Studentův poměr při 90% pravděpodobnosti pro n – 1 stupňů volnosti [30]

	Počet jednotlivých nástřiků			
	3	4	5	6
B (%)	Maximální dovolená relativní směrodatná odchylka			
2,0	0,41	0,59	0,73	0,86
2,5	0,52	0,74	0,92	1,06
3,0	0,62	0,89	1,10	1,27

Tab. 1: Požadavky na opakovatelnost [30]

3.4.2 Přesnost

Přesnost vyjadřuje míru shody mezi jednotlivými výsledky opakovaně naměřenými s jedním vzorkem. Vyjadřuje se jako relativní směrodatná odchylka šesti stanovení zhomogenizovaného vzorku, připraveného kompletním postupem [33, 34].

Podle podmínek opakování se rozlišují tři úrovně:

Opakovatelnost se provádí opakováním metody jedním pracovníkem se stejnými činidly na jednom přístroji [33].

Mezilehlá přesnost se provádí s různými činidly, různými lidmi v různý čas, ale na stejném přístroji a se stejným vzorkem [33].

Reprodukovatelnost se provádí stejně jako mezilehlá přesnost, ale v různých laboratořích [33].

Přesnost nemá vztah k pravé hodnotě, je závislá na rozdělení náhodných chyb. Vyjadřuje se směrodatnou odchylkou (SD). Není-li odchylka závislá na obsahu, uvádí se její absolutní hodnota v jednotkách výsledku, jestliže závislá je, udává se relativní směrodatná odchylka ($RSD_{\%}$) v procentech [37].

3.4.3 Správnost

Správnost je vyjádřením shody mezi výsledkem a správnou hodnotou, která se získá buď jinou ověřenou nezávislou metodou, nebo analýzou modelového vzorku (placebo s přidaným standardem), případně analýzou vzorku s přidavkem standardu. Pro stanovení přesnosti se analyzuje nejméně 6 vzorků a vyjádří se buď jako rozdíl správné a získané hodnoty, nebo jako výtěžnost [33]:

$$\text{výtěžnost (\%)} = \frac{100 \cdot \text{nalezená hodnota}}{\text{správná hodnota}}$$

3.4.4 Linearita

Linearitou je označována schopnost dávat výsledky přímo úměrné koncentraci stanovované látky. Pro stanovení je nutné naměřit minimálně 5 vzorků v rozmezí 50-150 % deklarovaného množství. Pokud je metoda lineární, lze vyjádřit směrnici z jednoho bodu [33].

Linearita se dokládá graficky nebo matematicky jako výsledek regresní analýzy [34].

3.4.5 Robustnost

Robustnost vyjadřuje míru vlivu proměnných podmínek na výsledky analýzy, např. složení mobilní fáze nebo pH vodné složky [33].

3.4.6 Selektivita (specifita)

Selektivita je schopnost změřit správně a přesně určenou látku za přítomnosti interferujících látek – rozkladných produktů, pomocných látek, nečistot, zbytkových rozpouštědel nebo jiných neznámých látek. Parametr se dokládá výsledkem analýzy standardu a např. vzorků bez analyzované látky [34, 37].

3.4.7 Detekční limit

Detekční limit (LOD) určuje citlivost metody a je dán nejnižší detekovatelnou koncentrací látky nestanovované kvantitativně, určuje se jako koncentrace analyzované látky s poměrem signálu k šumu s hodnotou 3, což se ověřuje analýzou vzorku o příslušné koncentraci [33].

3.4.8 Kvantitativní limit

Kvantitativní limit (LOQ) je parametrem citlivosti metody a udává nejnižší koncentraci látky, kterou lze stanovit s přijatelnou přesností a správností. Jako kvantitativní limit lze označit i koncentraci, při níž hodnota relativní směrodatné odchylky dosáhne 10 %, obvykle se jedná o

trojnásobek detekčního limitu. Lze ho vyjádřit jako koncentrace s poměrem signálu k šumu s hodnotou 10 [33].

Parametry detekční a kvantitativní limit je nutné doložit u metod pro stanovení nečistot [34].

3.4.9 Rozsah

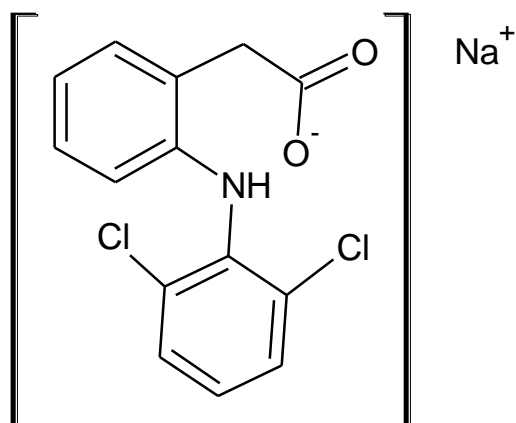
Rozsah jsou koncentrační hranice, vymežující interval použitelnosti metody. Spodní hranicí je detekční limit, horní hranice je určena maximální odezvou, nad kterou již přístroj nepracuje přesně [33].

SÚKL nevyžaduje doložení tohoto parametru [34].

3.5 Diklofenak sodný

Lékopisný název: Diclofenacum natricum (Diklofenak sodná sůl)

Strukturní vzorec:



Obr. 2: Chemická struktura diklofenaku sodného [30]

Sumární vzorec: $C_{14}H_{10}Cl_2NNaO_2$

Chemický název: natrium-{2-[(2,6-dichlorfenyl)amino]fenyl}acetát

Molární hmotnost: 318,13

Diklofenak sodný (DF) je bílý nebo slabě nažloutlý krystalický, slabě hygroskopický prášek, mírně rozpustný ve vodě, snadno rozpustný v methanolu, dobře rozpustný v ethanolu 96%, těžce rozpustný v acetonu [30].

3.5.1 Klinické údaje

3.5.1.1 Terapeutické indikace

Přípravky s obsahem diklofenaku sodného jsou indikovány při symptomatické léčbě zánětlivých a degenerativních onemocnění pohybového aparátu, bolestivých otoků a zánětů po operacích a poraněních, při léčbě zánětlivých afekcí v gynekologii, vaskulárních bolestí hlavy a jako doplnění léčby bolestivých afekcí v oblasti ORL [38].

3.5.1.2 Dávkování

Obvyklá dávka perorálně podávaného DF je 25-50 mg 2-3× denně. Tablety se užívají po jídle, pro rychlejší nástup účinku je možno podat před jídlem s dostatečným množstvím vody. [3, 38].

Doporučná protizánětlivá dávka je 50-75 mg 4× denně [39].

U dětí a mladistvých do 15 let se DF podává pouze při diagnóze juvenilní idiopatické artritidy, u dětí nad 6 let a 20 kg se pak podává 1-3 mg/kg/den rozdělené ve 2-3 denních dávkách [38].

3.5.1.3 Kontraindikace

DF je kontraindikován u pacientů přecitlivělých na účinnou látku, kyselinu acetylsalicylovou nebo jiný inhibitor syntézy prostaglandinu, u gastrointestinálního krvácení a perforace, peptického vředu, hemoragii, srdečního selhání a v posledním trimestru gravidity (v prvním a druhém trimestru je možné DF podávat na doporučení lékaře v co nejmenších účinných dávkách) [38].

3.5.1.4 Interakce

DF zvyšuje plazmatické koncentrace lithia a dioxinu, zeslabuje účinek diuretik, zvyšuje účinek antikoagulancií, s antiagregancii a SSRI zvyšuje riziko krvácení, zvyšuje toxicitu cyklosporinu a methotrexátu, v kombinaci s chinoliny vyvolává křeče. Současné podávání s ostatními NSAID zvyšuje riziko vzniku nežádoucích účinků. U pacientů s perorálními diabetiky je doporučena úprava jejich dávek [38].

3.5.1.5 Nežádoucí účinky

Nejčastější nežádoucí účinky DF se projevují v oblasti gastrointestinálního traktu (nausea, zvracení, průjem, dyspepsie, epigastrická bolest, plynatost a nechutenství), dále se objevují bolesti hlavy a závratě, vyrážka na kůži a zvýšené hodnoty aminotransferáz [38].

3.5.2 Farmakologické vlastnosti

3.5.2.1 Farmakodynamika

Farmakoterapeutická skupina: nesteroidní antirevmatikum

ATC kód: M01ABO5

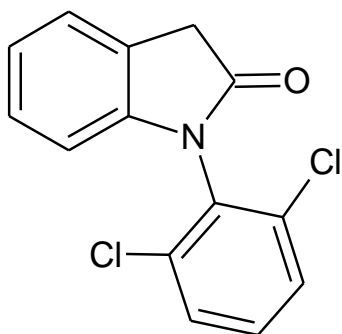
DF je nesteroidní sloučenina s analgetickými, antiflogistickými a antipyretickými účinky, hlavním mechanismem účinku je inhibice syntézy prostaglandinu [38].

DF vykazuje analgetický účinek u středně těžkých a těžkých bolestivých stavů. Při zánětu dochází jak k uvolnění spontánní bolesti, tak bolesti z pohybu a zmenšení otoků. U primární dysmenorey uvolňuje bolest a zeslabuje krvácení, u migrény dochází k uvolnění bolesti a zmírnění doprovodných symptomů [38].

3.5.2.2 Farmakokinetika

Po perorálním podání je diklofenak rychle absorbován, systémová biologická dostupnost je 30-70 % díky metabolismu prvním průchodem játry, biologický poločas je 1-2 hodiny. Kumuluje se v synoviální tekutině, jeho biologický poločas je v tomto kompartmentu 2-6 hodin. Je metabolizován CYP3A4 a CYP2C9 hydroxylací a konjugací na neaktivní metabolity a je vylučován močí i žlučí [39, 40].

3.6 Degradční produkt 1-(2,6-dichlorfenyl)indolin-2-on



Obr. 3: Chemická struktura degradačního produktu DPI [30]

Ačkoli je chemická stabilita diklofenaku sodného vysoká, ČL 2009 popisuje několik potencionálních nečistot. Hlavní (v ČL označována jako nečistota A) je 1-(2,6-dichlorfenyl)indolin-2-on (DPI), obecně označován jako meziprodukt syntézy DF, který se může vyskytnout ve farmaceutických formulacích při dlouhém skladování, zejména pak po expozici teplem nebo světlem [5, 30, 41].

3.7 Přehled prací zabývajících se stanovením DF a DPI

3.7.1 Práce zabývající se stanovením DF a DPI

Pro simultánní stanovení diklofenaku sodného a jeho degradačního produktu 1-(2,6-dichlorfenyl)indolin-2-onu byli vyvinuty tyto metody:

- R. Hájková a kolektiv vyvinuli metodu pro stanovení DF, jeho degradačního produktu a konzervačních přísad methylparabenu a propylparabenu v topickém 1% emulgelu metodou kapalinové chromatografie na obrácených fázích se spektrofotometrickou detekcí (254 nm). Byla využita kolona Supelco Discovery C18 (125×4 mm, 5 μm, Sigma-Aldrich) s předkolonou SuperGuard (20×4 mm, 5 μm, Sigma-Aldrich), mobilní fází byla směs methanolu a fosforečnanového pufru, pH 2,5 (65:35, v/v). Vnitřním standardem byl flurbiprofen, při průtoku mobilní fáze 1,0 ml.min⁻¹. Čas analýzy byl < 17 min [5].

Tato metoda vytvořila základ základem mé diplomové práce. Místo náplňové kolony byla využita monolitická kolona (zejména pro zrychlení celkové doby analýzy), místo fosforečnanového pufru byl použit vodný roztok kyseliny fosforečné shodného pH. Při stejném průtoku tak doba analýzy klesla pod 4 min.

- S. E. Vignaduzzo, P. M. Castellano, T. S. Kaufman popsali metodu pro současné stanovení pridinolu a DF v kombinovaných přípravcích se současným limitním testem pro nečistotu A diklofenaku (DPI). Separace probíhá na C18 koloně s UV detekcí (225 nm). Mobilní fází byla kombinace methanolu, 2-propanolu a fosforečnanového pufru (50 mM, pH 5,5) 48:9:43 (v/v/v) s průtokem 1 ml.min⁻¹. Metoda byla aplikována pro analýzu komerčně vyráběných tablet a kapslí [42].
- J. Krzek a M. Starek vyvinuli chromatograficko-denzitometrickou metodu pro identifikaci a kvantifikaci DF a jeho nečistot DPI a indolin-2-onu a sledovali vliv pH, teploty a ultrafialového záření na koncentraci diklofenaku. Chromatografická separace probíhala na silikagelem potažených hliníkových TLC deskách. Jako mobilní fáze byla použita směs cyklohexanu, chloroformu a methanolu (12:6:1, v/v/v), denzitometrická detekce probíhala při 248 nm. Metoda vykazuje vysokou citlivost, selektivitu a přesnost, její výsledky jsou srovnatelné s HPLC a je použitelná pro hodnocení DF ve farmaceutických přípravcích. Bylo vysledováno, že koncentrace DF je závislá na teplotě, pH a UV záření, které redukuje jeho koncentraci a indukuje tvorbu degradačních produktů [43].

Pro doplnění uvádím práci, zabývající se identifikací degradačních produktů diklofenaku:

- M.-J. Galmier a kolektiv vytvořili metodu pro identifikaci degradačních produktů DF. Ve své práci popsali tři degradační produkty, mezi nimi i DPI. Jedná se o kapalinovou chromatografii s následnou detekcí hmotnostní spektrometrií. Pro separaci diklofenaku a degradačních produktů byla použita kapilární kolona Kromasil C18 (150 mm × 500 μm, 5 μm, AIT) a mobilní fáze složení methanol – 0,1% vodný roztok kyseliny mravenčí pH 2,5 (80:20, v/v) s průtokem 0,4 ml/min. Separace probíhala za normální teploty. Pro detekci byl použit UV detektor (254 nm) a on-line MS [41].

3.7.2 Práce zabývající se stanovením DF metodou HPLC

V této kapitole jsou uvedeny metody zaměřené pouze na stanovení diklofenaku sodného.

3.7.2.1 Práce zabývající se stanovením DF metodou HPLC

Viz. Tab. 2

citace	Kolona	MF	Průtok ml/min	detekce	Poznámky
[44]	Kromasil C18 (150×4,6 mm, 5 μm)	ACN/ MeOH/ KH ₂ PO ₄ (pH 7) 21:21:58		DAD	Stanovení v synoviální tekutině. Temperace na 35°C.
[45]	RP Luna C8(2) (100×2,0 mm, 3 μm)	A: ACN/ H ₂ O/ CH ₃ COOH/ TEA 200:791,18:8,17:0,65 (pH 2-3) B: ACN/ H ₂ O/ CH ₃ COOH/ TEA 600:391,18:8,17:0,65 (pH 4,5) 5 min 25% B, pak 1 min rostoucí B na 76,15 % (15 min konst.), pak 2 min B do 25%	0,3	UV 280 nm	IS: indometacin Vzorky získané mikrodialýzou z lidské podkožní tukové tkáně po topické aplikaci DF. Temperace na 30°C.
[45]	Superspher RP select B (125×3,0 mm, 5 μm)	ACN/ kyselina mravenčí (20 mM) 53:47 (pH 2-3)		MS	Vzorky získané mikrodialýzou z lidské podkožní tukové tkáně po topické aplikaci DF.
[46].	C-18 kolona s RP (250×4,6 mm, 5μm) Beckman	ACN/ sodný acetátový pufr (75mM) pH 5,0 (CH ₃ COOH) 2:1,5	0,5	UV 280 nm	IS: N-fenylanthranilová kyselina Stanovení DF a metabolitů v séru.
[47]	Chromolith® Performance RP-18e (100×4,6 mm, monolit)	A: kyselina mravenčí B: MeOH Gradient ze 40 na 70 % B během 10 min	2,5	DAD Fluorim.	Stanovení DF, IBU a SAL v lidské moči. Fluorimetrické stanovení při 220 a 230 nm.

[48]	Separon SGX C-18 (150×3 mm, 7 μm)	MeOH/ FoP (pH 6,5) (110:100) s přidavkem tetrabutylamonium jodidu (5 mM/l)	0,5	UV 284 nm	IS: <i>N</i> -fenylanthranilová kyselina Stanovení v transdermálních systémech.
[49]	Spherisorb C-18 (250×4,6 mm, 5 μm)	ACN/ octan sodný (0,1M) 35:75 pH 6,5	1	UV 278	IS: flurbiprofen Stanovení v plazmě.
[50]	Lichrocard RP-18 (125×4 mm, 5 μm) Předkolona Pelliguard LC-18 (50×4,6 mm, 40 μm)	ACN/ H ₂ O pH 3,45 (CH ₃ COOH) 40:60	0-6,5 min: 0,8 pak 1,9	UV 240 nm	Současné stanovení kyanokobalaminu, betamethasonu a DF ve farmaceutických preparátech Temperance na 34°C.
[51]	Hypersil BDS C ₁₈ (250×4,6 mm, 5 μm)	TEA/ ACN 40:60 pH 2,75 (H ₃ PO ₄)	1	UV 284 nm	Současné stanovení timololu, rosuvastatinu a DF v plazmě a farmaceutických přípravcích. Temperace na 45°C.
[52]	Spherisorb S5 ODS2 (250×4,6 mm, 5 μm)	MeOH/ FoP (0,05M) 43:57 pH 6,2		Fluori- metricky	IS: harmol Excitace při 282 nm, emise při 365 nm Stanovení v séru.
[53]	Sunfire™ C 18 (150×4,6 mm, 5 μm)	ACN/ MeOH/ FoP (0,01M) 40:10:50 pH 4,1	1	UV 245 a 281 nm	IS: flurbiprofen Stanovení v dětské moči.
[54]	Exclipse XDB-C18 (150×4,6, 5 μm)	MeOH/ FoP 70:30	1	UV 280 nm	Kombinovaná metoda EME a HPLC pro stanovení biologických vzorků.

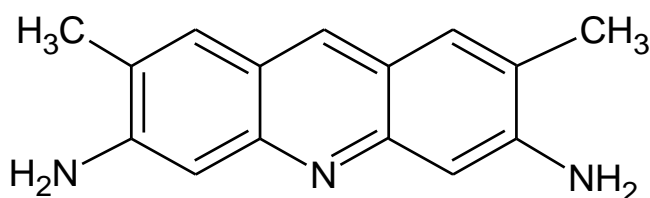
[55]	Eurospher 100 C18 5 μ m kolona (250 \times 4 mm) předkolona (5 \times 4 mm)	A: ACN/ THF 7:3 B: FoP (45mM, pH 7,0) 6 min lineární pokles z 72 na 62 % B 2 min isokraticky 55 % B Zpět na 72 % B	1,1	UV 280 nm	IS: dibromfenak Stanovení DF a metabolitů. Temperace na 20°C.
[56]	RP kolona C18 (250 \times 4,6 mm, 5 μ m) Merck	KH ₂ PO ₄ (25mM, pH 3,5)/ ACN 30:70	1	UV 280 nm	IS: IBU Stanovení v lidské plazmě po exkreci na tuhou fázi.

Tab. 2: Přehled prací zabývajících se stanovením diklofenaku sodného metodou HPLC (uvedené poměry složení mobilní fáze jsou vždy v objemových procentech)

3.7.2.2 *Práce zabývající se stanovením DF jinými metodami*

- A. M. Pimenta, A. N. Araújo a M. C. B. S. M. Montenegro realizovali současně dvě nezávislé metody stanovení DF metodou sekvenční injekční analýzy. Potenciometrické stanovení bylo prováděno iontově selektivními elektrodami s cyklodextrinem, fluorimetrické stanovení bylo prováděno po excitaci rtuťovou výbojkou při 254 nm. Obě tyto metody byly aplikovány do analýzy farmaceutických přípravků. Ve srovnání s referenčními metodami nevykazují tyto metody statisticky významné rozdíly s pravděpodobností 95 % [57].
- Jednoduché citlivé a velmi selektivní stanovení vyvinuli M. L. Fernández de Córdova, P. Ortega Barrales a A. Molina Díaz pro stanovení DF ve farmaceutických preparátech založené na fixaci účinné látky na Sephadex QAE A-25 při pH 7 a následné přímé stanovení absorbance pevné fáze při 281 a 400 nm. Metoda byla aplikována na analýzu farmaceutických přípravků a bylo shledáno, že jiné aktivní látky, používané v kombinaci s DF, nemají vliv na toto stanovení [58].
- Citlivé a rychlé stanovení DF průtokovou injekční spektroskopií založené na tvorbě barevné sloučeniny reakcí s Ce(IV)-3-methyl-2-benzothiazolinonhydrazon hydrochloridem (MBTH) v kyselině sírové 0,03M vyvinuli M. Soledad García a kolektiv. Tato metoda byla úspěšně aplikovaná jak na stanovení DF ve farmaceutických substancích, tak ve vzorcích moči [59].
- Jednoduchou spektrofotometrickou metodu pro stanovení DF ve farmaceutických preparátech vyvinuli A. A. Martin, M. A. Farajzadeh a A. Jouyban. Metoda je založena na reakci DF s 63% (w/v) kyselinou dusičnou za vzniku nažloutlého produktu s maximem absorbance při 380 nm. Detekční limit tohoto stanovení je 0,46 mg.l⁻¹, kalibrační křivka vykazuje linearitu v rozsahu 1-30 mg.l⁻¹[60].
- Spektrofluorimetrické stanovení DF ve vodném roztoku v přítomnosti α -cyklodextrinu vyvinuli J. A. Arancibia, M. A. Boldrini a G. M. Escandar. Metoda využívá skutečnosti, že emise fluorescenčního záření diklofenaku se zvýší v přítomnosti α -CD., se kterým tvoří komplex v poměru 1:1. Lineární závislost byla popsána v rozsahu 0-5 μ g.ml⁻¹. Metoda je použitelná pro analýzu farmaceutických přípravků [61].

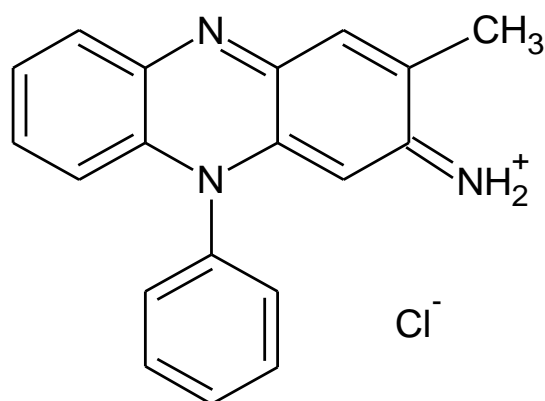
- A. O. Santini, H. R. Pezza a L. Pezza popsali stanovení DF pomocí Pt |Hg |Hg₂DF₂| grafitové elektrody, která DF detekuje s citlivostí $58 \pm 0,8$ mV v rozsahu $5 \cdot 10^{-5}$ až $1 \cdot 10^{-2}$ mol.l⁻¹ s detekčním limitem $3,2 \cdot 10^{-5}$ mol.l⁻¹. Konstrukce elektrody je jednoduchá za relativně nízkou cenu a je použitelná po dobu pěti měsíců. Stanovení DF je selektivní a to i v přítomnosti jiných látek, zejména karboxylátových nebo anorganických iontů, ve shodě s postupy amerického lékopisu [62].
- L. A. Carreira a kolektiv vytvořili metodu pro stanovení DF ve farmaceutických přípravcích s použitím iontů Eu³⁺ jako fluorescenční sondy. Ionty Eu³⁺ v kombinaci s DF (který obsahuje karboxylovou skupinu) tvoří komplexy v poměru 1:1, vykazují jinak zakázaný přechod při 616 nm a dochází ke zvýšení emitovaného fluorescenčního záření. Emise fluorescenčního záření při 592 nm není ovlivněna touto vazbou. Poměr I₅₉₂/I₆₁₆, označovaný R (poměr intenzity), je měřítkem podílu vázaných iontů. Lineární závislost vazby Eu³⁺ - DF byla stanovena pro koncentrace 10 až 200 µg.ml⁻¹. Výsledky metody vykazují shodu se spektrofotometrickými metodami [63].
- T. Pérez-Ruiz a kolektiv vyvinuli spektrofotometrické stanovení stopového množství DF extrakcí s akridinovou žlutí s využitím průtokového systému, které umožňuje stanovení v rozsahu 3-80 µg.ml⁻¹ až u 40 vzorků za hodinu. Metoda byla úspěšně aplikována pro stanovení DF ve farmaceutických preparátech [64].



Obr. 4: Akridinová žlutá [65]

- W. Jin aj. Zhang využili pro stanovení DF kapilární zónovou elektroforézu (CZE) s ampérometrickou detekcí mikroelektrodou z uhlíkových vláken při konstantním potenciálu 0,83 V oproti nasycené kalomelové elektrodě. Optimálních podmínek pro separaci a detekci bylo dosaženo pufrů Na₂HPO₄ ($4,90 \cdot 10^{-3}$ mol.l⁻¹), NaH₂PO₄ ($3,10 \cdot 10^{-3}$ mol.l⁻¹, oba pH 7,0), napětí 10 kV pro separaci a 5kv a 10 s pro injekční dávkování. Limit detekce je $2,5 \cdot 10^{-6}$ mol.l⁻¹ nebo 5,2 fmol. Metoda je použitelná pro stanovení DF v moči [66].

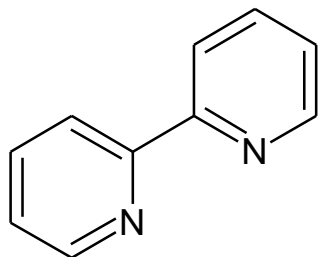
- M. R. Borenstein a kolektiv validovali kapilární GC-MS metodu pro stanovení DF v lidské plazmě s využitím heptanu jako extrakčního činidla a přítomností deproteinačního agens (aceton). K dělení byla použita kolona H-1 (12 m × 0,2 mm, 0,33 μm film, Hewlett-Packard) a helium jako nosný plyn (průtok 0,92 ml/min). Píky DF a vnitřního standardu 4'-methoxydiklofenaku byly detekovány hmotnostním spektrofotometrem s iontově selektivním monitorovacím režimem (urychlovací napětí 3,5 kV, elektron-ionizační energie 70 eV). Lineární rozsah metody je 5-2000 ng/ml, detekční limit 0,2 ng/ml. Metoda je použitelná pro farmakokinetické studie nebo pro studie lékových interakcí [67].
- Z. Kormosh, I. Hunka a Y. Bazel popsali potenciometrické stanovení DF membránovou elektrodou tvořenou asociátem iontu diklofenaku s barvivem Safranin T. Metoda je použitelná v rozsahu $5 \cdot 10^{-5}$ - $5 \cdot 10^{-2}$ mol.l⁻¹ při pH 6-12 s detekčním limitem $3,2 \cdot 10^{-5}$ mol.l⁻¹. Elektroda je snadno připravitelná, je použitelná po dobu 3,5 měsíce a vykazuje dobrou selektivitu pro DF v přítomnosti různých látek. Tato technika je použitelná pro stanovení ve farmaceutických preparátech metodou standardního přídatku [68].



Obr. 5: Barvivo Safranin T [67]

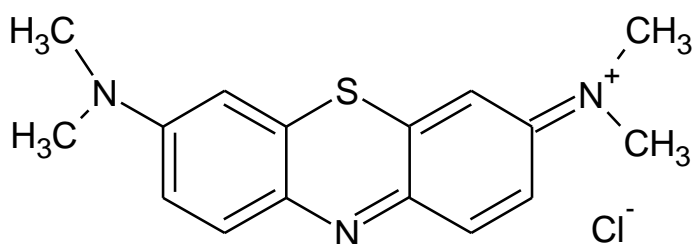
- P. C. Damiani a kolektiv vyvinuli rychlé, selektivní, citlivé spektrofotometrické stanovení DF v mastech a tabletách. Excitace probíhá při 287 nm kyselinou chlorovodíkovou (0,01M), emitované záření je detekováno při 362 nm. Lineární rozsah metody je 0,2-5,0 mg.l⁻¹. Metoda byla ozkoušena na mnohých farmaceutických preparátech a bylo zjištěno, že excipienty nebo jiné látky obsažené v těchto přípravcích nemají na stanovení vliv [69].
- Y. K. Agrawal a K. Shivramchandra popsali dvě spektrofotometrické metody pro stanovení DF. První metoda využívá skutečnosti, že DF ve vodném roztoku redukuje ionty Fe³⁺ na Fe²⁺. Železnaté ionty pak tvoří komplex s 2,2'-bipyridinem s maximem

absorbance při 520 nm (rozsah 10-80 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$). Tato metoda je vhodná pro stanovení DF v tabletách.



Obr. 6: 2,2'-bipyridin [70]

Druhá metoda je založena na úpravě DF methylenovou modří v přítomnosti fosforečnanového pufru (pH 6,8) a extrakci chloroformem. Komplex vykazuje maximum absorbance při 640 nm. Absorbanční křivka vykazuje linearitu v rozsahu 5-40 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. Tato metoda je použitelná i v případě, že tablety obsahují kromě DF i paracetamol [71].



Obr. 7: Methylenová modř [72]

- Citlivou metodu pro stanovení DF v séru vysokoúčinnou chromatografií na tenké vrstvě vyvinuli L. G. Lala a kolektiv. Diklofenak byl z biologických vzorků extrahován ethylacetátem. Separace probíhala na deskách Silica gel 60F₂₅₄ (Merck) s mobilní fází ve složení toluen – aceton – ledová kyselina octová (80:30:1, v/v/v). Densitometrické stanovení DF probíhalo při 280 nm [73].

4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 Použitý chromatografický materiál, přístroje, chemikálie, pomůcky

4.1.1 Vzorke léčivých přípravků

Veral[®] 25mg tablety, šarže 2021209, 2010311, Herbacos-Bofarma s.r.o, Pardubice

4.1.2 Chemikálie

Diclofenak sodný, šarže 086K1407, Sigma-Aldrich, Německo

1-(2,6-dichlorfenyl)indolin-2-on, šarže PIND/00058/001, Amoli Organics Ltd, Indie

Kyselina fosforečná 85% p.a., šarže K35531273/602, Merck, Německo

Methanol 99,9%, šarže S2BB218SV, Sigma-Aldrich, Německo

Methylester kyseliny p-aminobenzoové, šarže 1166641 33705170, Sigma-Aldrich, Německo

Propylester kyseliny p-aminobenzoové, šarže 1134999 33505086 Sigma-Aldrich, Německo

Pufr TLP 4, šarže 108800, Fisher Scientific, USA

Pufr TLP 7, šarže 108802, Fisher Scientific, USA

Ultračistá voda (čištěná systémem Milli-Q RG, Millipore, USA)

4.1.3 HPLC sestava a kolona

HPLC sestava LC2010 C Shimadzu s vestavěným UV detektorem, Kyoto, Japonsko

Chromatografický software Class VP, Verze 6.13., Kyoto, Japonsko

Chromatografická kolona Chromolith[®] Performance RP-18e, 100×3 mm, Merck, Německo

4.1.4 Přístroje

Analytické váhy 2004 MP, Sartorius, Německo

Analytické váhy ME-5OCE, Sartorius, Německo

Centrifuga EBA 21, Hettich Zentrifugen, Německo

Filtrační zařízení pro filtraci mobilní fáze, Millipore, USA

Filtrační zařízení pro přípravu ultračisté vody Milli-Q RG, Millipore, USA

Magnetická míchačka Color squid, Ika Werke, Německo

pH metr pH 212 Microprocessor pH Meter, Hanna Instruments, Německo

Ultrazvuková lázeň Sonorex Digitec, Bandelin, Německo

4.1.5 Pomůcky

Centrifugační zkumavky plastové

Filtrační papíry Glass Microfibre filters, Whatman, Německo

Injekční stříkačky Norn-ject 2ml (3ml), Henke-Sass Wolf, Německo

Kádinky

Nálevky skleněné

Odměrné baňky

Odměrné válce

Pipetovací balonek

Pipety

Pipety Pasteur nesterilní

Plastová lžička

Stříkačkové membránové filtry o velikosti pórů 0,45 μm , Biotech, ČR

Váženka

Zátky plastové

4.2 Zpracování vzorku

Zvážením 20 tablet přípravku Veral 25 mg byla zjištěna průměrná hmotnost jedné tablety.

Tablety byly rozdrceny v třence a důkladně homogenizovány. Do centrifugační zkumavky bylo odváženo množství vzorku odpovídající jedné tabletě, přidáno 20,00 ml roztoku vnitřního standardu flurbiprofenu (IS) o koncentraci 1 mg/ 100 ml a degradačního produktu DPI o koncentraci 0,5 mg/ 100 ml (vzhledem k tomu, že se pracovalo s čerstvými roztoky, bylo nutno degradační produkt přidávat) a tato směs byla umístěna na dobu 10 minut do ultrazvukové lázně. Poté byla směs centrifugována po dobu 15 minut při rychlosti 6000 otáček za minutu.

Takto připravený vzorek byl použit pro měření přesnosti.

4.3 Příprava roztoků

4.3.1 Příprava standardního roztoku

Pro testování míry vlivu proměnných experimentálních podmínek, testování účinnosti chromatografického systému a stability byl připraven roztok obsahující DF o koncentraci 25 mg/ 100 ml, degradační produkt DPI o koncentraci 0,5 mg/ 100 ml a IS o koncentraci 1 mg/100 ml.

4.3.2 Příprava roztoků pro měření přesnosti

Pro stanovení přesnosti se pracovalo s roztoky vzorku tablet Veral podle kapitoly 4.2 Zpracování vzorku. Bylo vytvořeno 6 roztoků vzorků a každý z nich byl proměřen 3x.

4.3.3 Příprava roztoků pro měření linearitu

Byly připraveny pracovní roztoky DF o koncentraci 100 mg/ 100 ml, DPI o koncentraci 5 mg/ 100 ml a vnitřního standardu flurbiprofenu o koncentraci 20 mg/ 100 ml.

Zásobní roztok DF o koncentraci 100 mg/ 100 ml byl připraven navážením 200 mg DF do odměrné baňky objemu 200 ml a doplněním methanolem po rysku.

Zásobní roztok DPI o koncentraci 5 mg/ 100 ml byl připraven navážením 2,5 mg DPI do odměrné baňky objemu 50 ml a doplněním methanolem po rysku.

Zásobní roztok IS o koncentraci 20 mg/ 100 ml byl připraven navážením 10 mg flurbiprofenu do odměrné baňky objemu 50 ml a doplněním methanolem po rysku.

Pomocí zásobních roztoků bylo připraveno 6 pracovních roztoků pro měření linearitu podle následující tabulky:

DF		DPI		IS	
c (mg/100ml)	zás.Θ (ml)	c (mg/100ml)	zás.Θ (ml)	c (mg/100ml)	zás.Θ (ml)
10	10	0,05	1	1	5
15	15	0,1	2	1	5
20	20	0,15	3	1	5
25	25	0,2	4	1	5
30	30	0,25	5	1	5
35	35	0,5	10	1	5

Tab. 3: Koncentrace a příprava jednotlivých pracovních roztoků pro měření linearitu

Obsah každé baňky byl doplněn po rysku a promíchán. Každý vzorek byl proměřen 3x.

4.3.4 Příprava roztoků pro měření správnosti

Pro hodnocení správnosti byla vybrána metoda standardního přídatku. Pracovalo se šesti roztoky, připravenými dle kapitoly 4.2 Zpracování vzorku, ke kterým bylo přidáno známé množství DF – 25 mg. Každý vzorek byl proměřen 3x.

4.3.5 Příprava roztoků pro měření detekčního a kvantitativního limitu

Pro vyhodnocení limitů byly využity dva roztoky standardů (vždy s obsahem DF o koncentraci 25 mg/100 ml a IS o koncentraci 1 mg/100 ml), jeden bez DPI a druhý s přídatkem DPI v koncentraci 0,5 mg/100 ml.

4.4 Příprava mobilní fáze

Pro validaci metody byla použita mobilní fáze ve složení methanol - roztok kyseliny fosforečné pH 2,5 v poměru 65:35.

Roztok kyseliny fosforečné byl připravován z ultračisté vody přidáním kyseliny fosforečné na pH 2,5, přefiltrován filtračním zařízením pro přípravu mobilní fáze Milipore a následně smíchán s methanolem v daném poměru.

5 VÝSLEDKY A DISKUZE

5.1 Optimalizace chromatografických podmínek

Jedna tableta přípravku Veral obsahovala deklarované množství 25 mg diklofenaku sodného. Pro stanovení této látky v tabletách byly hledány vhodné chromatografické podmínky optimalizací již vyvinuté metody.

Základem byla metoda pro stanovení diklofenaku sodného, jeho degradačního produktu a konzervačních přísad v topickém emulgelu kapalinovou chromatografií na obrácených fázích [5]. Tablety neobsahují parabeny jako konzervační látky, jejich stanovením se tato práce nezabývá. Cílem bylo tuto metodu optimalizovat tak, aby byla použitelná pro stanovení DF a DPI ve formě perorálních potahovaných tablet a aby se pokud možno zkrátila doba analýzy.

5.1.1 Výběr stacionární fáze

Pro analýzu byla vybrána monolitická kolona Chromolith® Performance RP-18e (100×3 mm) firmy Merck.

5.1.2 Výběr mobilní fáze

Jako mobilní fáze byla vybrána kombinace methanolu a vodného roztoku kyseliny fosforečné. Byly testovány tyto kombinace objemových poměrů a pH:

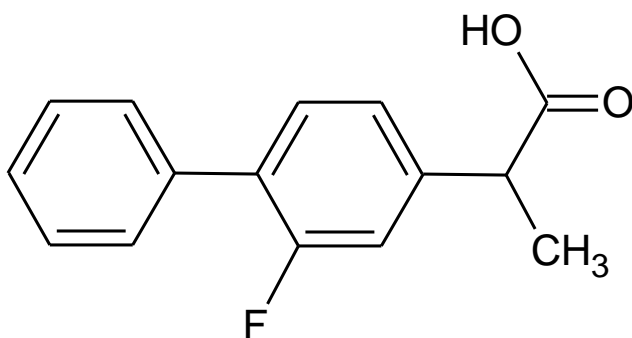
MF	MeOH	vod.Ø H ₃ PO ₄	pH
1	70	30	2,5
2	65	35	2,5
3	65	35	3
4	65	35	3,5
5	60	40	2,5
6	60	40	3
7	60	40	3,5
8	55	45	2,5
9	55	45	3
10	55	45	3,5

Tab. 4: Objemové poměry složení mobilní fáze a hodnota pH vodné složky

Všechny tyto kombinace (kromě MF 1, která se hned při prvním měření neosvědčila) byly testovány při průtocích 0,5 až 1,2 ml/min.

5.1.3 Výběr standardu

Pro stanovení byla zvolena metoda vnitřního standardu. V prezentovaných metodách stanovení DF byly jako vnitřní standardy (IS) užity flurbiprofen, [49], [53], indometacin [45], kyselina N-fenylanthranilová [46], [48], naproxen sodný [51], harmol [52], dibromfenak [55] a ibuprofen [56]. Pro tuto práci byl vybrán flurbiprofen, který byl použit i v metodě pro současné stanovení diklofenaku a 1-(2,6-dichlorfenyl)indolin-2-onu [5].



Obr. 8: Strukturní vzorec flurbiprofenu

5.1.4 Výběr vlnové délky pro detekci

Pro detekci byla určena vlnová délka 254 nm, předepsaná v aktuálním lékopise pro stanovení příbuzných látek [30] a užitá ve výchozí metodě [5].

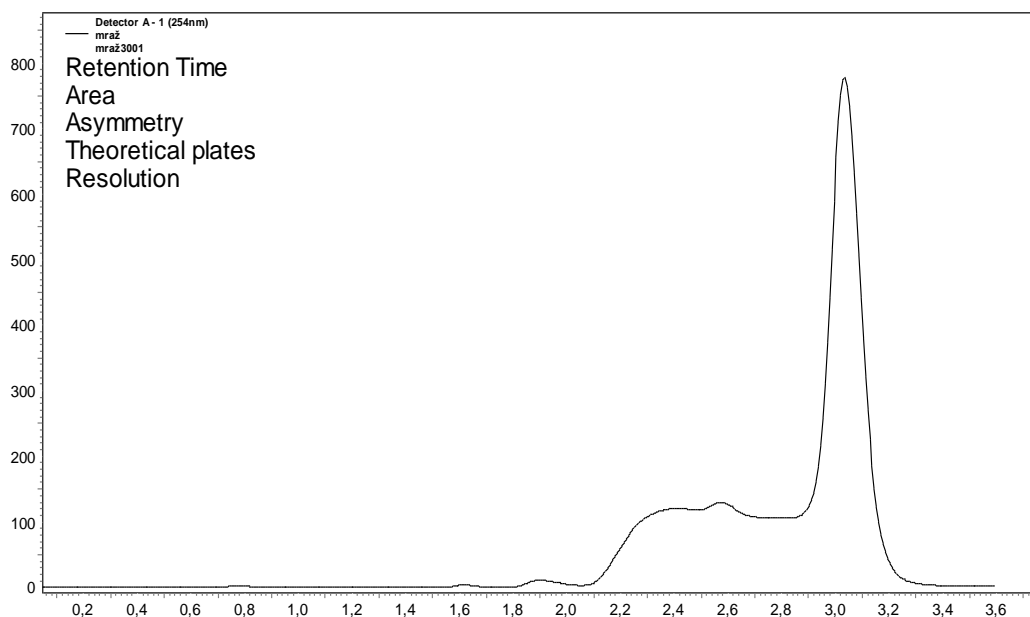
5.2 Chromatografické podmínky

Na základě testu vhodnosti chromatografického systému byly pro stanovení diklofenaku sodného a jeho degradačního produktu v tabletách (obsah DF 25 mg) vybrány tyto chromatografické podmínky: monolitická kolona Chromolith® Performance RP-18e (100 mm × 3 mm, Merck), mobilní fáze tvořená směsí methanolu a vodného roztoku kyseliny fosforečné o pH 3 v objemovém poměru 65:35 s průtokem rychlostí 1 ml/ min, vnitřní standard flurbiprofen, detekce UV detektorem při 254 nm. Vzorky byly dávkovány na kolonu v objemu 5 μ l.

Při optimalizaci pH byly porovnávány hodnoty pH 2,5 a 3,0. Výsledky u těchto měření byly velmi podobné, ale vzhledem k šetrnosti k životnímu prostředí a chromatografickému systému bylo vybráno méně kyselé pH.

Stanovení při pH 3,0 se však v průběhu validace ukázalo jako nemožné, vzhledem k tomu, že některá z pomocných látek obsažená v tabletovině destruuje pík IS a DF a znemožňuje tak stanovení. Byly učiněny pokusy o eliminaci tohoto nežádoucího vlivu – rozpouštění vzorku v mobilní fázi, filtrace vzorku, odstranění obalového filmu tablet, zmražení vzorku, proměření

bez přidavku flurbiprofenu (vyloučení interference vnitřního standardu s některou z balastních látek), úprava poměru složek mobilní fáze, změna průtoku, ale žádný z těchto pokusů (ani jejich kombinace) nevedl k úspěchu.



Obr. 9: Chromatogram vzorku rozpuštěného v mobilní fázi ve složení methanol – vodný roztok kyseliny fosforečné o pH 3 v poměru 65:35, po filtraci a následném zražení.

Proto byly podmínky analýzy upraveny: monolitická kolona Chromolith® Performance RP-18e (100 mm × 3 mm, Merck), mobilní fáze tvořená směsí methanolu a vodného roztoku kyseliny fosforečné o pH 2,5 v objemovém poměru 65:35 s průtokovou rychlostí 1 ml/ min, vnitřní standard flurbiprofen, detekce UV detektorem při 254 nm. Vzorky byly dávkovány na kolonu v objemu 5µl.

5.3 Test vhodnosti chromatografického systému

Pro následující měření byl použit standardní roztok připravený dle kapitoly 4.3.1 Příprava standardního roztoku. K vyhodnocení dle vzorců uvedených v kapitole 3.4.1 Test způsobilosti chromatografického systému byl použit software Class VP. Byly užity průměrné hodnoty ze 3 měření.

5.3.1 Počet teoretických pater

látka	N
DPI	1773
DF	2975

Tab. 5: Počty teoretických pater pro DPI a DF

Požadavek: $N > 1500$

VYHOVUJE

5.3.2 Faktor symetrie píku

látka	A_s
DPI	1,18
DF	1,25

Tab. 6: faktory symetrie pro DPI a DF

Požadavek: $T = 0.8-1,5$ [30]

VYHOVUJE

5.3.3 Rozlišení

látka	$R_{1,2}$
DPI - IS	3,75
IS-DF	2,78

Tab. 7: hodnoty rozlišení pro píky DPI a DF

Požadavek: $R_{1,2} > 1,5$ [30]

VYHOVUJE

5.3.4 Opakovatelnost

Byl opakovaně dávkován roztok analyzované látky v methanolu o koncentraci DPI 0,549 mg/100ml, DF 25,016 mg/100ml.

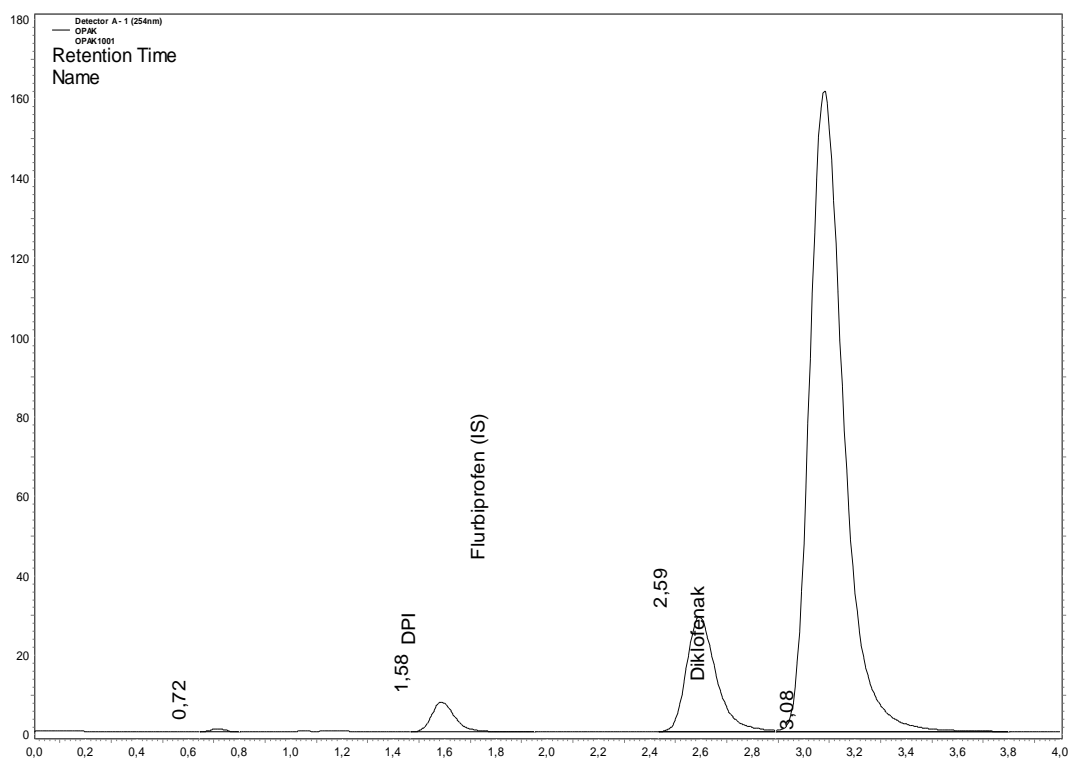
vzorek	DPI		DF	
	t _R	A	t _R	A
1	1,59	47754	3,08	1484191
2	1,58	48170	3,06	1482033
3	1,58	47859	3,07	1480600
4	1,58	48515	3,07	1483932
5	1,58	48503	3,08	1480658
6	1,58	48431	3,08	1482556

Tab. 8: Zprůměrované hodnoty každého vzorku pro měření opakovatelnosti

průměr	1,5817	48205	3,0733	1482328
SD	0,0041	334,76	0,0081	1546,44
RSD _%	0,26	0,70	0,27	0,10

Požadavek: RSD_% < 1% [74]

VYHOVUJE



Obr. 10: Chromatogram standardů: degradační produkt 1-(2,6-dichlorophenyl)indolin-2-on, vnitřní standard flurbiprofen a diklofenak sodný

5.4 Validace metody

5.4.1 Přesnost

Pro stanovení přesnosti metody bylo nezávislým postupem připraveno 6 roztoků vzorků tablet Veral (s přidavkem degradačního produktu DPI) dle kapitoly 4.3.2 Příprava roztoků pro měření přesnosti. Každý vzorek byl proměřen 3x a byly porovnávány poměry ploch píků DF/IS a DPI/IS, přepočtené na jednu tabletu, vypočtena směrodatná odchylka a relativní směrodatná odchylka.

vzorek	A_{DPI}/A_{IS}	A_{DF}/A_{IS}
1	0,2148	32,4325
2	0,2204	32,4617
3	0,2205	32,3646
4	0,2169	32,6134
5	0,2165	32,1688
6	0,2175	32,3401

Tab. 9: Průměrné hodnoty poměrů ploch píků pro každý vzorek

průměr 0,2178 32,3969

SD 0,0021 0,1474

RSD% 0,96 0,46

Požadavek: RSD% < 5 %

VYHOVUJE

5.4.2 Linearita

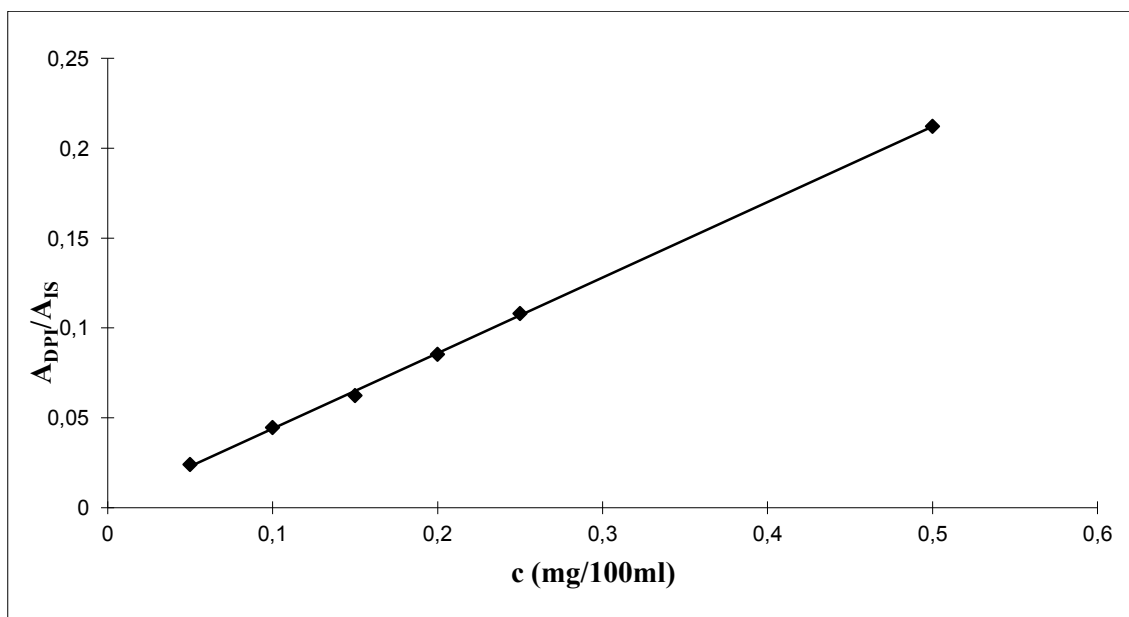
Linearita byla stanovena metodou vnitřního standardu. Bylo proměřeno 6 roztoků s odstupňovanou koncentrací DF a jeho degradačního produktu DPI a s konstantní koncentrací IS (příprava těchto roztoků viz. kapitola 4.3.3 Příprava roztoků pro měření linearitu). Každý roztok byl měřen 3x a výsledné poměry ploch píků látek a vnitřního standardu byly zprůměrovány.

Po chromatografickém vyhodnocení byly sestaveny kalibrační křivky - grafy závislosti poměrů ploch DF (resp. DPI) a IS ke koncentraci DF (resp. DPI) a byly vyhodnoceny metodou lineární regrese.

5.4.2.1 Hodnocení linearity pro stanovení DPI

vzorek	c (mg/100ml)	A_{DPI}/A_{IS}
1	0,05	0,0241
2	0,1	0,0446
3	0,15	0,0624
4	0,2	0,0854
5	0,25	0,1081
6	0,5	0,2122

Tab. 10: Hodnoty pro vytvoření kalibrační křivky degradačního produktu DPI



Obr. 11: Kalibrační křivka degradačního produktu DPI

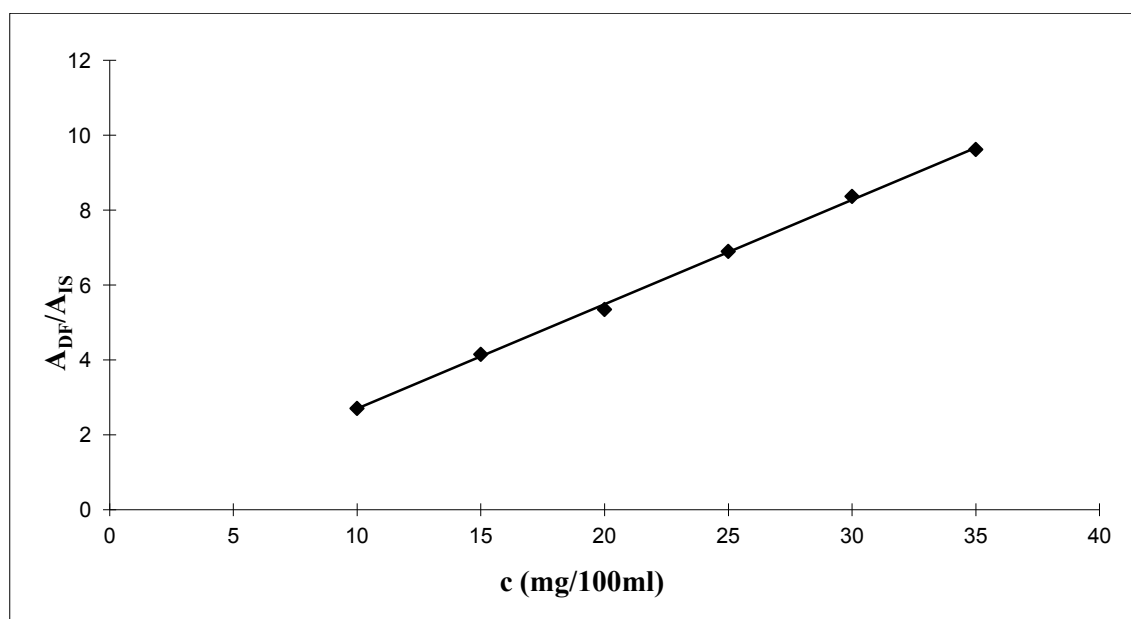
Regresní funkce : $y = kx + q$				
počet bodů: n = 6	počet stupňů volnosti: v = 4			
Parametry regresní přímky a odhady jejich směrodatných odchylek				
směrnice	k =	0,4202	±	0,0044
absolutní člen	q =	0,0019	±	0,0011
koeficient korelace	R =	0,99978		
reziduální odchylka	$S_{rez} =$	0,00156		
hodnota F-statistiky	F =	9,23E+03		
Závislost y na x byla prokázána se spolehlivostí				99.9 % .

Tab. 11: Parametry kalibrační křivky DPI získané metodou lineární regrese

5.4.2.2 Hodnocení linearity pro stanovení DF

vzorek	c (mg/100ml)	A_{DF}/A_{IS}
1	10	2,70637
2	15	4,1507
3	20	5,3490
4	25	6,9001
5	30	8,3683
6	35	9,6221

Tab. 12: Hodnoty pro vytvoření kalibrační křivky DF



Obr. 12: Kalibrační křivka DF

Regresní funkce : $y = kx + q$				
počet bodů: n = 6	počet stupňů volnosti: v = 4			
Parametry regresní přímky a odhady jejich směrodatných odchylek				
směrnice	k =	0,2788	±	0,0044
absolutní člen	q =	-0,09	±	0,11
koeficient korelace	R =	0,99951		
reziduální odchylka	$s_{rez} =$	0,0918		
hodnota F-statistiky	F =	4,04E+03		
Závislost y na x byla prokázána se spolehlivostí				99.9 % .

Tabulka 13: Parametry kalibrační křivky DF získané metodou lineární regrese (odkázat na program?)

Požadavek: korelační koeficient $R > 0,999$

VYHOVUJE

5.4.3 Správnost

Pro hodnocení správnosti byla vybrána metoda standardního přídatku. Pracovalo se se šesti vzorky připravenými dle kap. 4.3.4 Příprava roztoků pro měření správnosti. Každý vzorek byl 3x proměřen. Výtěžnost byla počítána ze vztahu:

$$R_i = \frac{x_i - x_v}{x_0}$$

x_imnožství diklofenaku sodného zjištěného ve vzorku po přidavku standardu diklofenaku (mg)

x_0 množství diklofenaku sodného přidaného ke vzorku

x_vmnožství diklofenaku sodného ve vzorku zjištěného při analýze bez přidavku standardu

vzorek	x_i	x_0	x_v	R_i
1	50,66741	25,005	25,21971	101,77
2	50,70366	25,005	25,39488	101,21
3	51,90909	25,005	25,21002	102,78
4	51,00361	25,005	25,39094	102,43
5	50,25718	25,005	25,12501	100,51
6	50,77262	25,005	25,07195	102,78

Tab. 14: Hodnoty pro výpočet výtěžnosti DF

průměr 101,91

SD 0,92

RSD% 0,90

Požadavek: R_i v intervalu $100 \pm 3\%$

$RSD (\%) \leq 5\%$

VYHOVUJE

Správnost pro stanovení degradačního produktu DPI nebyla v rámci této diplomové práce stanovována.

5.4.4 Robustnost

V rámci robustnosti byla testována stabilita a vliv vlastností mobilní fáze (složení, pH vodné složky a rychlost průtoku) na plochu chromatografického píku a retenční čas. Pro měření byly použity roztoky připravené podle postupu uvedeného v kapitole 4.3.1 Příprava standardního roztoku.

5.4.4.1 Vliv složení mobilní fáze

Vliv složení mobilní fáze na plochu chromatografického píku byl testován při pH 2,5 a byly použity směsi methanolu a roztoku kyseliny fosforečné v poměrech 55:45, 60:40, 65:35 a 70:30.

Vliv složení mobilní fáze na plochu píku

Složení MF MeOH:OH ₃ PO ₄	DPI		DF	
	A _i	A _R (%)	A _i	A _R (%)
55:45	31726	79,44	1444939	96,29
60:40	37869	94,83	1505820	100,35
65:35	39936	100,00	1500607	100,00
70:30	49030	122,77	1478789	98,55

Tab. 15: Vliv složení mobilní fáze na plochy píků DPI a DF

A_iplocha píku

A_Rrelativní plocha $A_R = 100 \frac{A_i}{A_{65:35}}$

Vliv složení mobilní fáze na retenční čas

Složení MF MeOH:OH ₃ PO ₄	DPI	DF
	t _R (min)	t _R (min)
55:45	2,77	8,54
60:40	2,24	5,43
65:35	1,60	3,19
70:30	1,24	2,02

Tab. 16: Vliv složení mobilní fáze na retenční časy DPI a DF

Vyšší obsah methanolu v mobilní fázi má pozitivní vliv na retenční čas, při poměru 70: 30 však nedochází k úplnému oddělení píků IS a DF.

5.4.4.2 Vliv pH vodné složky mobilní fáze

Vliv pH vodné složky mobilní fáze na plochu píku

pH	DPI		DF	
	A _i	A _R (%)	A _i	A _R (%)
2,5	39936	100,00	1500607	100,00
3,0	40029	100,23	1539844	102,61
3,5	38640	96,75	1534677	102,27

Tab. 17: Vliv pH mobilní fáze na plochy píků DPI a DF

Píky dosahují největších ploch při pH 3,0.

Vliv pH vodné složky mobilní fáze na retenční čas

pH	DPI	DF
	t _R (min)	t _R (min)
2,5	1,60	3,19
3	1,53	3,07
3,5	1,43	2,72

Tab. 18: Vliv pH mobilní fáze na retenční časy DPI a DF

Vyšší hodnota pH mobilní fáze má pozitivní vliv na rychlost analýzy. Z důvodu interference balastních látek v tabletách však není možné při pH 3,0 nebo 3,5 pracovat.

5.4.4.3 Vliv rychlosti průtoku mobilní fáze

Vliv rychlosti průtoku mobilní fáze na plochu píku

Průtok (ml/min)	DPI		DF	
	A _i	A _R (%)	A _i	A _R (%)
1,2	36127	90,46	1253876	83,56
1,1	39803	99,67	1362380	90,79
1	39936	100,00	1500607	100,00
0,9	46613	116,72	1680353	111,98
0,7	57557	144,12	2129327	141,90
0,5	80179	200,77	2929824	195,24

Tab. 19: Vliv rychlosti průtoku mobilní fáze na plochu píku

Čím je rychlost průtoku mobilní fáze nižší, tím větší je plocha píku.

Vliv rychlosti průtoku mobilní fáze na retenční čas

Průtok (ml/min)	DPI	DF
	t _R (min)	t _R (min)
1,2	1,36	2,71
1,1	1,48	2,96
1	1,60	3,19
0,9	1,78	3,63
0,7	2,31	4,74
0,5	3,20	6,60

Tab. 20: Vliv rychlosti průtoku mobilní fáze na retenční časy DPI a DF

Čím je rychlost průtoku vyšší, tím kratší je retenční čas. Při vyšších průtocích však nemusí dojít k úplnému oddělení píků DF a IS.

5.4.4.4 Stabilita

Byla testována stabilita roztoku standardu o koncentraci DPI 0,34 mg/100ml a DF 50,31 mg/100ml za uchovávání:

- 1) za snížené teploty (4°C) chráněn před světlem
- 2) za laboratorní teploty a přístupu světla

Každý roztok byl 3x měřen v čas přípravy, po 24, 48 a 72 hodinách.

DPI				
t (hod)	A (4°C)	S _T (%)	A (lab.t)	S _T (%)
0	16953	0,00	17590	0,00
24	16643	1,83	17167	2,40
48	16434	3,07	17920	1,88
72	16425	3,12	20958	19,15

Tab. 21: Stabilita DPI ve standardním roztoku v závislosti na době a způsobu uchovávání

DF				
t (hod)	A (4°C)	S _T (%)	A (lab.t)	S _T (%)
0	1478978	0,00	1476014	0,00
24	1472965	0,41	1474542	0,10
48	1481479	0,17	1468787	0,49
72	1487380	0,57	1475783	0,02

Tab. 22: Stabilita DF ve standardním roztoku v závislosti na době a způsobu uchovávání

A_i plocha píku v příslušném čase

A_0 plocha píku v čase $t = 0$ hod

Faktor stability S_T (%) byl vypočten ze vzorce:

$$S_T(\%) = 100 \frac{|A_i - A_0|}{A_0}$$

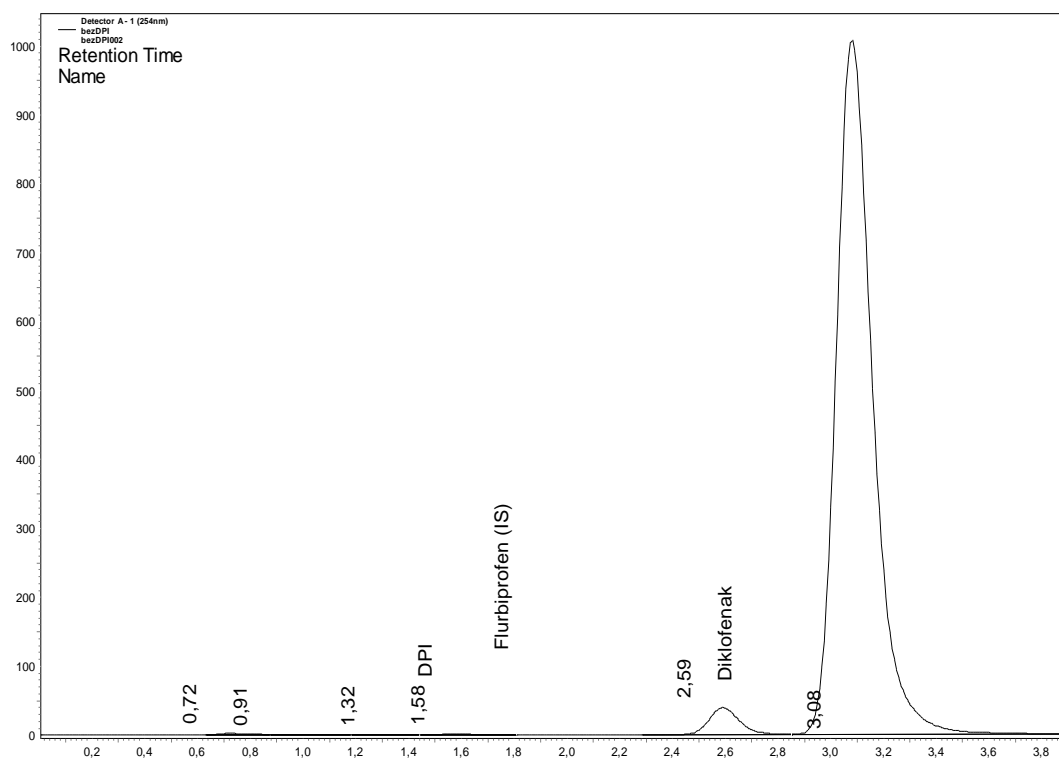
Požadavek: $S_T < 1\%$ [76]

Požadavek je splněn pro diklofenak sodný při skladování po 72 hodinách při 4°C i laboratorní teplotě, pro degradační produkt 1-(2,6-dichlorfenyl)indolin-2-on nikoli. Standardní roztok degradačního produktu je třeba připravovat vždy čerstvý

5.4.5 Detekční a kvantitativní limit

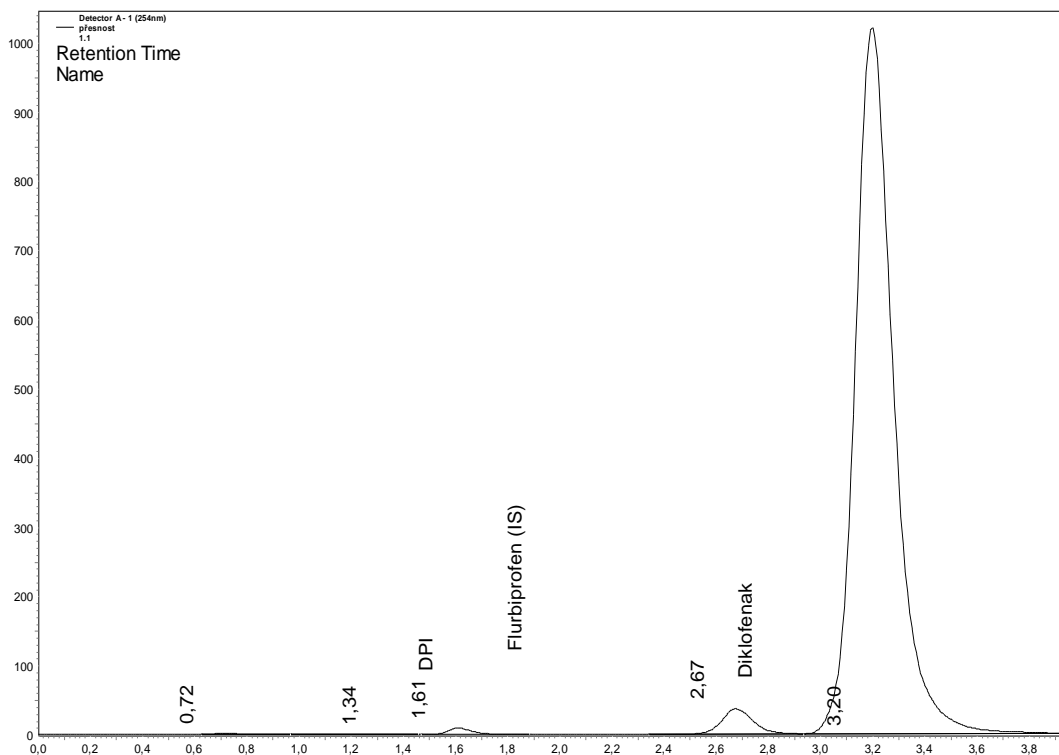
Pro stanovení detekčního a kvantitativního limitu byl změřen vzorek bez přídavku DPI a ze záznamu šumu v okolí retenčního času stanovované nečistoty byla změřena nejvyšší kladná (r^+) a záporná (r^-) amplituda šumu, z tohoto rozpětí šumu odhadnuta jeho směrodatná odchylka:

$$SD = \frac{(r^+ - r^-)}{5}$$



Obr. 13: Chromatogram vzorku bez přidání degradačního produktu DPI

Poté byl změřen vzorek s přídavkem degradačního produktu DPI ($c = 0,5092$ mg/100ml).



Obr. 14: Chromatogram vzorku po přidání degradačního produktu DPI

Detekční limit byl vypočten ze vzorce:

$$LOD = 3 \frac{SD \cdot K}{b_1}$$

Výpočet kvantitativního limitu:

$$LOQ = 10 \frac{SD \cdot K}{b_1}$$

K.....plocha píku/výška píku

b₁ plocha píku/koncentrace analytu

Pro výpočet byly využity průměrné hodnoty z 6 měření.

DPI		LOD (ml.l ⁻¹)	LOQ (ml.l ⁻¹)
SD	0,172	0,0029	0,0095
K	6929,148		
b₁	1248073		

Tab. 23: Detekční a kvantitativní limit pro stanovení degradačního produktu 1-(2,6-dichlorfenyl)-2-indolinu

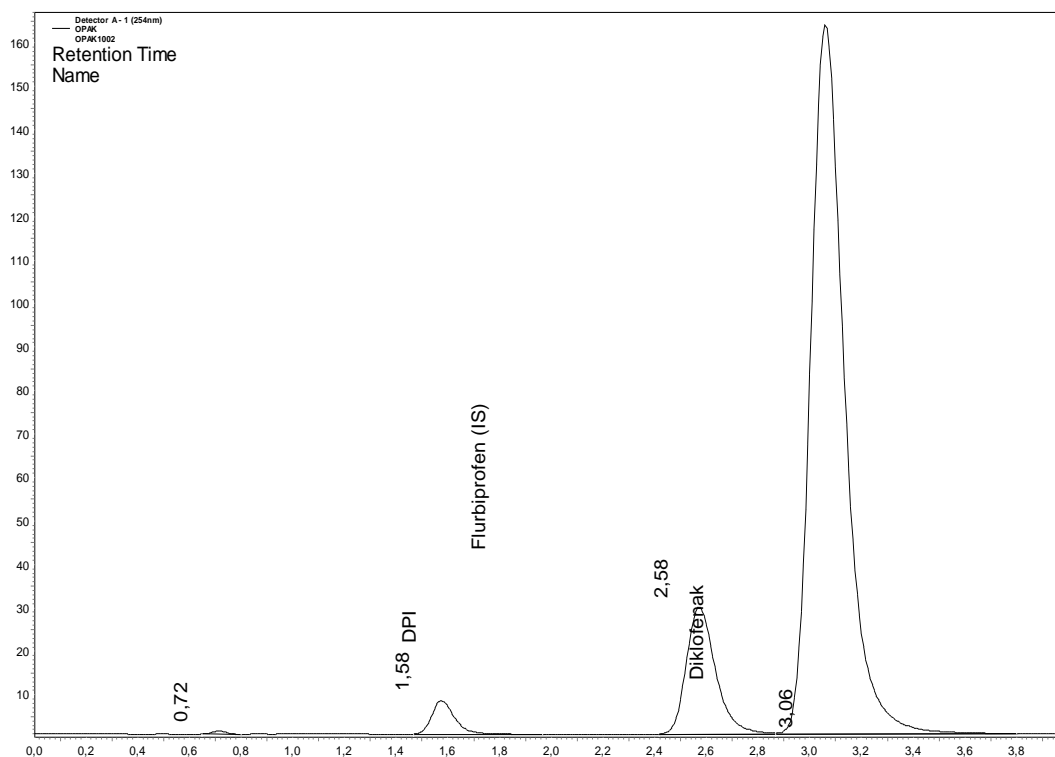
Nejnižší detekovatelná koncentrace degradačního produktu DPI za použití této HPLC metody je $0,0028 \text{ mg.l}^{-1}$, kvantitativním limitem je koncentrace $0,0095 \text{ mg.l}^{-1}$.

5.4.6 Selektivita

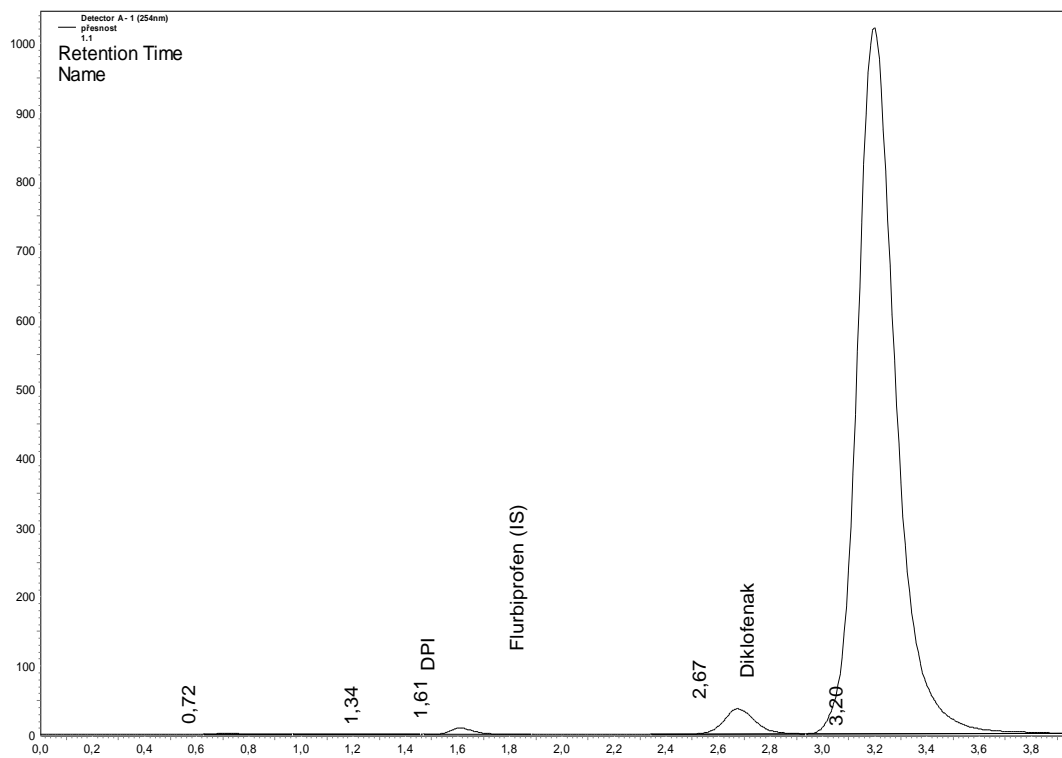
První chromatogram (obr. 15) dokumentuje analýzu standardního roztoku DF (25 mg/100 ml), DPI (0,5 mg/100 ml) a IS flurbiprofenu (1 mg/100 ml).

Druhý chromatogram (obr. 16) zobrazuje analýzu vzorku přípravku Veral 25 mg tablety s přídavkem DPI (0,5 mg/100 ml) a IS (1 mg/100 ml).

Z uvedených chromatogramů je patrné, že metoda je schopna selektivně stanovit diklofenak sodný v tabletách.



Obr. 15: Chromatogram standardního roztoku DF (25 mg/100 ml), DPI (0,5 mg/100 ml) s přídavkem IS (1 mg/100 ml).



Obr. 16: Chromatogram vzorku přípravku Veral 25 mg tablety s přidavkem DPI (0,5 mg/100 ml) a IS (1 mg/100 ml).

6 ZÁVĚR

Cílem diplomové práce byla optimalizace a validace HPLC metody pro stanovení diklofenaku sodného a jeho degradačního produktu 1-(2,6-dichlorfenyl)indolin-2-onu v tabletách.

Základem této práce byla metoda stanovení diklofenaku sodného (DF), jeho degradačního produktu (DPI) a konzervačních látek v topickém emulgelu [5]. Její podmínky byly upravovány a optimalizovány tak, aby byla metoda použitelná pro stanovení v tabletách.

Jako vnitřní standard byl ponechán flurbiprofen a byla zvolena monolitická kolona Chromolith[®] Performance RP-18e (100×3 mm) firmy Merck. Jako mobilní fáze se nejvíce osvědčila směs methanolu a vodného roztoku kyseliny fosforečné o pH 3 (65:35 v/v) s průtokovou rychlostí 1 ml/min, během validace však bylo zjištěno, že pomocné látky obsažené v tabletovině znemožňují stanovení a pH muselo být upraveno na 2,5. Detekce analyzovaných látek byla realizována UV detektorem při vlnové délce 254 nm.

Byla testována účinnost chromatografického systému a metoda byla validována. Dle výsledků validace lze usuzovat, že metoda poskytuje přesné a správné výsledky a je vhodná pro stanovení diklofenaku sodného a jeho degradačního produktu v přípravku Veral tablety

7 ZDROJE

- [1] JAMPÍLEK, J., R. OPATŘILOVÁ a I. LIŠKA. *Návody do cvičení z analytické chemie: vybrané instrumentální metody*. Vyd. 1. Brno: Veterinární a farmaceutická univerzita, 2007, 74 s. ISBN 978-80-7305-007-8
- [2] JOKL, V., R. KARLÍČEK a D. SVOBODOVÁ. *Stručné základy analytické chemie pro posluchače farmacie II*. 1/1. vyd. Praha: Státní pedagogické nakladatelství, 1988, 154 s.
- [3] HRDINA, R.. *Farmakologický slovník*. 3. vyd. Praha: Maxdorf, 1997, 410 s. ISBN 80-858-0042-X
- [4] LÜLLMANN, H., K. MOHR a M. WEHLING. *Farmakologie a toxikologie: překlad 15., zcela přepracovaného vydání*. Vyd. 2. české. Praha: Grada, 2004, 725 s. ISBN 80-247-0836-1
- [5] HÁJKOVÁ, R., P. SOLICH, M. POSPÍŠILOVÁ a J. ŠÍCHA. Simultaneous determination of methylparaben, propylparaben, sodium diclofenac and its degradation product in a topical emulgel by reversed-phase liquid chromatography. *Analytica Chimica Acta* [online]. 2002, č. 467, s. 91-96 [cit. 2012-02-23]. Dostupné z: ScienceDirect
- [6] KARLÍČEK, R. *Analytická chemie pro farmaceuty*. 3. vyd. Praha: Karolinum, 2007, 281 s. ISBN 978-80-246-1453-3
- [7] CHURÁČEK, J. a P. JANDERA. *Separace látek: kapalinová vysokoúčinná kolonová chromatografie*. Vyd. 1. Praha: Státní nakladatelství technické literatury, 1981, 140 s.
- [8] MIKEŠ, O. Základní typy chromatografie In: MIKEŠ, O. et al. *Laboratorní chromatografické metody*. 1. vyd. Praha: Státní nakladatelství technické literatury, 1980, 673 s.
- [9] KOMERS, R. a M. KREJČÍ. *Plynová chromatografie* In: MIKEŠ, Otakar et al. *Laboratorní chromatografické metody*. 1. vyd. Praha: Státní nakladatelství technické literatury, 1980, 673 s.
- [10] MOTYKA, K. aj. HLAVÁČ. *Stručný přehled separačních metod*. 1. vyd. Olomouc: Univerzita Palackého v Olomouci, 2009, 45 s. ISBN 978-80-244-2304-3
- [11] KLOUDA, P. *Moderní analytické metody*. 2. upr. a dopl. vyd. Ostrava: Pavel Klouda, 2003, 132 s. ISBN 80-863-6907-2
- [12] ŠTULÍK, K. et al. *Analytické separační metody*. 1. vyd. Praha: Univerzita Karlova, nakladatelství Karolinum, 2004, 264 s. ISBN 80-246-0852-9
- [13] Laureáti Nobelovy ceny za chemii: Nobelova cena za chemii - seznam laureátů. BUREŠ, J. *ConVENTER* [online]. 2002 [cit. 2012-02-08].

Dostupné z: <http://www.converter.cz/nobel/chemie.htm>

- [14] PROCHÁZKA, Ž., M. HEJTMÁNEK, K. ŠEBESTA a V. TOMÁŠEK. Papírová chromatografie In: MIKEŠ, Otakar et al. *Laboratorní chromatografické metody*. 1. vyd. Praha: Státní nakladatelství technické literatury, 1980, 673 s.
- [15] KLIMEŠ, J. et al. *Kontrola léčiv I*. 1. vyd. Praha: Karolinum, 2002, 141 s. ISBN 80-246-0419-1
- [16] MOTL, O. a L. NOVOTNÝ. Chromatografie na tenké vrstvě In: MIKEŠ, O. et al. *Laboratorní chromatografické metody*. 1. vyd. Praha: Státní nakladatelství technické literatury, 1980, 673 s
- [17] JANDERA, P. Teorie kolonové kapalinové chromatografie v systémech s obrácenými fázemi In: CHURÁČEK, J. et al. *Nové trendy v teorii a instrumentaci vybraných analytických metod*. 1. vyd. Praha: Academia, 1993, 387 s. ISBN 80-200-0010-0
- [18] JANDERA, P. Pokroky kolon pro HPLC: Současný stav a perspektivy. [online]. [cit. 2012-03-15]. Dostupné z: www.vitamins.cz/archiv/2003/doc/w/HPLC_01.doc
- [19] MOTL, O. a L. NOVOTNÝ. Adsorpční a rozdělovací kolonová chromatografie In: MIKEŠ, O. et al. *Laboratorní chromatografické metody*. 1. vyd. Praha: Státní nakladatelství technické literatury, 1980, 673 s
- [20] MIKEŠ O., J. ŠTABERG , M. HEJTMÁNEK a K. ŠEBESTA. Ionově výměnná chromatografie In: MIKEŠ, O. et al. *Laboratorní chromatografické metody*. 1. vyd. Praha: Státní nakladatelství technické literatury, 1980, 673 s
- [21] TOMÁŠEK, V. Gelová chromatografie In: MIKEŠ, O. et al. *Laboratorní chromatografické metody*. 1. vyd. Praha: Státní nakladatelství technické literatury, 1980, 673 s
- [22] TURKOVÁ, J. Afinitní chromatografie In: MIKEŠ, O. et al. *Laboratorní chromatografické metody*. 1. vyd. Praha: Státní nakladatelství technické literatury, 1980, 673 s
- [23] LOWE, Ch. R. a P. D. DEAN. *Afinitní chromatografie*. 1. vyd. Praha: Státní nakladatelství technické literatury, 1979, 118 s.
- [24] Sorbenty Iontosorb: Afinitní chromatografie. TOKAR, O. IONTOSORB. *IONTOSORB: Bead Cellulose Derivatives* [online]. 1999, 2012-01-01 [cit. 2012-03-04]. Dostupné z: http://www.iontosorb.cz/cz/afi_chro.htm
- [25] CHURÁČEK, J. a P. JANDERA. *Úvod do vysokoučinné kapalinové kolonové chromatografie*. 1. vyd. Praha: Státní nakladatelství technické literatury, 1984, 188 s.
- [26] NOVÁK, J. Principy a teorie chromatografie In: CHURÁČEK, J. et al. *Nové trendy v teorii a instrumentaci vybraných analytických metod*. 1. vyd. Praha: Academia, 1993, 387 s. ISBN 80-200-0010-0

- [27] ŠARŠŮNOVÁ, M. a O. HANČ. *Vysokoučinná kvapalinová chromatografie vo farmácii a biochémií*. 1. vyd. Martin: Osveta, 1985, 390 s.
- [28] JANDERA, P. Pokroky v instrumentaci kapalinové chromatografie In: CHURÁČEK, J. et al. *Nové trendy v teorii a instrumentaci vybraných analytických metod*. 1. vyd. Praha: Academia, 1993, 387 s. ISBN 80-200-0010-0
- [29] MELOUN, B. Automatizace a mechanizace kolonových operací v kapalinové chromatografii In: MIKEŠ, O. et al. *Laboratorní chromatografické metody*. 1. vyd. Praha: Státní nakladatelství technické literatury, 1980, 673 s
- [30] *Český lékopis 2009* [elektronická verze]. 1. vyd. Praha: Grada Publishing, 2009, 3968 s. ISBN 978-802-4729-947
- [31] Monolitické kolony. DOUŠA, M. *HPLC.cz* [online]. 2000, 2010-06-03 [cit. 2012-02-03]. Dostupné z: http://www.hplc.cz/Teorie/monolitic_columns.htm
- [32] ŠVEC, F. Monolitické stacionární fáze pro HPLC. *Chemické listy*. 2004, roč. 98, č. 5, s. 232-238. ISSN 00092770
- [33] KLIMEŠ, J. et al. *Kontrola léčiv II*. 1. vyd. Praha: Univerzita Karlova, nakladatelství Karolinum, 2004, 94 s. ISBN 80-246-0818-9.
- [34] ŠABARTOVÁ, J. Validace analytických metod v kontrole léčiv. *Věstník SÚKL*. 1994, roč. 1, č. 1, s. 6-8
- [35] Validace metod. *EffiChem* [online]. 2011 [cit. 2012-03-05]. Dostupné z: <http://www.ffiichem.cz/produkty/effivalvalidation-3-0/moduly/validace-metod/>
- [36] KATEDRA FARMACEUTICKÉ CHEMIE A KONTROLY LÉČIV. *Chromatografické metody: Veličiny a výpočty*[online]. prezentace MS Powerpoint. [cit. 2012-03-16]. Dostupné z: <http://www.faf.cuni.cz/studium/Materialy/Forms/AllItems.aspx?RootFolder=%2Fstudium%2FMaterialy&View=%7B5162C45A-44AE-4ACC-B2EE-5C61F435F1B9%7D>
- [37] Validační program pro statistické zpracování analytických dat. DOUŠA, M. *HPLC.cz* [online]. 2000, 2011-01-26 [cit. 2012-03-07]. Dostupné z: http://www.hplc.cz/Validace/program_validace.htm
- [38] *SPC Veral tablety*. 16.2.2010. Mikro-verze AISLP. Praha
- [39] KATZUNG, B. G. *Základní a klinická farmakologie*. Vyd. v ČR 2., Praha: H & H, 2006, 1106 s. ISBN 80-7319-056-7
- [40] HYNIE, Sixtus. *Farmakologie v kostce*. Vyd. 2. Praha: Triton, 2001, 520 s. ISBN 80-7254-181-1

- [41] GALMIER, M.-J. et al. Identification of degradation products of diclofenac by electrospray ion trap mass spectrometry. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* [online]. 2005, č. 38, s. 790-796 [cit. 2012-03-07]. Dostupné z: ScienceDirect
- [42] VIGNADUZZO, S. E., P. M. CASTELLANO a T. S. KAUFMAN. Experimentally designed validated HPLC simultaneous determination of pridinol and diclofenac in their combined pharmaceutical formulations, which allows lifting diclofenac related compound A. *Journal of liquid chromatography & related technologies* [online]. 2010, roč. 33, č. 19, s. 1720-1732 [cit. 2012-03-13]. Dostupné z: Web of Science (abstrakt)
- [43] KRZEK, J. a M. STAREK. Densitometric determination of diclofenac, 1-(2,6-dichlorophenyl)indolin-2-one and indolin-2-one in pharmaceutical preparations and model solutions. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* [online]. 2002, č. 28, s. 227-243 [cit. 2012-03-07]. Dostupné z: ScienceDirect
- [44] ROŠKAR, R. a V. KMETEC. Liquid chromatographic determination of diclofenac in human synovial fluid. *Journal of Chromatography B* [online]. 2003, č. 788, s. 57-64 [cit. 2012-03-07]. Dostupné z: ScienceDirect
- [45] MAYER, B. X. et al. Comparison of UV and tandem mass spectrometric detection for the high-performance liquid chromatographic determination of diclofenac in microdialysis samples. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* [online]. 2003, č. 33, s. 745-754 [cit. 2012-03-07]. Dostupné z: ScienceDirect
- [46] KAPHALIA, L. et al. Efficient high performance liquid chromatography/ ultraviolet method for determination of diclofenac and 4'-hydroxydiclofenac in rat serum. *Journal of Chromatography B* [online]. 2006, č. 830, s. 231-237 [cit. 2012-03-07]. Dostupné z: ScienceDirect
- [47] PAYÁN, M. R. et al. HPLC determination of ibuprofen, diclofenac and salicylic acid using hollow fiber-based liquid phase microextraction (HF-LPME). *Analytica Chimica Acta* [online]. 2009, č. 653, s. 184-190 [cit. 2012-03-07]. Dostupné z: ScienceDirect
- [48] KLIMEŠ, J. et al. HPLC evaluation of diclofenac in transdermal therapeutic preparations. *HPLC evaluation of diclofenac in transdermal therapeutic preparations* [online]. 2001, č. 217, s. 153-160 [cit. 2012-03-07]. Dostupné z: ScienceDirect
- [49] GIAGOUDAKIS, G. a S. L. MARKANTONIS. An alternative high-performance liquid-chromatographic method for the determination of diclofenac and flurbiprofen in plasma. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* [online]. 1998, č. 17, s. 897-901 [cit. 2012-03-07]. Dostupné z: ScienceDirect

- [50] GONZÁLEZ, L., G. YULN a M. G. VOLONTÉ. Determination of cyanocobalamin, betamethasone and diclofenac sodium in pharmaceutical formulations by high performance liquid chromatography. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* [online]. 1999, č. 20, s. 487-492 [cit. 2012-03-07]. Dostupné z: ScienceDirect
- [51] NASIR, F. et al. Simultaneous determination of timolol maleate, rosuvastatin calcium and diclofenac sodium in pharmaceuticals and physiological fluids using HPLC-UV. *Journal of Chromatography B* [online]. 2011, č. 879, s. 3434-3443 [cit. 2012-03-07]. Dostupné z: ScienceDirect
- [52] MONCRIEFF, J. Extractionless determination of diclofenac sodium in serum using reversed-phase high-performance liquid chromatography with fluorimetric detection. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications* [online]. 1992, č. 577, s. 185-189 [cit. 2012-03-26]. Dostupné z: ScienceDirect
- [53] LAXMAN KOLE, P., J. MILLERSHIP a J. C. McELNAY. Determination of diclofenac from paediatric urine samples by stir bar sorptive extraction (SBSE)–HPLC–UV technique. *Talanta* [online]. 2011, č. 85, s. 1948-1958 [cit. 2012-03-26]. Dostupné z: ScienceDirect
- [54] DAVARANI, S. S. H. Electro membrane extraction of sodium diclofenac as an acidic compound from wastewater, urine, bovine milk, and plasma samples and quantification by high-performance liquid chromatography. *Analytica Chimica Acta* [online]. 2012, č. 722, s. 55-62 [cit. 2012-03-26]. Dostupné z: ScienceDirect
- [55] SCHMITZ, G., H. LEPPER a C.-J. ESTLER. High-performance liquid chromatographic method for the routine determination of diclofenac and its hydroxy and methoxy metabolites from in vitro systems. *Journal of Chromatography: Biomedical Applications* [online]. 1993, č. 620, s. 158-163 [cit. 2012-03-26]. Dostupné z: ScienceDirect
- [56] ARCELLONI, C. High-performance liquid chromatographic determination of diclofenac in human plasma after solid-phase extraction. *Journal of Chromatography B* [online]. 2001, č. 763, s. 195-200 [cit. 2012-03-27]. Dostupné z: ScienceDirect
- [57] PIMENTA, A. M., A. N. ARAÚJO a M. C. B. S. M. MONTENEGRO. Simultaneous potentiometric and fluorimetric determination of diclofenac in a sequential injection analysis system. *Analytica Chimica Acta* [online]. 2002, č. 470, s. 185-195 [cit. 2012-03-7]. Dostupné z: ScienceDirect
- [58] FERNÁNDEZ DE CÓRDOVA, M. L., P. ORTEGA BARRALES a A. MOLINA DÍAZ. Sensitive and selective determination of diclofenac sodium in pharmaceutical preparations by solid phase ultraviolet absorptiometry. *Analytica Chimica Acta* [online]. 1998, č. 369, s. 263-268 [cit. 2012-03-07]. Dostupné z: ScienceDirect

- [59] SOLEDAD GARCÍA, M., M. ISABEL ALBERO, C. SÁNCHEZ-PEDREÑO a J. MOLINA. Flow-injection spectrophotometric determination of diclofenac sodium in pharmaceuticals and urine samples. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* [online]. 1998, č. 17, 267–273 [cit. 2012-03-07]. Dostupné z: ScienceDirect
- [60] MATIN, A. A., M. A. FARAJZADEH a A. JOUYBAN. A simple spectrophotometric method for determination of sodium diclofenac in pharmaceutical formulations. *Il Farmaco* [online]. 2005, č. 60, s. 855-858 [cit. 2012-03-07]. Dostupné z: ScienceDirect
- [61] ARANCIBIA, J. A., M. A. BOLDRINI a G. M. ESCANDAR. Spectrofluorimetric determination of diclofenac in the presence of alfa-cyclodextrin. *Talanta* [online]. 2000, č. 52, s. 261-268 [cit. 2012-03-07]. Dostupné z: ScienceDirect
- [62] SANTINI, A. O., H. R. PEZZA a L. PEZZA. Determination of diclofenac in pharmaceutical preparations using a potentiometric sensor immobilized in a graphite matrix. *Talanta* [online]. 2006, č. 68, 636–642 [cit. 2012-03-07]. Dostupné z: ScienceDirect
- [63] CARREIRA, L. A. et al. Europium(III) ion probe spectrofluorometric determination of diclofenac sodium. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* [online]. 1995, č. 13, s. 1331-1337 [cit. 2012-03-07]. Dostupné z: ScienceDirect
- [64] PÉREZ-RUIZ, T. et al. Flow extraction spectrophotometric method for the determination of diclofenac sodium in pharmaceutical preparations. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* [online]. 1997, č. 16, s. 249-254 [cit. 2012-03-07]. Dostupné z: ScienceDirect
- [65] Acridine yellow. In: *Wikipedia: the free encyclopedia* [online]. San Francisco (CA): Wikimedia Foundation, 2001-, 2012-02-28 [cit. 2012-03-26]. Dostupné z: http://en.wikipedia.org/wiki/Acridine_yellow
- [66] JIN, W. a J. ZHANG. Determination of diclofenac sodium by capillary zone electrophoresis with electrochemical detection. *Journal of Chromatography A* [online]. 2000, č. 868, s. 101-107 [cit. 2012-03-07]. Dostupné z: ScienceDirect
- [67] BORENSTEIN, M. R. et al. Sensitive capillary gas chromatographic-mass spectrometricselected- ion monitoring method for the determination of diclofenac concentrations in human plasma. *Journal of Chromatography B* [online]. 1996, č. 685, s. 59-66 [cit. 2012-03-07]. Dostupné z: ScienceDirect
- [68] KORMOSH, Z., I. HUNKA a Y. BAZEL. Potentiometric determination of diclofenac in pharmaceutical formulation by membrane electrode based on ion associate with base dye. *Chinese Chemical Letters* [online]. 2007, č. 18, s. 1103-1106 [cit. 2012-03-25]. Dostupné z: ScienceDirect

- [69] DAMIANI, P. C. et al. Spectrofluorometric determination of diclofenac in tablets and ointments. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* [online]. 1999, č. 20, s. 587-590 [cit. 2012-03-07]. Dostupné z: ScienceDirect
- [70] Bipyridine. In: *Wikipedia: the free encyclopedia* [online]. San Francisco (CA): Wikimedia Foundation, 2001-, 2010-08-30 [cit. 2012-03-26]. Dostupné z: <http://en.wikipedia.org/wiki/Bipyridine>
- [71] AGRAWAL, Y. K. a K. SHIVRAMCHANDRA. Spectrophotometric determination of diclofenac sodium in tablets. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* [online]. 1991, č. 9, s. 97-100 [cit. 2012-03-26]. Dostupné z: ScienceDirect
- [72] Methylene Blue - Compound Summary. In: *PubChem* [online]. 2005-03-26 [cit. 2012-03-26]. Dostupné z: <http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/summary/summary.cgi?cid=6099>
- [73] LALA, L. G., P. M. D'MELLO a S. R. NAIK. HPTLC determination of diclofenac sodium from serum. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* [online]. 2002, č. 29, s. 539-544 [cit. 2012-03-26]. Dostupné z: ScienceDirect
- [74] KAZAKEVICH, Y. a R. LOBRUTTO. *HPLC for pharmaceutical scientists* [online]. Hoboken, N.J.: Wiley-Interscience, c2007, 1104 s. [cit. 2012-03-19]. ISBN 04-716-8162-8. Dostupné z: <http://books.google.com/>