UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

Katedra analytické chemie

Dvoudimenzionální separace v nízkotlakém systému sekvenční injekční chromatografie

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: Doc. RNDr. Dalibor Šatínský, Ph.D.

Hradec Králové 2013

Bc. Olga Válová

PROHLÁŠENÍ:

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

V Hradci Králové

Dne ….

PODĚKOVÁNÍ:

Velice ráda bych touto cestou poděkovala svému vedoucímu diplomové práce Doc. RNDr. Daliboru Šatínskému, Ph.D. za jeho užitečné rady, připomínky, trpělivost a především vstřícnost.

ABSTRAKT

Univerzita Karlova v Praze
Farmaceutická fakulta v Hradci Králové
Katedra analytické chemie

Kandidát: Bc. Olga Válová
Konzultant: Doc. RNDr. Dalibor Šatínský, Ph.D.
Název diplomové práce: Dvoudimenzionální separace v nízkotlakém systému sekvenční injekční chromatografie

Předmětem této práce byl vývoj nové metody pro separaci dvou látek, které se liší svými chemickými vlastnostmi a zejména lipofilitou.

Nově popsaná metoda s názvem dvoudimenzionální sekvenční injekční chromatografie (2D-SIC) v nízkotlakém systému byla v této práci vyvinuta pro analýzu farmaceutického přípravku Otobacid N, jehož účinnými látkami je dexamethason a cinchokain, tj. látkami s rozdílnými jak chemickými, tak i farmakologickými vlastnostmi.

Separace byla provedena na dvou rozdílných kolonách. V první dimenzi pro separaci dexamethasonu byla použita monolitní kolona 25 x 4,6 mm C-18 s mobilní fází acetonitril/voda v poměru 35/65, průtokovou rychlostí 15 µl/s. V druhé dimenzi pro separaci cinchokainu byla použita monolitní kolona 10 x 4,6 mm C-18 s předkolonou 5 x 4,6 mm C-18 s mobilní fází acetonitril/voda v poměru 60/40, průtokovou rychlostí 15 µl/s. Spektrofotometrickou detekcí byla zvolena optimální vlnová délka při 240 nm.

Relativní směrodatné odchylky (RSD) opakovatelnosti pro dexamethason se pohybovaly v rozmezí 1,88 – 3,10 % a pro cinchokain 0,37 – 2,26 %. RSD přesnosti byla pro dexamethason 3,12 % a pro cinchokain 1,72 %. RSD výtěžnosti pro dexamethason: 2,63 % a cinchokain: 1,95 %. Výtěžnost v procentech činila 99,02 % pro dexamethason a 99,48 pro cinchokain.

Koeficient linearity nabýval hodnot r^2=0,99912 pro dexamethason a r^2=0,99969 pro cinchokain.

Dvoudimenzionální sekvenční injekční chromatografie byla porovnána s metodou HPLC za izokratických podmínek separace a využitím monolitické kolony 25 x 4,6 mm C-18.

Klíčová slova: Průtoková injekční analýza (FIA), Sekvenční injekční analýza (SIA), Sekvenční injekční chromatografie (SIC), Dvoudimenzionální sekvenční injekční chromatografie (2D-SIC), dexamethason, cinchokain

ABSTRACT

Charles University in Prague
Faculty of Pharmacy in Hradec Králové
Department of Biochemical Sciences

Candidate: Bc. Olga Válová
Supervisor: Doc. RNDr. Dalibor Šatínský, Ph.D.

Title of diploma thesis: Two Dimensional Separation in the Low Pressure System of Sequential Injection Chromatography

The subject of this work was to construct a new method for separation of two analytes, which are different in their chemical properties and lipophilicity.

Newly described method named Two Dimensional Sequential Injection Chromatography (2D-SIC) for isocratic system was applied in this work for the analysis of pharmaceutical preparation Otobacid N, which contains active substances Dexamethasone and Cinchocaine, i.e. substances with different chemical properties.

The separation was carried out in two dimensions of two columns. In the first dimension for separation of Dexamethasone was used column 25 x 4.6 mm C-18 monolithic column with mobile phase acetonitrile/water in ratio of 35/65, flow rate 15 µl/sec. In the second dimension for separation of Cinchocaine was used column 10 x 4.6 mm C-18 monolithic column with precolumn 5 x 4.6 mm C-18 with mobile phase acetonitrile/water in ratio 60/40, flow rate 15 µl/sec. Optimal wavelength at 240 nm was chosen by spectrophotometric detection.

Relative standard deviation (RSD) of repeatability ranged from 1.88 % to 3.10 % for Dexamethasone and from 0.37 % to 2.26 % for Cinchocaine. RSD of precision was 3.12 % for Dexamethasone and 1.72 % for Cinchocaine. And RSD of recovery for Dexamethasone: 2.63 % and Cinchocaine: 1.95 %. The percentage of recovery was 99.02 % for dexamethason and 99.48 % for cinchocain.

The correlation coefficient of linearity was determined by the value of r^2=0,99911 for Dexamethasone and r^2=0,99969 for Cinchocaine.

Two Dimensional Sequential Injection Chromatography was compared with HPLC method under isocratic conditions of separation and with used monolithic column 25 x 4.6 mm C-18.

Keywords: Flow Injection Analysis (FIA), Sequential Injection Analysis (SIA), Sequential Injection Chromatography (SIC), Two Dimensional Sequentioal Injection Chromatography (2D-SIC), dexamethasone, cinchocaine

OBSAH

ABSTRAKT **3**

ABSTRACT **5**

SEZNAM ZKRATEK **9**

SEZNAM OBRÁZKŮ **11**

SEZNAM TABULEK **12**

1 ÚVOD **13**

2 CÍL A ZADÁNÍ PRÁCE **14**

3 TEORETICKÁ ČÁST **15**

3.1 PRŮTOKOVÉ NESEPARAČNÍ METODY **15**

3.1.1 PRŮTOKOVÁ INJEKČNÍ ANALÝZA 15

3.1.2 SEKVENČNÍ INJEKČNÍ ANALÝZA 17

3.2 PRŮTOKOVÉ SEPARAČNÍ METODY **19**

3.2.1 SEKVENČNÍ INJEKČNÍ CHROMATOGRAFIE 19

3.2.2 DVOUDIMENZIONÁLNÍ SEKVENČNÍ INJEKČNÍ CHROMATOGRAFIE (2D-SIC) 21

3.3 STANOVOVANÉ LÁTKY **23**

3.3.1 FARMACEUTICKÝ PŘÍPRAVEK OTOBACID N 23

3.3.2 DEXAMETHASON 23

3.3.3 CINCHOKAIN (DIBUKAIN) 24

3.4 METODY STANOVENÍ DEXAMETHASONU A CINCHOKAINU **26**

3.4.1 DEXAMETHASON 26

3.4.2 CINCHOKAIN 27

4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST **28**

4.1 PŘÍSTROJE A MATERIÁLY **28**

4.2 CHEMIKÁLIE 29
4.3 PŘÍPRAVA ROZTOKŮ 30
4.3.1 PŘÍPRAVA MOBILNÍCH FÁZÍ 30
4.3.2 PŘÍPRAVA ZÁSOBNÍCH ROZTOKŮ 30
4.3.3 PŘÍPRAVA ROZTOKŮ VZORKŮ PRO OPTIMALIZACI KOLON 30
4.3.4 PŘÍPRAVA KALIBRAČNÍCH ROZTOKŮ 31
4.3.5 PŘÍPRAVA ROZTOKU STANDARDU 31
4.3.6 PŘÍPRAVA ROZTOKU PLACEBA 31
4.3.7 PŘÍPRAVA VZORKŮ UŠNÍCH KAPEK OTOBACID N PRO PŘESNOST 31
4.3.8 PŘÍPRAVA VZORKŮ PRO VÝTĚŽNOST 32

5 VÝSLEDKY A DISKUSE 33

5.1 OPTIMALIZACE METODY 33
5.1.1 OPTIMALIZACE VLNOVÉ DÉLKY 33
5.1.2 OPTIMALIZACE MOBILNÍ FÁZE A KOLONY 34
5.2 OPTIMÁLNÍ PODMÍNKY PROGRAMU SIA 39
5.3 KALIBRAČNÍ KŘIVKA 41
5.3.1 KALIBRAČNÍ ZÁVISLOST PRO DEXAMETHASON 42
5.3.2 KALIBRAČNÍ ZÁVISLOST PRO CINCHOKAIN 43
5.4 OPAKOVATELNOST 45
5.4.1 SMĚRODATNÁ ODCHYLKA 45
5.4.2 RELATIVNÍ SMĚRODATNÁ ODCHYLKA 45
5.4.3 OPAKOVATELNOST PRO KONCENTRACI 50 MG/L 46
5.4.4 OPAKOVATELNOST PRO KONCENTRACI 200 MG/L 46
5.4.5 OPAKOVATELNOST PRO KONCENTRACI 500 MG/L 47
5.5 PŘESNOST A STANOVENÍ OBSAHU ÚČINNÝCH LÁTEK 48
5.6 VÝTĚŽNOST (SPRÁVNOST) 49
5.6.1 STRUČNÝ PŘEHLED VALIDACE METODY 50

6 ZÁVĚR 51

7 LITERATURA 53

SEZNAM ZKRATEK

A – absorbance

AAS – atomová absorpční spektroskopie

ACN – acetonitril

APCI – chemická ionizace za atmosférického tlaku

CAS – registrační číslo

Cat. No. – kategorizační číslo

CE – kapilární elektroforéza

CIN – cinchokain

CoTC – tetrathiokyanát kobaltu

CrTC – tetrathiokyanát chromu

DAD – diodearry detektor

DEX – dexamethason

EI – elektronová ionizace

FIA – průtoková sekvenční analýza

GC – plynová chromatografie

GC/MS – plynová chromatografie/hmotnostní spektrometrie

HPLC – vysokoúčinná kapalinová chromatografie

IUPAC – International Union ofPour and Appliedchemistry

LC – kapalinová chromatografie

LC/MS/MS – kapalinová chromatografie/hmotnostní spektroskopie

Log – logaritmus

MC – monolitická kolona

MeOH – metanol

MF – mobilní fáze

Mr – relativní molekulová hmotnost

MV – vícecestný selekční ventil

m/z – hmotnost/náboj

Obr. – obrázek

PC – počítač

pI – izoelektrický bod

RP – reverzní fáze

RSD – relativní směrodatná odchylka

S – vzorek

SD – směrodatná odchylka

SDS-PAGE – sodiumdodecylsulfatepolyacrylamide gel electrophoresis

SIA – sekvenční injekční analýza

SIC – sekvenční injekční chromatografie

SIC-2D – dvoudimenzionální sekvenční injekční chromatografie

SP – pístová pumpa

SV – solenoidní ventil

š. – šarže

TEA – triethylamin

TOF – timeofflight

UV/VIS – ultrafialová/viditelná oblast spektra světla

W – voda

ZFC – Z-průtoková cela

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obr. 1 Schéma zapojení průtokové injekční analýzy
Obr. 2 Princip průtokové injekční analýzy
Obr. 3 Schematické uspořádání SIA systému
Obr. 4 Schematické uspořádání SIC systému
Obr. 5 Schematické srovnání SIC a 2D-SIC metody
Obr. 6 Vzorec dexamethasonu
Obr. 7 Vzorec cinchokainu hydrochloridu
Obr. 8 Záznam spektra CIN a DEX
Obr. 9 Záznam DEX s MF MeOH/W (50/50)
Obr. 10 Záznam DEX s MF ACN/W (35/65)
Obr. 11 Záznam DEX s MF ACN/W (55/45)
Obr. 12 Výrazná retence CIN na koloně
Obr. 13 Záznam CIN s MF ACN/W (60/40) na 10 mm koloně
Obr. 14 Záznam CIN s MF ACN/W (60/40) na 15 mm koloně
Obr. 15 Chromatogram linearity DEX a CIN o koncentraci 100 mg/l
Obr. 16 Kalibrační řada pro dexamethason
Obr. 17 Kalibrační řada pro cinchokain

SEZNAM TABULEK

Tab. 1 Kalibrační řada
Tab. 2 Program SIA pro dlouhou kolonu (DEX)
Tab. 3 Program SIA pro krátkou kolonu (CIN)
Tab. 4 Parametry linearity regrese pro dexamethason
Tab. 5 Koncentrace kalibračních roztoků s odpovídající absorbancí
Tab. 6 Parametry linearity regrese pro cinchokain
Tab. 7 Koncentrace kalibračních roztoků s odpovídající absorbancí
Tab. 8 Opakovatelnost pro koncentraci 50 mg/l
Tab. 9 Opakovatelnost pro koncentraci 200 mg/l
Tab. 10 Opakovatelnost pro koncentraci 500 mg/l
Tab. 11 Výsledky přesnosti měření
Tab. 12 Výsledky výtěžnosti měření
Tab. 13 Parametry validace 2D-SIC

1 ÚVOD

V této diplomové práci jsem se zaměřila na možnost separace a identifikace dvou, po chemické stránce, odlišných látek (cinchokain a dexamethason) a vhodnou metodu dále optimalizovat. Danou metodou byla dvoudimenzionální sekvenční injekční chromatografie (2D-SIC), která využívá principy metod sekvenční injekční analýzy (SIA), které jsou v této práci také stručně charakterizovány.

Pro analýzu multikomponentních vzorků, kterými jsou především farmaceutické přípravky s obsahem více účinných látek, bylo nutné vyvinout novou metodu, která by takovou analýzu umožňovala, aniž by docházelo k interferencím mezi stanovovanými látkami. Touto metodou je 2D-SIC.

Sekvenční injekční chromatografie (SIC) je název pro novou instrumentální metodu, která vychází z principů sekvenční injekční analýzy (SIA), v analytice často používané metody např. ke stanovení jedné účinné látky ve farmaceutickém přípravku. Sekvenční injekční chromatografie vznikla na Katedře analytické chemie, Farmaceutické fakulty v Hradci Králové. Cíleným krokem bylo zapojení krátké, komerčně dostupné monolitické chromatografické kolony do SIA systému a tím získání nových možností moderní analytické techniky. SIC metoda si ponechala veškeré výhody SIA systému, kterými jsou vysoká přesnost, citlivost, robustnost, rychlost, minimální spotřeba vzorku a činidla a možnost on-line úpravy vzorku.

Další inovací bylo sestrojení 2D-SIC, kdy byly do systému sekvenční injekční chromatografie zařazeny dvě kolony a dvě mobilní fáze o různé koncentraci. Metoda byla navrhnuta k identifikaci a separaci více látek, lišících se svými chemickými a retenčními vlastnostmi. Umožňuje účinně separovat látky v závislosti na jejich rozdílné lipofilitě. Značnou výhodou této metody při práci se dvěma mobilními fázemi, kde každá je používána pro jinou kolonu, je vyhnutí se časové náročnosti kondicionace kolony po gradientové eluci.

2D-SIC separace probíhá na dvou kolonách (dimenzích). První dimenze je určena k separaci a identifikaci jednoho analytu (dexamethasonu) a druhá dimenze k separaci a identifikaci analytu druhého (cinchokainu). Vždy za použití jiné mobilní fáze pro každou kolonu.

2 CÍL A ZADÁNÍ PRÁCE

Tato diplomová práce si kladla za cíl optimalizovat a validovat podmínky metody dvoudimenzionální sekvenční injekční chromatografie (2D-SIC) pro stanovení dvou účinných látek (dexamethasonu a cinchokainu) ve farmaceutickém přípravku Otobacid N. Úkolem bylo tyto dvě účinné látky současně separovat na dvou různých kolonách pomocí dvou odlišných mobilních fází a stanovit obsah dexamethasonu a cinchokainu v ušních kapkách Otobacid N.

3 TEORETICKÁ ČÁST

3.1 PRŮTOKOVÉ NESEPARAČNÍ METODY

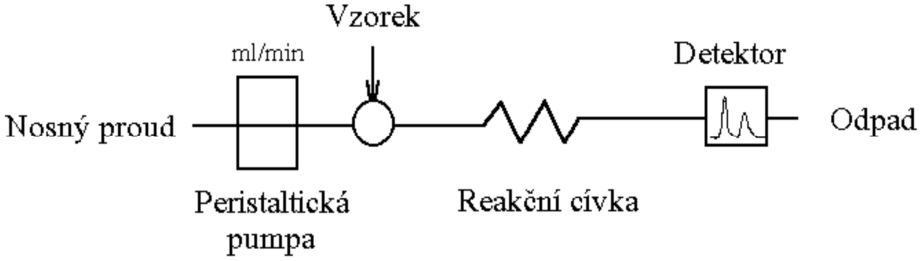
Z důvodů vysokých nároků kladených především na značné množství analýz s vysokou přesností, citlivostí, rychlostí a snadnou automatizací, bylo nutné klasické analytické metody nahradit metodami moderními automatickými. Jedná se zejména o metody průtokové neseparační a separační analytické chemie, které dnes patří k často využívaným metodám v analytických laboratořích.

Mezi průtokové neseparační metody analytické chemie patří průtoková injekční analýza (FIA) a sekvenční injekční analýza (SIA). Obě metody budou v následující kapitole stručně popsány.

3.1.1 Průtoková injekční analýza

Průtoková injekční analýza (Flow Injection Analysis = FIA) je první generací neseparační průtokové metody zaváděné Prof. Jaromírem Růžičkou (University of Washington) a Prof. Elo H. Hansenem (Technical University of Denmark) v roce 1974. Zrodila se v době, kdy součástí běžné práce v analytických laboratořích byla „práce v kádinkách“ [1]. V České republice tuto metodu rozšířil Prof.RNDr. Rolf Karlíček, DrSc. a kol. z Farmaceutické fakulty v Hradci Králové.

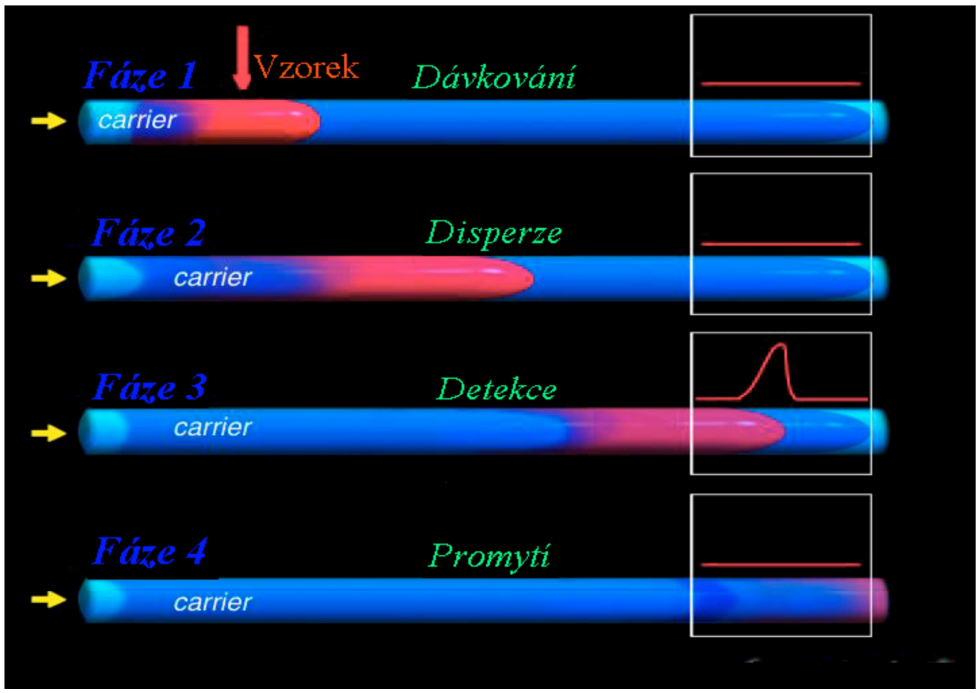
Součástí celého systému je vícekanálová peristaltická pumpa, injekční dávkovací ventil, dávkovací smyčka, reakční cívka a detektor, jak je schematicky znázorněno na Obr. 1 [2].



Obr. 1 Schéma zapojení průtokové injekční analýzy [2]

FIA je charakterizována vstřikováním kapalného vzorku v pravidelných intervalech do kontinuálního nosného proudu kapaliny vhodného složení. Po nadávkování zóny vzorku injekčním dávkovačem dochází k disperzi analyzovaného roztoku do činidla a vzniku chemické reakce v průtokovém reaktoru spojeném s detekovatelným produktem, který je dále transportován až k detektoru. Používané injekční dávkovače mohou být ovládány jak manuálně, tak automaticky přes počítač. Objem vstřikovaného vzorku je dán v závislosti na délce dávkovací smyčky připojené k dávkovacímu ventilu. Nejčastěji jsou v praxi využívány spektrofotometrické, chemiluminiscenční, amperometrické, citlivější fluorimetrické a potenciometrické detektory, které zaznamenávají požadovaný fyzikální parametr. Volba typu detekce je omezena vlastnostmi analyzované látky. Tvar píku závisí na koncentračním gradientu, který vzniká na základě disperze roztoku vzorku a nosného proudu [1,3,4]. Signál z detektoru je dále veden k zapisovači nebo je zpracován počítačem. Závislost koncentračního gradientu na tvaru píku je znázorněna na Obr. 2.

Ve FIA metodě je nutné udržet přímý kontinuální tok všech činidel, rychlé a důkladné mísení vzorku s nosným proudem kapaliny. Obrovskou výhodou této metody je flexibilnost v dávkování objemu vzorku, přičemž tato není omezena kapacitou kolony, jak je tomu v případě separačních technik. Další výhoda spočívá v nízkých pořizovacích nákladech přístrojového vybavení.

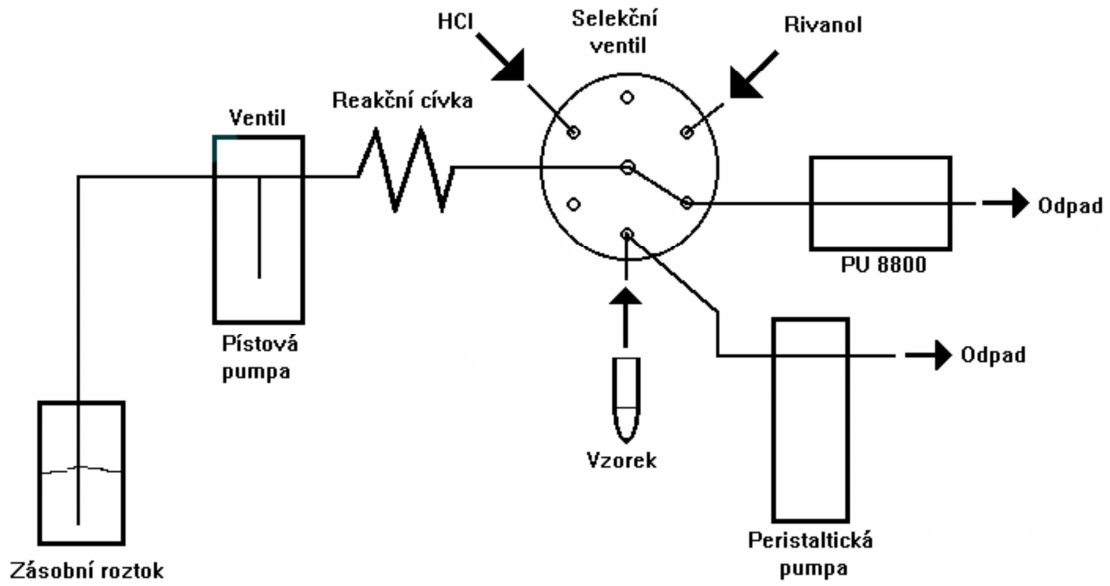


Obr. 2 Princip průtokové injekční analýzy [2]

3.1.2 Sekvenční injekční analýza

Sekvenční injekční analýza (Sequential Injection Analysis = SIA) jako druhá generace neseparačních průtokových metod byla poprvé publikována v roce 1990 profesorem Růžičkou a Marshallem. Ponechala si všechny výhody průtokové injekční analýzy (FIA), jako je nesegmentovaný tok nosného proudu a principy kontrolované parciální disperze zóny vzorku v nosném proudu. Navíc umožňuje snadnou automatizaci analýz velkého počtu vzorků [5].

Peristaltické pumpy využívané ve FIA systému jsou zde nahrazeny klasickými pístovými pumpami, které jsou schopny zajistit změnu směru toku nosného proudu (změna přímého a zpětného toku) a tak lepší konverzi analytu na výsledný produkt. Tok nosného proudu lze v jakémkoliv místě průtokového systému zastavit. Další výhodou práce v SIA systému je minimální spotřeba vzorku, nosného proudu a činidel díky diskontinuálnímu pohybu nosného proudu. Objemy vzorku a činidla, které jsou aspirovány pomocí selekčního ventilu, lze jednoduše programově měnit. Veškeré pokyny nezbytné k analýze, jako aspirace určitého objemu vzorku, nosného proudu, rychlosti aspirací a pohybu pístové pumpy, jsou řízeny programem přes počítač. Fyzický zásah do systému tedy odpadá [5,6].



Obr. 3 Schematické uspořádání SIA systému [8]

Jednokanálová obousměrná pístová pumpa, spojena s dvoucestným selekčním ventilem, slouží k aspiraci mobilní fáze a vzorku. Dvoucestný selekční ventil, jenž je

propojený přes mísící cívku, která brání vniknutí vzorku a činidel do pístové pumpy a zároveň promísení jednotlivých zón, navazuje na vícecestný selekční ventil. Ten umožňuje jednotlivé zóny činidla a vzorku dávkovat do mísící cívky při pohybu pístové pumpy. Při obrácení směru toku nosného proudu dojde k dokonalému promísení zón za vzniku reakčního produktu, který je transportován k detektoru. Podobně jako u FIA metody je získaným signálem pík, jež je záznamem koncentračního gradientu výsledného produktu při průchodu detektorem. Další mísící (reakční) cívka může být umístěna mezi vícecestný selekční ventil a průtokovou celu detektoru. Poslední nezbytnou součástí je počítač, který řídí jednotlivé naprogramované kroky celého SIA systému a zároveň sbírá, uchovává a vyhodnocuje získaná data. Spojovacím materiálem jsou hadičky o vnitřním průměru 0,5 – 0,8 mm [3,5,7].

Schéma SIA systému je znázorněno na následujícím obrázku 3.

Volba detektoru závisí na typu a vlastnostech analyzované látky. Fluorescenční, elektrochemické a spektrofotometrické detektory s určitými průtokovými celami se řadí k těm nejčastěji používaným. Jako příklad lze uvést Z-cela, která se využívá zejména ve spojení se spektrofotometrickým detektorem, a univerzální membránová cela umožňující online separaci analytu procházejícího přes dialyzační membránu [7].

Sekvenční injekční analýza nachází významné uplatnění v imunoanalytických laboratořích, dále v analýze anorganických iontů a organických látek včetně léčiv. Vyznačuje se analýzou velké série vzorků s vysokou produktivitou, specifičností a dostatečnou spolehlivostí [7].

3.2 PRŮTOKOVÉ SEPARAČNÍ METODY

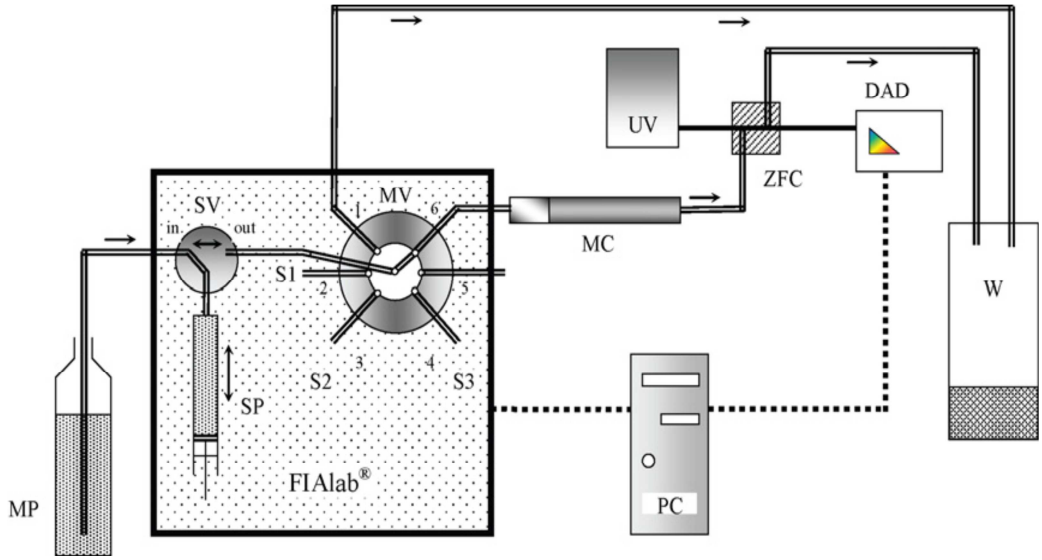
Mezi nízkotlaké průtokové separační analytické metody patří metody založené na principu sekvenční injekční chromatografie (SIC) a dvoudimenzionální sekvenční injekční chromatografie (2D-SIC).

Průtokové separační metody se v analytické chemii používají k separaci stanovované látky z analyzované směsi za současného odstranění rušivých složek [10].

3.2.1 Sekvenční injekční chromatografie

Sekvenční injekční chromatografie (Sequential Injection Chromatography = SIC) je jednou z průtokových separačních metod, která byla poprvé sestrojená v roce 2002 na Katedře analytické chemie, Farmaceutické fakulty v Hradci Králové. Princip metody spočívá v připojení komerčně dostupné krátké monolitické chromatografické kolony do systému SIA. Monolitická kolona je zapojena mezi vícecestný selekční ventil a průtokovou detekční celu [11,12,13]. Už z této informace je zřejmé, že se jedná o obdobu sekvenční injekční analýzy, pro kterou je v této poloze charakteristické připojení reakční cely. Z toho dále lze odvodit, že SIC využívá všechny výhody SIA a navíc je obohacena o možnost separace vícesložkových vzorků před jejich samotnou detekcí.

Zapojení chromatografické kolony do systému SIC je znázorněno na obrázku 4.



Obr. 4 Schematické uspořádání SIC systému: MP - mobilní fáze, SP – pístová pumpa, SV – solenoidní ventil, MV – 6-cestný selekční ventil, S1, S2, S3 – porty pro vzorek a standardy, MC – monolitická kolona, ZFC – Z průtoková cela, DAD – diode-array detektor, UV – UV zdroj, W – odpad, PC – počítač [13]

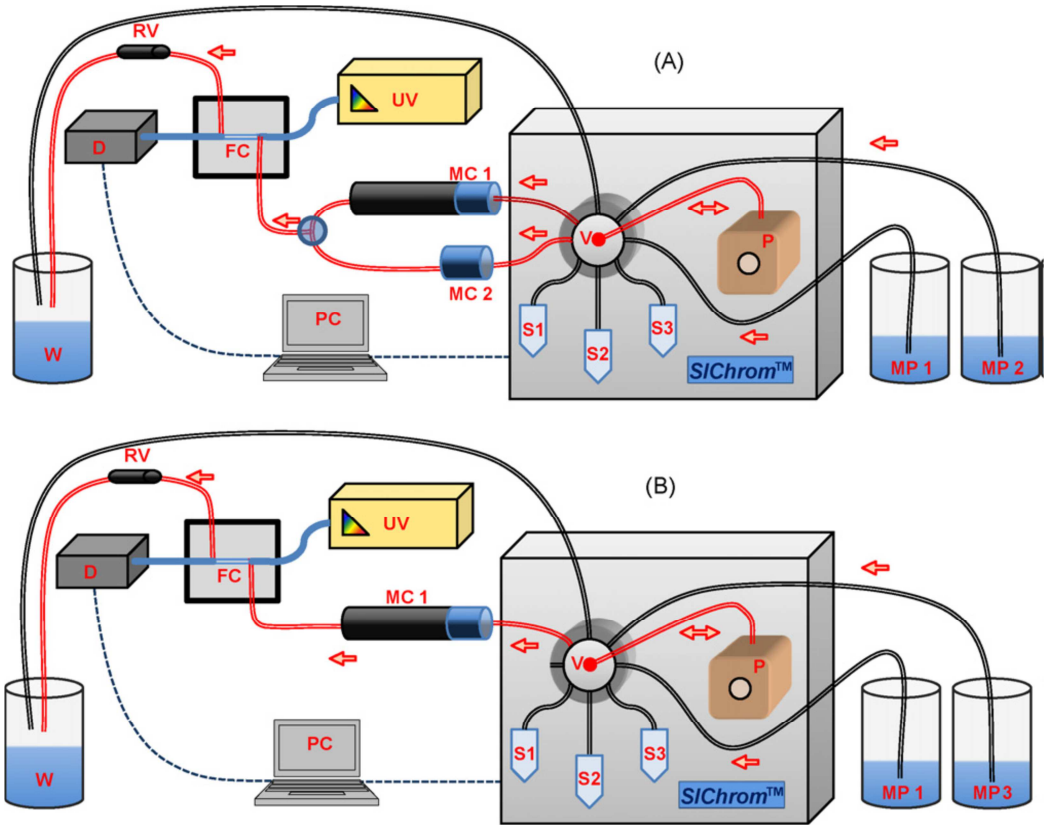
Jak již bylo zmíněno výše, sekvenční injekční chromatografie využívá výhody metody SIA, hlavně možnost automatizace, miniaturizace, rychlost procesu, nízké spotřeby vzorků, mobilních fází a činidel. Navíc je rozšířena o možnost separace a stanovení vícesložkových vzorků s obsahem více účinných látek, což je využíváno především pro analýzu farmaceutických přípravků. Doposud byly multikomponentní látky separovány pomocí plynové chromatografie (GC), kapilární elektroforézy (CE) nebo vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC). Sekvenční injekční chromatografie je jakousi nízkotlakou alternativou klasické HPLC metody [12].

Nevýhodami systému, ve srovnání s HPLC metodou, zůstávají omezené možnosti softwaru pro vyhodnocení separace analýzy, nižší robustnosti, průtokové rychlosti i objemu MF a vzorku aspirovaných pístovou pumpou [13,14].

3.2.2 Dvoudimenzionální sekvenční injekční chromatografie (2D-SIC)

Dvoudimenzionální sekvenční injekční chromatografie (2D – SIC) je jednou z úplně nejnověji sestrojených separačních chromatografických metod, která se vyznačuje paralelní separací dvou, či více analytů s vysoce rozdílnými chemickými vlastnostmi. Místo si našla především v separaci farmaceutických přípravků, jež obsahují dvě a více účinných látek a navíc se dané látky vyznačují rozdílnými retenčními vlastnostmi na reverzní fázi a hodnotami lipofility.

2D – SIC využívá výhody sekvenční injekční chromatografie (SIC). Poskytuje nesrovnatelné výhody v porovnání s HPLC metodou, jež neumožňuje separaci látek na dvou kolonách za isokratické eluce [15].



Obr. 5 Schematické srovnání SIC a 2D – SIC metody: (A) – 2D–SIC, (B) – SIC, W – odpad, D – CCD UV/VIS detektor, FC – Z-cela, RF – pojistný ventil, MC 1 – monolitická kolona 1, MC 2 – monolitická kolona 2, PC – počítač, S1,S2,S3 – vzorky, UV – UV lampa, MP1, MP2 – mobilní fáze, P – pístová pumpa, V – 8-cestný selekční ventil [15]

Myšlenkou k sestrojení této metody bylo vyvinout takovou sekvenční injekční chromatografii, kde by bylo možné separovat více analytů současně, tedy s použitím dvou odlišných kolon a dvou mobilních fází o jiné koncentraci. Cílem celé myšlenky bylo sestavit systém tak, aby jedna kolona sloužila k separaci a retenci méně lipofilního analytu a druhá kolona k separaci a retenci analytu o vyšší lipofilitě [15].

3.3 STANOVOVANÉ LÁTKY

Farmaceutický přípravek Otobacid N, firmy Haupt Pharma Amareg GmbH, obsahuje účinné látky dexamethason a cinchokain, které byly stanovovány metodou 2D-SIC.

3.3.1 Farmaceutický přípravek Otobacid N

Kód SÚKL: 0084700

Registrační číslo: 69/314/97-C

Držitel registrace pro ČR: Chiesi s.r.o., Praha

Farmaceutický název: AUR GTT SOL 1X5ML

Léková forma: ušní kapky, roztok

Účinnými látkami tohoto přípravku jsou dexamethasonum (0,2 mg), cinchokaini hydrochloridum (5 mg), 1,3 - butandiolum (479,8 mg v 1 g roztoku) a pomocná látka glycerol. Jedná se o otorinolaryngologiím (ušní-nosní-krční přípravek), lokální anestetikum (místně znecitlivující) a antiflogistikum (protizánětlivé). Přípravek je určen k léčbě zánětlivých onemocnění ucha, ušního boltce, ekzémům zevního zvukovodu a k léčbě zánětu středního ucha [16,17].

Případné nežádoucí účinky, které se mohou objevit po použití kapek, jsou především kožní změny spojené s místem aplikace tohoto přípravku. Tyto se projevují zarudnutím, otokem, svěděním, pálením, šupinatěním nebo tvorbou podkožních žilek [17].

3.3.2 Dexamethason

Dexamethasonum (dle ČL 2009)

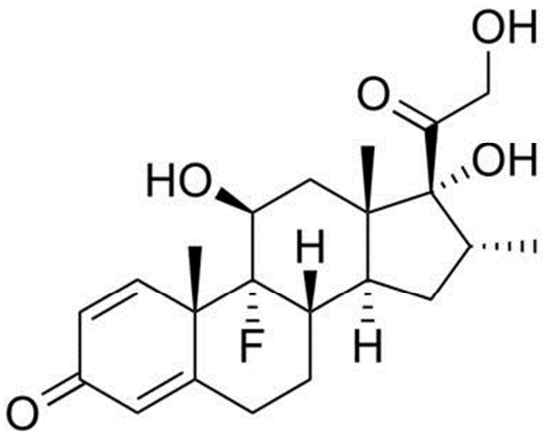
(IUPAC: 9-fluor-11β,17,21-trihydroxy-16α-methylpregna-1,4-dien-3,20-dion)

Sumární vzorec: $C_{22}H_{29}FO_5$

CAS (registrační číslo): 50-02-2

Mr (molární hmotnost): 392, 47 g/mol

Skupina: glukokortikoid



Obr. 6 Vzorec dexamethasonu [18]

Vlastnosti:

Jedná se o bílý krystalický prášek. Ve vodě je prakticky nerozpustný, mírně rozpustný v bezvodém etanolu, těžce rozpustný v dichlormethanu. Ke zkouškám totožnosti náleží například tenkovrstvá chromatografie či infračervená absorpční spektrofotometrie [19].

Dexamethason se řadí mezi hormony ze skupiny glukokortikoidů, které se vyznačují protizánětlivými, imunosupresivními, antialergickými a antipruriginózními účinky. Protizánětlivý účinek se vyznačuje inhibicí fosfolipázy A2, čímž dochází k inhibici prostaglandinů. Je dostupný v nejrůznějších lékových formách, jako: kapsle, injekce, orální pasty, dermální masti a krémy, nebo ušní, oční kapky [20].

3.3.3 Cinchokain (Dibukain)

Cinchocaini hydrochloridum (dle ČL 2009)

IUPAC název:

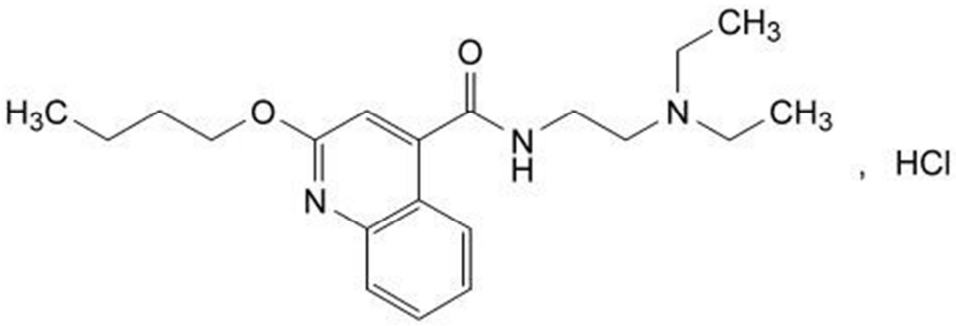
2-butoxy-N-[2-(diethylamino)ethyl]chinolin-4-karboxamid-hydrochlorid

Sumární vzorec: $C_{20}H_{30}ClN_3O_2$

CAS (registrační číslo): 61-12-1

Mr (molární hmotnost): 379, 93 g/mol

Skupina: lokální anestetikum



Obr. 7 Vzorec cinchokainu hydrochloridu [19]

Vlastnosti:

Cinchocaini hydrochloridum je bílý, hygroskopický krystalický prášek, bez zápachu a slabě hořké chuti. Velmi snadno rozpustný ve vodě, snadno rozpustný v acetonu, v 96 % etanolu a v dichlormethanu. Velmi snadno tvoří aglomeráty [19].

Cinchokain, derivát amidového typu, patří mezi lokální anestetika, které po podání znecitlivují kůži a sliznici. Je určen pro povrchovou nebo spinální anestézii s vasodilatačním efektem. Z důvodu možné fotosenzitivní reakce se přípravky s obsahem cinchokainu uchovávají ve tmě bez přístupu světla. Tato účinná látka je součástí nejrůznějších mastí, krémů, očních i nosních kapek a ústních roztoků. Široké uplatnění nachází v přípravcích na léčbu hemoroidů. Nástup účinku je rychlý [21].

3.4 METODY STANOVENÍ DEXAMETHASONU A CINCHOKAINU

Stanovení obou látek (dexamethason a cinchokain) současně nebylo dosud nikým provedeno. Látky byly analyzovány pouze samostatně, nezávisle na sobě, nebo ve směsích s dalšími látkami.

Ke stanovení dexamethasonu je možné využít vysokoúčinnou kapalinovou chromatografii (HPLC) nebo metody tandemové, jako GC/MS, LC/MS/MS. Kapalinová chromatografie v kombinaci s tandemovou MS/MS poskytuje výborné separační možnosti, vysokou citlivost a robustnost [22].

Ke stanovení cinchokainu lze využít několik analytických metod. Je to především spektrofotometrie, atomová absorpční spektrometrie (AAS), fluorimetrie, plynová chromatografie, vysokoúčinná kapalinová chromatografie, elektroforéza nebo tenkovrstvá chromatografie [23,24,25].

3.4.1 Dexamethason

HPLC/Extrakce disperzní tuhou fází je metoda vhodná ke stanovení dexamethasonua a prednisolonu ve vzorku kravského mléka. Metoda byla provedena za použití mobilní fáze acetonitril/voda o poměru 25/75, HPLC C18 koloně (250 mm x 4,6 mm x 5 μm). Extrakce disperzní tuhou fází poskytuje zakoncentrování, čištění a extrakci v jednom kroku. Příprava vzorku je jednodušší a rychlejší a umožňuje provést vyšší počet analýz v kratším časovém úseku [26].

RP-HPLC je další metodou vhodnou k detekci jak dexamethasonu, tak lidokainu, buthylhydroxyanisolu a degradačních produktů hydrochinonu ve farmaceutických přípravcích (čípky, masti) určených k léčbě hemoroidů. Analýza byla provedena za podmínek: HPLC kolona (250 mm x 4,6 mm x 5 μm), mobilní fáze acetonitril/voda v poměru 50/50, UV/VIS detektor a pH 2,5. Detekce probíhala při vlnové délce 240 nm. Metoda je vysoce selektivní, citlivá a reprodukovatelná [27].

HPLC/MS (ionizace elektrosprejem) metoda vhodná pro separaci dvou izomerů: dexamethasonu a betamethasonu, které se liší pouze v orientaci methylové skupiny v pozici 16. Metoda se prováděla za podmínek: HPLC kolona C18 (100 mm x 2,1 mm x 1,8 μm), kvadrupólový hmotnostní analyzátor, ionizace elektrosprejem, N_2 jako nebulizační plyn. Tato kvantitativní metoda byla potvrzena jako metoda vhodná pro

screening a detekci přítomnosti dexamethasonu a betamethasonu v kravské a prasečí moči s dostatečným časovým odstupem [28].

3.4.2 Cinchokain

Spektrofotometrická metoda použitá pro analýzu cinchokainu byla založena na reakci cinchokainu s CoTC (tetrathiokyanát kobaltu) a CrTC (tetrathiokyanát chromu) a na následné tvorbě barevných nerozpustných iontů. Nejvhodnějším rozpouštědlem pro kvantitativní extrakci při absorpčním maximu 620 a 555 nm je toluen a isobutylalkohol [23].

Atomová absorpční spektrometrie je založená na měření přebytečného kobaltu a chrómu ve vodném roztoku, při vlnové délce 240,7 a 357,9 nm. Ke stanovení se opět využívaly sloučeniny CoTC a CrTC [23].

Obě tyto metody jsou vysoce přesné, citlivé, jednoduché, rychlé a vhodné především pro analýzu čistého cinchokainu.

HPLC metodou byl cinchokain stanoven za podmínek: UV detektor, 254 nm, HPLC kolona (30 cm x 3,9 mm), objem vzorku 20 µl a mobilní fáze acetonitril/trihydrát octanu sodného v poměru 45/55. Analýza se prováděla za použití farmaceutického přípravku, Neocain krém, jenž obsahuje cinchokain, methylparaben a propylparaben. Cílem metody bylo prokázat možnost stanovení cinchokainu, methylparabenu a propylparabenu současně. Což se potvrdilo [25].

NMR metodou byl testován vliv a lokalizace lokálních anestetik (cinchokainu, tetrakainu, lidokainu a prokainu) na lipidovou dvouvrstvu, jako výsledek interakce mezi fosfolipidovými molekulami a lokálním anestetikem. Metodou bylo zjištěno, že cinchokain upřednostňuje umístění svého hydrofobního postranního řetězce do hlubších vrstev membrány [29].

4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 PŘÍSTROJE A MATERIÁLY

FIAlab®3500 automatický SIA systém (FIAlab® Instruments, USA), Software FIAlab for Windows 5.0®

- Dlouhá kolona (25 mm): Cat. No. 1.51463.0001
  Chromolith Flash
  HPLC column
  RP-18e 25-4,6 mm
  No.UM8010/012
  Merck, Německo
- Krátká kolona (10 mm): Cat. No. 1.51452.0001
  Chromolith
  Guard Cartridge
  RP-18e 10-4,6 mm
  Merck, Německo
- Předkolona (5 mm): Cat. No. 1.51451.0001
  Chromolith
  RP-18e 5-4,6 mm
  Guard Cartridge
  Merck, Německo
- UV-VIS diode array detektor USB 2000 (Ocean Optics Inc., Dunedin, FL, USA)
- UV-VIS světelná lampa LS-1 (Ocean Optics Inc., Dunedin, FL, USA)
- Optická vlákna (Avantes Inc., USA)
- Průtoková Z cela (10 mm, Colorado, USA)
- 8 - cestný selekční ventil (Valco Instrument Co., USA)
- Hadičky ø 0,75 mm (PTFE)
  Analytické váhy (Sartorius Gottingen, Německo)
- Ultrazvuková lázeň (Sonorex RK31)
- Digitální pH-metr PHM 220 MeterLab (Radiometer Analytical, Francie)

4.2 CHEMIKÁLIE

- Methanol Chromasolv, for LC (Sigma-Aldrich, Německo)
- Acetonitril Chromasolv, for LC (Sigma-Aldrich, Německo)
- Cinchokain, čistota ≥ 98 %, log P=4,75 (Sigma-Aldrich, Německo)
- Dexamethason, čistota ≥ 98 %, log P=1,93 (Sigma-Aldrich, Německo)
- Farmaceutický přípravek Otobacid N (Haupt Pharma Amareg GmbH, Německo), držitel registrace pro ČR – Chiesi CZ s.r.o.
- Glycerol 85 % (Sigma-Aldrich, Německo)
- 1,2- propandiol, čistota ≥ 99,5 % (Sigma-Aldrich, Německo)
- 1,3- butanediol, čistota 99 % (Sigma-Aldrich, Německo)
- Fosfátový pufr – 1,0 M kyselina fosforečná (Sigma-Aldrich, Německo)
- Triethylamin, čistota ≥ 99 % (Sigma-Aldrich, Německo)
- Deionizovaná voda čištěná Milli – Q RG systém (Millipore s.r.o., Praha, ČR)

4.3 PŘÍPRAVA ROZTOKŮ

Při měření diplomové práce bylo potřeba připravit roztoky mobilních fází (MF), zásobní roztoky, roztoky vzorků, standardu a placeba.

4.3.1 Příprava mobilních fází

Mobilní fáze byly připravovány za použití metanolu, acetonitrilu a destilované vody v určitém poměru a v závislosti na použité koloně.

Všechny mobilní fáze byly odměřeny do 500 ml lahví. Pro finální měření na dlouhé koloně (25 mm) byla připravena MF ACN/W (35/65), což odpovídá 175 ml acetonitrilu a 325 ml destilované vody. Pro krátkou kolonu (15 mm) MF ACN/W (30/70), což odpovídá 150 ml acetonitrilu a 350 ml destilované vody. Mobilní fáze byly odplyněny v ultrazvukové lázni po dobu 2 minut.

4.3.2 Příprava zásobních roztoků

Zásobní roztoky (ZR) dexamethasonu a cinchokainu byly připraveny v koncentracích 1000 mg/l. Tedy 50,00 mg vzorku standardu bylo převedeno do odměrné baňky kalibrované na 50,00 ml a rozpuštěno v MF ACN/W (35/65) zalkalizované 0,1 % TEA.

4.3.3 Příprava roztoků vzorků pro optimalizaci kolon

Pro optimalizaci kolon byly ze zásobních roztoků připraveny roztoky vzorků cinchokainu a dexamethasonu o koncentracích 200 mg/l (2 ml zásobního roztoku CIN a 2 ml DEX doplnit MF ACN/W (35/65) zalkalizovanou 0,1 % TEA do odměrných baněk kalibrovaných na 10,00 ml). Poté směsný vzorek CIN + DEX o stejné koncentraci: 200 mg/l (2 ml CIN + 2 ml DEX byl převeden do 10,00 ml odměrných baněk a doplněn MF ACN/W (35/65) zalkalizovanou 0,1 % TEA.

4.3.4 Příprava kalibračních roztoků

Ze zásobních roztoků byly připraveny roztoky vzorků o koncentracích: 50, 75, 100, 150, 200, 250, 300, 400 a 500 mg/l do 10,00 ml odměrných baněk doplněných MF ACN/W (35/65) zalkalizovanou 0,1 % TEA.

Tab.1 Kalibrační řada

koncentrace (mg/l)	objem ZR DEX (ml)	objem ZR CIN (ml)
50	0,50	0,50
75	0,75	0,75
100	1,00	1,00
150	1,50	1,50
200	2,00	2,00
250	2,50	2,50
300	3,00	3,00
400	4,00	4,00
500	5,00	5,00

4.3.5 Příprava roztoku standardu

Do 10,00 ml odměrné baňky bylo nepipetováno 2 ml zásobního roztoku cinchokainu (1000 mg/l) a 1 ml zásobního roztoku dexamethasonu (1000 mg/l) a doplněno po rysku MF ACN/W (35/65) + 0,1 % TEA. Tento roztok byl použit pro kvantifikaci přesnosti a správnosti farmaceutického přípravku.

4.3.6 Příprava roztoku placeba

Do 100,00 ml odměrného válce bylo odměřeno 50,00 ml 100 % 1,3- butandiolu a 50,00 ml 85 % glycerolu a následně dokonale zhomogenizováno.

4.3.7 Příprava vzorků ušních kapek Otobacid N pro přesnost

V závislosti na obsahovém složení účinných látek v ušních kapkách (DEX: 200 mg/l a CIN: 5000 mg/l) a zachování dané koncentrace obou účinných složek (DEX: 100 mg/l a CIN: 200 mg/l) byly ušní kapky ředěny MF ACN/W (35/65) + 0,1 % TEA. A to v poměru:

DEX: 1:1 → 2,5 ml kapek + 2,5 ml MF + 0,1 % TEA

CIN: 1:25 → 200 µl kapek + 4,8 ml MF + 0,1 % TEA

Pro přípravu těchto vzorků byly použity ušní kapky Otobacid N v šaržích:

- š. 14031B
- š. 04028B

4.3.8 Příprava vzorků pro výtěžnost

Ke stanovení výtěžnosti měření pro dexamethason byly připraveny roztoky dle následujícího rozpisu: 1 ml zásobního roztoku DEX + 5 ml placeba a doplnit MF ACN/W (35/65) + 0,1 % TEA.

Ke stanovení výtěžnosti měření pro cinchokain byly připraveny roztoky dle následujícího rozpisu: 2 ml zásobního roztoku CIN + 400 µl placeba a doplnit MF ACN/W (35/65) + 0,1 % TEA.

5 VÝSLEDKY A DISKUSE

5.1 OPTIMALIZACE METODY

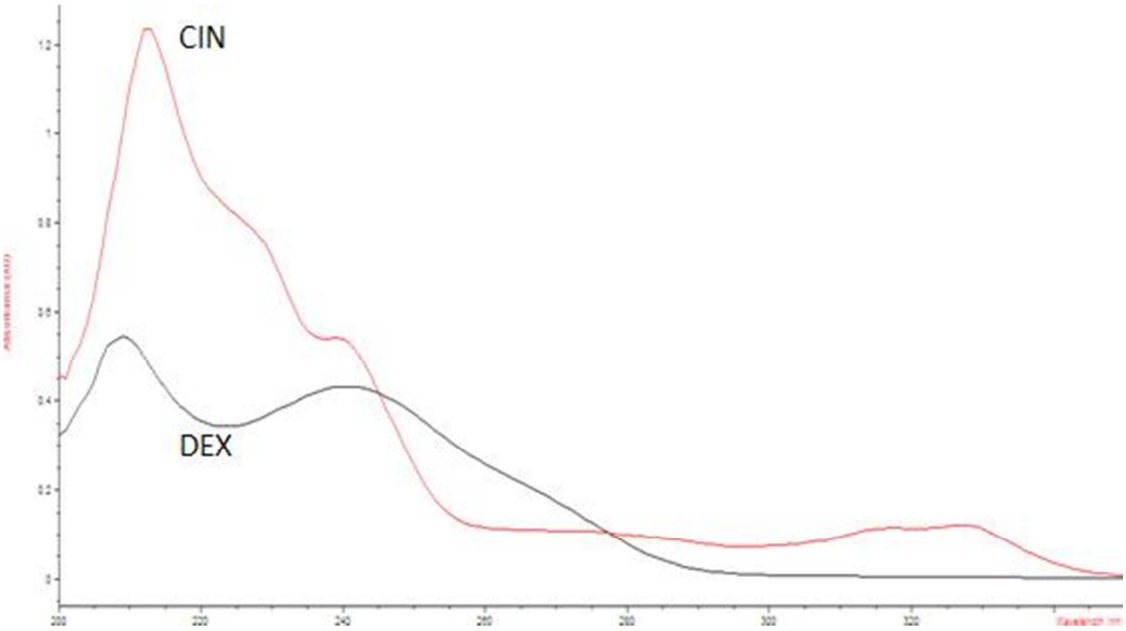
Pro výběr optimální a současně finální metody byl brán zřetel na předchozí analýzu prováděnou na HPLC. Tato analýza byla provedena především z důvodu vyšší robustnosti a snadně následnému přenosu podmínek analýzy na SIA systém. Z těchto důvodů byla 2D-SIC metoda optimalizována za použití MF ACN/W (30/70) pro dlouhou kolonu (25 mm) a MF ACN/W (60/40) pro krátkou kolonu. V tomto případě se jednalo o kolonu o rozměrech 10 mm.

Cílem optimalizace metody bylo najít vhodnou mobilní fázi a dostatečně dlouhou kolonu. V průběhu SIA analýzy došlo oproti HPLC metody k nepatrným úpravám jak v délce kolony, tak složení mobilní fáze (poměru ACN/W).

5.1.1 Optimalizace vlnové délky

Pro optimalizaci vlnové délky byl použit spektrofotometr, kterým byla změřena absorpční spektra jednotlivých látek v UV oblasti. Měření absorpčních spekter pro jednotlivé látky se testovalo s použitím roztoku vzorku dexamethasonu o koncentraci 10 mg/l a roztoku vzorku cinchokainu o koncentraci 10 mg/l v mobilní fázi ACN/W (35/65) + 0,1 % TEA. Zjištěná optimální vlnová délka (240 nm) pro dexamethason a cinchokain byla následně nastavená jako měřící vlnová délka detektoru v SIA systému. Je to taková vlnová délka záření, která pro danou analyzovanou látku vykazuje absorpční maximum.

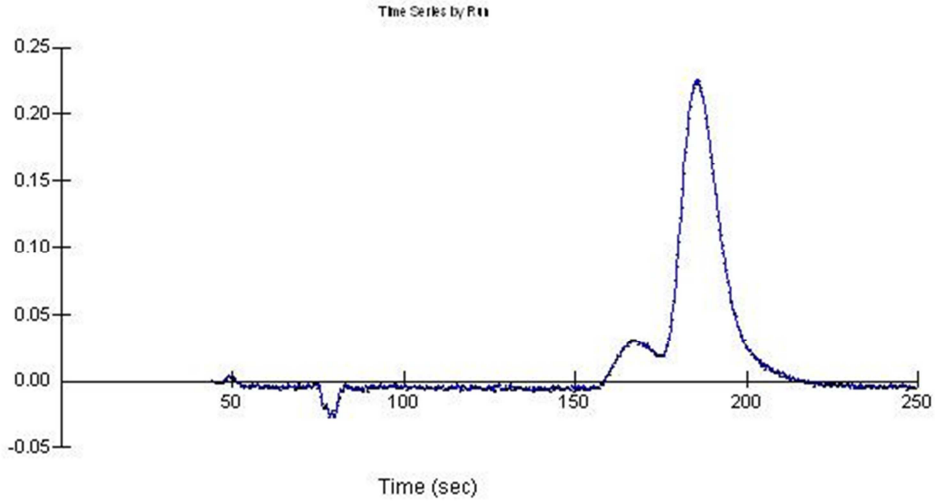
Vlnové délky pro dexamethason a cinchokain jsou zobrazeny na obrázku 8. Červená linie je platná pro cinchokain a černá linie pro dexamethason.



Obr. 8 Záznam spektra CIN a DEX

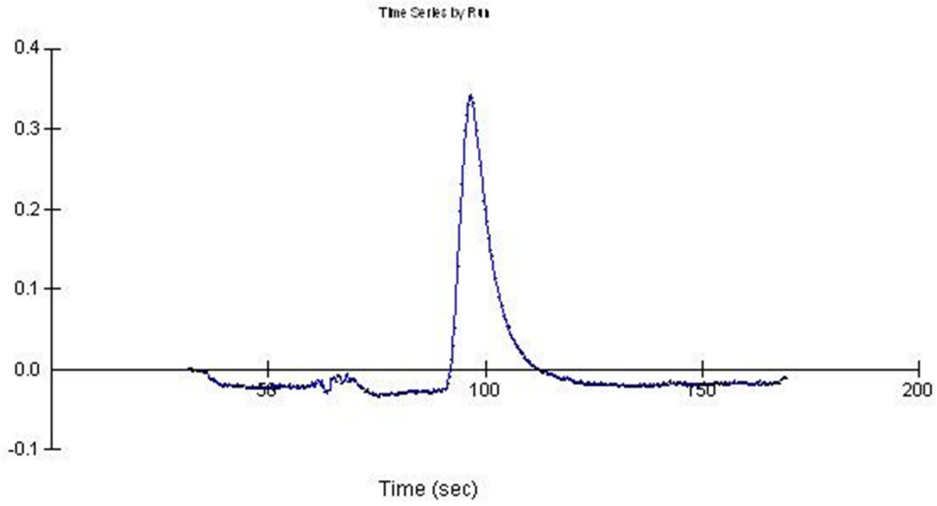
5.1.2 Optimalizace mobilní fáze a kolony

Optimalizace první mobilní fáze byla zahájena na dlouhé koloně za použití MF MeOH/W (30/70) pro dexamethason (c=200 mg/l) rozpuštěný v MeOH. Monolitická kolona Chromolith Flash, RP – 18e, 25 – 4,6 mm byla zapojena v SIA přístroji mezi 8- cestný selekční ventil a detektor. Protože retenční čas dexamethasonu byl příliš dlouhý, byla vyměněna tato MF za MF o vyšší koncentraci organické složky: MeOH/W (35/65) se snahou urychlit retenční čas, a urychlit eluci sledované látky sorbentem kolony. Pro ověření vhodného retenčního času byla použita i MF o složení MeOH/W v poměru 50/50, jak je tomu na obrázku 9.



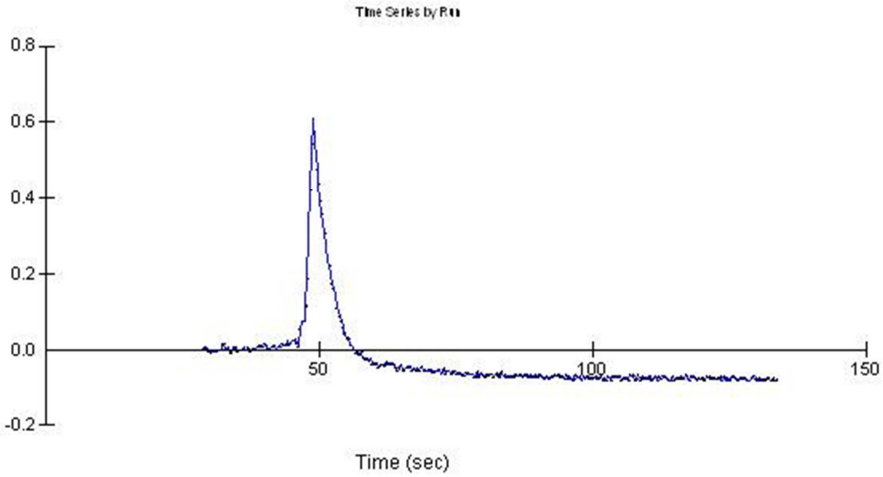
Obr. 9 Záznam DEX s MF MeOH/W (50/50)

Problém, ale stále zůstával v chvostování píku dexamethasonu. Z toho důvodu byla připravena nová mobilní fáze o složení ACN a vody, a to v poměru 35/65. Takto připravený roztok byl zapojen do systému k separaci látky dexamethasonu. Výsledky byly velice příznivé. Chromatogram této analýzy je k dispozici na obrázku 10. Retenční čas a tvar píku pro dexamethason byl zachován, stejně tak bylo dosaženo dostatečné odstoupení mrtvého objemu systému od píku dexamethasonu.



Obr. 10 Záznam DEX s MF ACN/W (35/65)

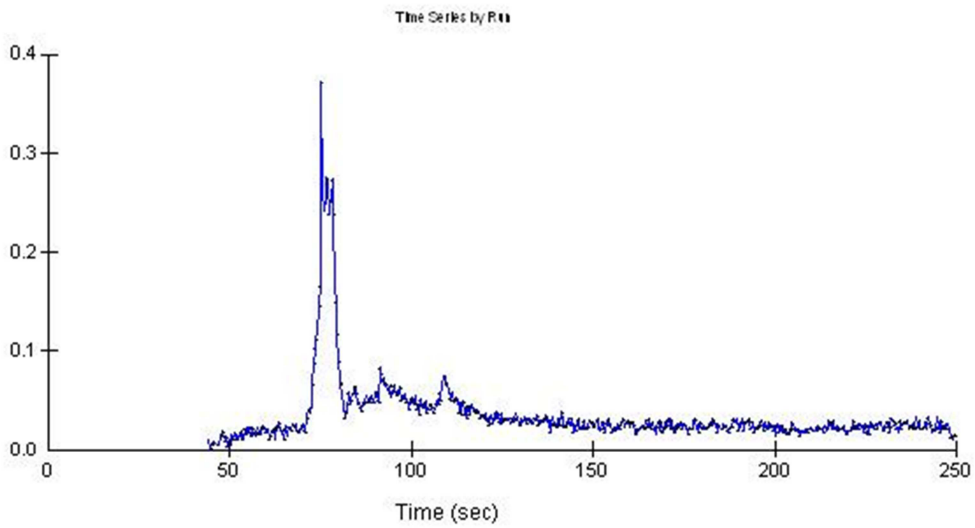
Vyšší koncentrace acetonitrilu neměly význam, neboť docházelo k nedostatečné retenci analytu na koloně, jak je v příkladu zachyceno na obrázku 11. Zde byla použita mobilní fáze ACN/W v poměru 55/45.



Obr. 11 Záznam DEX s MF ACN/W (55/45)

Jako optimální mobilní fáze pro dlouhou kolonu byla vybrána MF ACN/W (35/65).

Za stejných podmínek (MF = ACN/W 35/65) a za použití stejné kolony (25 mm) probíhalo testování retenčních vlastností i druhého analytu, cinchokainu (c=200 mg/l). Ostatní parametry zůstávají nezměněné. Výsledkem byla nedetekovatelnost píku pro CIN, a tedy nemožnost interference s dexamethasonem v dalších analýzách měření, což bylo také cílem této práce. Na obrázku 12 je možné vidět výraznou retenci analytu CIN (nepřítomnost píku) na dlouhé koloně v daném čase. Chromatogram byl pořízen po několika cyklech měření.

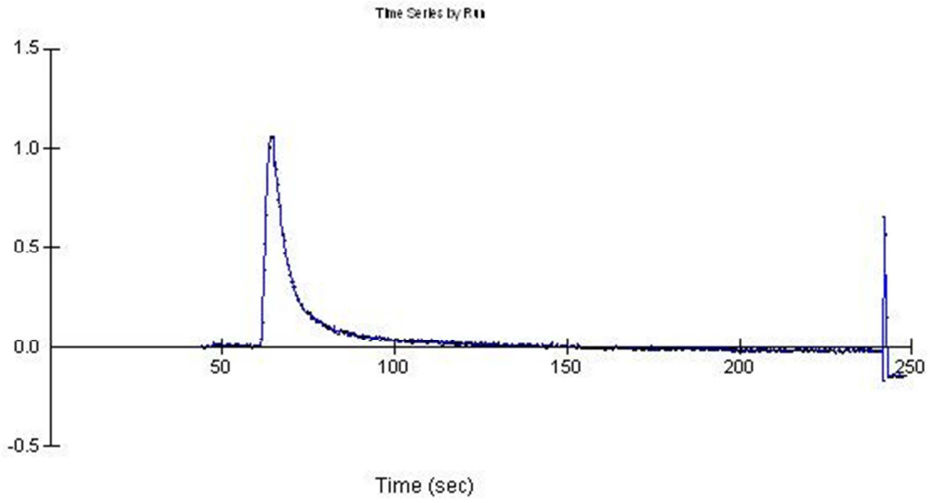


Obr. 12 Výrazná retence CIN na koloně

Proto bylo potřeba použít kratší kolonu a následně najít takovou optimální mobilní fázi, která by byla schopná eluovat silně zadržovaný vzorek cinchokainu větší rychlostí.

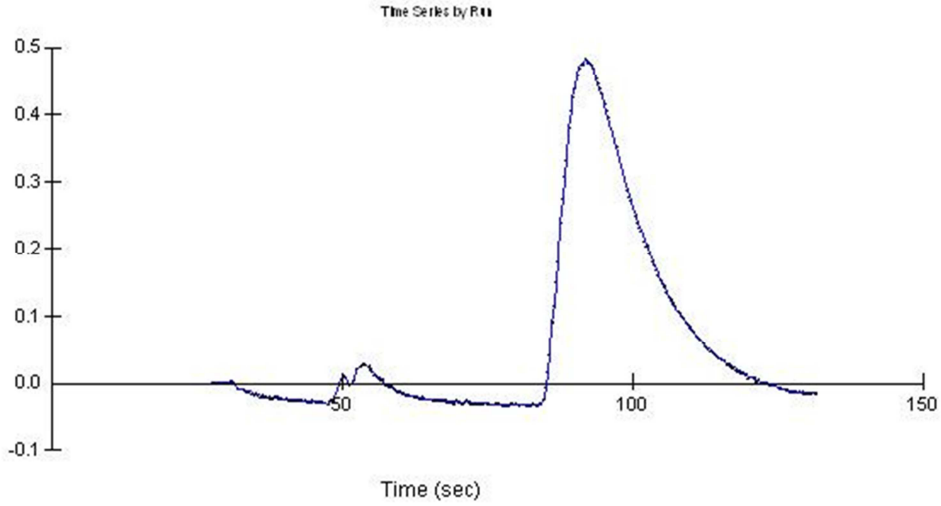
Pro optimalizaci druhé mobilní fáze byla nejdříve použita krátká kolona o délce 10 mm a analyt cinchokainu (c=200 mg/l) rozpuštěný v MeOH. Tato monolitická kolona Chromolith, RP – 18e, 10 – 4,6 mm byla opět zapojena do SIA přístroje mezi 8 – cestný selekční ventil a detektor. Jako mobilní fáze byla nejdříve použita směs s metanolem MeOH/W (65/35). Pík cinchokainu podléhal chvostování. S největší pravděpodobností měla na chvostování píku vliv mobilní fáze s obsahem metanolu, proto v další části analýzy byla použita MF ACN/W v poměrech 55/45 a 60/40.

Příznivější výsledky s ohledem na symetrii píku jevil roztok s ACN. Záznam pro cinchokain s mobilní fází ACN/W 60/40 je zachycen na obrázku 13.



Obr. 13 Záznam CIN s MF ACN/W (60/40) na 10 mm koloně

Příznivé výsledky zůstávají i za těchto podmínek, jen retenční čas byl příliš krátký. Proto bylo nutné kolonu prodloužit připojením 5 mm předklony Chromolith, RP – 18e, 5 – 4,6 mm a následně tak předejít interferenci při současném měření se vzorkem dexamethasonu na dlouhé koloně. Záznam analýzy zachycuje obrázek 14.



Obr. 14 Záznam CIN s MF ACN/W (60/40) na 15 mm koloně

Jako optimální mobilní fáze pro krátkou kolonu (15 mm) byla vybrána ACN/W (60/40).

Z těchto analýz byly vybrány optimální mobilní fáze a kolony:

- MF ACN/W (35/65) pro dlouhou kolonu (25 mm) – separace DEX
- MF ACN/W (60/40) pro krátkou kolonu s předkolonou (15 mm) – separace CIN

5.2 OPTIMÁLNÍ PODMÍNKY PROGRAMU SIA

Protože práce na SIA přístroji je ovládána přes počítačový software, bylo potřeba vytvořit takový program, v němž budou uvedeny jednotlivé kroky potřebné k celému měření. Mezi takové kroky patří promytí systému, promytí kolony a vzorku, dále aspirace vzorku z určitého portu o určitém objemu a s určitou průtokovou rychlostí. Stejně tak aspirace požadované mobilní fáze o daném objemu a dané průtokové rychlosti. V tomto programu je dále zaznamenán směr toku MF se vzorkem. Podrobné znění celého programu pro dlouhou kolonu je znázorněno v tabulce číslo 2. Aspirace cinchokainu procházejícího krátkou kolonou je zachycena v tabulce 3.

Tab.2 Program SIA pro dlouhou kolonu (DEX)

Součástka	Příkaz	Parametr
Dvoucestný ventil pumpy	Poloha OUT	OUT
Selekční ventil	Nastavit do polohy 2	Port 2
Pístová pumpa	Nasát MF o objemu [µl]	500
Pístová pumpa	Nasát MF průtokovou rychlostí [µl/s]	100
Selekční ventil	Nastavit do polohy 1	Port 1
Pístová pumpa	Průtoková rychlost [µl/s]	200
Pístová pumpa	Vyprázdnit MF	
Selekční ventil	Nastavit do polohy 2	Port 2
Pístová pumpa	Nasát MF o objemu [µl]	2300
Pístová pumpa	Nasát MF průtokovou rychlostí [µl/s]	100
Selekční ventil	Nastavit do polohy 5	Port 5
Pístová pumpa	Nasát vzorek o objemu [µl]	20
Pístová pumpa	Nasát MF průtokovou rychlostí [µl/s]	30
Selekční ventil	Nastavit do polohy 8	Port 8
Pístová pumpa	Průtoková rychlost [µl/s]	15
Pístová pumpa	Vyprázdnit pumpu	
Spektrometr	Skenovat při 240 nm	240
Spektrometr	Neskenovat po dobu [s]	Delay 75

Tab.3 Program SIA pro krátkou kolonu (CIN)

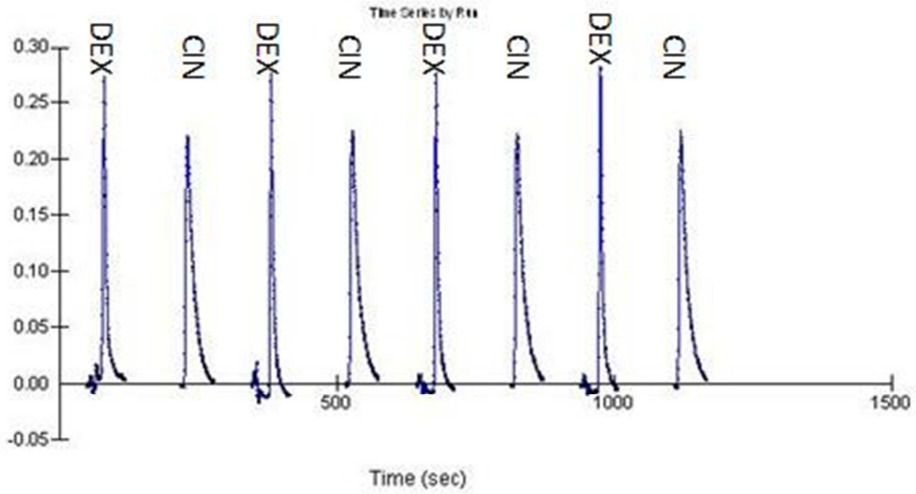
Součástka	Příkaz	Parametr
Dvoucestný ventil pumpy	Poloha OUT	OUT
Selekční ventil	Nastavit do polohy 3	Port 3
Pístová pumpa	Nasát MF o objemu [µl]	500
Pístová pumpa	Nasát MF průtokovou rychlostí [µl/s]	100
Selekční ventil	Nastavit do polohy 1	Port 1
Pístová pumpa	Průtoková rychlost [µl/s]	200
Pístová pumpa	Vyprázdnit MF	
Selekční ventil	Nastavit do polohy 3	Port 3
Pístová pumpa	Nasát MF o objemu [µl]	2000
Pístová pumpa	Nasát MF průtokovou rychlostí [µl/s]	100
Selekční ventil	Nastavit do polohy 6	Port 6
Pístová pumpa	Nasát vzorek o objemu [µl]	10
Pístová pumpa	Nasát MF průtokovou rychlostí [µl/s]	30
Selekční ventil	Nastavit do polohy 7	Port 7
Pístová pumpa	Průtoková rychlost [µl/s]	15
Pístová pumpa	Vyprázdnit pumpu	
Spektrometr	Skenovat při 240 nm	240
Spektrometr	Neskenovat po dobu [s]	Delay 50

5.3 KALIBRAČNÍ KŘIVKA

Kalibrační křivka je grafické znázornění závislosti koncentrace roztoku vzorku na jeho absorbanci.

Ke stanovení linearity bylo připraveno 9 kalibračních roztoků v koncentračním rozmezí 50 - 500 mg/l. Koncentrační roztoky se připravovaly do mobilní fáze ACN/W v poměru (35/65) + 0,1 % TEA. Jejich příprava je zobrazena v kapitole 4.3.4.

Pro každý kalibrační roztok byly vždy provedeny 4 nástřiky na požadovanou kolonu. 4 nástřiky na dlouhou kolonu pro analýzu dexamethasonu s aspirací mobilní fáze ACN/W 35/65 + 0,1 % TEA a 4 nástřiky na krátkou kolonu pro analýzu cinchokainu s aspirací mobilní fáze ACN/W 60/40. Příkladem takové analýzy znázorňuje obrázek 15, na kterém je zachycen celkový záznam 8 nástřiků dexamethasonu a cinchokainu v koncentraci 100 mg/l.



Obr. 15 Chromatogram linearity DEX a CIN o koncentraci 100 mg/l

Pomocí SIA programu byly získány 4 hodnoty absorbancí pro každý analyt, z nichž byla stanovena průměrná hodnota absorbance a ta použita k sestrojení grafu závislosti plochy píku na koncentraci.

Tato závislost byla stanovena metodou lineární regrese a jejími grafickými parametry (korelační koeficient, směrnice kalibrační přímky – regresní koeficient) a znázorněna na následujících grafech a tabulkách. K validaci metody je důležitý parametr korelačního koeficientu, jehož hodnota by podle lékopisu měla být minimálně

0,99. V obou případech, tj. při stanovení dexamethasonu i při stanovení cinchokainu, byla tato podmínka splněna.

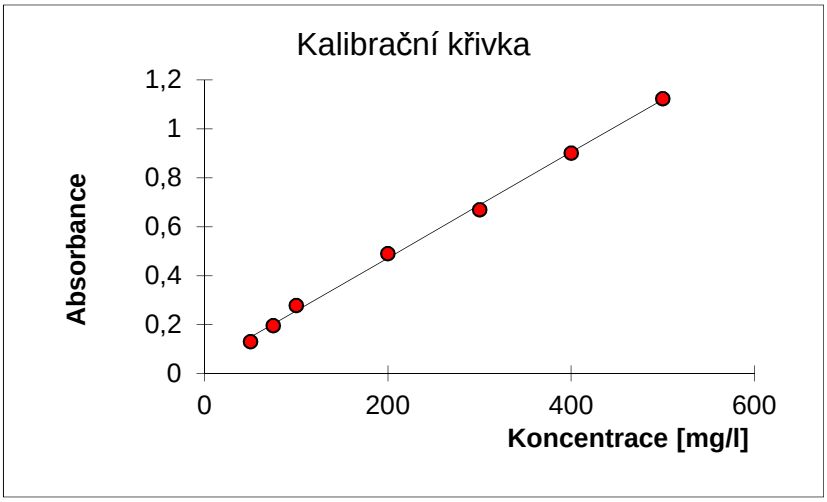
Kalibrační roztoky o koncentraci 50 mg/l, 200 mg/l a 500 mg/l byly ve stejný den a za stejných podmínek měření dále použity pro opakovatelnost.

5.3.1 Kalibrační závislost pro dexamethason

Kalibrační závislost pro dexamethason byla stanovena měřením 7 kalibračních roztoků v koncentracích: 50 mg/l, 75 mg/l, 100 mg/l, 200 mg/l, 300 mg/l, 400 mg/l a 500 mg/l. Grafická závislost koncentrace na absorbanci je znázorněna na Obr.16.

Měřením kalibračních roztoků za daných podmínek byl stanoven korelační koeficient a reziduální odchylka.

- Korelační koeficient – míra vyjádření „těsnosti lineární vazby“
- Reziduální odchylka (chyba predikace) – rozdíl mezi naměřenou a očekávanou hodnotou



Obr.16 Kalibrační křivka pro dexamethason

Tab.4 Parametry lineární regrese pro dexamethason

Statistické parametry pro regresi : y = k x + q				
Počet bodů	n =	7		Odhad chyby
Směrnice	k =	0,00215	±	4,08492E-05
Abs. člen	q =	0,03995	±	0,01153
Korelační koef.	r =	0,99910		
Reziduální odch.	s =	0,01737		

Ve sledovaném koncentračním rozmezí bylo dosaženo hodnot 0,9991 korelačního koeficientu a 0,0174 reziduální odchylky.

V následující tabulce (Tab.5) je přehled koncentrací používaných kalibračních roztoků a jim odpovídajících absorbancí.

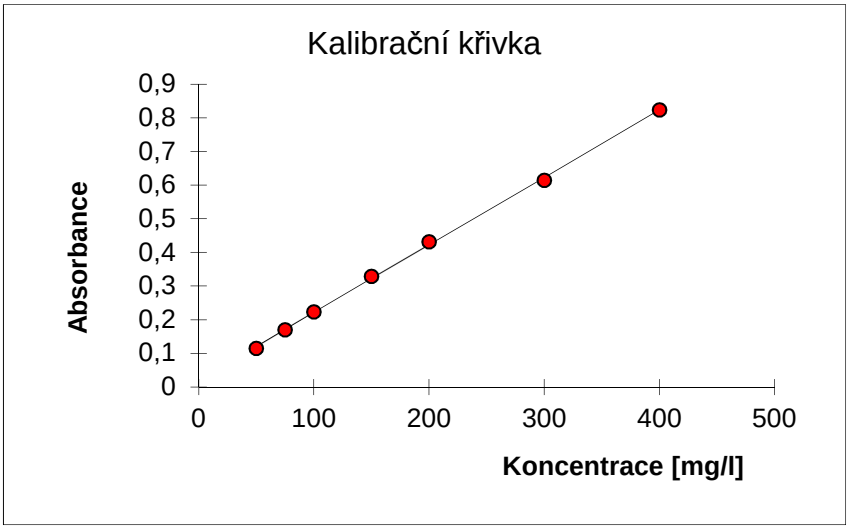
Tab.5 Koncentrace kalibračních roztoků s odpovídající absorbancí

Koncentrace	Absorbance
50	0,130
75	0,196
100	0,278
200	0,490
300	0,670
400	0,901
500	1,123

5.3.2 Kalibrační závislost pro cinchokain

Kalibrační závislost pro cinchokain byla stanovena měřením 7 kalibračních roztoků v koncentracích: 50 mg/l, 75 mg/l, 100 mg/l, 150 mg/l, 200 mg/l, 300 mg/l a 400 mg/l. Grafická závislost koncentrace na absorbanci je znázorněna na Obr.17.

Měřením kalibračních roztoků za daných podmínek byl stanoven korelační koeficient a reziduální odchylka.



Obr.17 Kalibrační křivka pro cinchokain

Tab.6 Parametry lineární regrese pro cinchokain

Statistické parametry pro regresi : y = k x + q				
Počet bodů	n =	7		Odhad chyby
Směrnice	k =	0,00200	±	2,24956E-05
Abs. člen	q =	0,02105	±	0,00488
Korelační koef.	r =	0,99968		
Reziduální odch.	s =	0,00705		

Ve sledovaném koncentračním rozmezí bylo dosaženo hodnot 0,9997 korelačního koeficientu a 0,0071 reziduální odchylky.

V následující tabulce (Tab.7) je přehled koncentrací používaných kalibračních roztoků a k nim odpovídajících absorbancí.

Tab.7 Koncentrace kalibračních roztoků s odpovídající absorbancí

Koncentrace	Absorbance
50	0,114
75	0,170
100	0,223
150	0,328
200	0,431
300	0,614
400	0,823

5.4 OPAKOVATELNOST

Opakovatelnost (Repeatability) metody vyjadřuje těsnost souhlasu mezi výsledky nezávislých měření stejného analytu provedených stejnou metodou, za stejných podmínek měření, stejným pracovníkem, na stejném přístroji a stejném místě. Opakovatelnost je vlastností metody, nikoli výsledku [30].

Opakovatelnost byla provedena na kalibračních roztocích vzorků dexamethasonu a cinchokainu. Vždy v koncentracích: 50 mg/l, 200 mg/l a 500 mg/l.

Tento typ parametru byl proveden v 8 nástřicích pro každou kolonu a každou koncentraci.

Z 8 získaných hodnot absorbance byl vypočítán průměr a směrodatná odchylka (SD). Z těchto dvou získaných hodnot byla dále vypočítaná relativní směrodatná odchylka (RSD).

5.4.1 Směrodatná odchylka

Směrodatná odchylka je kvadratický průměr odchylek hodnot prvku od jejich aritmetického průměru. Jsou-li hodnoty směrodatné odchylky malé, prvky souboru si jsou vzájemně značně podobné. Naopak, jsou-li hodnoty vysoké, vypovídá to o velké vzájemné odlišnosti [31].

Vzorec pro směrodatnou odchylku:

$$s = \sqrt{s^2}$$

5.4.2 Relativní směrodatná odchylka

Relativní směrodatná odchylka (variační koeficient) je relativní mírou přesnosti série paralelních stanovení. Typická je pro ni závislost na koncentraci analytu [32].

RSD = 100*SD / $\bar{x}$ [%)]

SD…..směrodatná odchylka

$\bar{x}$ …..průměr hodnot

5.4.3 Opakovatelnost pro koncentraci 50 mg/l

Opakovatelnost roztoků vzorků dexamethasonu a cinchokainu o koncentraci 50 mg/l probíhala za stejných (optimalizovaných) podmínek, jako analýza kalibrační křivky.

Naměřené hodnoty absorbance a vypočítané hodnoty opakovatelnosti měření pro jednotlivé látky o koncentraci 50 mg/l jsou zachyceny v tabulce 8.

Tab.8 Opakovatelnost pro koncentraci 50 mg/l

číslo analýzy	DEX	CIN
1	0,127	0,116
2	0,129	0,117
3	0,131	0,112
4	0,134	0,110
5	0,123	0,111
6	0,128	0,111
7	0,124	0,112
8	0,123	0,112
SD	**0,00**	**0,00**
Průměr	**0,13**	**0,11**
RSD (%)	**3,10**	**2,26**

5.4.4 Opakovatelnost pro koncentraci 200 mg/l

Opakovatelnost pro roztoky dexamethasonu a cinchokainu o koncentraci 200 mg/l probíhala opět za stejných podmínek, jako pro koncentraci 50 mg/l.

Naměřené hodnoty absorbance a vypočítané hodnoty opakovatelnosti měření pro jednotlivé látky v koncentraci 200 mg/l jsou uvedeny v tabulce 9.

Tab.9 Opakovatelnost pro koncentraci 200 mg/l

číslo analýzy	DEX	CIN
1	0,484	0,427
2	0,494	0,431
3	0,480	0,435
4	0,499	0,433
5	0,494	0,429
6	0,473	0,429
7	0,490	0,429
8	0,477	0,426
SD	**0,01**	**0,00**
Průměr	**0,49**	**0,43**
RSD (%)	**1,88**	**0,66**

5.4.5 Opakovatelnost pro koncentraci 500 mg/l

Za dodržení předepsaných podmínek měření byly získány hodnoty absorbance a z nich vypočítány hodnoty opakovatelnosti pro jednotlivé látky v koncentracích 500 mg/l. Uvedené ilustruje tabulka 10.

Tab.10 Opakovatelnost pro koncentraci 500 mg/l

číslo analýzy	DEX	CIN
1	1,098	0,942
2	1,105	0,952
3	1,165	0,950
4	1,122	0,949
5	1,135	0,948
6	1,145	0,950
7	1,160	0,944
SD	**0,03**	**0,00**
Průměr	**1,13**	**0,95**
RSD (%)	**2,29**	**0,37**

5.5 PŘESNOST A STANOVENÍ OBSAHU ÚČINNÝCH LÁTEK

Pro stanovení přesnosti v ušních kapkách Otobacid N bylo připraveno 7 vzorků pro analýzu dexamethasonu a 7 vzorků pro analýzu cinchokainu do 5ml odměrné baňky. Příprava těchto vzorků je popsána v kapitole 4.3.7.:

DEX: 1:1 → 2,5 ml kapek + 2,5 ml MF + 0,1 % TEA

CIN: 1:25 → 200 µl kapek + 4,8 ml MF + 0,1 % TEA

Pojem přesnost měření je definován jako těsnost shody mezi naměřenou hodnotou veličiny a pravou hodnotou měřené veličiny [33].

Parametr přesnosti poukazuje na preciznost celé metody, a to od přípravy samotného vzorku až po získání výsledků. Výsledkem této metody je relativní směrodatná odchylka RSD získaná ze 7 analýz stanovení procentuálního obsahu účinných látek v ušních kapkách Otobacid N.

Výsledky jednotlivých měření pro stanovení obsahu účinných látek a hodnoty RSD jsou znázorněny v tabulce 11. Hodnoty jsou vyjádřeny jako % deklarovaného množství látky v přípravku.

Tab. 11 Výsledky přesnosti měření

VZOREK	CIN (%)	DEX (%)
A	98,50	95,60
B	103,50	96,70
C	102,60	96,33
D	101,70	96,00
E	100,60	102,00
F	101,00	102,10
SD	**1,74**	**3,06**
Průměr	**101,32**	**98,12**
RSD	**1,72**	**3,12**

5.6 VÝTĚŽNOST (SPRÁVNOST)

Termín správnost vyjadřuje míru shody výsledků mezi změřenou hodnotou a skutečnou/specifickou hodnotou měřené veličiny [33].

Správnost je kombinací přesnosti a pravdivosti a její výsledky poukazují na přítomnost či nepřítomnost náhodných chyb měření.

Roztoky vzorků výtěžnosti byly připraveny dle rozpisu v kapitole 4.3.8.

Z hodnot výtěžnosti pro dexamethason a cinchokain, které se udávají v %, byla získána hodnota RSD (relativní směrodatná odchylka). Získané hodnoty jsou zachyceny v tabulce 12.

Vzorec pro stanovení výtěžnosti:

% = A (látky) / A (standardu) * 100

- A – absorbance

Tab. 12 Výsledky výtěžnosti měření

VZOREK	CIN (%)	DEX (%)
1	100,70	99,40
2	99,88	97,40
3	97,46	96,30
4	97,62	100,50
5	102,50	103,30
6	98,73	97,20
SD	**1,94**	**2,61**
Průměr	**99,48**	**99,02**
RSD	**1,95**	**2,63**

5.6.1 Stručný přehled validace metody

V následující tabulce 13 je stručně popsaná validace celé metody 2D-SIC.

Tab. 13 Parametry validace 2D-SIC

Parametr	DEX	CIN
Kalibrační rozmezí (mg/l)	50 - 500	50 – 400
Korelační koeficient	0,99912	0,99969
Opakovatelnost RSD (%)	1,88 - 3,10	0,37 - 2,26
Přesnost RSD (%)	3,12	1,72
Průměrná výtěžnost (%) ± SD	99,02 ± 2,61	99,48 ± 1,94

6 ZÁVĚR

Pro separaci a identifikaci analytů dexamethasonu a cinchokainu ve farmaceutickém přípravku Otobacid N (Haupt Pharma Amareg GmbH) byly optimalizovány a validovány vhodné podmínky separace pro metodu dvoudimenzionální sekvenční injekční chromatografie (2D-SIC).

Jako optimální podmínky měření metodou 2D-SIC byly zvoleny:

Dlouhá kolona: Chromolith Flash, RP-18e 25-4,6 mm
Krátká kolona: Chromolith Flash, RP-18e 10-4,6 mm
Předkolona: Chromolith, RP-18e 5-4,6 mm
Dávkování: 20 µl DEX, 10 µl CIN
Průtoková rychlost: 0,9 ml/min
Detekce: 240 nm
Mobilní fáze pro dlouhou kolonu: acetonitril/voda (35/65)
Mobilní fáze pro krátkou kolonu: acetonitril/voda (60/40)
Typ eluce: izokratická

Korelační koeficient linearity pro dexamethason byl stanoven na hodnotu $r^2 = 0{,}99912$ a pro cinchokain na hodnotu $r^2 = 0{,}99969$, což jsou hodnoty, které odpovídají požadavkům dle lékopisu. Lékopis stanovuje hodnotu korelačního koeficientu minimálně 0,99. Hodnoty koeficientů byly získány měřením kalibrační řady v rozmezí 50 – 500 mg/l pro dexamethason a 50 – 400 mg/l pro cinchokain.

Relativní směrodatné odchylky (RSD) opakovatelnosti pro dexamethason činily 3,10 %; 1,88 %; 2,29 % a pro cinchokain 2,26 %; 0,66 %; 0,37 %. Opakovatelnost měření se prováděla s roztoky analytů o koncentraci 50 mg/l, 200 mg/l a 500 mg/l.

Relativní směrodatné odchylky (RSD) přesnosti metody byly stanoveny na hodnoty pro dexamethason 3,12 % a pro cinchokain 1,72 %.

Výtěžnost metody stanovená v procentech (%) dosahovala pro dexamethason 99,02 % s 2,63 směrodatné odchylky a pro cinchokain 99,48 % s 1,94 směrodatné odchylky.

Ze získaných hodnot měření je patrné, že metodu dvoudimenzionální sekvenční injekční chromatografie lze použít pro separaci a identifikaci dvou chemicky odlišných

látek. Separované látky na dvou kolonách mezi sebou vzájemně neinterferují, což potvrzují i získané výsledky validace metody.

7 LITERATURA

1. RŮŽIČKA J., HANSEN E.H., *Peer Reviewed: Flow Injection Analysis: From Beaker to Microfluidics*, Analytical Chemistry. 2000, Vol. 72, s. 212-217 (citováno: 23. 1. 2013)

2. *Průtoková injekční analýza se spektrofotometrickou detekcí* [online]. (citováno: 23. 1. 2013). Dostupné z: http://web.natur.cuni.cz/analchem/pprakt/fia.pdf

3. ŠATINSKÝ D., Habilitační práce: Využití chromatografických sorbentů v sekvenční injekční analýze, FaF UK, katedra analytické chemie, 2008

4. KOLEV S. D., MCKELVIE I. D., *Advances in Flow injection analysis and related techniques*, Comprehensive Analytical Chemistry. 2008, Vol. 54, s. 761 (citováno: 18. 1. 2013)

5. ECONOMOU A., *Sequential-injection analysis (SIA): A useful tool for on-line sample-handling and pre-treatment*, Laboratory of Analytical Chemistry. 2005, Vol. 24, s. 416-425 (citováno: 25. 1. 2013)

6. RŮŽIČKA J., MARSHALL G.D., *Sequential injection: a new koncept for chemical sensors, process analysis and laboratory assays*, Analytica Chimica Acta. 1990, Vol. 237, s. 329-343 (citováno: 24. 1. 2013)

7. PASEKOVÁ H., POLÁŠEK M., SOLICH P., *Sekvenční injekční analýza*, Chemické listy. 1999, Vol. 93, s. 354-359 (citováno: 25. 1. 2013)

8. *Sekvenční injekční analýza* [online]. (citováno: 15. 4. 2013). Dostupné z: http://web.natur.cuni.cz/analchem/pprakt/sia_dus.pdf

9. HANSEN E.H., WANG J., *Implementation of suitable flow injection/sequential injection-sample separation/preconcentrations chemes for determination of trace*

metal concentrations using detection by electrothermal atomic absorption spectrometry and inductively coupled plasma masss pectrometry, Analytica Chimica Acta. 2002, Vol. 467, s. 3–12 (citováno: 22. 1. 2013)

10. *Separační metody v analytické chemii*[online]. (citováno: 31. 1. 2013). Dostupné z: *http*://users.prf.jcu.cz/sima/analyticka_chemie/separa.htm

11. ZACHARIS C. K., VERDOUKAS A., TZANAVARAS P. D., THEMELIS D. G., *Automated sample preparation coupled to sequential injection chromatography: On-line filtration and dilution protocols prior to separation*, Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. 2009, Vol. 49, s. 726-732 (citováno: 25. 1. 2013)

12. CHOCHOLOUŠ P., ŠATINSKÝ D., SOLICH P., *Sekvenční injekční chromatografie-nový směr v průtokových metodách*, Chemické listy. 2008, Vol. 102, s. 179-264 (citováno: 25. 1. 2013)

13. CHOCHOLOUŠ P., SOLICH P., ŠATINSKÝ D., *Anoverview of sequential injection chromatography*, Analytica Chimica Acta. 2007, Vol. 600, s. 129-135 (citováno: 25. 1. 2013)

14. ŠATINSKÝ D., HUCLOVÁ J., SOLICH P., KARLÍČEK R., *Reversed-phase porous silica rods, alternative approach to high-performance liquid chromatographic separation using the sequential injection chromatography technice*, Journal of Chromatography A. 2003, Vol. 1015, s. 239-244 (citováno: 26. 1. 2013)

15. CHOCHOLOUŠ P., ŠATINSKÝ D., SKLENÁŘOVÁ H., SOLICH P., *Two – column Sequential Injection Chromatography – New approach for fast and effective analysis and its comparison with gradient elution chromatography*, Analytica Chimica Acta. 2010, Vol. 668, s. 61-66 (citováno: 27. 1. 2013)

16. *Otobacid N* [online]. (citováno: 31. 1. 2013). Dostupné z: http://farmaceutika.info/otobacid-n

17. *Příbalová informace, Příloha č. 2 ke sdělení sp.zn.sukls145564/2011* [online]. (citováno: 31. 1. 2013). Dostupné z: http://www.sukl.cz/download/pil/PI21122.pdf

18. *Dexamethason* [online]. (citováno: 31. 1. 2013). Dostupné z: http://de.wikipedia.org/wiki/Dexamethason

19. Český lékopis 2009 (ČL 2009), 2. díl, Praha (2009), Grada Publishing, a.s., s. 1705 a 1850 (citováno: 5. 2. 2013)

20. *Dexamethason v současné terapii* [online]. Edukafarm 2010. MLYNÁŘ P., MLYNÁŘOVÁM., ŠRÁMEK D., (citováno: 7. 2. 2013). Dostupné z: http://www.edukafarm.cz/soubory/farminews-2010/3/dexasmetason.pdf

21. *Dibucaine hydrochloride* [online]. RNDr. František Kratochvíl, DrSc. (citováno: 5. 2. 2013). Dostupné z: http://www.epitesty.cz/pasports/D%20005%20A.pdf

22. RAY J. A., KUSHNIR M.M., ROCKWOOD A.L., MEIKLE A.W., *Analysis of cortisol, cortisone and dexamethasone in human serum using liquid chromatography tandem masss pectrometry and assessment of cortisol: Cortisone ratios in patients with impaired kidney function,* Clinica Chimica Acta. 2011, Vol. 412, s. 1221-1228 (citováno: 5. 3. 2013)

23. ABDEL-GHANI N.T., YOUSSEF A.F.A., AWADY M.A., *Cinchocaine hydrochloride determination by atomic absorption spectrometry and spectrophotometry,* IL Farmaco. 2005, Vol. 60, s. 419-424 (citováno: 5. 3. 2013)

24. SALEH G.A., ASKAL H.F., *Spectrophotometric determination of certain local anaesthetics in pharmaceutical preparation,* Analytical Letters. 1995, Vol. 28, s. 2663-2671 (citováno: 6. 3. 2013)

25. EL-GINDY A., KORANY M.A., BEDAIR M.F., *First derivative spectrophotometric and high-performance liquid chromatographic determination of cinchocaine hydrochloride in presence of its acid degradation product,* Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. 1998, Vol. 17, s. 1357-1370 (citováno: 5. 3. 2013)

26. DÉSI E., KOVÁCS A., PALOTAI Z., KENDE A., *Analysis of dexamethasone and prednisolone residues in bovine milk using matrix solid phase dispersion-liquid chromatography with ultraviolet detection,* Microchemical Journal. 2008, Vol. 89, s. 77-81 (citováno: 19. 3. 2013)

27. ZIVANOVIC L., ZECEVIC M., MARKOVIC S., PETROVIC S., IVANOVIC I., *Validation of liquid chromatographic method for analysis of lidocaine hydrochloride, dexamethasone acetate, calcium dobesilate, buthylhydroxyanisol and degradation product hydroquinone in suppositories and ointment,* Journal of Chromatography A. 2005, Vol. 1088, s. 182-186 (citováno: 19. 3. 2013)

28. ANDERSEN J.H., HANSEN H.G., PEDERSEN M., *Optimization of solid phase extraction clean up and validation of quantitative determination of corticosteroids in urine by liquid chromatography-tandem mass spectrometry,* Analytica Chimica Acta. 2008, Vol. 617, s. 216-224 (citováno: 20. 3. 2013)

29. WEIZENMANN N., HUSTER D., SCHEIDT H.A., *Interaction of local anesthetics with lipid bilayers investigated by H MAS NMR spectroscopy,* Biochimica et Biophysica Acta. 2012, Vol. 1818, s. 3010-3018 (citováno: 25. 3. 2013)

30. *Metrologická terminologie v chemii* [online]. (citováno: 11. 12. 2012). Dostupné z*:* http://www.vscht.cz/lam/new/barekterminologie2000_07_01.pdf

31. *Směrodatná odchylka* [online]. (citováno: 31. 1. 2013). Dostupné z: http://cs.wikipedia.org/wiki/Sm%C4%9Brodatn%C3%A1_odchylka

32. *Matematicko statistické parametry analytických výsledků* [online]. (citováno: 31. 1. 2013). Dostupné z: http://web.vscht.cz/poustkaj/Matematicko%20statisticke%20parametry.htm

33. *Metrologická terminologie* [online]. (citováno: 8. 1. 2013). Dostupné z: http://www.sekk.cz/terminologie/Text/Terminologie.htm

34. Sigma Aldrich [online]. (citováno: 30. 1. 2013). Dostupné z: http://www.sigmaaldrich.com/technical-service-home/product-catalog.html