

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

KATEDRA ANALYTICKÉ CHEMIE

**VÝVOJ HPLC METODY PRO STANOVENÍ
HOMATROPINU A SKOPOLAMINU V OČNÍCH
KAPKÁCH**

RIGORÓZNÍ PRÁCE

**KONZULTANT RIGORÓZNÍ PRÁCE
Hradec Králové 2014**

**PharmDr. Ludmila Matysová, Ph.D.
Mgr. Barbora Sohrová**

Děkuji PharmDr. Ludmile Matysové, Ph.D. za odborné vedení, cenné rady a pomoc při vypracování rigorózní práce.

Prohlašuji, že tato rigorózní práce je mým autorským dílem, které jsem vypracovala samostatně. Literatura a zdroje, z nichž jsem při zpracování práce čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury. Tato práce nebyla použita k získání stejného nebo jiného titulu.

Mgr. Barbora Sohrová

Abstrakt

Univerzita Karlova v Praze

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra analytické chemie

Kandidát: Mgr. Barbora Sohrová

Konzultant: PharmDr. Ludmila Matysová, Ph.D.

Název rigorózní práce: Vývoj HPLC metody pro stanovení homatropinu a skopolaminu v očních kapkách

Byla vyvinuta a validována metoda pro stanovení homatropin-hydrobromidu a jeho degradačního produktu- skopolamin-hydrobromidu v očních kapkách o koncentraci 1% (s chloridem sodným), 2% (s chloridem sodným) a 2% (s pufrém F 6,45) účinné látky.

V průběhu vývoje metody byly testovány různé mobilní i stacionární fáze. Pro validaci byla použita kolona Ascentis Express F5 (100 x 4,6 mm, 2,7 μ m). Mobilní fázi tvořila směs acetonitrilu a fosfátového pufru v poměru 9:91 (V/V). Fosfátový pufr obsahoval 3,12% vodný roztok dihydrogenfosforečnanu sodného dihydrátu a 200 μ l triethylaminu. PH pufru bylo upraveno kyselinou fosforečnou 85% na hodnotu 2,5. Na kolonu bylo dávkováno 5 μ l analyzovaného roztoku, analýza probíhala při průtokové rychlosti 1,1 ml/min a detekci v UV oblasti při 210 nm. Čas analýzy nepřesáhl 6,5 minuty.

Analyzovaný roztok obsahoval roztok standardu homatropin-hydrobromidu o koncentraci 25 mg/100 ml a jeho degradační produkt skopolamin-hydrobromid o koncentraci 0,5 mg/100 ml.

Vyvinutá metoda byla kompletně validována a byl vypracován test vhodnosti chromatografického systému. Dále byly hodnoceny validační parametry: přesnost, správnost, selektivita, linearita, robustnost, stabilita a limit detekce. Validace metody poskytla přesné a správné výsledky a je možné využít metodu pro rutinní analýzu v laboratoři.

Abstract

Charles University in Prague

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Analytical Chemistry

Candidate: Mgr. Barbora Sohrová

Consultant: PharmDr. Ludmila Matysová, Ph.D.

Thesis Title: Development of HPLC method for the determination of homatropine and scopolamine in eye drops

High performance liquid chromatography (HPLC) method for the determination of homatropine hydrobromide and its degradation product-scopolamine hydrobromide in eye drops at a concentration of 1% (with sodium chloride), 2% (with sodium chloride) and 2% (with buffer F 6.45) active substance was developed.

During the development of the method, various mobile and stationary phases were tested. For the validation was chosen column Ascentis Express F5 (100 x 4.6 mm, 2.7 μm). The mobile phase was composed of acetonitrile and phosphate buffer in a ratio of 9:91 (V/V). Phosphate buffer contained 3.12% aqueous solution of sodium dihydrogen phosphate dihydrate and 200 μl of triethylamine. Buffer pH was adjusted with phosphoric acid 85% to the value 2.5. Injection volume was 5 μl , flow rate was 1.1 ml/min and UV detection was performed at a wavelength of 210 nm. Analysis time was less than 6.5 minutes.

Analyzed solution contained standard solution homatropine hydrobromide at a concentration of 25 mg/100 ml, and its degradation product scopolamine hydrobromide at a concentration of 0.5 mg/100 ml.

The developed method was completely validated and test suitability of the chromatographic system has been worked out. Validation parameters were evaluated: precision, accuracy, selectivity, linearity, robustness, stability and detection limit. Validation method provides precise and accurate results; it is suitable for using in the routine analysis in the control laboratory.

Obsah

OBSAH	6
1 ÚVOD	11
2 CÍL A ZADÁNÍ PRÁCE	12
3 TEORETICKÁ ČÁST	13
3.1 VYSOKOÚČINNÁ KAPALINOVÁ CHROMATOGRFIE	13
3.1.1 <i>Klasifikace HPLC metod</i>	13
3.1.2 <i>Instrumentace</i>	18
3.1.3 <i>Validace HPLC metody</i>	25
3.2 PARASYMPATOLYTIKA.....	28
3.2.1 <i>Účinek parasimpatolytik</i>	28
3.2.2 <i>Mydriatika a cykloplegika</i>	29
3.3 HOMATROPINI HYDROBROMIDUM	30
3.3.1 <i>Charakteristika</i>	30
3.4 SCOPOLAMINI HYDROBROMIDUM	31
3.4.1 <i>Charakteristika</i>	31
3.5 REŠERŠE PUBLIKOVANÝCH HPLC METOD	32
3.5.1 <i>Lékopisná metoda pro stanovení příbuzných látek v surovině homatropin-hydrobromid</i>	32
3.5.2 <i>HPLC metoda pro stanovení prednisolonu, prednisolon-fosfát sodné soli, homatropinu a atropinu</i>	32
3.5.3 <i>HPLC stanovení atropinu a atropinu podobných alkaloidů pomocí konduktometrického detektoru</i>	33
3.5.4 <i>Stanovení atropin-sulfátu a benzalkonium-chloridu v očních kapkách</i>	33
3.5.5 <i>Stanovení atropinu a skopolaminu za použití fenylové kolony</i>	33
3.5.6 <i>HPLC stanovení atropinu, detekovaného fluorimetrickým detektorem</i>	34
3.5.7 <i>Stanovení atropinu, jeho degradačních produktů a příbuzných látek pomocí HPLC</i>	34
3.5.8 <i>HPLC stanovení atropinu s použitím elektrochemické detekce</i>	34

3.5.9	<i>HPLC stanovení atropinu v plasmě</i>	35
3.5.10	<i>HPLC analýza atropin-sulfátu a skopolamin-N-butylbromidu ve farmaceutických přípravcích a biologických tekutinách</i>	35
3.5.11	<i>HPLC stanovení tropanových alkaloidů z krmiva a biologických vzorků</i>	35
3.5.12	<i>HPLC stanovení atropinu a skopolaminu v extraktu z pablenu</i>	36
4	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	37
4.1	POUŽITÉ MATERIÁLY A POMŮCKY	37
4.1.1	<i>Standardy, vzorky, chemikálie</i>	37
4.1.2	<i>HPCL přístroj, podmínky separace</i>	38
4.1.3	<i>Další přístroje</i>	38
4.1.4	<i>Oční kapky</i>	39
4.2	PŘÍPRAVA ROZTOKŮ	40
4.2.1	<i>Příprava rozpouštěcí směsi</i>	40
4.2.2	<i>Příprava zásobního roztoku standardu skopolamin-hydrobromidu</i>	40
4.2.3	<i>Příprava zásobního roztoku standardu homatropin-hydrobromidu</i>	40
4.2.4	<i>Příprava směsného roztoku standardů homatropin-hydrobromidu a skopolamin-hydrobromidu</i>	40
4.2.5	<i>Příprava kalibračních roztoků skopolamin-hydrobromidu pro stanovení linearity</i>	41
4.2.6	<i>Příprava kalibračních roztoků homatropin-hydrobromidu pro stanovení linearity</i>	41
4.2.7	<i>Příprava mobilní fáze</i>	42
5	VÝSLEDKY A DISKUZE	43
5.1	OPTIMALIZACE METODY	43
5.1.1	<i>Výběr vlnové délky pro detekci UV detektorem</i>	43
5.1.2	<i>Výběr mobilní fáze</i>	43
5.1.3	<i>Výběr stacionární fáze</i>	45
5.1.4	<i>Optimální chromatografické podmínky</i>	48
5.2	VÝSLEDKY VALIDACE	49
5.2.1	<i>Test vhodnosti chromatografického systému</i>	49

5.2.2	<i>Validace metody</i>	52
6	ZÁVĚR	72
7	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	73

SEZNAM ZKRATEK

a	plocha píku / koncentrace nečistoty v mg/1000 ml
A	plocha píku / koncentrace stanovené látky v mg/100 ml
A ₀	plocha píku v čase přípravy
A _n	vložená plocha píku
A _R	poměr ploch píků při měření robustnosti
A _S	faktor symetrie
ACN	acetonitril
AV-blok	atrioventrikulární blok
c	naměřená koncentrace
c ₀	vložená koncentrace
C8 kolona	silikagelová kolona s 8 mi uhlíkatým postranním řetězcem
C18 kolona	silikagelová kolona s 18 ti uhlíkatým postranním řetězcem
ČL	Český lékopis
F5 kolona	pentafluorofenylová kolona
F pufr	fosfátový pufr
GIT	gastrointestinální trakt
HIC	hydrofobní interakční chromatografie
HILIC	hydrofilní interakční chromatografie
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
HS F5	pentafluorofenylpropylová kolona
CHOPN	chronická obstrukční plicní nemoc
IS	vnitřní standard
K	plocha píku / výška píku stanovené látky
LOD	detekční limit
LOQ	kvantitativní limit
M receptor	muskarinový receptor
MEKC	micelární elektrokinetická chromatografie
MF	mobilní fáze
MLC	micelární kapalinová chromatografie
m	hmotnost
n	počet členů

NaCl	chlorid sodný
r^+	největší kladná amplituda šumu
r^-	největší záporná amplituda šumu
R	koeficient korelace
R_i	výtěžnost
R_s	rozlišení
RSD	relativní směrodatná odchylka
SD	směrodatná odchylka
s_n	směrodatná odchylka šumu $s_n=(r^+-r^-)/5$
S_T	faktor stability
t_R	retenční čas
x	průměr hodnot
z	náboj molekuly

1 ÚVOD

Homatropin-hydrobromid se řadí mezi parasymptolytika a v očním lékařství je používán díky schopnosti antagonizovat účinky acetylcholinu na muskarinových receptorech. Díky těmto účinkům dojde v oku k rozšíření zornice a paralýze ciliárního svalu.

Oční kapky s homatropin-hydrobromidem se používají k vyvolání cykloplegie a jako součást terapie uveitidy [1].

Hlavním požadavkem při vývoji nové analytické metody byla schopnost stanovení homatropin-hydrobromidu i jeho degradačního produktu, skopolamin-hydrobromidu. Bylo nutné, aby metoda byla proveditelná v běžných laboratorních podmínkách, nevyžadovala složitou přípravu analytických vzorků a nebyla časově náročná. Vyvinutá HPLC metoda splňuje všechny požadavky a celková analýza nepřesahuje 6,5 minuty.

2 CÍL A ZADÁNÍ PRÁCE

Cílem rigorózní práce byl vývoj metody pro HPLC stanovení homatropin-hydrobromidu v očních kapkách o koncentraci 1% (s chloridem sodným), 2% (s chloridem sodným) a 2% (s pufrém F 6,45). Následně byla provedena validace metody prokazující správnost, přesnost, linearitu metody a vhodnost pro zamýšlené použití.

3 TEORETICKÁ ČÁST

3.1 Vysokoučinná kapalinová chromatografie

HPLC je v současnosti jedna z nejprogresivnějších analytických metod. Je to separační metoda umožňující dělení směsi látek na adsorpční koloně v průtokovém systému. HPLC umožňuje kvalitativní i kvantitativní hodnocení separovaných složek směsi s vysokou citlivostí, selektivitou a v relativně krátkém čase za využití velmi malého množství vzorku. Z HPLC záznamu je možné získat informace o identitě, čistotě a obsahu stanovované látky [2,3].

3.1.1 Klasifikace HPLC metod

3.1.1.1 Klasifikace HPLC metody na základě mechanismu retence

- a) Normální systém fází- normální systém fází značí systém, ve kterém je stacionární fáze více polární než fáze mobilní. Tato metoda se používá pro analýzu látek rozpustných v nepolárních rozpouštědlech [3,4].

- b) Reverzní systém fází- reverzní systém fází je mnohem rozšířenější, umožňuje separaci velkého množství látek s různými skupinami. Analýza je provedena v systému obsahující nepolární stacionární fázi a polární mobilní fázi. Jako mobilní fáze se používá nejčastěji směs vodné složky (voda, zředěné vodné roztoky kyselin nebo bazí, pufrů) s polárními organickými rozpouštědly mísitelnými s vodou [3,4,5].

3.1.1.2 Klasifikace HPLC metody na základě principu separace

K separaci látek pomocí HPLC lze využít všech vratných dvoufázových separačních postupů: adsorpci, rozdělování, iontovou výměnu a síťový efekt gelu. Díky tomu je možná separace všech organických látek rozpustných ve vodě, zředěných kyselinách nebo organických rozpouštědlech [6].

- a) Adsorpční chromatografie- principem separace je různá adsorbovatelnost separovaných látek na povrch absorbentu.
- b) Rozdělovací chromatografie- podstatou separace je rozdílná rozpustnost dělených látek ve dvou vzájemně nemísitelných kapalinách, přičemž kapalina použitá jako stacionární fáze je zakotvena na vhodném nosiči.
- c) Iontově výměnná chromatografie- k separaci látek dochází na základě různé afinity dělených látek (iontů) k iontovýměnným skupinám iontoměniče. U této chromatografie je nutná přítomnost iontoměniče jako stacionární fáze.
- d) Gelová chromatografie- při gelové chromatografii dochází k separaci látek na základě různé velikosti molekul. Směs látek je nesena mobilní fází kolonou naplněnou polymerní stacionární fází, přičemž malé molekuly pronikají do pórů a jsou při eluci zbrzdovány a velké molekuly vychází z kolony bez zdržení [2].
- e) Afinitní chromatografie- tato metoda je založena na schopnosti biologicky aktivních látek vytvářet reverzibilní komplexy se specifickým ligandem navázaným na specifický nosič. V koloně po nanesení vzorku dojde k tvorbě komplexu, zatímco ostatní látky jsou z kolony vymyty. Po nanesení tlumivého roztoku nebo specifického protiligandu dojde k uvolnění a vymytí dané biomolekuly [7].
- f) Hydrofilní interakční chromatografie (HILIC)- HILIC je chromatografická metoda, při které analyty interagují s hydrofilní stacionární fází a eluce je prováděna relativně hydrofobní mobilní fází obsahující vodnou složku jako silné eluční činidlo. Mechanismus zodpovědný za separaci není plně objasněn, ale je považován za komplexní.

g) Vícemodální chromatografie- takto je definována separace, která umožňuje současně ovlivňovat více než jeden významný separační mechanismus. U stacionárních fází se uplatňuje především iontová síla mobilní fáze, která určuje výměnu iontů, pH mobilní fáze, které ovlivňuje ionizaci stacionární fáze a analytů, a hydrofobicita, která ovlivňuje hydrofobní interakce. Stacionární fáze mají jako základ hydrofobní skelet, do něhož jsou včleněny kladně nebo záporně nabitě funkční skupiny. U vícemodálních stacionárních fází mohou být uplatněny mechanismy rozdělování, elektrostatické interakce a HILIC [5].

h) Micelární kapalinová chromatografie (MLC) a micelární elektrokinetická chromatografie (MEKC)- pro úspěšnou separaci je nutné, aby v mobilní fázi nebo v pracovním elektrolytu vznikly micely. Vznik micel závisí na koncentraci tenzidu v rozpouštědle.

-v MLC micely slouží jako úplná nebo částečná náhrada polárního organického rozpouštědla ve vodně-organické mobilní fázi v systémech s reverzní fází. Princip separace je založen na rozdělování analyzovaných látek mezi třemi fázemi: vodnou fází, micelární pseudofází a stacionární fází pokrytou tenzidem. V MLC systémech dochází k adsorpci tenzidu na stacionární fázi. Největší výhoda MLC se projeví při stanovení látek v biologickém materiálu, kdy odpadá problém s úpravou vzorků před analýzou. Micely solubilizují bílkovinnou matici, takže nedochází k ucpání kolony maticí.

-MEKC je elektromigrační technika využívající micely pro separaci neiontových látek. Pro separaci je nutné přidání tenzidu do pracovního elektrolytu, nejčastěji anionického tenzidu. V elektrolytu vznikají negativně nabitě micely, které v elektrickém poli migrují směrem k anodě [5,8].

- i) Hydrofobní interakční chromatografie (HIC)- tato separační metoda používá vodnou mobilní fázi bez přídavku organických rozpouštědel. Retence analytů je ovlivňována přídavkem organických nebo anorganických solí do vody. HIC byla primárně použita pro separaci proteinů, protože přítomnost organických rozpouštědel v mobilní fázi vede k jejich denaturaci [5].
- j) Chirální chromatografie- separace enantiomerů není možná na běžných stacionárních fázích, pro její realizaci je nutné použití chirálního selektoru. Vznik diastereoizomerů, které dovolují separaci páru enantiomerů, je možné uskutečnit dvěma způsoby:
- přímá separace- je separace za vzniku transitního diastereoizomeru, který vzniká mezi chirální stacionární fází nebo chirálním selektorem v mobilní fázi a enantiomerem.
 - nepřímá separace- diastereoizomer vzniká chemickou reakcí mezi chirálním činidlem a párem enantiomerů. Chirální derivatizace probíhá reakcí chirální molekuly s chirálním derivatizačním činidlem na dva diastereomerní deriváty, které mohou být separovány pomocí konvenční chromatografie [5].

3.1.1.3 Klasifikace HPLC dle kontinuity mobilní fáze

- a) Isokratická eluce- při isokratické eluci dochází od začátku do konce k separaci pomocí mobilní fáze se stále stejnými vlastnostmi. Je vhodná pro separaci látek se stejnou afinitou ke stacionární fázi, kdy jsou separovány rychle jedna za druhou.
- b) Gradientová eluce- při gradientové eluci dochází k průběžné změně složení mobilní fáze, čehož se využívá k dosažení separace směsi obsahující látky s různou afinitou ke stacionární fázi. Na začátku analýzy se používá mobilní fáze s nízkou eluční silou, později se tato fáze mění na mobilní fázi s vyšší eluční silou [3].

3.1.1.4 Klasifikace HPLC dle typu analýzy

a) Kvalitativní analýza- kvalitativní analýza slouží pro identifikaci složek směsi. Pro identifikaci jsou důležitá data jako retenční čas, retenční objem a retenční index. Nejvýhodnější postup pro identifikaci látek je porovnání retenčních charakteristik daného píku s údaji standardních látek [6].

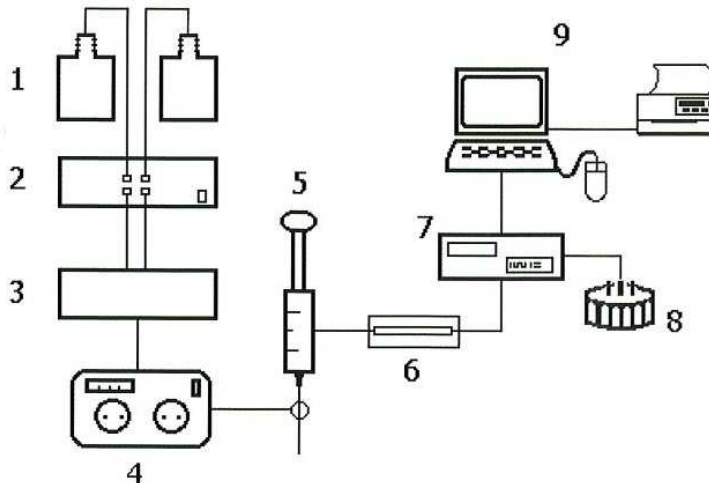
b) Kvantitativní analýza- kvantitativní zastoupení určité látky ve směsi je dáno plochou pod píkem dané látky, popřípadě srovnání výšek píků látky a standardu, což je možné pouze v případě absolutně symetrických píků. Pro stanovení se používají dvě metody [6]:

-metoda vnějšího standardu- analýza spočívá ve dvou krocích. Nejprve se na kolonu dávkuje roztok analyzovaného vzorku a poté se nastříkne roztok vnějšího standardu. Jako vnější standard se nejčastěji používá standard stanovované látky nebo u složených přípravků jedna ze složek dané směsi. Koncentrace látek se vypočítá z poměru ploch (výšek) píků stanovovaných látek a vnějších standardů.

-metoda vnitřního standardu- při stanovení metodou vnitřního standardu se ke známému objemu roztoku vzorku přidá definovaný objem roztoku vnitřního standardu a nastříkne se na kolonu. Vnitřní standard musí být eluován v blízkosti píku analyzované látky, musí mít podobnou koncentraci a musí být chemicky inertní. Koncentrace látek se vypočítá z poměru ploch (výšek) píků stanovovaných látek a vnitřního standardu. Tato metoda je méně časově náročná a také přesnější [9].

3.1.2 Instrumentace

Kapalinový chromatograf se skládá ze zásobníku mobilních fází, pumpy, umožňující tok mobilní fáze a vzorku systémem, dávkovacího zařízení, kolony, detektoru, zásobníku odpadu a ze zařízení na zpracování dat [3].



Obr. 1: Schéma kapalinového chromatografu: 1-zásobník MF, 2-odplyňovač, 3-směšovač, 4-vysokotlaké čerpadlo, 5-dávkovač vzorku, 6-chromatografická kolona, 7-detektor, 8-sběrač frakcí, 9-datová stanice [5]

3.1.2.1 Zásobník mobilní fáze

HPLC aparatura může obsahovat jeden nebo více zásobníků mobilní fáze. Jsou to skleněné nádoby o různém objemu. Zásobníky většinou obsahují zařízení pro odplynění fází, sloužící k odstranění bublin plynu a prachových částic z kapaliny [10].

3.1.2.2 Čerpadla

Nároky na čerpadla jsou velmi vysoké. Jsou proto konstruovány z velmi odolných materiálů, které odolávají korozi i adsorpci vzorků. Nejčastěji jsou z oceli nebo titanu. Někdy mohou být čerpadla také z nekovových materiálů, například z teflonu nebo keramiky. Vnitřní objem čerpadla by měl být co

nejmenší, aby byla možná rychlá výměna mobilní fáze. Čerpadla musí umožnit variabilní průtok kapaliny od 0,1 do 10 ml/min při tlaku až do 100 MPa, aniž by došlo k výraznému kolísání. Průtok mobilní fáze musí být bezimpulsní, bez monotónních změn, přesný a správný (odchylka do 1 %) [3,5,10].

3.1.2.3 Dávkovací zařízení

Kvalita separace látek na chromatografické koloně je závislá na kvalitě dávkování vzorku. Krátké a prudké dávkování zvyšuje předpoklad úzkých a ostrých píků. Při nedokonalém dávkování může docházet k rozmývání píků vlivem mimokolonového příspěvku dávkovacího zařízení. V současné době se používají smyčkové dávkovače na principu přepínacích ventilů nebo automatické dávkovače- autosamplery [5,11].

3.1.2.4 Kolony

Kolony se nejčastěji používají z nerezové oceli, většinou o délce 10 – 30 cm a vnitřním průměru 3 – 5 mm. Tyto kolony jsou naplněny sorbenty o velikosti částic nejčastěji 5 nebo 10 μm . Nově vyvinuté kolony mají mnohem menší rozměry, často mezi 3 – 7,5 cm a vnitřní průměr je 1 – 4,6 mm. Velikost částic v těchto kolonách je 3 nebo 5 μm , pro lepší separaci se používají částice o velikosti 2,7 μm , popřípadě menší, zde je však nutná úprava systému, protože stoupá zpětný tlak na koloně a v celém HPLC systému. Náplň kolony musí být naprosto homogenní a rovnoměrná, proto se používají kolony plněné a testované přímo výrobcem [3,6,10].

3.1.2.4.1 Stacionární fáze na bázi silikagelu

Většina běžně používaných chromatografických kolon obsahuje silikagelový nosič. Jeho výhodami jsou vysoká účinnost, relativně vysoká mechanická pevnost umožňující separaci při vysokém tlaku a možnost separace v přítomnosti organických rozpouštědel, protože v jejich přítomnosti neobtná ani se nerozpouští. Může být použit samotný silikagel nebo silikagel

s navázanými chemickými ligandy a lze jej připravit ve velmi čisté formě s různě modifikovanými fyzikálními vlastnostmi. Silikagel je také možné použít při vysokých teplotách, je stabilní při teplotách až do 200°C. Nevýhodou je omezené použití při zásaditém pH, kdy dochází k rozpouštění silikagelu [5,11].

Termodynamické chování analytů je určeno fyzikálně-chemickými vlastnostmi stacionární fáze a dynamické vlastnosti jsou dány strukturou a velikostí částic nosiče. Jako nosič je používán silikagel, jehož povrchové hydroxylové skupiny jsou modifikovány chemickou reakcí s příslušným ligandem [5].

Mezi nejčastěji používané chemicky vázané stacionární fáze patří:

-fáze s chemicky vázanými alkyly o délce uhlíkového řetězce C₂ – C₃₀, popřípadě fenylové, alkylfenylové nebo bifenylové.

-fáze s chemicky vázanou aminopropylovou a kyanopropylovou skupinou patří mezi středně polární fáze, umožňující separaci na normálních, reverzních fázích i v modulu HILIC. Aminové fáze mají také slabé vlastnosti iontoměniče.

-diolové fáze mohou být použity v systému s normálními, reverzními fázemi, pro iontovou výměnu i v modulu HILIC.

-nitrofenylové a pentafluorofenylpropylové fáze uplatňují hlavně π-donor a π-akceptorové interakce s analytem, proto mají jinou selektivitu na normálních nebo na reverzních fázích [5].

-silikagelové fáze pro separace s mobilními fázemi s vysokým obsahem vody jsou určeny k separaci velmi polárních látek. Vznikají použitím silanizačních činidel s polárními sekundárními amidovými či karbamátovými skupinami, které působí jako vložka mezi povrchem silikagelu a dlouhými alkyly stacionární fáze [12].

3.1.2.4.2 Stacionární fáze na bázi oxidů kovů

Jako stacionární fáze pro HPLC se používají oxid zirkoničitý a titaničitý. Oxid zirkoničitý lze připravit ve formě monodisperzních porézních kulových částic, které v mnoha případech vykazují srovnatelnou účinnost jako silikagelové částice, ale vykazují vynikající stabilitu při pH až do hodnoty 14, a

jsou vysoce odolné. Přítomnost adsorpčních center charakteru silných Lewisových kyselin však vyžaduje přísadu pufrů, které kompenzují silné interakce center s hydroxylovými, fosfátovými, fluoridovými či karboxylovými funkčními skupinami v molekulách látek [12].

3.1.2.4.3 Polymerní stacionární fáze

Polymerní stacionární fáze byly zkoumány s myšlenkou nahradit silikagelové stacionární fáze. Jejich výhodou je vysoká chemická i tepelná stabilita. Moderní polymerní stacionární fáze jsou tvořeny sítí malých mikrosfér, které vytváří porézní strukturu. Nevýhodou je přítomnost mikropórů o velikosti 1 nm v částicích polymerního sorbentu, které brání převodu hmoty, dále srážení či bobtnání polymerů při vysokém obsahu organické složky v mobilní fázi a možnost použití při tlaku pouze do 20 MPa.

Polymerní sorbenty se nejčastěji využívají pro analýzu proteinů, glykoproteinů a peptidů [5].

3.1.2.4.4 Hybridní stacionární fáze

Hybridní anorganicko-organické stacionární fáze vznikají reakcí anorganického silikagelu a organického organosilanu za vzniku hybridní částice. Tyto stacionární fáze kombinují nejlepší vlastnosti silikagelu (vysoká účinnost a mechanická odolnost) s vlastnostmi polymerních sorbentů (vysoká pH stabilita a snížený efekt reziduálních silanolů) [13].

3.1.2.4.5 Stacionární fáze na bázi grafitového uhlíku

Porézní grafitový uhlík je používán od roku 1988 a je charakterizován silnými adsorpčními vlastnostmi. Výhodou uhlíkových stacionárních fází je vysoká stabilita vůči agresivním mobilním fázím v celém rozmezí pH, stabilita vůči vysokým teplotám, možnost změny retence bazických látek změnou pH mobilní fáze a předvídatelnější chování ve srovnání s alkylsilikagely. Díky ploché struktuře dochází ve větší míře k interakcím s planárními molekulami

než s prostorově uspořádanými molekulami, které mohou interagovat se stacionární fází pouze malou částí molekuly. Plochá struktura je také důvodem vysoké stereoselektivity [5].

3.1.2.4.6 Monolitické kolony

Monolity jsou separační média, která jsou tvořena jediným kusem pórovitého materiálu vyplňujícím vnitřní část kolony. Neobsahují mezičásticové prostory, proto veškerá mobilní fáze musí protékat makropóry monolitu. Středně velké póry (mesopóry) poskytují monolitu dostatečně velký povrch, a tím vysokou separační kapacitu. Tato struktura umožňuje vysoké průtoky mobilní fáze bez přílišného zvýšení tlaku a bez ztráty separační účinnosti i pro separované makromolekuly [14,15].

3.1.2.5 Detektory

Detektory jsou v HPLC zařazeny za chromatografickou kolonu a zaznamenávají rozdíl v signálu mezi průchodem čisté mobilní fáze a mobilní fáze obsahující analyt. Nejčastěji se dělí na koncentrační, které reagují na změnu hmotnostní koncentrace složky nezávisle na rychlosti přívodu složky do detektoru a hmotnostní, které reagují na změnu hmotnostního toku složky do detektoru. Dalším způsobem je dělení na destrukční a nedestrukční. V destrukčních detektorech se detekovaná komponenta ireverzibilně mění, zatímco v nedestrukčním nedochází k chemické změně detekovatelné komponenty [5].

-spektrofotometrický detektor je nejčastěji používaným detektorem v chromatografii. Je založen na principu absorpce záření určité vlnové délky v oblasti vlnových délek 190 – 800 nm. Podle konstrukčního uspořádání se dělí na detektory s fixní vlnovou délkou (nejčastěji 253,7 nm) používající nízkotlakou rtuťovou výbojku, detektory s měnitelnou vlnovou délkou s předem danými vlnovými délkami, detektory s programovatelnou vlnovou délkou a detektory s diodovým polem, které snímají celé spektrum v reálném čase bez přerušení chromatografické separace [2,5].

-fluorimetrický detektor se používá, pokud analyzovaná látka vykazuje fluorescenci nebo pokud je nefluoreskující látku možné derivatizací převést na fluoreskující derivát. Tyto detektory jsou založeny na měření emisního záření, které látka vydá pro absorpci excitačního záření, které způsobí přechod molekuly ze základního singletového elektromagnetického stavu do různých vibračních hladin excitačního singletového elektromagnetického stavu. Absorbovanou energii může excitovaná molekula vyzářit jako fluorescenci, přeměnit jiným mechanismem na energii vibrační, nebo předat jiným molekulám [2,5].

-elektrochemický detektor je využíván pro stanovení látek, které jsou schopné elektrochemické reakce probíhající na fázovém rozhraní elektroda-mobilní fáze. Tyto detektory měří určitou elektrochemickou veličinu vyvolanou průchodem látky průtokovou celou detektorem, ve které jsou umístěny elektrody s vloženým pracovním napětím nezbytným k průběhu elektrochemické reakce [5].

-refraktometrický detektor je založen na měření rozdílu indexu lomu mezi mobilní fází a eluentem. Podmínkou pro správné měření je přesná teplota. Tento detektor není možné použít pro gradientovou eluci [16].

-vodivostní detektor měří elektrickou vodivost eluentu vytékajícího z kolony mezi dvěma elektrodami v průtokové cele. Vodivostní detektor se hodí pouze pro detekci iontů, které zprostředkovávají vedení proudu v roztocích. Mobilní fáze by měla být nevodivá, což není pro separaci iontů úplně vhodné, proto je třeba přidat do mobilní fáze málo koncentrovanou slabě vodivou sůl [7].

-bezkontaktní vodivostní detektor je takový, kdy při detekci nejsou elektrody v přímém kontaktu s analyzovaným roztokem, ale jsou umístěny na vnějších stěnách kapiláry z nevodivého materiálu. Dvě z elektrod vysílají vysokofrekvenční signál a dvě z nich signál přijímají. Tento signál je zesílen a registrován [5].

-hmotnostně spektrometrický detektor patří mezi univerzální detektory, umožňující potvrzení totožnosti analyzované molekuly. Během procesu identifikace musí nejdříve dojít k ionizaci vzorku, rozdělení molekul podle poměru hmotnosti a náboje (m/z), jejich urychlení v analyzátoru a detekci iontů [3,5].

-univerzální detektory na bázi aerosolu umožňují detekci jakýchkoliv analytů bez ohledu na jejich vlastnosti. Před vlastní detekcí je nutné převést eluent na kapky aerosolu nebulizací a odpaření mobilní fáze. Mezi takové detektory se řadí odpařovací detektor rozptylu, detektor nabitého aerosolu a detektor využívající nukleační technologie (nano quantity analyte detector) [5].

3.1.3 Validace HPLC metody

Analytické metody musí být dostatečně přesné a spolehlivé. Tyto parametry musí být experimentálně ověřeny a doloženy procesem, který se nazývá validace analytické metody. Validace je série experimentů, která potvrdí, že metoda dává reprodukovatelné a spolehlivé výsledky a je vhodná pro zamýšlené použití [17].

Validace se provádí při vývoji nových metod, pokud došlo ke změně metody, má-li být metoda přenesena do jiné laboratoře, nebo při průkazu rovnocennosti dvou metod. Hodnoty validačních parametrů musí být zaneseny do validačního protokolu, který musí obsahovat také náležitou dokumentaci [9].

3.1.3.1 Test způsobilosti chromatografického systému

U instrumentálních fyzikálně-chemických metod není možné přesně definovat všechny podmínky, za kterých má být metoda použita, aby poskytovala spolehlivé výsledky. Test způsobilosti se zkouší při každém použití metody (př. změna chromatografického systému, použití metody v jiné laboratoři) na další sérii analytů a splněním jeho požadavků se předpokládá, že již dříve provedená validace je platná [9,17].

Základními údaji testu způsobilosti jsou požadavky na reprodukovatelnost chromatografického systému, rozlišení, počet teoretických pater a symetrii píku [17].

3.1.3.2 Přesnost

Přesnost analytické metody je míra shody mezi jednotlivými výsledky metody opakovaně prováděné s homogenním vzorkem. Daný vzorek se šestkrát analyzuje kompletním postupem včetně přípravy vzorku. Výsledek měření se vyjadřuje jako relativní směrodatná odchylka ze šesti stanovení. Dle podmínek opakování metody se rozlišuje opakovatelnost a reprodukovatelnost.

- a. **Opakovatelnost**- při stanovení opakovatelnosti se metoda provádí jedním analytikem, na tomtéž přístroji, se stejnými činidly na tomtéž homogenním vzorku.
- b. **Mezilehlá přesnost**- metoda se provádí s různými činidly, analytiky i přístroji, v různý den, ale v jedné laboratoři a se stejným homogenizovaným vzorkem.
- c. **Reprodukovatelnost**- při měření reprodukovatelnosti se metoda provádí na jednom homogenním vzorku, ale v různých laboratořích, různými analytiky, s různými činidly i přístroji [9,17].

3.1.3.3 Správnost

Správnost je odchylka výsledku metody od správné hodnoty. Správnou hodnotu lze zjistit buď jinou nezávislou metodou s ověřenou správností, nebo se připraví modelový vzorek ze všech složek přípravku a přesně přidaného standardu. Správnost se hodnotí z výsledků analýzy nejméně šesti vzorků a vyjádří se jako rozdíl získané a správné hodnoty nebo jako výtěžnost [9,17].

$$\text{Výtěžnost} = (\text{nalezená hodnota} / \text{správná hodnota}) \times 100$$

3.1.3.4 Linearita

Linearita je schopnost metody poskytnout v daném rozsahu přijatelnou lineární korelaci mezi odezvou detektoru a koncentrací stanovované látky. Linearita je v analytické chemii přímá závislost jedné veličiny na druhé, nezávisle proměnné, kdy jedna hodnota je násobkem proměnné veličiny, případně je k součinu přičtena konstanta. Obecně se jedná o přímkovou závislost, kdy musí být vhodně zvolen kalibrační model a metoda vyhodnocení linearity.

Těsnost vzájemné závislosti dvou náhodných proměnných charakterizuje korelační koeficient (R). Při lineární závislosti nabývá hodnoty +/- 1 a čím více se blíží hodnotě 1, tím je závislost proměnných těsnější. Korelační koeficient je nejčastější způsob hodnocení linearity [18].

3.1.3.5 Rozsah

Rozsah vychází z linearity a udává koncentrační hranice, ve kterých může být metoda používána [9].

3.1.3.6 Robustnost

Robustnost metody je definována jako míra vlivu mírného kolísání jednotlivých parametrů metody na výsledek stanovení nebo také jako míra kapacity metody poskytovat shodné výsledky při jejím reprodukování za nepatrně změněných podmínek [18].

3.1.3.7 Selektivita

Selektivita je definována jako schopnost metody poskytnout informaci o kvalitativním i kvantitativním složení vzorku v přítomnosti interferujících látek, jež lze očekávat [9,18].

3.1.3.8 Detekční a kvantitativní limit

Limit detekce (LOD) odpovídá koncentraci, pro kterou je analytický signál statisticky významně odlišitelný od šumu.

Limit kvantifikace (LOQ) odpovídá koncentraci, při které přesnost a správnost stanovení dovoluje kvantitativní hodnocení.

Hodnoty LOD a LOQ jsou silně závislé na způsobu výpočtu, proto je nutné jej uvést [18].

$$\text{LOD}=(3 \times s_n \times K) / a$$

$$\text{LOQ}=(10 \times s_n \times K) / a$$

3.2 Parasympatolytika

Parasympatolytika jsou látky, chovající se jako kompetitivní reverzibilní antagonisté acetylcholinu na muskarinových receptorech a inhibující parasympatickou aktivaci. Účinek na nikotinových receptorech způsobuje blokaci parasympatické aktivace ve vegetativních gangliích. Tyto látky se označují jako ganglioplegika neboli periferní myorelaxancia. V přírodě se vyskytují v mnoha rostlinách čeledě Solanaceae [19,20].

3.2.1 Účinek parasympatolytik

Mezi projevy parasympatolytického účinku patří mydriáza, zvýšená srdeční frekvence, spasmolýza, zpomalená peristaltika GIT, snížená sekrece slz, slin, potu, bronchů a žaludku [21].

Účinek projevující se již při velmi nízkých dávkách (0,5 – 1 mg) je snížení činnosti sekrečních žláz, které je doprovázeno suchými sliznicemi v ústech, bronších, sliznicí žaludku a nedostatečnou tvorbou potu se suchou a teplou pokožkou. Tohoto účinku se využívá hlavně při snižování nadměrné bronchiální sekrece před inhalační anestézií nebo pro snížení sekrece kyseliny chlorovodíkové v žaludku [20,22].

Při podání středních dávek (1 – 2 mg) se projeví tachykardie blokadou muskarinových M_2 receptorů v sinoatriálním uzlu. V praxi je možné použít ipratropium při bradykardii nebo k facilitaci převodu vzruchu při AV-bloku [20,22].

V praxi se velmi využívá účinek parasympatolytik na bronchy. Působením na M_3 receptory dochází k bronchodilataci a k inhibici mukociliární funkce. Nevýhodou je ale kumulace bronchiálního sekretu v bronších. Tuto nevýhodnou vlastnost postrádá ipratropium, proto se také využívá v terapii CHOPN, méně často při terapii astmatu [20].

Pro svůj spasmolytický účinek se využívá N-butylskopolamin k terapii žlučových či renálních kolik. Spasmolytický účinek se projevuje díky schopnosti přímo relaxovat hladkou svalovinu [22].

3.2.2 Mydriatika a cykloplegika

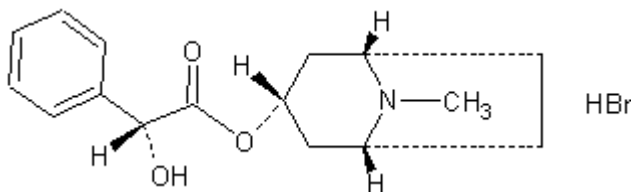
Účinek na oko se projevuje po podání středních dávek atropinu (1 – 2 mg). Po podání parasymptolytika dochází ke snížení tonu musculus sphincter pupillae a k následné mydriáze a poruše akomodace (cykloplegie). Tento účinek se využívá v diagnostice pro vyšetření očního pozadí [20,22].

Z parasymptolytik se jako mydriatika a cykloplegika využívají krátkodobě působící látky podané lokálně- atropin, skopolamin, homatropin a tropikamid. 0,5% tropikamid a 1% homatropin jsou slabá, krátce působící mydriatika používaná k vyšetření očního pozadí. Atropin vyvolává cykloplegii, proto je v praxi používán k vyšetření refrakce u malých dětí a k terapii či profylaxi zadních synechií [1].

3.3 Homatropini hydrobromidum

Lékopisný název: Homatropini hydrobromidum, Homatropin-hydrobromid

Strukturní vzorec:



Obr. 2: Homatropin-hydrobromid [23]

Sumární vzorec: C₁₆H₂₂BrNO₃

Molární hmotnost: 356,26 g.mol⁻¹

Chemický název: (1R,3r,5S)-8-methyl-8-azabicyklo[3.2.1]oktan-3-yl-(2RS)-2-hydroxy-2-fenylacetát-hydrobromid

Vlastnosti: Bílý nebo téměř bílý krystalický prášek nebo bezbarvé krystaly. Snadno rozpustný ve vodě, mírně rozpustný v etanolu 96%. Teplota tání asi 216°C, za rozkladu.

Skladování: Chráněn před světlem [23]

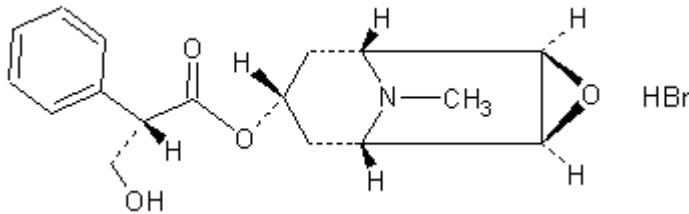
ATC klasifikace: S01FA05 [1]

3.3.1 Charakteristika

Mydriatický a cykloplegický účinek homatropin-hydrobromidu nastupuje do 20 minut po aplikaci, maximální účinek se projevuje za 30 – 60 minut a přetrvává 1 – 3 dny. Po aplikaci do spojivkového vaku se z větší části vstřebává. Homatropin-hydrobromid je indikován k vyvolání cykloplegie před měřením refrakce a také je součástí komplexní léčby uveitidy [1].

3.4 Scopolamini hydrobromidum

Lékopisný název: Scopolamini hydrobromidum, Hyoscini hydrobromidum, Skopolamin-hydrobromid



Obr. 3: Skopolamin-hydrobromid [23]

Sumární vzorec: $C_{17}H_{22}BrNO_4$

Molární hmotnost: $438,31 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

Chemický název: (1R,2R,4S,5S,7s)-9-methyl-3-oxa-9-azatricyklo-[3.3.1.0^{2,4}]nonan-7-yl-(2S)-2-fenyl-3-hydroxypropanoát-hydrobromidu

Vlastnosti: Bílý nebo téměř bílý krystalický prášek nebo bezbarvé krystaly, na vzduchu zvětrávající. Snadno rozpustný ve vodě, dobře rozpustný v etanolu 96%

Skladování: Ve vzduchotěsných zcela naplněných maloobjemových obalech, chráněn před světlem [23]

ATC klasifikace: S01FA02 [1]

3.4.1 Charakteristika

Mydriatický a cykloplegický účinek skopolamin-hydrobromidu nastupuje do 20 – 30 minut po aplikaci, maximální účinek se projevuje za 60 – 120 minut a přetrvává 3 – 7 dní. Po aplikaci do spojivkového vaku se z větší části vstřebává. Skopolamin-hydrobromid je indikován k vyvolání cykloplegie před měřením refrakce, k vyvolání mydriázy před diagnostickým výkonem na oku nebo po nitroočním chirurgickém zákroku. Skopolamin-hydrobromid se také využívá v terapii a profylaxi zadních synechií, terapii iridocyklitidy a je součástí komplexní léčby uveitidy [1].

3.5 Rešerše publikovaných HPLC metod

Byly vyvinuty různé metody pro stanovení homatropin-hydrobromidu, skopolamin-hydrobromidu nebo jiných tropanových alkaloidů pomocí HPLC metody. V následujících odstavcích jsou uvedeny parametry některých z nich.

3.5.1 Lékopisná metoda pro stanovení příbuzných látek v surovině homatropin-hydrobromid

Stacionární fáze: C18 kolona, 100 x 4,6 mm, velikost částic 5 µm

MF: směs methanolu a roztoku připraveného z 6,8 g dihydrogenfosforečnanu draselného R a 7,0 g natrium-heptansulfonátu monohydrátu R v 1000 ml vody, jehož pH se upraví roztokem kyseliny fosforečné na hodnotu 2,7 (33:67).

Průtok: 1,5 ml/min

Detekce: UV, 210 nm

Ředící směs: MF [23]

Při vývoji nové metody se vycházelo z těchto parametrů a některé byly zachovány v konečné validaci.

3.5.2 HPLC metoda pro stanovení prednisolonu, prednisolon-fosfát sodné soli, homatropinu a atropinu

Stacionární fáze: Fenyl-Hexylová kolona, 250 x 4,0 mm, velikost částic 5 µm

MF: ACN:hydrogenfosforečnan draselný 10 mmol/l (35:65), pH 6,9

Průtok: 1,0 ml/min

Detekce: UV, 210 nm pro atropin, homatropin, 240 nm pro prednisolon, prednisolon-fosfát sodná sůl

Ředící směs: MF [24]

3.5.3 HPLC stanovení atropinu a atropinu podobných alkaloidů pomocí konduktometrického detektoru

Stacionární fáze: kolona Beckman Industries, Ultrasphere 5 µm, 250 x 4,6 mm
MF č. 1: voda:ACN:tetrahydrofuran (67:30:3) s 1 mM kyselinou chloristou pro analýzu atropin-sulfátu, homatropin-hydrobromidu, hyoscin-hydrobromidu, hyoscin-metylbromidu

MF č. 2: voda:ACN:tetrahydrofuran (47:50:3) s 1 mM kyselinou chloristou pro analýzu hyoscin-butylbromidu

Průtok: 1 ml/min

Teplota: 30°C

Detekce: konduktometrická

Ředící směs: MF [25]

3.5.4 Stanovení atropin-sulfátu a benzalkonium-chloridu v očních kapkách

Stacionární fáze: RP C8 kolona, 100 x 4,6 mm, velikost částic 3 µm

MF: ACN:kyselina octová 0,25 M, pH 2,5 (80:20) a 6 mM trimethylamin

Průtok: 1,4 ml/min

Detekce: UV, 260 nm

Ředící směs: MF [26]

3.5.5 Stanovení atropinu a skopolaminu za použití fenylové kolony

Stacionární fáze: Xterra fenylová kolona, 150 x 2,1 mm, velikost částic 5 µm

MF: ACN:voda obsahující 10 mM octan amonný s pH upraveným amoniakem na hodnotu 10,5 (10:90 – 80:20), gradientová eluce

Průtok: 0,2 ml/min

Detekce: hmotnostní spektrometr[27]

3.5.6 HPLC stanovení atropinu, detekovaného fluorimetrickým detektorem

Stacionární fáze: Cosmocil 5C18-MS kolona, 150 x 4,6 mm, velikost částic 5 μm

MF: ACN:0,02 M dodecylsírán sodný upravený kyselinou fosforečnou na hodnotu pH 3,5 (60:40)

Průtok: 1,0 ml/min

Teplota: 40°C

Detekce: fluorimetrická, 255 a 474 nm excitační a emisní vlnová délka

Ředící směs: 1,3 M chlorid amonný, upravený na hodnotu pH 10 [28]

3.5.7 Stanovení atropinu, jeho degradačních produktů a příbuzných látek pomocí HPLC

Stacionární fáze: kolona Thermo Hypersil Aquasil C18, 125 x 4,6 mm, velikost částic 5 μm

MF: 20 mM fosfátový pufr upravený na hodnotu pH 2,5 kyselinou fosforečnou:ACN v gradientu o koncentraci 20-40 % ACN

Průtok: 2,0 ml/min

Teplota: 25°C

Detekce: UV, 215 nm

Během analýzy byly stanoveny následující látky: atropin-sulfát, kyselina tropová, kyselina atropová, hyoscin, 7-hydroxyhyoscyamin, 6-hydroxyhyoscyamin, norhyoscyamin, littorin, apoatropin [29]

3.5.8 HPLC stanovení atropinu s použitím elektrochemické detekce

Stacionární fáze: Chromatografická kolona Lichrosorb DIOL, 250 x 4 mm, velikost částic 5 μm

MF:ACN:0,0125 M fosfátový pufr o pH 7,2 (20:80)

Průtok: 1 ml/min

Detekce: amperometrická

Ředící směs: MF [30]

3.5.9 HPLC stanovení atropinu v plasmě

Stacionární fáze: C18 kolona, 150 x 4,6 mm, velikost částic 5 µm

MF: ACN:fosfátový pufr (33:67), fosfátový pufr obsahoval 0,01 M fosforečnan amonný rozpuštěný ve vodě a upravený na hodnotu pH 5,0

Průtok: 2,0 ml/min

Teplota: 40°C

Detekce: fluorimetrická, excitační vlnová délka 328 nm, emisní vlnová délka 389 nm [31]

3.5.10 HPLC analýza atropin-sulfátu a skopolamin-N-butylbromidu ve farmaceutických přípravcích a biologických tekutinách

Stacionární fáze: Brownlee RP-18, Spheri-5, 220 x 4,6 mm, velikost částic 5 µm

MF: 0,05 octan amonný:metanol:ACN (48:32:20)

Průtok: 1,3 ml/min pro analýzu farmaceutických přípravků, 1,1 ml/min pro analýzu biologického materiálu

Detekce: UV, 220 nm

Ředící směs: metanol [32]

3.5.11 HPLC stanovení tropanových alkaloidů z krmiva a biologických vzorků

Stacionární fáze: Lichrosorb RP-18, 250 x 4,0 mm, velikost částic 10 µm

MF: ACN:metanol:-0,05 M octan amonný (20,9:27,9:51,2)

Průtok: 1,3 ml/min

Teplota: 22°C

Detekce: UV, 210 nm

Analyzovány byly tropanové alkaloidy skopolamin a hyoscyamin [33]

3.5.12 HPLC stanovení atropinu a skopolaminu v extraktu z pableny

Stacionární fáze: kolona Discovery HS F5, 250 x 4,6 mm, velikost částic 5 µm
MF: ACN:10 mmol/l octan amonný (80:20) upravené na hodnotu pH 5,0
kyselinou chlorovodíkovou
Průtok: 2,0 ml/min
Teplota: 40°C
Detekce: UV, 210 nm [34]

Byly porovnány různé metody pro stanovení tropanových alkaloidů za různých podmínek. Bylo použito velké množství stacionárních fází, přičemž žádná se nevyskytovala významně častěji než jiná. Při různých separacích byl často použit fosfátový pufr jako součást mobilní fáze, proto byl fosfátový pufr zkoušen i při vývoji metody pro stanovení homatropin-hydrobrodimu. Rychlost separace se měnila v závislosti na použité stacionární fázi.

Pokud byl analyt detekován pomocí UV-VIS spektrofotometru, byla vlnová délka detekce v rozmezí 210 – 220 nm. V rešerších se objevil i jiný způsob detekce: za použití fluorimetrického, konduktometrického, amperometrického nebo hmotnostně spektrometrického detektoru.

4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 Použité materiály a pomůcky

4.1.1 Standardy, vzorky, chemikálie

Homatropin-hydrobromid, KulichPharma s.r.o., ČR, šarže: 080701

Skopolamin-hydrobromid, KulichPharma s.r.o., ČR, šarže: 255201811062

Dihydrogenfosforečnan sodný dihydrát, Fluka Analytical, Německo, šarže: 1253517

Kyselina fosforečná 85%, Merck KgaA, Německo, šarže: K43367273223

Acetonitril, Lach-Ner, ČR, šarže: 2012-1759

Triethylamin, Sigma Aldrich, Německo, šarže: STBD1993V

Hydroxid sodný, Penta, ČR, šarže: 1502010210

Dihydrogenfosforečnan draselný, Sigma Aldrich, Německo, šarže: 080M0045V

Kyselina askorbová, KulichPharma s.r.o., ČR, šarže: 200912658

Epineprhrin tartras, KulichPharma s.r.o., ČR, šarže: 258R

Penicilin G, Sigma Aldrich, Německo, šarže: 112H0341

Chlorhexidin, Sigma Aldrich, Německo, šarže: 26130AB

Paracetamol, KulichPharma s.r.o., ČR, šarže: OP00205

Indometacin, KulichPharma s.r.o., ČR, šarže: T04-025

Diklofenak sodný, KulichPharma s.r.o., ČR, šarže: DS/0405/120B

Dilthiazem hydrochlorid, KulichPharma s.r.o., ČR, šarže: DIL/M-086/2000

Verapamil, Sigma Aldrich, Německo, šarže: 09716AZ

Triamcinolon, Sigma Aldrich, Německo, šarže: 120H0149

Triamcinolon acetonid, KulichPharma s.r.o., ČR, šarže: N006/08

Oční kapky s homatropin-hydrobromidem 1% (s NaCl)

Oční kapky s homatropin-hydrobromidem 2% (s NaCl)

Oční kapky s homatropin-hydrobromidem 2% (s pufrem F 6,45)

Oční kapky s homatropin-hydrobromidem 1% (s NaCl), placebo

Oční kapky s homatropin-hydrobromidem 2% (s NaCl), placebo

Oční kapky s homatropin-hydrobromidem 2% (s pufrem F 6,45), placebo

Oční kapky a placebo očních kapek byly předem připraveny ve Fakultní nemocnici v Motole. Jejich složení je popsáno v kapitole 4.1.4.

4.1.2 HPCL přístroj, podmínky separace

Kapalinový chromatograf LC 2010 C Shimadzu s vestavěným UV detektorem, Kyoto, Japonsko

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

Chromatografická kolona Discovery HS C18, 250 x 4,6 mm, 5 µm

Chromatografická kolona Discovery C18, 150 x 4,6 mm, 5 µm

Chromatografická kolona Ascentis Express C18, 150 x 4,6 mm, 2,7 µm

Chromatografická kolona ZORBAX SB-Phenyl, 75 x 4,6 mm, 3,5 µm

Chromatografická kolona Ascentis Express F5, 100 x 4,6 mm, 2,7 µm

Průtok mobilní fáze: 0,6 – 1,8 ml/min

Dávkování: 5 µl

UV detekce: 210, 215 nm

Mobilní fáze: Acetonitril-Dihydrogenfosforečnan sodný dihydrát-
Voda R

Acetonitril-Dihydrogenfosforečnan draselný-Voda R

Acetonitril-Dihydrogenfosforečnan sodný dihydrát-

Voda R-Triethylamin

Typ eluce: isokratická

Teplota: laboratorní

4.1.3 Další přístroje

Analytické váhy ME-50CE, Sartorius, Německo

Analytické váhy, Sartorius Cubis, Německo

Filtrační zařízení pro filtraci mobilní fáze Millipore, USA

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

Magnetická míchačka Color squad, Ika Werke, Německo

pH metr 212 Microprocessor pH Meter, Hanna Instruments, Německo

UV spektrofotometr Hewlett Packard 8453, USA

4.1.4 Oční kapky

Pro validaci metody byly použity oční kapky s homatropin-hydrobromidem v různých koncentracích a roztoky placebo daných očních kapek. Všechny roztoky byly předem připraveny ve Fakultní nemocnici v Motole. V analyzovaných roztocích obsahujících oční kapky nebo placebo očních kapek byla vždy koncentrace homatropin-hydrobromidu ve výsledném roztoku 25 mg/100 ml.

4.1.4.1 Oční kapky s homatropin-hydrobromidem 1% (s NaCl)

Složení:

Homatropini hydrobromidum		0,10 g
Natrii chloridum		0,073 g
Carbethopendecinii bromidum		0,002 g
Aqua purificata (sterilní)	ad	10,00 g

4.1.4.2 Oční kapky s homatropin-hydrobromidem 2% (s NaCl)

Složení:

Homatropini hydrobromidum		0,20 g
Natrii chloridum		0,056 g
Carbethopendecinii bromidum		0,002 g
Aqua purificata (sterilní)	ad	10,00 g

4.1.4.3 Oční kapky s homatropin-hydrobromidem 2% (s pufrem F 6,45)

Složení:

Homatropini hydrobromidum		0,20 g
Natrii dihydrogenophosphas dihydricus		0,098 g
Natrii hydrogenophosphas dodecahydricus		0,107 g
Carbethopendecinii bromidum		0,002 g
Aqua purificata (sterilní)	ad	10,0 g

4.2 Příprava roztoků

4.2.1 Příprava rozpouštěcí směsi

Pro rozpouštění chemikálií byla zvolena rozpouštěcí směs složená z acetonitrilu a vody v poměru 3:7.

4.2.2 Příprava zásobního roztoku standardu skopolamin-hydrobromidu

Pro validaci metody byl vytvořen zásobní roztok standardu skopolamin-hydrobromidu o koncentraci 0,5 mg/100 ml. Tento roztok byl připraven rozpuštěním navážky 2,507 mg skopolamin-hydrobromidu v rozpouštěcí směsi a doplněním po značku 500 ml odměrné baňky.

4.2.3 Příprava zásobního roztoku standardu homatropin-hydrobromidu

Zásobní roztok standardu homatropin-hydrobromidu o koncentraci 25 mg/100 ml byl připraven rozpuštěním navážky 125,08 mg homatropin-hydrobromidu v rozpouštěcí směsi a doplněním po značku 500 ml odměrné baňky.

4.2.4 Příprava směsného roztoku standardů homatropin-hydrobromidu a skopolamin-hydrobromidu

Směsný roztok standardů homatropin-hydrobromidu a skopolamin-hydrobromidu obsahoval tyto látky o koncentracích 25 mg/100 ml a 0,5 mg/100 ml. Směsný roztok vznikl rozpuštěním 125,04 mg homatropin-hydrobromidu a 2,510 mg skopolamin-hydrobromidu v rozpouštěcí směsi a následně byl doplněn po značku 500 ml odměrné baňky.

4.2.5 Příprava kalibračních roztoků skopolamin-hydrobromidu pro stanovení linearitu

Bylo připraveno 6 kalibračních roztoků o koncentraci 0 – 0,5 mg/100 ml skopolamin-hydrobromidu. Ze zásobního roztoku standardu skopolamin-hydrobromidu připraveného v kapitole 4.2.2 byly připraveny další roztoky. Kalibrační roztok o koncentraci 0,5 mg/100 ml nebyl nijak upravován, jako kalibrační roztok o koncentraci 0 mg/100 ml byla použita samotná rozpouštěcí směs.

Příprava kalibračního roztoku o koncentraci 0,1 mg/100 ml: do 20 ml odměrné baňky byly odměřeny 4 ml zásobního roztoku skopolamin-hydrobromidu a objem byl doplněn rozpouštěcí směsí po rysku.

Příprava kalibračního roztoku o koncentraci 0,2 mg/100 ml: do 20 ml odměrné baňky bylo odměřeno 8 ml zásobního roztoku skopolamin-hydrobromidu a objem byl doplněn rozpouštěcí směsí po rysku.

Příprava kalibračního roztoku o koncentraci 0,3 mg/100 ml: do 20 ml odměrné baňky bylo odměřeno 12 ml zásobního roztoku skopolamin-hydrobromidu a objem byl doplněn rozpouštěcí směsí po rysku.

Příprava kalibračního roztoku o koncentraci 0,4 mg/100 ml: do 20 ml odměrné baňky bylo odměřeno 16 ml zásobního roztoku skopolamin-hydrobromidu a objem byl doplněn rozpouštěcí směsí po rysku.

4.2.6 Příprava kalibračních roztoků homatropin-hydrobromidu pro stanovení linearitu

Pro přípravu kalibračních roztoků homatropin-hydrobromidu byl připraven zásobní roztok homatropin-hydrobromidu o koncentraci 50 mg/ 100 ml.

Příprava kalibračního roztoku o koncentraci 12,5 mg/100 ml: do 20 ml odměrné baňky bylo odměřeno 5 ml zásobního roztoku homatropin-hydrobromidu a objem byl doplněn rozpouštěcí směsí po rysku.

Příprava kalibračního roztoku o koncentraci 17,5 mg/100 ml: do 20 ml odměrné baňky bylo odměřeno 7 ml zásobního roztoku homatropin-hydrobromidu a objem byl doplněn rozpouštěcí směsí po rysku.

Příprava kalibračního roztoku o koncentraci 22,5 mg/100 ml: do 20 ml odměrné baňky bylo odměřeno 9 ml zásobního roztoku homatropin-hydrobromidu a objem byl doplněn rozpouštěcí směsí po rysku.

Příprava kalibračního roztoku o koncentraci 27,5 mg/100 ml: do 20 ml odměrné baňky bylo odměřeno 11 ml zásobního roztoku homatropin-hydrobromidu a objem byl doplněn rozpouštěcí směsí po rysku.

Příprava kalibračního roztoku o koncentraci 32,5 mg/100 ml: do 20 ml odměrné baňky bylo odměřeno 13 ml zásobního roztoku homatropin-hydrobromidu a objem byl doplněn rozpouštěcí směsí po rysku.

Příprava kalibračního roztoku o koncentraci 37,5 mg/100 ml: do 20 ml odměrné baňky bylo odměřeno 15 ml zásobního roztoku homatropin-hydrobromidu a objem byl doplněn rozpouštěcí směsí po rysku.

4.2.7 Příprava mobilní fáze

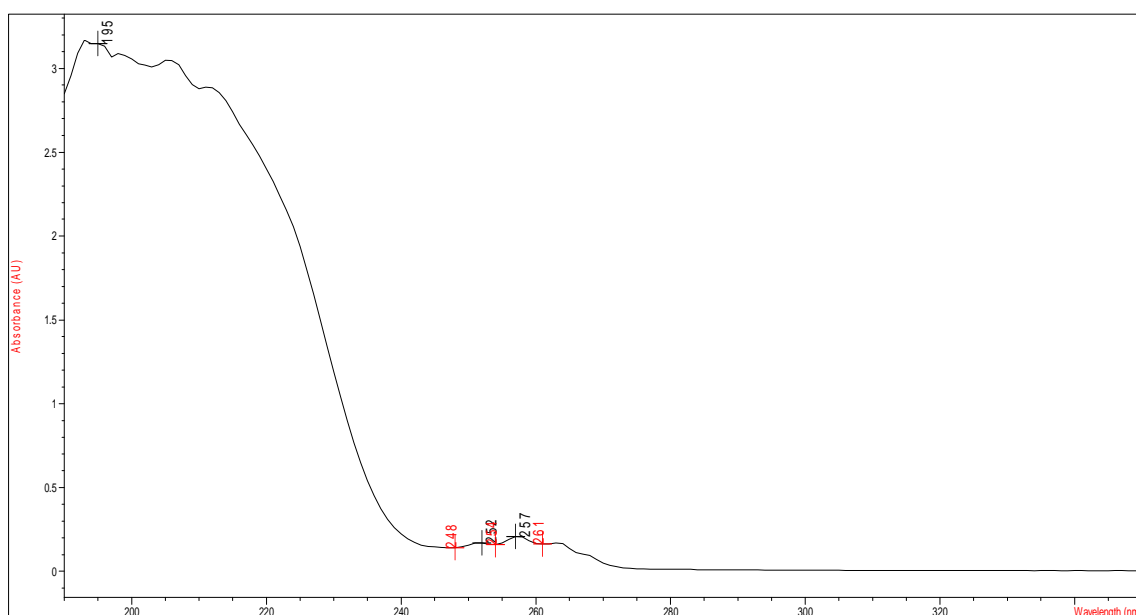
Jako mobilní fáze byl zvolen směsný roztok acetonitrilu a fosfátového pufru v poměru 9:91 (V/V). Fosfátový pufr byl připraven rozpuštěním 3,12082 g dihydrogenfosforečnanu sodného dihydrátu v 1000,0 g vody. Do roztoku bylo přidáno 200 µl triethylaminu. Takto připravený směsný roztok byl upraven kyselinou fosforečnou 85% na hodnotu pH 2,5 a přefiltrován přes filtrační zařízení na mobilní fáze Millipore.

5 VÝSLEDKY A DISKUZE

5.1 Optimalizace metody

5.1.1 Výběr vlnové délky pro detekci UV detektorem

Lékopisná hodnota vlnové délky pro stanovení příbuzných látek homotropin-hydrobromidu je 210 nm. Absorpční maximum bylo změřeno pomocí UV spektrofotometru a při analýze byly použity vlnové délky 210 a 215 nm. Validace byla provedena při vlnové délce 210 nm.



Obr. 4: UV spektrum homotropin-hydrobromidu

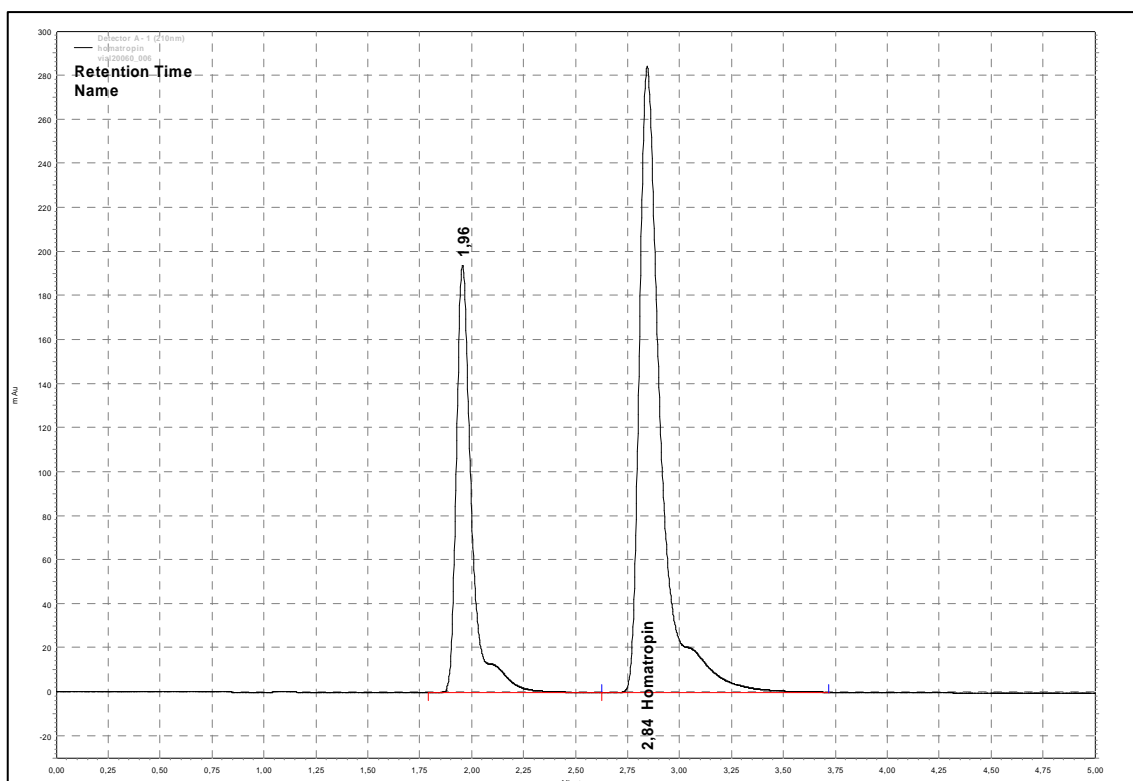
5.1.2 Výběr mobilní fáze

5.1.2.1 Příprava mobilní fáze č. 1: Acetonitril:Fosfátový pufr 1

Jako první mobilní fáze byla vyzkoušena fáze obsahující acetonitril a fosfátový pufr v poměru 25:75. Fosfátový pufr byl připraven rozpuštěním 3,12058 g dihydrogenfosforečnanu sodného dihydrátu v 1000,0 g vody. Směsný roztok byl upraven kyselinou fosforečnou 85% na hodnotu pH 2,5, 3,5 a 4,5. Takto upravený roztok byl přefiltrován přes filtrační zařízení na mobilní fáze Millipore. PH roztoku nemělo vliv na vlastní analýzu.

5.1.2.2 Příprava mobilní fáze č. 2: Acetonitril:Fosfátový pufr 2

Jako druhá byla připravena obdobná mobilní fáze obsahující acetonitril a fosfátový pufr v poměru 25:75. Tento fosfátový pufr vznikl rozpuštěním 2,72094 g dihydrogenfosforečnanu draselného v 1000,0 g vody a směsný roztok byl upraven hydroxidem sodným na hodnotu pH 5,0, 6,0 a 7,0. Nakonec byl roztok přefiltrován přes filtrační zařízení na mobilní fáze Millipore. Tato mobilní fáze nebyla v analýze použita z důvodu nevhodného tvaru píku homatropin-hydrobromidu.



Obr. 5: Chromatogram homatropin-hydrobromidu při použití MF č. 2, analýza proběhla na chromatografické koloně Discovery HS C18, 250 x 4,6 mm, 5 μ m, při průtoku MF 1,8 ml/min a UV detekci při 210 nm.

5.1.2.3 Příprava mobilní fáze č. 3: Acetonitril:Fosfátový pufr s triethylaminem

Mobilní fáze číslo jedna neumožnila optimální separaci homatropin-hydrobromidu a skopolamin-hydrobromidu. Z toho důvodu byla mobilní fáze č. 1 upravena. Fosfátový pufr byl připraven rozpuštěním 3,12082 g

dihydrogenfosforečnanu sodného dihydrátu v 1000,0 g vody. Do roztoku bylo přidáno 200 µl triethylaminu. Takto připravený směsný roztok byl upraven kyselinou fosforečnou 85% na pH 2,5 a přefiltrován přes filtrační zařízení na mobilní fáze Millipore. Složení mobilní fáze bylo acetonitril a fosfátový pufr s triethylaminem v poměru 9:91. Triethylamin byl použit pro zlepšení tvaru píků. Tato mobilní fáze byla použita pro vlastní validaci.

5.1.3 Výběr stacionární fáze

5.1.3.1 Kolona Discovery HS C18, 250 x 4,6 mm, 5 µm

Jako první byla vyzkoušena kolona C18 o délce 25 cm a velikosti částic 5 µm. Na této koloně byla vyzkoušena MF č. 1 a MF č. 2 při průtoku 1,8 ml/min a dávkovaný objem činil 5 µl. MF č. 1 byla zkoušena při různých pH, viz kapitola 5.1.2.1 a také při různých poměrech složek. Zvýšení množství acetonitrilu v MF mělo za následek urychlení analýzy, ale také nedostatečné rozdělení píku bromidového iontu a homatropin-hydrobromidu. MF č. 2 byla vyzkoušena pouze na této koloně a také při různých pH, ale pro nevhodný tvar píku nebyla použita.

5.1.3.2 Kolona Discovery C18, 150 x 4,6 mm, 5 µm

Zkrácením kolony nebylo dosaženo lepších výsledků. Byla použita MF č. 1 a průtoková rychlost byla snížena na 1,2 ml/min. Tato kolona nebyla dále použita z důvodu nevhodného tvaru píků.

5.1.3.3 Ascentis Express C18, 150 x 4,6 mm, 2,7 µm

Tato kolona byla použita za stejných chromatografických podmínek jako kolona Discovery C18, 150 x 4,6 mm, 5 µm při použití MF č. 1. Výsledkem bylo značné urychlení analýzy, ale také nedostatečné rozdělení píků bromidového iontu a homatropin-hydrobromidu.

5.1.3.4 Kolona Zorbax SB-Phenyl 75 x 4,6 mm, 3,5 µm

Tato kolona byla použita za stejných podmínek jako kolona Discovery C18, 150 x 4,6 mm, 5 µm. Jevila se jako vhodná, proto byl k homatropin-hydrobromidu hledán vhodný vnitřní standard (IS). Z látek dostupných v laboratoři byly vyzkoušeny následující:

Kyselina askorbová, KulichPharma s.r.o., ČR, šarže: 200912658

Epinephrin tartras, KulichPharma s.r.o., ČR, šarže: 258R

Penicilin G, Sigma Aldrich, Německo, šarže: 112H0341

Chlorhexidin, Sigma Aldrich, šarže: 26130AB

Paracetamol, KulichPharma s.r.o., ČR, šarže: OP00205

Indometacin, KulichPharma s.r.o., ČR, šarže: T04-025

Diklofenak sodný, KulichPharma s.r.o., ČR, šarže: DS/0405/120B

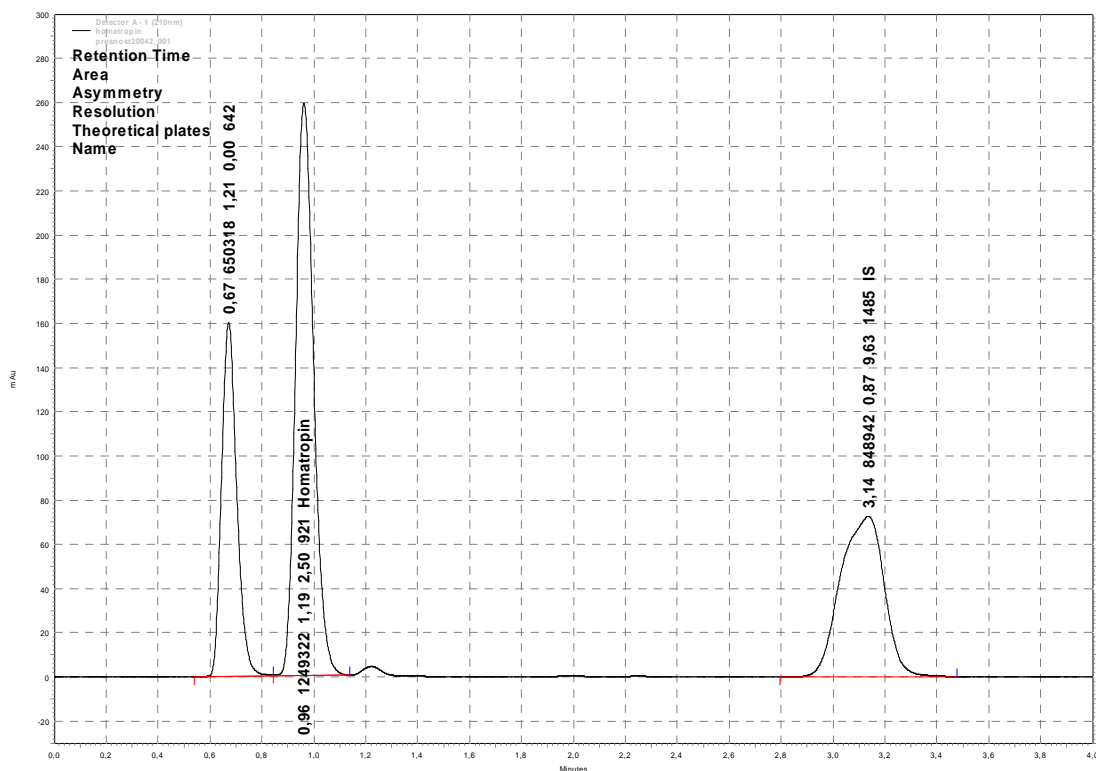
Diltiazem hydrochlorid, KulichPharma s.r.o., ČR, šarže: DIL/M-086/2000

Verapamil, Sigma Aldrich, Německo, šarže: 09716AZ

Triamcinolon, Sigma Aldrich, Německo, šarže: 120H0149

Triamcinolon acetonid, KulichPharma s.r.o., ČR, šarže: N006/08

Jako nejvhodnější ze zkoušených chemikálií se jevil triamcinolon. Ke směsi homatropin-hydrobromidu a triamcinolonu byl ještě přidán skopolamin-hydrobromid, jako rozkladný produkt homatropin-hydrobromidu. Za uvedených chromatografických podmínek bohužel nebylo možné dostatečně separovat homatropin-hydrobromid a skopolamin-hydrobromid. Z tohoto důvodu byla vyzkoušena ještě další kolona.



Obr. 6: Chromatogram obsahující homatropin-hydrobromid o koncentraci 25 mg/100 ml, triamcinolon jako IS o koncentraci 25 mg/100 ml. Měřeno za chromatografických podmínek uvedených v této kapitole, při použití mobilní fáze č. 1, průtokové rychlosti 1,2 ml/min a detekci v UV oblasti při 210 nm.

5.1.3.5 Ascentis Express F5 100 x 4,6 mm, 2,7 µm

Výše uvedená stacionární fáze neumožnila dostatečné oddělení homatropin-hydrobromidu od skopolamin-hydrobromidu. Vzhledem k nemožnosti sledování průběhu rozkladu a přeměny homatropin-hydrobromidu na skopolamin-hydrobromid bylo nutné najít kolonu umožňující separaci těchto dvou látek, což poslední zkoušená kolona umožnila. Z důvodu menších částic stacionární fáze bylo nutné snížit průtok na 1,1 ml/min. MF č. 1 sice umožnila separaci zmíněných látek, ale tvar píků nebyl dostatečně symetrický. Proto byla vyvinuta MF č. 3 a poměr fází upraven, aby byla možná vhodná separace. Ke směsi obsahující homatropin-hydrobromid a skopolamin-hydrobromid nebyla bohužel nalezena vhodná látka, která by byla použitelná jako IS. Vzhledem k jednoduché matici očních kapek a tím jednoduchosti přípravy vzorku k analýze bylo rozhodnuto validovat metodu bez použití vnitřního standardu.

5.1.4 Optimální chromatografické podmínky

Pro validaci metody byly zvoleny následující podmínky separace:

Stacionární fáze: Ascentis Express F5 100 x 4,6 mm, 2,7 μm

Mobilní fáze: Acetonitril:Fosfátový pufr s triethylaminem v poměru 9:91

Průtok mobilní fáze: 1,1 ml/min

Dávkovaný objem: 5 μl

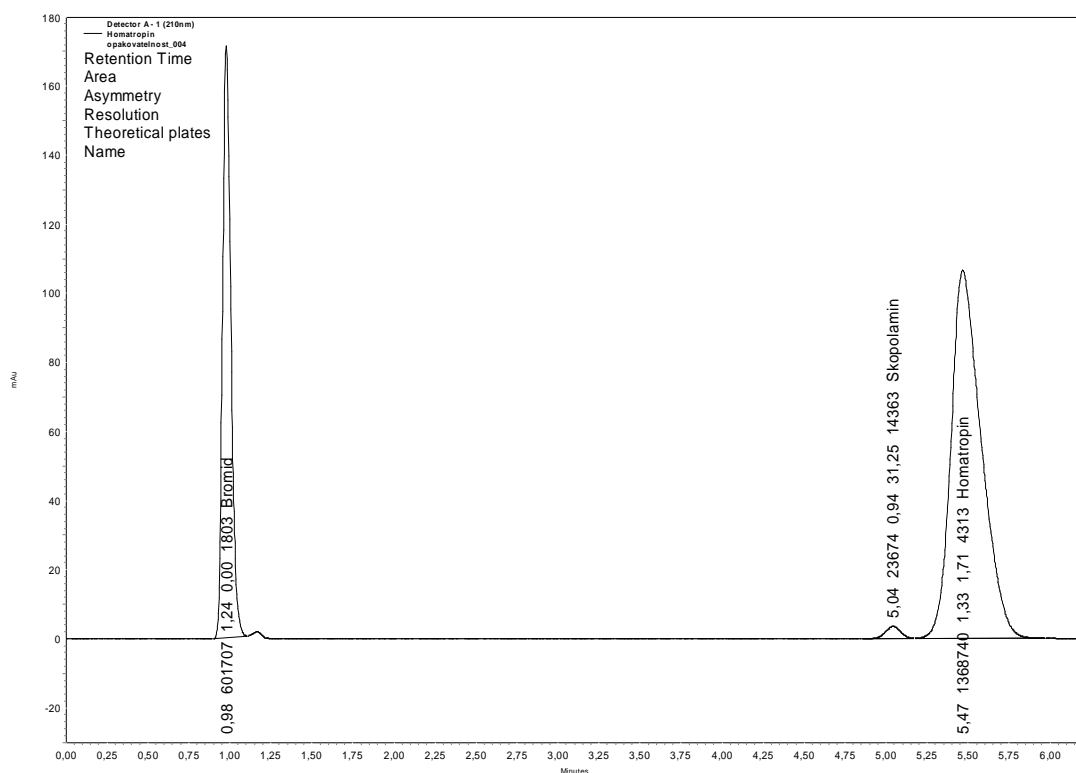
UV detekce: 210 nm

Teplota: laboratorní

5.2 Výsledky validace

5.2.1 Test vhodnosti chromatografického systému

Pro ověření testu vhodnosti byl šestkrát dávkován směsný roztok připravený dle kapitoly 4.2.4 Příprava směsného roztoku standardů homatropin-hydrobromidu a skopolamin-hydrobromidu. Výsledky jsou uvedeny v tabulkách Tab. 1 – 4.



Obr. 7: Test vhodnosti chromatografického systému, měřeno za chromatografických podmínek viz kapitola 5.1.4.

5.2.1.1 Rozlišení

Číslo vzorku	Skopolamin-hydrobromid	Homatropin-hydrobromid
1	30,82	1,68
2	30,95	1,69
3	30,80	1,70
x	30,86	1,69

Tab. 1: Rozlišení

Parametr VYHOVUJE požadavku na rozlišení $R_S > 1,5$ [23].

Vysoká hodnota rozlišení píku skopolamin-hydrobromidu je dána přítomností píku bromidového iontu v úvodu separace.

5.2.1.2 Faktor symetrie

Číslo vzorku	Skopolamin-hydrobromid	Homatropin-hydrobromid
1	0,99	1,33
2	0,93	1,33
3	0,96	1,34
x	0,96	1,33

Tab. 2: Faktor symetrie

Parametr VYHOVUJE požadavku na faktor symetrie $A_S = 0,8 - 1,5$ [23].

5.2.1.3 Zdánlivý počet teoretických pater

Číslo vzorku	Skopolamin-hydrobromid	Homatropin-hydrobromid
1	13775	4288
2	13946	4236
3	13887	4318
x	13869	4281

Tab. 3: Zdánlivý počet teoretických pater

5.2.1.4 Opakovatelnost

Číslo měření	Skopolamin-hydrobromid		Homatropin-hydrobromid	
	A	t _R	A	t _R
1	23544	5,00	1372676	5,43
2	23789	5,03	1371127	5,45
3	23985	5,02	1372032	5,45
4	24008	5,04	1373200	5,47
5	23674	5,04	1368740	5,47
6	24049	5,06	1360582	5,49
n	6	6	6	6
x	23841,5	5,031667	1369726,167	5,46
SD	187,3897	0,018634	4332,754029	0,019149
RSD (%)	0,79	0,37	0,32	0,35

Tab. 4: Opakovatelnost

Parametr VYHOVUJE požadavku na opakovatelnost RSD < 1 %.

5.2.2 Validace metody

5.2.2.1 Přesnost

Pro stanovení přesnosti byly připraveny roztoky léčivých přípravků a roztoku standardu skopolamin-hydrobromidu připraveného dle kapitoly 4.2.2.

Navážka roztoku očních kapek byla doplněna po rysku odměrné baňky roztokem standardu nečistoty skopolamin-hydrobromidu, připraveného dle kapitoly 4.2.2 Příprava zásobního roztoku standardu skopolamin-hydrobromidu, aby výsledná koncentrace homatropin-hydrobromidu byla 25 mg/100 ml.

V případě 1% roztoku očních kapek (s chloridem sodným) byla navážka doplněna po rysku 20 ml odměrné baňky. U 2% očních kapek (s NaCl i s puřem F 6,45) byla navážka doplněna po rysku 25 ml odměrné baňky.

Bylo připraveno šest roztoků od každého druhu očních kapek a každý připravený roztok byl měřen třikrát. V tabulkách Tab. 6, 8, 10 jsou uvedeny průměry z těchto tří měření.

5.2.2.1.1 Oční kapky s homatropin-hydrobromidem 1% (s NaCl)

Číslo roztoku	Navážka léčivého přípravku (g)
1	0,50210
2	0,50248
3	0,50107
4	0,50147
5	0,50110
6	0,50034

Tab. 5: Navážky vzorků

Číslo měření	Skopolamin-hydrobromid		Homatropin-hydrobromid	
	A	t _R	A	t _R
1	24718	4,9167	1350990	5,34
2	25122,33	4,92	1365623	5,34
3	24857	4,9133	1351371	5,333
4	24652,67	4,9067	1342893	5,32
5	24667,67	4,91	1356755	5,33
6	24611,67	4,9167	1339151	5,3367
n	6	6	6	6
x	24771,6	4,914	1351131	5,3333
SD	174,977	0,004	8690,13	0,0069
RSD (%)	0,71	0,09	0,64	0,13

Tab. 6: Přesnost pro 1% oční kapky

Parametr VYHOVUJE požadavku RSD < 5 %.

5.2.2.1.2 Oční kapky s homatropin-hydrobromidem 2% (s NaCl)

Číslo roztoku	Navážka léčivého přípravku (g)
1	0,31765
2	0,31700
3	0,31495
4	0,30954
5	0,31555
6	0,30990

Tab. 7: Navážky vzorků

Číslo měření	Skopolamin-hydrobromid		Homatropin-hydrobromid	
	A	t _R	A	t _R
1	24918	4,9067	1388455	5,3167
2	25188,67	4,9067	1377945,67	5,3133
3	25000	4,90	1376048,33	5,3133
4	25313,67	4,91	1358609	5,32
5	25049,67	4,92	1372642	5,33
6	24819	4,9133	1341894	5,33
n	6	6	6	6
x	25048,2	4,909	1369266	5,3206
SD	164,325	0,006	15076,2	0,0071
RSD (%)	0,66	0,13	1,10	0,13

Tab. 8: Přesnost pro 2% oční kapky

Parametr VYHOVUJE požadavku RSD < 5 %.

5.2.2.1.3 Oční kapky s homatropin-hydrobromidem 2% (s pufrem F 6,45)

Číslo roztoku	Navážka léčivého přípravku (g)
1	0,31578
2	0,31558
3	0,31658
4	0,31603
5	0,31738
6	0,31994

Tab. 9: Navážky vzorků

Číslo měření	Skopolamin-hydrobromid		Homatropin-hydrobromid	
	A	t _R	A	t _R
1	24964	4,9067	1385602,67	5,3167
2	25045	4,92	1387760,67	5,33
3	25335,33	4,9167	1383994,33	5,3267
4	26694,33	4,9067	1396777,67	5,31
5	24681,33	4,91	1402682,67	5,3133
6	25158,33	4,8967	1412259	5,3067
n	6	6	6	6
x	25313,1	4,909	1394846	5,3172
SD	648,733	0,008	10179,7	0,0085
RSD (%)	2,56	0,15	0,73	0,16

Tab. 10: Přesnost pro 2% kapky s pufrém
Parametr VYHOVUJE požadavku RSD < 5 %.

5.2.2.2 Robustnost

Pro měření robustnosti byl použit roztok připravený dle kapitoly 4.2.4 Příprava směsného roztoku standardů homatropin-hydrobromidu a skopolamin-hydrobromidu. Směsný roztok standardů byl analyzován při různých poměrech mobilní fáze, viz Tab. 11. Průměrné hodnoty z měření jsou uvedeny v tabulkách Tab. 12 – 13.

Acetonitril (%)	Fosfátový pufr (%)
5	95
7	93
9	91
11	89
13	87

Tab. 11: Složení mobilní fáze pro testování robustnosti

Vliv na retenční čas

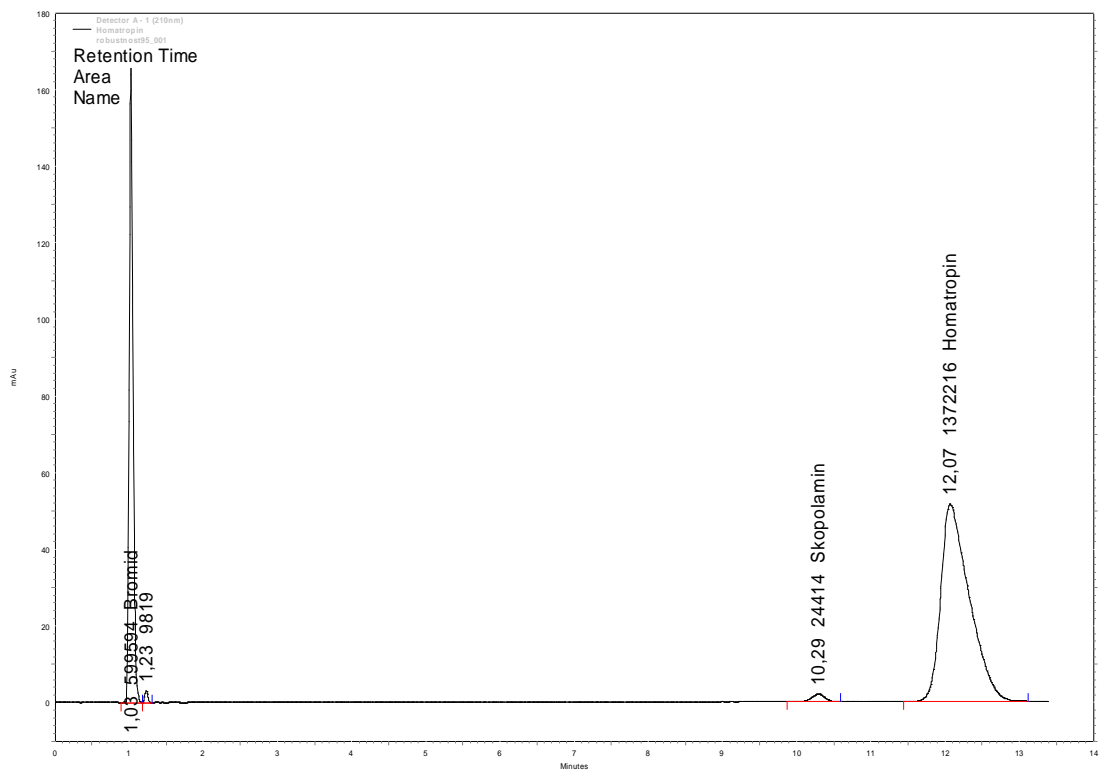
Mobilní fáze (%)	Skopolamin-hydrobromid	Homatropin-hydrobromid
5:95	10,29	12,07
7:93	6,995	7,335
9:91	5,03	5,46
11:89	3,7433	3,9767
13:87	3,14	3,14

Tab. 12: Vliv složení mobilní fáze na retenční čas

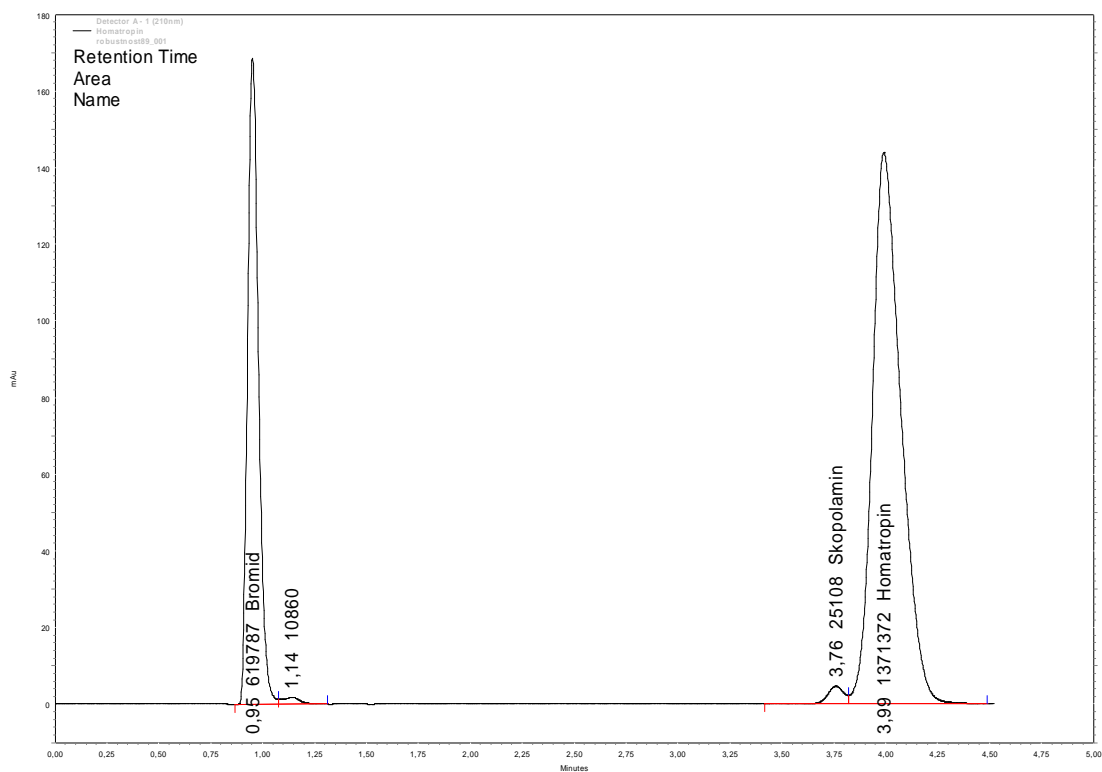
Vliv na plochu píku

Mobilní fáze (%)	Skopolamin-hydrobromid		Homatropin-hydrobromid	
	A	A _R (%)	A	A _R (%)
5:95	21617	92,33	1374475	100,66
7:93	24462,5	104,49	1379102	101,00
9:91	23412,17	100,00	1365514	100,00
11:89	24848,33	106,13	1371850,33	100,46
13:87	1391550,67	5943,71	1391550,67	101,91

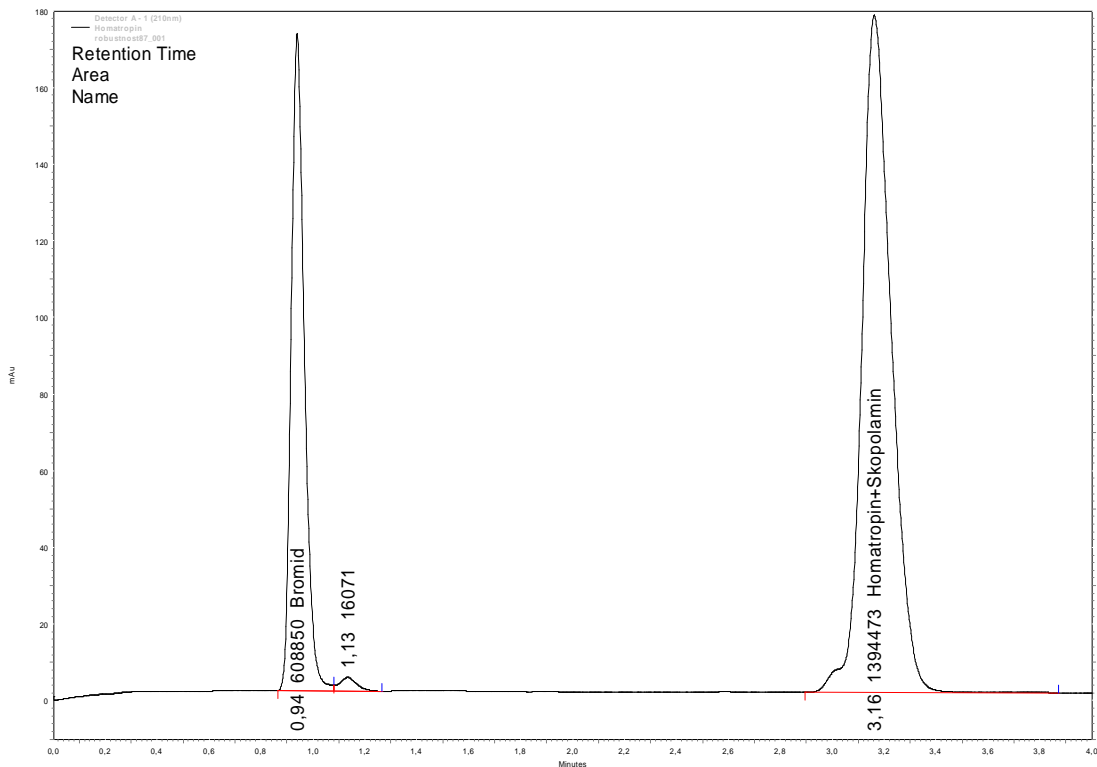
Tab. 13: Vliv složení mobilní fáze na plochu píku



Obr. 8: Robustnost při poměru mobilní fáze 5:95, měřeno za chromatografických podmínek viz kapitola 5.1.4.



Obr. 9: Robustnosti při poměru mobilní fáze 11:89, měřeno za chromatografických podmínek viz kapitola 5.1.4.



Obr. 10: Robustnost při poměru mobilní fáze 13:87, měřeno za chromatografických podmínek viz kapitola 5.1.4.

Složení mobilní fáze má velký vliv na retenční čas a separační účinnost metody. Se snižujícím se množstvím acetonitrilu v mobilní fázi dochází k výraznému prodloužení retenčního času homatropin-hydrobromidu i skopolamin-hydrobromidu. Při vyšších koncentracích acetonitrilu je analýza urychlena natolik, že nejsou dostatečně odděleny píky stanovovaných látek.

Vliv na plochu píku homatropin-hydrobromidu je při změně chromatografických podmínek pouze minimální. Plocha píku skopolamin-hydrobromidu se změnou mobilní fáze mění minimálním způsobem.

5.2.2.3 Linearita

Pro měření linearity bylo připraveno 6 kalibračních roztoků skopolamin-hydrobromidu a homatropin-hydrobromidu dle kapitol 4.2.5 Příprava kalibračních roztoků skopolamin-hydrobromidu pro stanovení linearity a 4.2.6 Příprava kalibračních roztoků homatropin-hydrobromidu pro stanovení linearity. Každý roztok byl měřen třikrát a výsledek je uveden jako průměr hodnot z měření v Tab. 14 a 15.

5.2.2.3.1 Skopolamin-hydrobromid

Koncentrace (%)	Koncentrace (mg/100 ml)	A
0	0	0
20	0,1	6190
40	0,2	11150,67
60	0,3	16288
80	0,4	21664,67
100	0,5	25908,33

Regresní funkce : $y = kx + q$

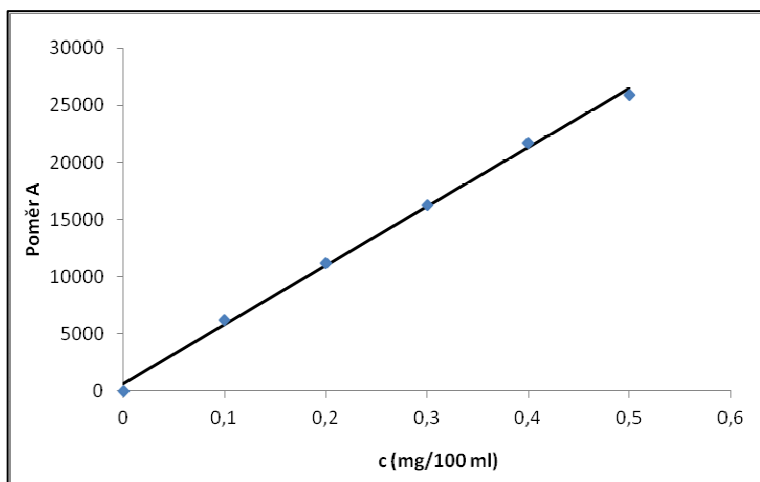
počet: bodů $n = 6$

Parametry regresní přímky a odhady jejich směrodatných odchylek

směrnice	$k = 51742,8571428571 \pm 1226,29871709989$
absolutní člen	$q = 597,619047619053 \pm 371,280374505679$
koeficient korelace	$R = 0,99899$
reziduální odchylka	$s_{rez} = 512,99755859375$

Závislost y na x **byla** prokázána na hladině významnosti 0,001

Tab. 14: Linearita pro skopolamin-hydrobromid, parametry kalibrační křivky skopolamin-hydrobromidu byly získané metodou lineární regrese.



Obr. 11: Kalibrační křivka skopolamin-hydrobromidu

Parametr VYHOVUJE požadavku na linearitu, koeficient korelace $R = 0,9990$.

5.2.2.3.2 Homatropin-hydrobromid

Koncentrace (%)	Koncentrace (mg/100 ml)	A
50	12,5	684053,33
70	17,5	946129,67
90	22,5	1224151,67
110	27,5	1512973
130	32,5	1796237,33
150	37,5	2065401

Regresní funkce : $y = kx + q$

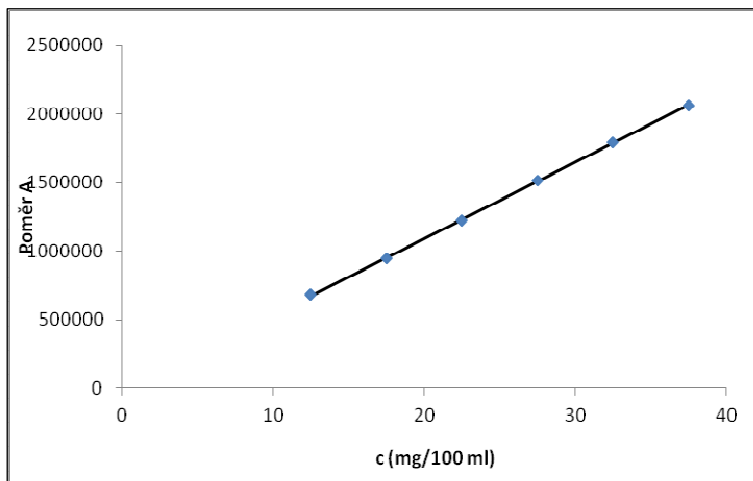
počet: bodů $n = 6$

Parametry regresní přímky a odhady jejich směrodatných odchylek

směrnice	$k = 55690,7580571429 \pm 385,742665496946$
absolutní člen	$q = -20777,9514285735 \pm 10190,5931229565$
koeficient korelace	$R = 0,99990$
reziduální odchylka	$s_{rez} = 8068,38671875$

Závislost y na x **byla** prokázána na hladině významnosti 0,001

Tab. 15: Linearita pro homatropin-hydrobromid, parametry kalibrační křivky homatropin-hydrobromidu získané metodou lineární regrese.



Obr. 12: Kalibrační křivka homatropin-hydrobromidu

Parametr VYHOVUJE požadavku na linearitu, koeficient korelace $R = 0,9990$.

5.2.2.4 Správnost

Měření správnosti bylo provedeno metodou standardního přidavku stanovovaných látek k placebo přípravku.

Roztoky placebo příslušných očních kapek byly připraveny předem ve Fakultní nemocnici v Motole.

Směsný roztok standardů byl připraven dle kapitoly 4.2.4 Příprava směsného roztoku standardů homatropin-hydrobromidu a skopolamin-hydrobromidu.

Bylo připraveno šest roztoků odpovídajících složením jednotlivým očním kapkám. K navážce roztoku placebo odpovídající koncentraci 25 mg/100 ml homatropin-hydrobromidu (ve výsledném roztoku, v odpovídajících očních kapkách) byl přidán směsný roztok standardů.

Roztoky obsahující 1% roztok placebo očních kapek (s chloridem sodným) byly připraveny navážením 0,625 g roztoku placebo očních kapek a doplněním po rysku 25 ml odměrné baňky směsným roztokem standardů.

Roztoky obsahující 2% roztok placebo očních kapek (s chloridem sodným, s puřem F 6,45) byly připraveny navážením 0,3125 g roztoku placebo očních kapek a doplněním po rysku 25 ml odměrné baňky směsným roztokem standardů.

Každý připravený roztok byl měřen třikrát a průměr z těchto tří měření je uveden v tabulkách Tab. 16 – 18.

Vzorce pro výpočet: $c=(A/A_n)\times c_0$
 $R_i=(c/c_0)\times 100$

Skopolamin-hydrobromid:

$$c_0=0,5014 \text{ mg}/100 \text{ ml}$$

$$A_n=24607,33$$

Homatropin-hydrobromid:

$$c_0=25,016 \text{ mg}/100 \text{ ml}$$

$$A_n=1359193,33$$

5.2.2.4.1 Oční kapky s homatropin-hydrobromidem 1% (s NaCl)

	Skopolamin-hydrobromid			Homatropin-hydrobromid		
	A	c	R _i (%)	A	c	R _i (%)
1	24032,3	0,4897	97,67	1355933,67	24,956	99,76
2	23502	0,4789	95,51	1335207,33	24,5745	98,24
3	23633	0,4815	96,03	1349074,33	24,8298	99,26
4	23679,6	0,4825	96,23	1347946,67	24,8090	99,17
5	23782,33	0,4846	96,65	1346270,67	24,7782	99,05
6	25795	0,5256	104,83	1342696,33	24,7124	98,79
x	24070,7	0,49	97,82	1346188,17	24,777	99,05
SD	788,015	0,016	3,20	6313,68371	0,1162	0,46
RSD (%)	3,27	3,27	3,27	0,47	0,47	0,47

Tab. 16: Správnost pro 1% oční kapky

Parametr VYHOVUJE požadavku na správnost $R_i=100\% \pm 5\%$ a $RSD < 5\%$.

5.2.2.4.2 Oční kapky s homatropin-hydrobromidem 2% (s NaCl)

	Skopolamin-hydrobromid			Homatropin-hydrobromid		
	A	c	R _i (%)	A	c	R _i (%)
1	24021	0,4895	97,63	1355945	24,9562	99,76
2	23839,67	0,4858	96,89	1363330,33	25,092	100,30
3	23409	0,4770	95,13	1362302	25,0732	100,23
4	24069,33	0,4904	97,81	1373759,67	25,2841	101,07
5	24013,33	0,4893	97,59	1373244,33	25,2746	101,03
6	24042,67	0,4899	97,71	1373068,33	25,2714	101,02
x	23899,2	0,487	97,13	1366941,61	25,159	100,57
SD	231,383	0,005	0,94	6822,01919	0,1256	0,50
RSD (%)	0,97	0,97	0,97	0,50	0,50	0,50

Tab. 17: Správnost pro 2% oční kapky

Parametr VYHOVUJE požadavku na správnost R_i=100 % +/- 5 % a RSD < 5 %.

5.2.2.4.3 Oční kapky s homatropin-hydrobromidem 2% (s pufrem F 6,45)

	Skopolamin-hydrobromid			Homatropin-hydrobromid		
	A	c	R _i (%)	A	c	R _i (%)
1	24099,67	0,4911	97,95	1380475,33	25,4077	101,57
2	24192	0,4929	98,30	1374114	25,2906	101,20
3	23501	0,4789	95,51	1363180,33	25,0894	100,29
4	24793,67	0,5052	100,76	1347037,66	24,7923	99,11
5	24829	0,5059	100,90	1353219,33	24,9060	99,56
6	23909,67	0,4872	97,17	1371546,33	25,2434	100,91
x	24220,8	0,494	98,43	1364928,83	25,122	100,44
SD	470,55	0,01	1,91	11762,3405	0,2165	0,88
RSD (%)	1,94	1,94	1,94	0,86	0,86	0,88

Tab. 18: Správnost pro 2% oční kapky s pufrem

Parametr VYHOVUJE požadavku na správnost R_i=100 % +/- 5 % a RSD < 5 %.

5.2.2.5 Stabilita

Pro měření stability byly připraveny dva roztoky. První roztok obsahoval roztok standardu skopolamin-hydrobromidu o koncentraci 0,5 mg/100 ml a byl připraven dle kapitoly 4.2.2. Druhý roztok obsahoval homatropin-hydrobromid o koncentraci 25 mg/100 ml a byl připraven dle kapitoly 4.2.3.

Vzorec pro výpočet faktoru stability: $S_T = (|A - A_0| / A_0) \times 100$

5.2.2.5.1 Homatropin-hydrobromid

5.2.2.5.1.1 Stabilita za snížené teploty, za nepřístupu světla

Čas (h)	A	S _T (%)
0	1359193,33	0
24	1364451,33	0,39
48	1370443	0,82
72	1369923	0,79

Tab. 19: Stabilita za snížené teploty, za nepřístupu světla

5.2.2.5.1.2 Stabilita za laboratorní teploty, na světle

Čas (h)	A	S _T (%)
0	1359193,33	0
24	1354969	0,31
48	1360665,33	0,11
72	1360301,33	0,08

Tab. 20: Stabilita za laboratorní teploty, na světle

Parametr VYHOVUJE požadavku na stabilitu, faktor stability S_T je < 1 %.

5.2.2.5.2 Skopolamin-hydrobromid

5.2.2.5.2.1 Stabilita za snížené teploty, za nepřístupu světla

Čas (h)	A	S _T (%)
0	24607,33	0
24	25741,33	4,61
48	27066,67	9,99
72	-	-

Tab. 21: Stabilita za snížené teploty, za nepřístupu světla

5.2.2.5.2.2 Stabilita za laboratorní teploty, na světle

Čas (h)	A	S _T (%)
0	24607,33	0
24	25473,33	3,52
48	25786	4,79
72	-	-

Tab. 22: Stabilita za laboratorní teploty, na světle

Parametr NEVYHOVUJE požadavku na stabilitu, faktor stability S_T není < 1 %.

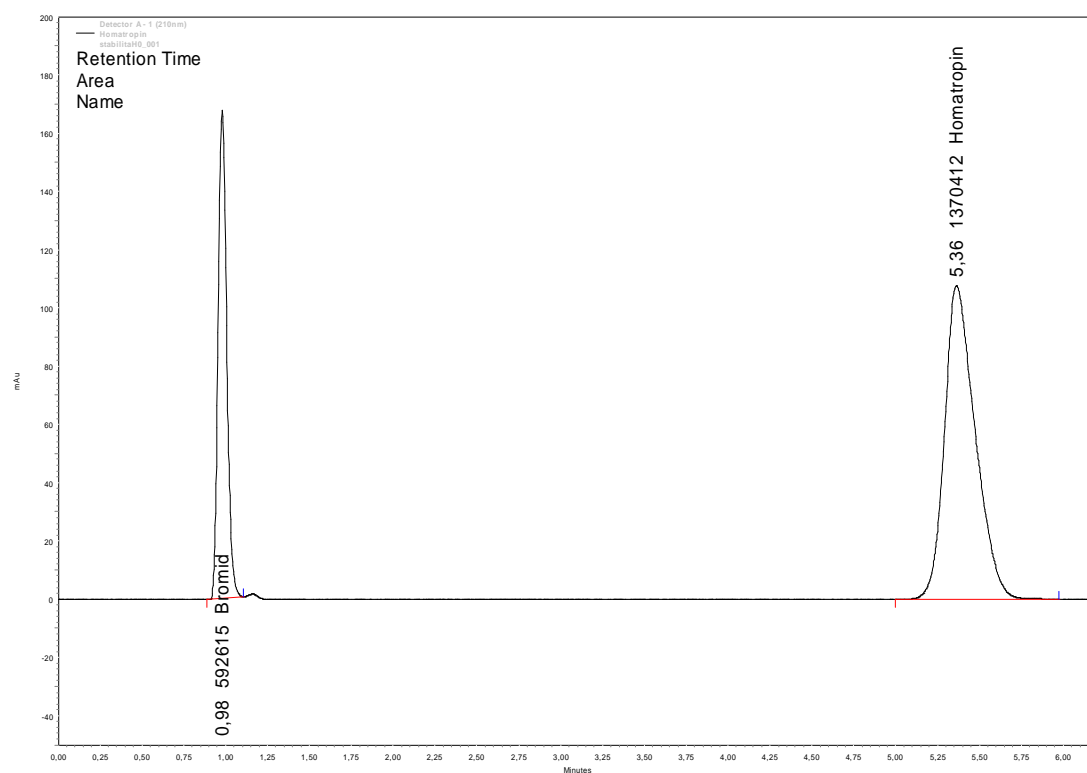
Z důvodu vysoké nestability skopolamin-hydrobromidu při výše zmíněných podmínkách skladování již po 48 hodinách, jsme se rozhodli stabilitu po 72 hodinách již neměřit.

Homatropin-hydrobromid je dostatečně stabilní za obou podmínek stanovení. Podle výsledku měření stability je výhodnější homatropin-hydrobromid skladovat za laboratorní teploty a za přístupu světla.

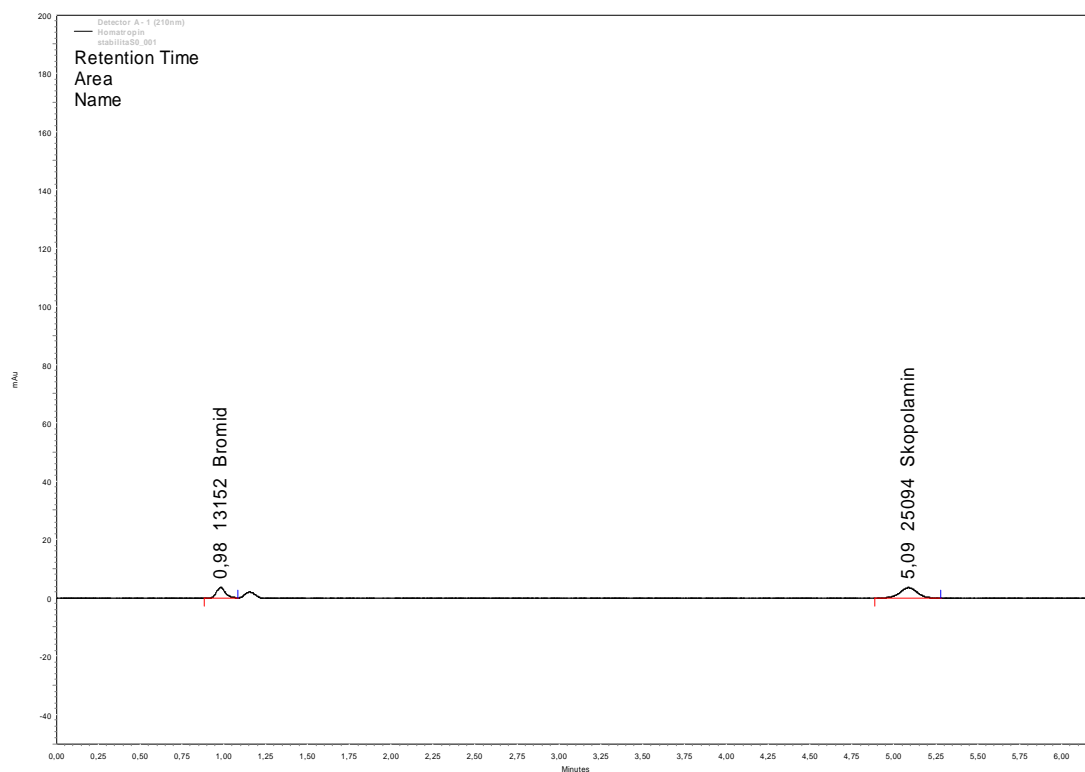
5.2.2.6 Selektivita

Do selektivity byly vybrány základní chromatogramy roztoku homatropin-hydrobromidu (Obr. 13), skopolamin-hydrobromidu (Obr. 14), roztoků placeba očních kapek s homatropin-hydrobromidem 1% (s NaCl), 2% (s NaCl) a 2% (s puřrem F 6,45) o koncentraci 25 mg/100 ml (v odpovídajících očních kapkách), viz Obr. 15,17,19.

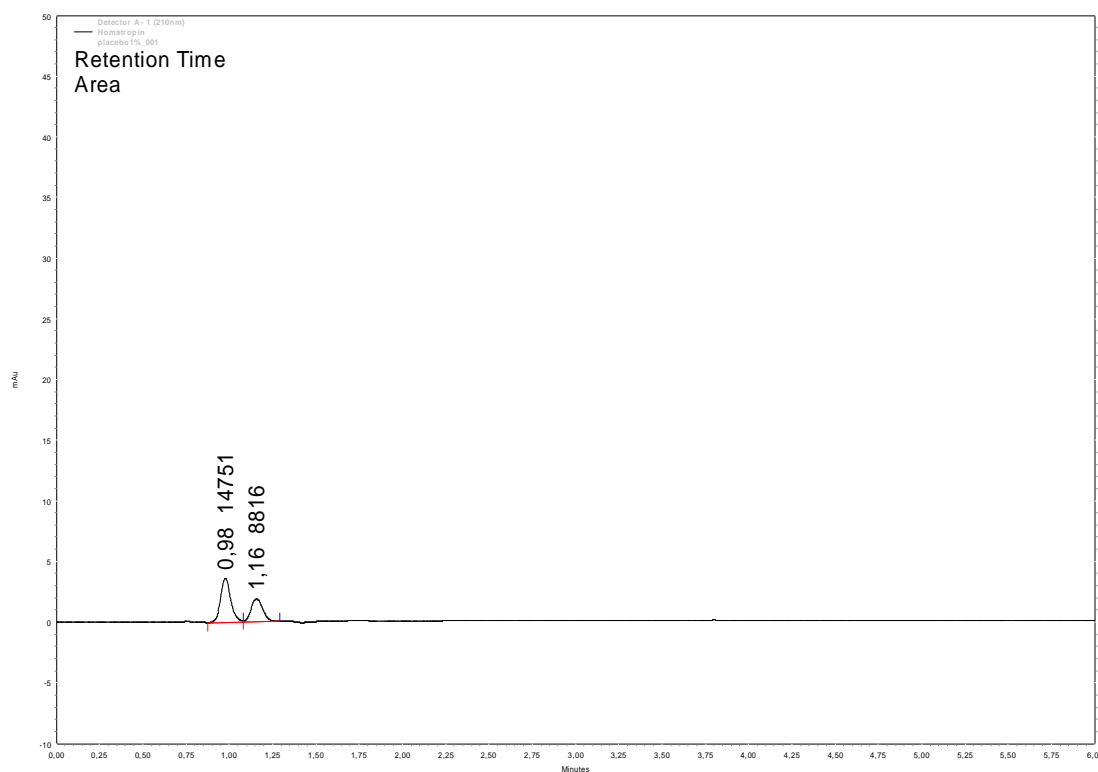
Dále jsou uvedeny chromatogramy směsných roztoků očních kapek a skopolamin-hydrobromidu odpovídající koncentraci 25 mg/100 ml homatropin-hydrobromidu a 0,5 mg/100 ml skopolamin-hydrobromidu (Obr. 16,18,20).



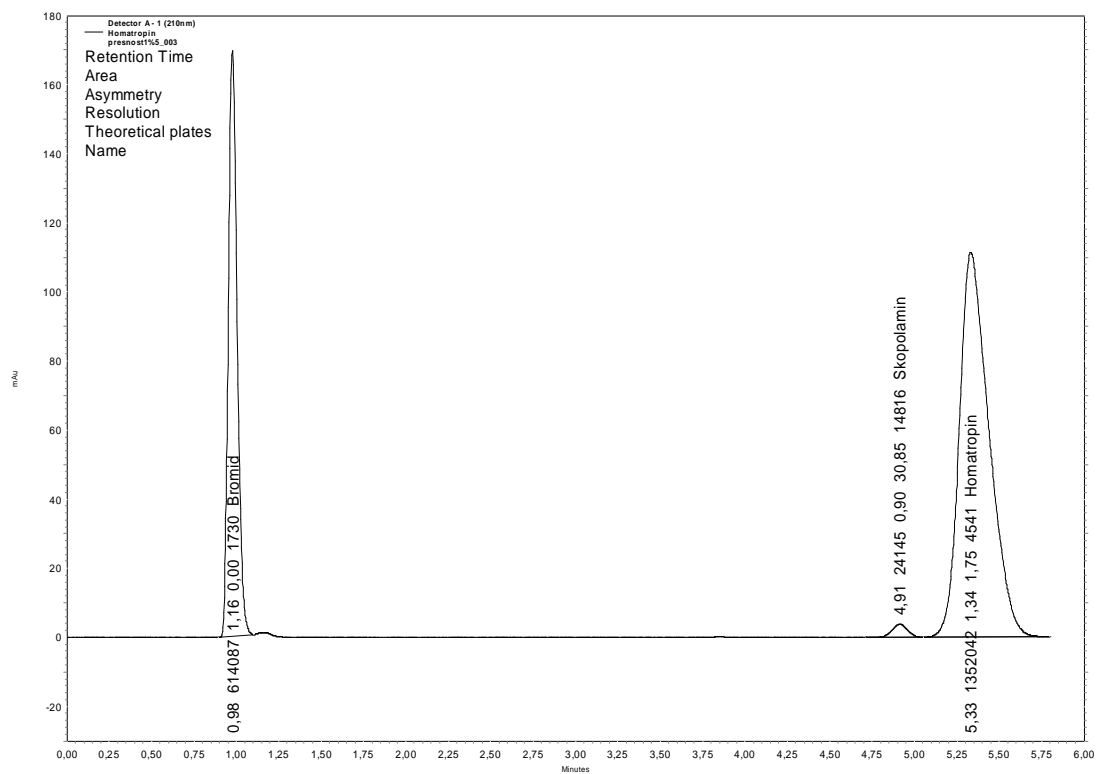
Obr. 13: Chromatogram roztoku homatropin-hydrobromidu o koncentraci 25 mg/100 ml, měřeno za chromatografických podmínek viz kapitola 5.1.4.



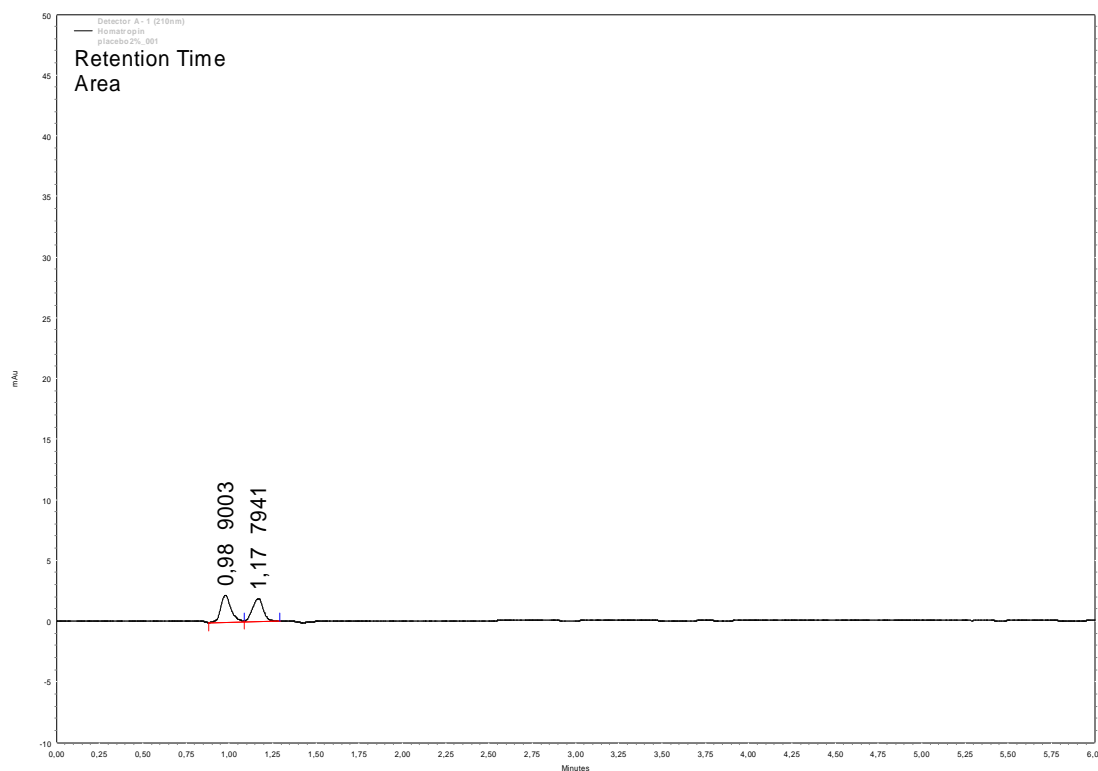
Obr. 14: Chromatogram roztoku skopolamin-hydrobromidu o koncentraci 0,5 mg/100 ml, měřeno za chromatografických podmínek viz kapitola 5.1.4.



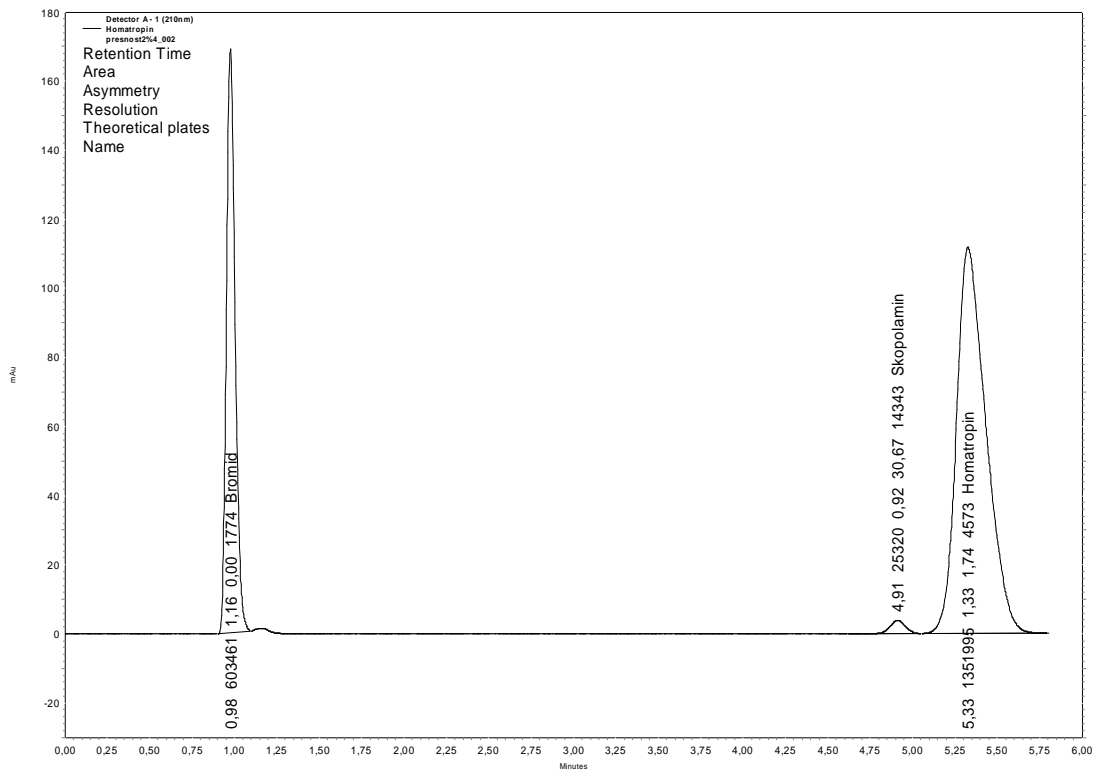
Obr. 15: Chromatogram roztoku placebo očních kapek s homatropin-hydrobromidem 1% (s NaCl), měřeno za chromatografických podmínek viz kapitola 5.1.4.



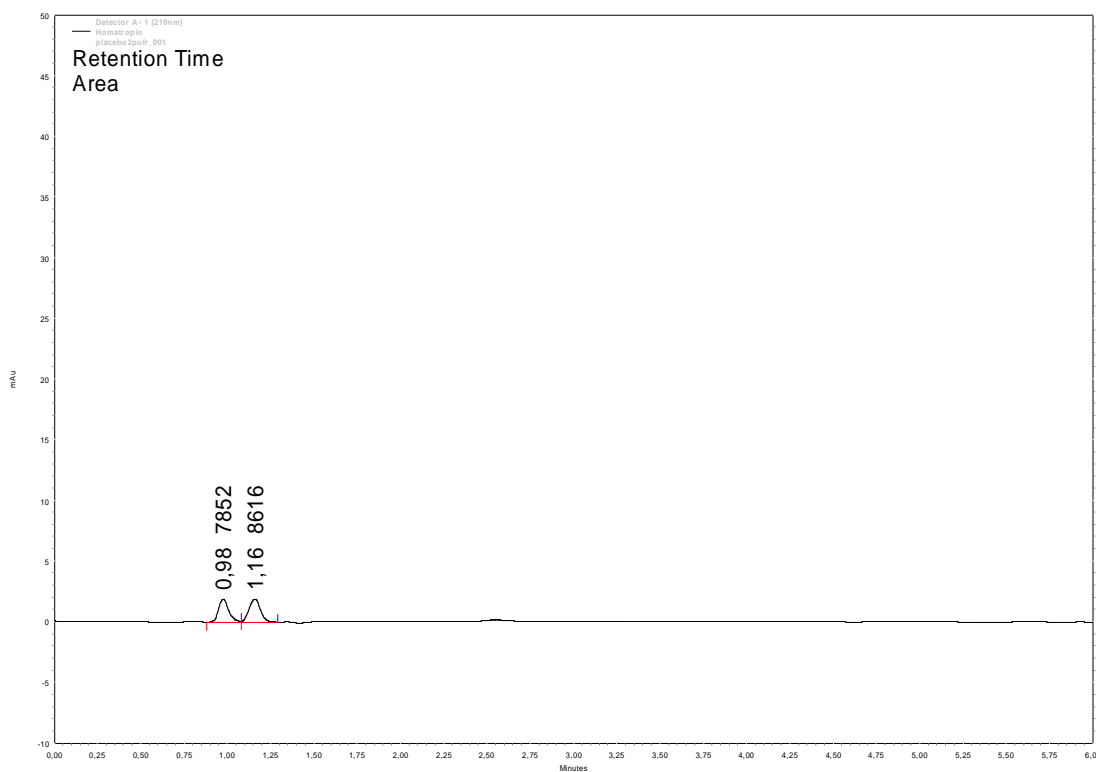
Obr. 16: Chromatogram směrného roztoku očních kapek s homatropin-hydrobromidem 1% (s NaCl) a skopolamin-hydrobromidu, měřeno za chromatografických podmínek viz kapitola 5.1.4.



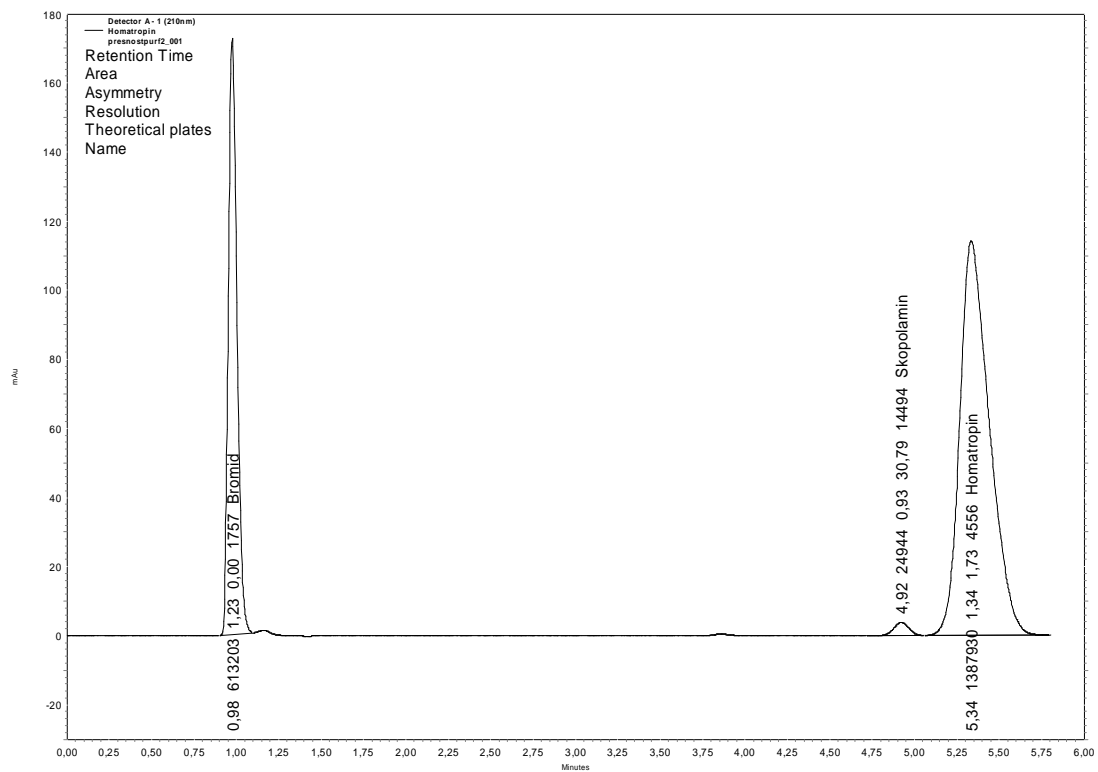
Obr. 17: Chromatogram roztoku placebo očních kapek s homatropin-hydrobromidem 2% (s NaCl), měřeno za chromatografických podmínek viz kapitola 5.1.4.



Obr. 18: Chromatogram směrného roztoku očních kapek s homatropin-hydrobromidem 2% (s NaCl) a skopolamin-hydrobromidu, měřeno za chromatografických podmínek viz kapitola 5.1.4.



Obr. 19: Chromatogram roztoku placebo očních kapek s homatropin-hydrobromidem 2% (s puřrem F 6,45), měřeno za chromatografických podmínek viz kapitola 5.1.4.



Obr. 20: Chromatogram směsného roztoku očních kapek s homatropin-hydrobromidem 2% (s pufrem F 6,45) a skopolamin-hydrobromidu, měřeno za chromatografických podmínek viz kapitola 5.1.4.

5.2.2.7 Limit detekce

Pro stanovení limitu detekce byly připraveny roztoky placebo očních kapek odpovídající koncentraci 25 mg/100 ml homatropin-hydrobromid (v odpovídajících očních kapkách).

LOD detekční limit $LOD=(3 \times s_n \times K)/a$

LOQ kvantifikační limit $LOQ=(10 \times s_n \times K)/a$

	1%	2%	2% s puřrem
m (g/100 ml)	2,42092	1,25048	1,27605
r ⁻ (mAu)	0,115	0,036	-0,042
r ⁺ (mAu)	0,175	0,072	0,025
s _n	0,012	0,0072	0,0034
K	10183,33		
a	497081,7120623		
c (Nečistota A)	0,0514 mg/1000 ml		
Výška píku	2,509		
Plocha píku	25550		

Tab. 23: Hodnoty z měření roztoků placebo očních kapek

	LOD (mg/l)	LOQ (mg/l)
1%	0,000737504	0,002458347
2%	0,000442502	0,001475008
2% s puřrem	0,000208959	0,000696531

Tab. 24: Výsledky LOD, LOQ

6 ZÁVĚR

Cílem rigorózní práce byl vývoj a validace HPLC metody pro stanovení homatropin-hydrobromidu a jeho rozkladného produktu skopolamin-hydrobromidu v 1% a 2% očních kapkách. Lékopisná metoda stanovuje pouze obsah homatropin-hydrobromidu, ale pro účely stabilitní studie je třeba sledovat i hladinu rozkladného produktu.

Jako mobilní fáze byl použit fosfátový pufr a acetonitril v poměru 91:9. Fosfátový pufr obsahoval 3,12082 g dihydrogenfosforečnanu sodného dihydrátu rozpuštěného v 1000,0 g vody. Do roztoku bylo přidáno 200 µl triethylaminu a pH roztoku bylo upraveno kyselinou fosforečnou 85% na hodnotu 2,5.

Bylo vyzkoušeno několik stacionárních fází, jako nejvhodnější byla vybrána chromatografická kolona Ascentis Express F5 100 x 4,6 mm, 2,7 µm. Výsledky byly vyhodnocovány za použití UV detektoru při vlnové délce 210 nm.

Během analýzy byly píky eluovány v pořadí: bromidový pík, pík skopolamin-hydrobromidu a pík homatropin-hydrobromidu. Vlastní délka analýzy nepřekročila 6,5 minuty při průtoku mobilní fáze 1,1 ml/min.

Při validaci byly ověřovány tyto parametry: test způsobilosti chromatografického systému, přesnost, správnost, robustnost, linearita, selektivita, stabilita a limit detekce. Vyvinutá metoda je vhodná pro použití při rutinní analýze v rámci kontrolní laboratoře, protože poskytuje přesné a správné výsledky.

7 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] Suchopár J., Valentová Š., Šimek R. a kolektiv *Remedia compendium*, 4. vydání, Praha, nakladatelství Panax Co. Spol. s.r.o., 2009, 946 s., ISBN 978-80-902806-4-9
- [2] Klimeš J. a kolektiv *Kontrola léčiv I*, 1. vydání, Praha, nakladatelství Karolinum, 2006, 149 s., ISBN 80-246-0419-1
- [3] Weston A., Brown P. R. *High Performance Liquid Chromatography & Capillary Electrophoresis Principles and Practice*, 1. vydání, San Diego, nakladatelství Academic Press, 1997, 280 s., ISBN 978-0-12-136640-7
- [4] Katz E., Eksteen R., Schoenmakers P. *Handbook of HPLC*, 1. vydání, New York, nakladatelství CRC Press, 1998, 1009 s., ISBN 978-0-12-136640-7
- [5] Nováková L., Douša M. a kolektiv *Moderní HPLC separace v teorii a praxi I.*, 1. vydání, Praha, vydali Lucie Nováková a Michal Douša, 2013, 300 s., ISBN 978-80-260-4243-3
- [6] Karlíček R. a kolektiv autorů *Analytická chemie pro farmaceuty*, 2. vydání, Praha, nakladatelství Karolinum, 2001, 281 s., ISBN 80-246-0348-9
- [7] Churáček J. a kolektiv *Analytická separace látek*, 1. vydání, Praha, vydavatelství SNTL Nakladatelství technické literatury, 1990, 384 s.
- [8] Jandera P., článek vzniklý na základě přednášky, dostupný na www.hplc.cz/Teorie/mlc.html, navštíveno 12.1.2014
- [9] Klimeš J. a kolektiv *Kontrola léčiv II*, 1. vydání, Praha, nakladatelství Karolinum, 2004, 94 s., ISBN 80-246-0818-9
- [10] Skoog D. A., West D. M., Holler F. J. *Fundamentals of Analytical Chemistry*, 7. vydání, Saunders College Publishing, 1995, 870 s., ISBN 978-0030059384
- [11] Bezáková Ž., Sedlářová E., Stankovičová M. *Základy farmaceutické analýzy, kvalitatívne hodnotenie chemických liečiv*, 1. vydání, Nitra, vydavateľ'stvo VA Print, 2002, 722 s., ISBN 80-968252-7-4
- [12] Jandera P. *Pokroky ve vývoji kolon pro HPLC-současný stav a perspektivy*, Katedra analytické chemie, Fakulta chemicko-technologická, Univerzita Pardubice, článek dostupný na stránce www.vitamins.cz/archiv/2003/doc/w/HPLC_01.doc, navštíveno 12.1.2014

- [13] Sýkora D., Tesařová E., Vosmanská M., Zvolánková M. *Moderní stacionární fáze pro HPLC*, Chemické listy 101, s. 101 – 107, 2007, ISSN 1213-7103, http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2007_03_190-199.pdf, navštíveno 12.1.2014
- [14] Švec F. *Monolitické stacionární fáze pro HPLC*, Chemické Listy 98, s. 232 – 238, 2004, ISSN 1213-7103, http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2004_05_01.pdf, navštíveno 12.1.2014
- [15] článek publikovaný na http://www.hplc.cz/Teorie/monolitic_columns.htm, navštíveno 12.1.2014
- [16] Motyka K., Hlaváč J. *Stručný přehled separačních metod*, 1. vydání, Olomouc, vydala Univerzita Palackého v Olomouci, 2009, 45 s., ISBN 978-80-244-2304-3
- [17] Šabartová J. *Validace analytických metod v kontrole léčiv*, Věstník SÚKL, 1994, číslo 1
- [18] Nováková L., Douša M. a kolektiv *Moderní HPLC separace v teorii a praxi II.*, 1. vydání, Praha, vydali Lucie Nováková a Michal Douša, 2013, 236 s., ISBN 978-80-260-4244-0
- [19] Martínková J. a kolektiv *Farmakologie pro studenty zdravotnických oborů*, 1. vydání, Praha, nakladatelství Grada Publishing, 2007, 380 s., ISBN 978-80-247-1356-4
- [20] Lincová D., Farghali H. et. al. *Základní a aplikovaná farmakologie*, 2. vydání, Praha, nakladatelství Galén, 2007, 672 s., ISBN 978-80-726-2373-0
- [21] Doležal M. a kolektiv *Farmaceutická chemie léčiv působících na autonomní nervový systém*, 1. vydání, Praha, nakladatelství Karolinum, 2009, 136 s., ISBN 978-80-246-1633-9
- [22] Lullman H., Mohr K., Hein L. *Barevný atlas farmakologie*, 3. české vydání (přeloženo z německého originálu 5. zcela přepracovaného a rozšířeného vydání, nakladatelství Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 2004), Praha, nakladatelství Grada Publishing, 2007, 384 s., ISBN 978-80-247-1672-5
- [23] *Český lékopis 2009*, elektronická verze, 1. vydání, Praha, nakladatelství Grada Publishing, 2009, 3968 s., ISBN 978-802-4729-947
- [24] Fonte A. N. B., Legró M. P., Céspedes Y. R. *Simple and fast RP-HPLC Method for the Determination Prednisolone Sodium Phosphate, Prednisolone,*

Atropine and Homatropine as Residuals in Cleaning Validation of Industrial Pharmaceutical Equipment, vol. 36, 2013, s. 213 – 228, *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, ISSN 1520-572X (online verze), <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/10826076.2011.649874#.Utb1UPsi> mME, navštíveno 12.1.2014

[25] Lau O.-W., Mok C.-S. *High-performance Liquid Chromatographic Determination of Atropine and Atropine-like Alkaloids in Pharmaceutical Preparations with Indirect Conductometric Detection*, vol. 766, 1997, s. 270 – 276, *Journal of Chromatography A*, ISSN 0021-9673, <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0021967396010199>, navštíveno 12.1.2014

[26] Santoni G., Tonsini A., Gratteri P., Mura P., Furlanetto S., Pinzauti S. *Determination of Atropine Sulphate and Benzalkonium Chloride in Eye Drops by HPLC*, Vol. 93, 1993, s. 239 – 243, *International Journal of Pharmaceutics*, ISSN 03785173, <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/037851739390183G>, navštíveno 12.1.2014

[27] Steenkamp P. A., Harding N. M., van Heerden F. R., van Wyk B.-E. *Fatal Datura Poisoning: Identification of Atropine and Scopolamine by High Performance Liquid Chromatography/Photodiode Array/Mass Spectrometry*, vol 145, 2004, s. 31 – 35, *Forensic Science International*, ISSN 0379-0738, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15374592>, navštíveno 12.1.2014

[28] Takahashi M., Nagashima M., Shigeoka S., Nishijima M., Kamata K. *Determination of Atropine in Pharmaceutical Preparations by Liquid Chromatography with Fluorescence Detection*, vol. 775, 1997, s. 137 – 141, *Journal of Chromatography A*, ISSN 0021-9673, <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0021967397003051>, navštíveno 12.1.2014

[29] Kirchhoff C., Bitar Y., Ebel S., Holzgrabe U. *Analysis of Atropine, its Degradation Products and Related Substances of Natural Origin by Means of Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatography*, vol. 1046, 2004, s. 115 – 120, *Journal of Chromatography A*, ISSN 0021-9673,

<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0021967304008726>,

navštíveno 12.1.2014

[30] Leroy P., Moreau A., Nicolas A., Hosotte B. *Sensitive HPLC Determination of Atropine with Electrochemical Detection*, vol. 6, 1983, s. 514 – 515, *Journal of High Resolution Chromatography*, ISSN 1521-4168 (online verze), <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/jhrc.1240060915/abstract>, navštíveno 12.1.2014

[31] Li S., Wahba Khalil S. K. *A HPLC Method for Determination of Atropine in Human Plasma*, vol. 13, 1990, s. 1339 – 1350, *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, ISSN 1520-572X (online verze), <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/01483919008049253?journalCode=ijlc19#.Utb4nfsimME>, navštíveno 12.1.2014

[32] Papadonyannis I., Zotou A., Samanidou V., Georgarakis M. *Solid-Phase Extraction and RP-HPLC Analysis of Atropine Sulphate and Scopolamine-N-Butylbromide in Pharmaceutical Preparations and Biological Fluids*, vol. 22, 1994, s. 83 – 103, *Instrumentation Science & Technology*, ISSN 1525-6030 (online verze), <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/10739149408003023?journalCode=list20#.Utb7hfsimME>, navštíveno 12.1.2014

[33] Papadonyannis I., Samanidou V. F., Theodoridis G. A., Vasilikiotis G. S., van Kempen G. J. M., Beelen G. M. *A Simple and Quick Solid Phase Extraction and Reversed Phase HPLC Analysis of Some Tropane Alkaloids in Feedstuffs and Biological Samples*, vol. 16, 1993, s. 975 – 998, *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, ISSN 1520-572X (online verze), http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/10826079308019565#.Utb84_simME, navštíveno 12.1.2014

[34] Sawabe Y., Yamasaki K., Tagami T., Kawaguchi M., Taguchi S. *Rapid Determination of Atropine and Scopolamine content in Scopolia Extract Powder by HPLC*, vol. 65, 2011, s. 395 – 399, *Journal of Natural Medicines*, ISSN 1861-0293 (online verze), <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21076881>, navštíveno 12.1.2014