

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ
KATEDRA BIOFYZIKY A FYZIKÁLNÍ CHEMIE

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

POROVNÁNÍ METOD MĚŘENÍ KALIBRAČNÍCH KŘIVEK

Vedoucí bakalářské práce: Ing. Martin Drastík, Ph.D.

HRADEC KRÁLOVÉ, 2014/2015

Alena Šerksová

Poděkování

Ráda bych poděkovala svému školiteli Ing. Martinu Drastíkovi, Ph.D. za jeho odborné vedení, cenné připomínky a pomoc, jak při praktických experimentech, tak i při zpracovávání dat, a psaní mé bakalářské práce.

Též děkuji své rodině za velkou trpělivost a podporu, nejen během času věnovanému této práci, ale během celé doby mého studia.

„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 jsou řádně citovány. Práce nebyla použita k získání jiného nebo stejného titulu.“

V Hradci Králové 16. 8. 2015

Alena Šerksová

OBSAH

1. ÚVOD	6
2. ZADÁNÍ – CÍL PRÁCE	7
3. TEORETICKÁ ČÁST	8
3.1 Chromatografické metody	8
3.1.1 <i>Dělení chromatografických metod</i>	8
3.2 Papírová chromatografie (PC)	9
3.3 Chromatografie na tenké vrstvě (TLC)	10
3.4 Plynová chromatografie (GC)	11
3.5 Vysokoučinná kapalinová chromatografie (HPLC)	11
3.5.1 <i>Chromatografický systém</i>	12
3.5.2 <i>Metody HPLC</i>	12
3.5.3 <i>Mobilní fáze</i>	12
3.5.4 <i>Stacionární fáze</i>	12
3.5.5 <i>Kolona</i>	13
3.5.6 <i>Vysokotlaká pumpa</i>	13
3.5.7 <i>Dávkování</i>	14
3.5.8 <i>Detektory HPLC</i>	14
3.5.9 <i>Chromatogram a chromatografické charakteristiky</i>	15
3.5.10 <i>Separční proces kolony</i>	17
3.5.11 <i>Vyhodnocování výsledků v HPLC</i>	18
3.5.12 <i>Využití HPLC</i>	25
3.6 Terbinafin	25
3.6.1 <i>Stanovení obsahu terbinafinu</i>	26
4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	27
4.1 Chemikálie	27
4.2 Přístrojové vybavení.....	27
4.3 HPLC metoda	28
4.4 Příprava roztoků	28
4.4.1 <i>Zásobní roztok terbinafinu (Standard)</i>	28

4.4.2	<i>Roztok propylparabenu (Interní standard)</i>	28
4.4.3	<i>Mobilní fáze HPLC</i>	28
4.4.4	<i>Kalibrační roztoky terbinafinu a interního standardu</i>	28
4.4.5	<i>Reálný vzorek</i>	29
5.	VÝSLEDKY A DISKUZE	30
5.1	První experiment.....	30
5.2	Opakovaný experiment.....	33
5.3	Pokusné experimenty v rámci šetření problému.....	35
6.	ZÁVĚR	39
7.	POUŽITÉ ZKRATKY	40
8.	SEZNAM TABULEK	41
9.	SEZNAM OBRÁZKŮ	42
10.	SEZNAM GRAFŮ	43
11.	CITOVANÁ LITERATURA	44

1. ÚVOD

Tato práce pojednává o chromatografické metodě vysokoúčinná kapalinová chromatografie, s kterou jsem se již setkala jak v teoretické rovině při svém studiu, tak i v praktické rovině v rámci svého zaměstnání. Zadání práce mi bylo tudíž velmi blízké, a proto jsem chtěla své znalosti prohloubit o další zkušenosti v problematice této metody.

2. ZADÁNÍ – CÍL PRÁCE

Zadáním mé práce je porovnání dvou metod při vyhodnocování analytické metody vysokoúčinná kapalinová chromatografie. Jedná se o porovnání metody vnějšího standardu a metody vnitřního standardu při měření obsahu léčivé látky terbinafinu. Obě metody porovnávám ve variantě vyhodnocení za použití kalibračních přímk. Dalším úkolem bylo rozšíření znalostí v této velmi často používané metodě v praxi a to jak po stránce teoretické tak i praktické, a dále vyhodnotit mnou naměřená data.

3. TEORETICKÁ ČÁST

3.1 Chromatografické metody

Chromatografické metody jsou analytické separační metody. Mají vysokou účinnost a lze je využít ke kvantitativní i kvalitativní analýze. Dochází k ustanovení rovnováhy mezi dvěma nemísitelnými fázemi. Pevná stacionární fáze zadržuje různou silou jednotlivé složky analyzované směsi. Pohyblivá mobilní fáze vymývá jednotlivé složky směsi ze stacionární fáze a to různou rychlostí, tím dochází k jejich separaci. Nepohyblivou stacionární fází může být pevná látka nebo kapalina ukotvená na pevném nosiči. Pohyblivou mobilní fází je kapalina nebo plyn. (1)

3.1.1 Dělení chromatografických metod

Chromatografické metody můžeme dělit podle různých hledisek:

1. Na základě různé separace

- **Adsorpční chromatografie** - k separaci dochází na základě různé adsorpce látky z mobilní fáze k povrchu stacionární fáze (adsorbentu). Mobilní fáze je tvořena čistými rozpouštědly nebo jejich směsí. Stacionární fází tvoří silikagel, celulóza, aktivní uhlí nebo oxid hořečnatý či hlinitý.
- **Rozdělovací chromatografie** - látky jsou separovány podle různého rozdělovacího koeficientu. Stacionární fází je zde kapalina, která je ukotvena na pevném nosiči. Nejčastější nepohyblivou fází bývá voda ukotvená na celulóze. Mobilní fází bývají organická rozpouštědla, která se nemísí se stacionární fází.
- **Iontovměnná chromatografie** - umožňuje separaci elektrolytů ve formě iontů. Nepohyblivou fází jsou zde iontoměniče.
- **Gelová chromatografie** - k rozdělení látek dochází na základě velikosti molekul, kde nepohyblivou fází tvoří gel (tzv. molekulová síta).

2. Dle provedení

- **Plošná chromatografie** - nepohyblivá stacionární fáze je nanášena na pevnou plochu desku. Může to být i samotný chromatografický papír.

- **Kolonová chromatografie** - Nepohyblivá stacionární fáze se nachází v koloně.

3. Na základě vyvíjení

- **Eluční chromatografie** – vzorek je dávkován do proudící mobilní fáze. Látky jsou postupně vymývány dle svého vzájemného působení se stacionární fází. Důležitou podmínkou je, aby složky analytu měly silnější interakci se stacionární fází než samotná mobilní fáze.
- **Frontální chromatografie** – vzorek je nepřetržitě přiváděn na chromatografickou kolonu. Kolonu postupně opouštějí látky podle síly své interakce se stacionární fází. Poslední z kolony odchází směs vzorku s mobilní fází.
- **Vytěšňovací chromatografie** – mobilní fáze se váže na kolonu silněji než vzorek, který je zároveň mobilní fází vytlačován. Jako první kolonu opouští složka s nejmenší vazbou na kolonu, jako poslední odchází samotná mobilní fáze.

4. Na základě skupenství mobilní fáze

- **Kapalinová chromatografie** – mobilní fázi tvoří kapalina.
- **Plynová chromatografie** – mobilní fázi tvoří plyn. (1)

3.2 Papírová chromatografie (PC)

Papírová chromatografie je založená na principu adsorpční a rozdělovací chromatografie. Do chromatografické cely se umístí chromatografický papír, jehož konec je ponořen do rozpouštědla – mobilní fáze. Stacionární fáze je tvořena přítomností zbytkového množství vody v celulóze chromatografického papíru. Vyvíjení může být vzestupné i sestupné, kdy je konec chromatografického papíru uchycen v zásobníku s rozpouštědlem.

Vyhodnocení papírové chromatografie může být kvantitativní i kvalitativní. Častěji se používá jako kvalitativní hodnocení za účelem identifikace analyzované látky. Hodnotíme polohu, barvu a intenzitu skvrny na chromatogramu a porovnáváme retardační faktor analyzované látky s retardačním faktorem standardu. Retardační faktor je poměr vzdálenosti středu skvrny od startu ke vzdálenosti startu chromatogramu k jeho čelu. Retardační faktor (RF) může mít hodnotu od 0 do 1. Je to bezrozměrná hodnota a vypočítáme jej dle vztahu [1]:

$$RF = a/b \quad [1]$$

a – vzdálenost středu skvrny od startu

b – vzdálenost čela od startu

Kvantitativní hodnocení je založeno na porovnání intenzity skvrny analytu s intenzitou skvrny standardu a jejich vyhodnocení denzitometrem. V dnešní době se již moc nevyužívá vzhledem k možnosti přesnějších a rychlejších kvantitativních analytických metod. (1; 2)

3.3 Chromatografie na tenké vrstvě (TLC)

Jedná se o kombinaci adsorpční a rozdělovací kapalinové chromatografie v plošném provedení.

Na skleněnou desku či hliníkovou folii je nanesen sorbent v tenké vrstvě. Nejčastěji používaný sorbent je celulóza, silikagel či oxid hlinitý. Deska se umístí do chromatografické vany, která se před vložením desky nechá nasytit parami mobilní fáze. Objem mobilní fáze v chromatografické vaně je okolo dvou centimetrů ode dna vany, ale zároveň pod startovací linií na chromatografické desce, která je naznačena obyčejnou tužkou přímo na desce. Na tuto linii se vyznačí místa pro nanášení vzorků i standardu a následně se na tato místa nanese několik mikrolitrů příslušného roztoku. Po jejich zaschnutí se deska umístí do chromatografické vany, kde vzlíná mobilní fáze směrem vzhůru a unáší spolu s sebou nanesené vzorky. Zhruba 1 cm před koncem desky se chromatografie ukončí. Deska se vyjme z vany a tužkou se označí čelo chromatogramu, tj. kam doputovala mobilní fáze.

U barevných látek jsou skvrny okamžitě viditelné po ukončení chromatografie. U bezbarvých látek je potřeba provést zviditelnění skvrn – detekci. Detekce se provádí postřikem vhodného činidla po odpaření mobilní fáze z desky. V TLC se využívá i fluorescenční detekce. K tomuto účelu se vyrábí přímo speciální chromatografické desky s fluorescenčním indikátorem.

Vyhodnocení tenkovrstvé chromatografie probíhá stejně jako u papírové chromatografie pomocí výpočtu retardačního faktoru a jeho porovnáním se standardem. (1; 2)

3.4 Plynová chromatografie (GC)

Separace látek v plynové chromatografii je založena na adsorpčním a rozdělovacím principu. Mobilní fázi tvoří inertní plyn, stacionární fáze je umístěna v koloně a může být kapalná či pevná. Jedná se tedy o chromatografii kolonovou.

Pevnou stacionární fázi může tvořit silanizovaná křemelina, silikagel či aktivní uhlí. V poslední době se používají i styrendivinybenzenové polymery nebo zesíťované polyakryláty.

Kapalná stacionární fáze bývá v podobě tenkého filmu vysokovroucí kapaliny na částicích sorbentu naneseného v koloně. Kapalně stacionární fáze bývají na bázi polyethylenglykolu, methyl-polysiloxanů nebo polysiloxanů s navázanými různě polárními funkčními skupinami.

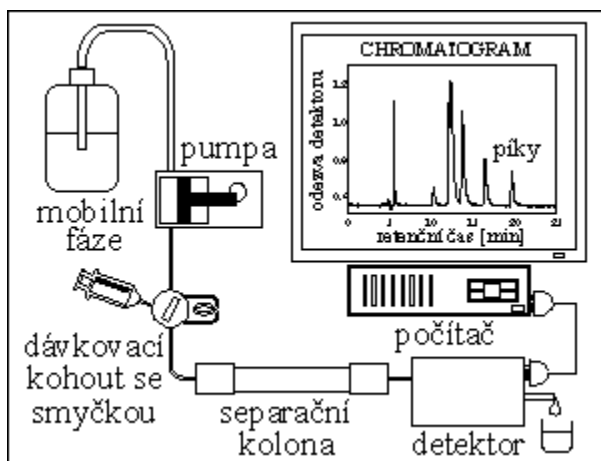
Analyzovat pomocí plynové chromatografie můžeme látky, které lze snadno převést do plynného stavu za vysoké teploty okolo 400 °C. Případně látky, které lze převést na těkavé deriváty. Podmínkou je stálost těchto látek či derivátů při vysoké teplotě, separace totiž probíhá pouze v plynném stavu, čímž je tato chromatografie omezena.

Velké využití má plynová chromatografie v potravinářství, životním prostředí a ve farmacii. (1)

3.5 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC)

Základem kapalinové chromatografie je použití kapalně mobilní fáze. Separace v kapalinové chromatografii může být na principu adsorpční, rozdělovací, iontovýměnné nebo gelové chromatografie. Stacionární fáze je stejně jako u plynové chromatografie umístěna v koloně, jedná se tedy o kolonovou chromatografii. Přístroj pro provádění HPLC metodiky se jmenuje kapalinový chromatograf. (1; 3)

3.5.1 Chromatografický systém



Obrázek 1 - Schéma HPLC

Zdroj: převzato (4)

HPLC systém se skládá z několika zařízení a částí – viz obr. 1. Mobilní fáze se umístí do vhodných zásobníků a odtud se přes vysokotlaké čerpadlo a směšovač přivádí přes dávkovací zařízení přímo na separační kolonu. V některých případech se před hlavní

separační kolonu umísťuje ještě předkolona, která dokáže odstranit nežádoucí zbytky z matrice, které by mohly poškodit analytickou kolonu. Na koloně dochází k separaci a jednotlivé oddělené složky analytu postupně opouštějí kolonu a prochází přes detektor. Signál z detektoru je přiváděn na počítač, kde je pomocí chromatografického softwaru vyhodnocen ve formě grafu. Tomuto vyhodnocení říkáme chromatogram. (1)

3.5.2 Metody HPLC

V HPLC se častěji používá obrácené neboli reverzní uspořádání fází (stacionární fáze je nepolární, mobilní fáze je polární) než normální uspořádání (stacionární fáze je polární a mobilní nepolární). (1; 3)

3.5.3 Mobilní fáze

Pro reverzní uspořádání HPLC se používají organická rozpouštědla jako acetonitril či methanol, jejich vodné roztoky či směsi s pufrý. (3)

Pro normální uspořádání HPLC se jako mobilní fáze používají rozpouštědla hexan, isopropanol či jejich směsi.

V HPLC se preferuje spíše reverzní typ uspořádání a tudíž i polární mobilní fáze.

3.5.4 Stacionární fáze

Nejstarší stacionární fází v HPLC je nemodifikovaný silikagel. Na povrchu silikagelu jsou silanolové skupiny, které vytváří polární povrch. Jedná se tudíž o stacionární fázi pro normální uspořádání HPLC.

Většinou se v praxi používá reverzní uspořádání HPLC, kde je stacionární fáze též na základě silikagelu, který je chemicky modifikovaný. Delší uhlíkaté řetězce (C8-C18) se vážou na kyslík silanolové skupiny. Navázané skupiny jsou nepolární a mobilní fáze tak musí být výrazně polárnější.

Modifikace uhlíkatých řetězců může být více. Lze vázat kyanoskupinu nebo aminoskupinu, které jsou středně polární a lze je tak využít pro oba typy uspořádání HPLC vhodným zvolením mobilní fáze.

Dalším typem můžou být zirkoniové nebo polymerní stacionární fáze. Jsou odolné jak z hlediska pH, tak i teploty.

Dalším typem stacionárních fází jsou monolitické kolony, které se liší od předchozích tím, že nejsou tvořeny částicemi, ale jedním kusem porézního materiálu. Tento materiál má v sobě póry, makropóry a mesopóry, a výhodou této kolony je její vysoká separace i při vyšším průtoku a zároveň nízkém tlaku. (3)

3.5.5 Kolona

Chromatografická kolona je nerezová trubice naplněná stacionární fází. Ta může být různá dle účelu použití. Typ stacionární fáze rozhoduje o schopnosti separace kolony rozdělit danou směs na jednotlivé složky. Délka kolony se pohybuje cca od 50 do 150 mm a její průměr bývá okolo 3–4,6 μm . Prostor uložení kolony může být termostatován (teplota se pohybuje zhruba v rozmezí od 20 do 60 $^{\circ}\text{C}$). Teplota kolony ovlivňuje jednak dobu analýzy, ale i kvalitu vlastní separace.

Při HPLC analýze lze využít i tzv. předkolonu. Jedná se stejný typ kolony (stejná náplň) jako hlavní separační kolona, ale výrazně kratší (5–10 mm). Její úloha spočívá v ochraně hlavní kolony. Používá se především při předpokladu zbytku matrice ve vzorku, který by mohl poškodit vlastní HPLC kolonu. Její zapojení v systému HPLC je tudíž hned před analytickou kolonou. (3)

3.5.6 Vysokotlaká pumpa

Čerpadlo umožňuje čerpání vodné či organické mobilní fáze pod velmi vysokým tlakem (obvykle až do cca 30–40 MPa). Díky použití směšovacího ventilu je možné použít více složek mobilní fáze odděleně a mísit je až při vlastní analýze HPLC navolením jejich poměru v ovládacím programu.

Pokud probíhá analýza při stále stejném složení mobilní fáze, mluvíme o isokratické eluci. Pokud dochází během analýzy ke změnám v poměru jednotlivých složek mobilní

fáze, mluvíme o gradientové eluci. Gradientová eluce se využívá u látek s vyšší retencí, kde se změnou složení mobilní fáze dosáhne snížení retence a tím i zkrácení času analýzy. (3)

3.5.7 Dávkování

Vzorek je do systému HPLC dávkován v roztoku buď mobilní fáze, nebo v její organické složce. Vzorky se připravují do speciálních nádobek – vialek. Velikost vialek se pohybuje od cca 200 µl do cca 2 ml, podle možnosti spotřeby vzorku. Tyto vialky se umísťují do speciálního zařízení – autosamplerů, které mohou být v případě potřeby termostatovány. Z autosampleru je vzorek automaticky nastříknut na kolonu. Dříve se využíval i manuální nástřik, ale v dnešní době se využívá již ojediněle. V rutinním prostředí laboratoří byl již vytlačen pohodlným a přesnějším automatickým systémem. (3)

3.5.8 Detektory HPLC

V rámci metody HPLC lze využít různé typy detektorů. Nejčastěji používaný detektor je spektrofotometrický a fluorescenční. Využití ale nachází i hmotnostní spektrometr, či refraktometrický detektor. Typ detektoru volíme podle účelu použití. Detektory se liší jak principem a funkcí, tak i citlivostí a selektivitou. Volba detektoru je důležitá a hlavně závislá na konkrétní aplikaci. Je potřeba zajistit detekci všech analyzovaných složek.

Dnes již tolik nevyužívaným detektorem je detektor refraktometrický. Je poměrně univerzální, ale zároveň velmi málo citlivý. Tím dochází k problematice stanovení u nízkých koncentrací látek ve vzorku. Další podmínkou je i jeho potřeba termostatování, neboť je založen na měření indexu lomu, kde hraje vliv teploty velkou roli.

Dalším typem detektoru je spektrofotometrický detektor. V současné době je velmi oblíbený a jedním z nejrozšířenějších detektorů v rámci HPLC metodiky. Je relativně univerzální a přitom zároveň dostatečně citlivý. Je použitelný pro většinu organických látek. Umožňuje měřit absorpenci v UV nebo VIS oblasti při jedné nebo více vlnových délkách. Při použití „diode array“ (diodového pole) umožňuje změřit celé spektrum vlnových délek v rámci jednoho měření.

Fluorimetrický detektor je poměrně citlivý, ale jeho použití není univerzální, je omezeno požadavkem na fluorescenci analyzovaných látek. Měření je založeno na emisi záření po excitaci molekuly primárním zářením. Často se používá v kombinaci s detektorem spektrofotometrickým.

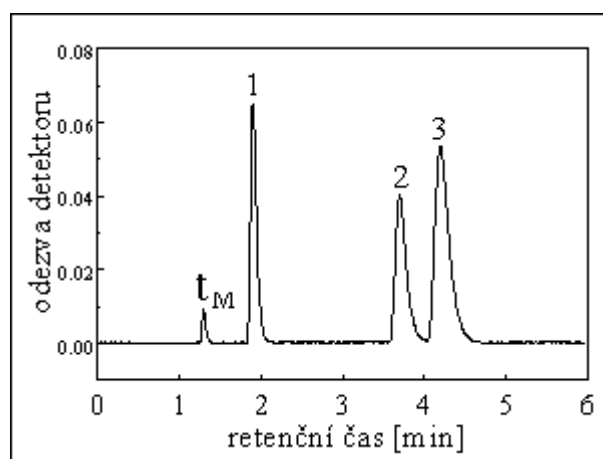
Jedním z nejmodernějších a zároveň i velmi citlivých detektorů je hmotnostní spektrometrie. Umožňuje stanovení velmi nízkých koncentrací stanovovaných látek. Zároveň je ale oproti ostatním detektorům znatelně dražší vzhledem k potřebě složitějšího přístrojového vybavení. Principem je hmotnostní detekce a ionizace analyzovaných látek. Dochází k rozdělení analytu podle poměru hmotnosti a náboje a následně detekci rozdělených fragmentů.

Další již méně často používané detektory jsou založeny na principu infračervené spektroskopie či na elektroanalytických metodách (konduktometrie, amperometrie). V detekci HPLC může být využit i princip chemiluminiscence či detektory založené na tvorbě aerosolu. (1)

3.5.9 Chromatogram a chromatografické charakteristiky

Výstupem z HPLC měření je graf závislosti signálu detektoru na retenčním čase. Tomuto výstupu říkáme chromatogram (obr. 2). Chromatogram se skládá z jednotlivých píků separovaných složek, jejichž plocha (A) závisí na obsahu látky v analyzované směsi. Retenční čas (t_R) nebo též eluční čas je doba od nástřiku vzorku až po maximum eluční křivky (píku). S retenčním časem souvisí retenční objem (V_R), což je objem mobilní fáze, který projde chromatografickou kolonou za stejný čas.

Obrázek 2 - Ukázka chromatogramu (Deriváty purinu)



Popis obrázku: Chromatogram derivátů purinu, (píky : 1. kofein, 2. theofyllin , 3. theobromin), kolona : 30 cm x 4 mm, stac. fáze : Nucleosil 50-5, eluent : methanol / voda / dichlormethan 47 / 17 / 936 (v/v/v), průtok eluentu : 0,8 ml/min při tlaku 100 bar, detekce : UV fotometrická při 280 nm

Zdroj: převzato (4)

Dalšími HPLC charakteristikami je veličina mrtvý retenční čas (t_M) a mrtvý retenční objem (V_M), které udávají retenční čas a objem látky, která projde přes kolonu stejně rychle jako mobilní fáze, aniž by byla na koloně zadržována. (3)

Další HPLC veličina, která charakterizuje míru separace od mrtvého retenčního času, se nazývá kapacitní faktor (k'). Čím je kapacitní faktor vyšší, tím více je látka zadržována na chromatografické koloně. Jeho hodnotu můžeme i experimentálně určit doplněním naměřených hodnot do vztahu [2]:

$$k' = (t_R - t_M) / t_M \quad [2]$$

Tvar píku na chromatogramu, jeho symetrii, charakterizuje faktor symetrie (A_s). Jeho ideální hodnota je 1,0. Český lékopis uvádí přijatelné rozpětí 0,8–1,5. Jeho hodnotu vypočítáme dle vzorce [3]:

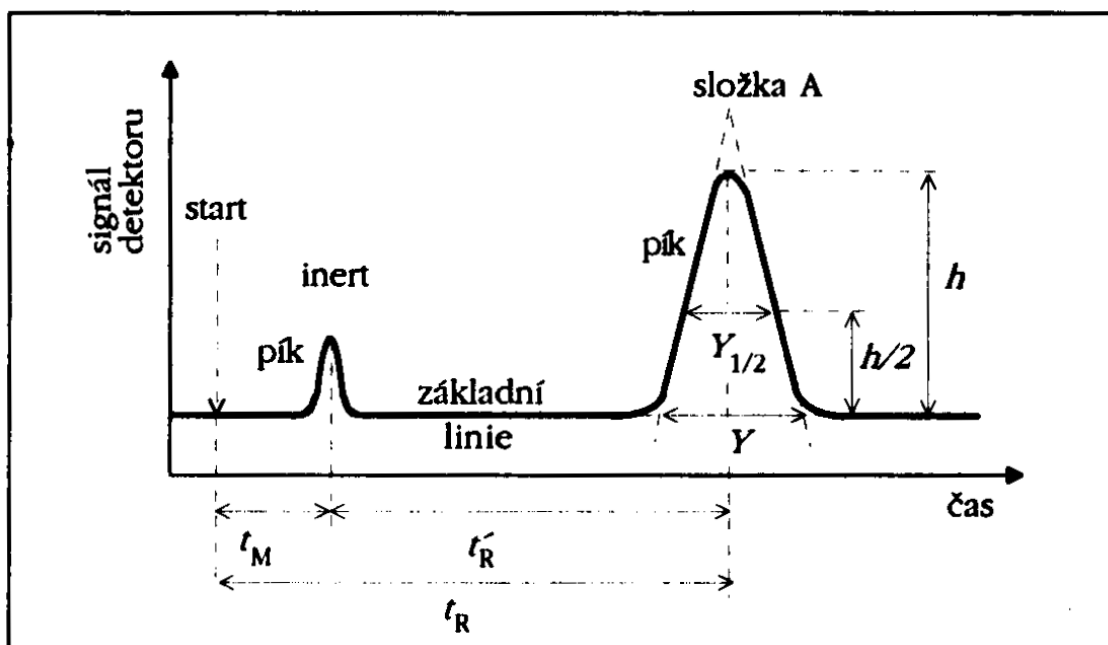
$$A_s = w_{0,05} / 2d \quad [3]$$

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

d – vzdálenost mezi kolmicí spuštěnou z vrcholu píku a vzestupnou částí píku v jedné dvacetině jeho výšky. (5)

Jednotlivé charakteristiky jsou názorně popsány v ukázkovém chromatogramu (obr. 3).

Obrázek 3 - Ukázka chromatogramu a jednotlivé charakteristiky



Popis obrázku:

H – výška píku

Y – šířka píku v základně

$Y_{1/2}$ – šířka píku v polovině jeho výšky

A – plocha píku

t_R – retenční čas

t'_R – redukovaný retenční čas

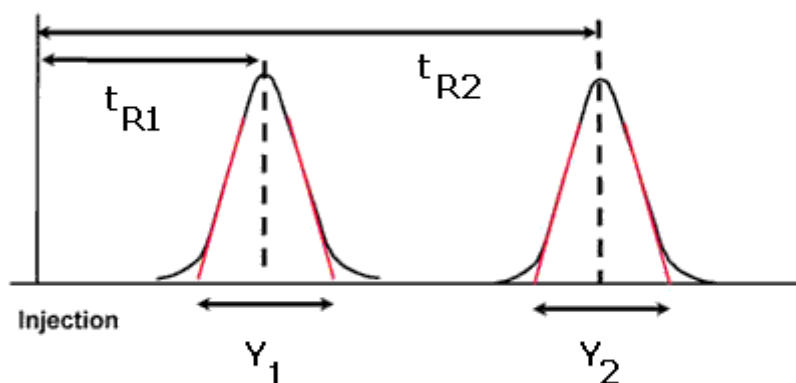
t_M – mrtvý retenční čas

Zdroj: převzato (5)

3.5.10 Separační proces kolony

Nejdůležitější vlastností chromatografické kolony je její schopnost umožnit dobrou separaci analytů. Rozlišení je rozdíl retenčních časů (t_{R1} , t_{R2}) dělených průměrnou hodnotou šířky píků (Y_1 , Y_2) rozdělených látek (obr. 4). Rozlišení je bezrozměrná jednotka. Čím je rozlišení větší, tím je lepší separace. V praxi jde ale spíše o dobré (potřebné) rozlišení, než o dosažení co nejvyšší hodnoty. (6)

Obrázek 4 - Grafické vyjádření rozlišení



Zdroj: převzato (6)

Účinnost separace na koloně udává též veličina, kterou nazýváme počet teoretických pater (N). Je to bezrozměrná veličina a je závislá na délce kolony (L). Čím je kolona účinnější, tím lépe dokáže od sebe jednotlivé složky směsi oddělit. Teoretické patro je pomyslná část kolony, kde dochází k ustálení rovnováhy mezi stacionární a mobilní fází. Čím více teoretických pater kolona má, tím je účinnější a separace lepší.

S počtem teoretických pater souvisí výškový ekvivalent teoretického patra (H), který dává lepší informaci o účinnosti separace, protože je již vztahený na délku kolony. Vypočítáme jej dle vztahu [4]:

$$H=L/N \quad [4]$$

L – délka kolony v μm

Chromatografická kolona je účinnější a tím i separace lepší, čím více teoretických pater má a čím menší má výškový ekvivalent teoretického patra. (1; 3; 5)

3.5.11 Vyhodnocování výsledků v HPLC

3.5.11.1 Kvalitativní vyhodnocení

Kvalitativní hodnocení v HPLC se využívá nejčastěji k identifikaci látek. K tomu slouží retenční čas nebo retenční objem. Další možností identifikace je porovnání spekter standardů se spektry neznámých vzorků měřených za stejných podmínek. (7)

3.5.11.2 Kvantitativní vyhodnocení

Pro kvantitativní vyhodnocení v rámci HPLC používáme plochu či výšku píku. Plocha či výška píku nám poskytuje informace o množství analyzované látky ve vzorku. Mezi plochou píku, příp. výškou píku, a množstvím eluované látky existuje vztah, který můžeme využít pro stanovení obsahu stanovované látky ve vzorku. V praxi se většinou pro kvantitativní stanovení používá jen plocha píku. Výška píku jen zřídka.

Pro správné a přesné stanovení kvantity látky je potřeba co nejpřesnější určení plochy píku. Nepřesné stanovení plochy je nejčastější chybou v rámci vyhodnocení HPLC. V rámci vyhodnocování je nutné, aby vzorky i standardy (referenční materiály) byly vyhodnocovány stejnou metodou (měly stejné podmínky). Na vyhodnocení se používá vyhodnocovací chromatografický software, který obsahuje různé způsoby integrace. (7)

3.5.11.3 Metoda vnějšího standardu

Metoda vnějšího standardu je nejjednodušším způsobem kvantitativního hodnocení. Je to metoda kalibrační křivky (obr. 5), kdy změřením více roztoků standardů o známé koncentraci ve více bodech, najdeme závislost kalibrační funkce $X=f(c)$, a neznámý obsah stanovované látky ve vzorku je určen pomocí funkce $c=f(X)$.

Ideální je, pokud je kalibrační funkce lineární, ale není to podmínkou. Pro spolehlivější získání výsledků je ale vhodné mít funkci lineární a počet kalibračních bodů by se měl pohybovat okolo 5 až 7 s tím, že každé měření by se mělo minimálně dvakrát zopakovat. Pro lineární kalibrační přímku pak platí rovnice [5]:

$$A_i = a + b \cdot c_i \quad [5]$$

A_i – plocha píku pro koncentraci c_i

b – směrnice kalibrační přímky

a – posunutí na ose y

pokud kalibrační přímka prochází počátkem, tzn. $a = 0$, pak se vyhodnocení ještě zjednoduší do tvaru [6]:

$$A_i = b \cdot c_i \quad [6]$$

Pak stačí porovnání s jedním vnějším standardem a pro výpočet se použije jednoduchá trojčlenka [7]:

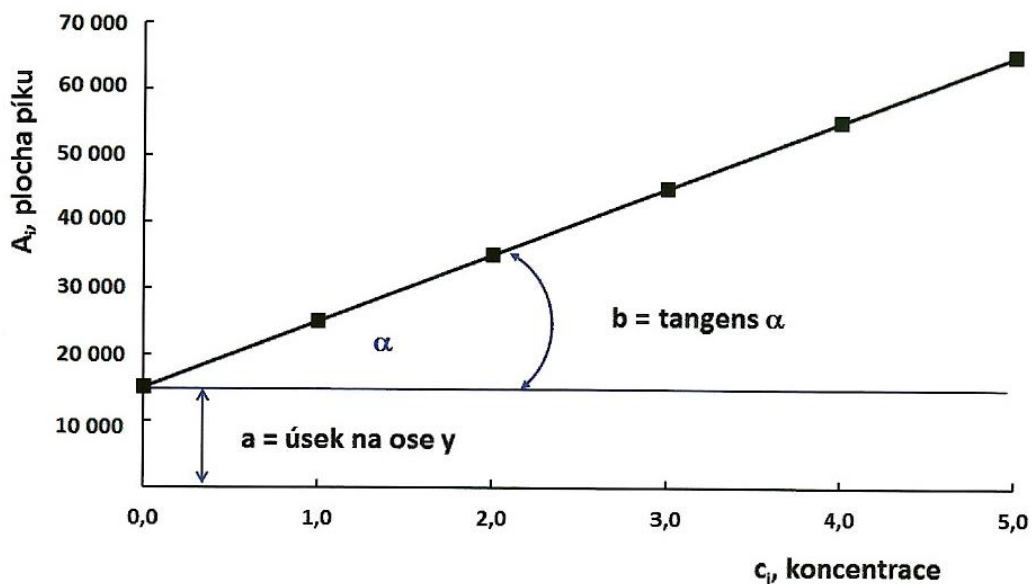
$$c_x = (A_i / A_s) \cdot c_s \quad [7]$$

A_i – plocha stanovované látky o neznámé koncentraci c_x

A_s – plocha standardu o známé koncentraci c_s

V tomto případě by neznámá koncentrace stanovované látky měla být řádově stejná jako koncentrace standardu.

Obrázek 5 - Grafické vyjádření kalibrační křivky – závislost plochy píku na koncentraci analytu



Zdroj: převzato (7)

U analýzy složitých vzorků se metoda vnějšího standardu v praxi nepoužívá. Její použití je vhodné pouze v případě, kdy jsou vzorky i standardy svými vlastnostmi podobné a vliv matrice je tak zanedbatelný. (7)

3.5.11.4 Metoda přidavku standardu

Použití metody přidavku standardu snižuje vznik chyb při kvantitativní analýze u složitějších vzorků. Podmínkou je ale linearita mezi plochou píku a stanovovanou koncentrací. Metoda je založená na přidání přesného a známého množství stejné látky, která se stanovuje ve vzorku. Provedení metody je založeno minimálně na dvou analýzách. První je analýza přesného množství samotného vzorku. Při druhém provedení analyzujeme vzorek, ke kterému přidáme známé množství sledovaného analytu. Tato metoda má několik podob provedení:

➤ **Metoda jednoho přidavku standardu**

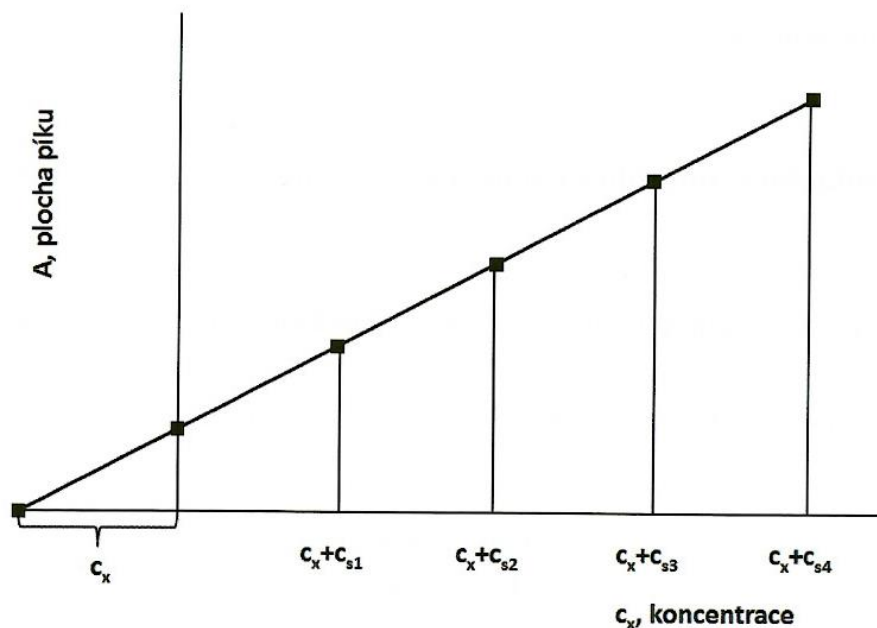
Metoda jednoho přidavku standardu se skládá ze dvou analýz. Jako první analyzujeme vzorek o známém objemu a neznámé koncentraci analyzované látky a zjišťujeme plochu píku vzorku. Ve druhé analýze přidáme ke vzorku známý objem standardu o známé koncentraci a opět analýzou dostaneme plochu píku.

Metoda jednoho přidavku standardu minimalizuje možnost výskytu systematické chyby. Bohužel může být zdrojem chyby náhodné.

➤ **Metoda více přidavků standardu**

Metoda spočívá v měření plochy vzorku před přidáním a po přidání dvou a více přidavků standardu. Závislost měřené plochy píku a změny koncentrace pomocí regresní přímky nám umožní stanovit koncentraci sledované složky. Přídavky standardů jsou násobky předpokládané koncentrace látky ve vzorku, naměřená data vyneseme do grafu a proložením bodů vznikne přímka. Opět se jedná o lineární závislost (obr. 6).

Obrázek 6 - Grafické znázornění metody více přidavků standardu



Zdroj: převzato (7)

Metoda se využívá hlavně u analýz, kde se předpokládá vliv matrice na stanovení analytu.

➤ Metoda přidavku standardu za konstantního objemu

Je připraveno několik roztoků, ke kterým se přidá stejný objem vzorku o objemu (V_i) o neznámé koncentraci (c_x). K těmto připraveným roztokům je přidáno N objemových jednotek standardu (V_s), kde N je rovno 0, 1, 2... o koncentraci (c_s). Všechny roztoky jsou doplněny na konečný objem (V_c) a změřeny plochy píků jednotlivých roztoků.

Pro metodu přidavku standardu za konstantního objemu platí rovnice přímkové závislosti (5), kdy směrnici (b) a posun na ose y (a) určíme graficky nebo výpočtem metodou nejmenších čtverců [8]. (7)

$$A_N = a + b \cdot N = (c_x \cdot V_i / V_c + N \cdot (c_s \cdot V_s / V_c)) \quad [8]$$

Z toho vyplývá pro koncentraci analyzované látky vztah [9]:

$$c_x = (a/b) \cdot (c_s \cdot V_s / V_i) \quad [9]$$

3.5.11.5 Metoda vnitřního standardu

Velkou výhodou metody vnitřního standardu oproti předchozí metodě je její jednodušší provedení, tj. jedna analýza v jednom nástřiku. Vnitřní standard totiž přidáváme přímo k roztoku vzorku i k roztoku standardu. Koncentraci vnitřního standardu známe a je stejná jak ve vzorku, tak ve standardu. Ideální je, pokud vnitřní standard přidáme na začátku analytického postupu, aby byl vliv podmínek při zpracovávání vzorků stejný na všechny analyzované látky a nedocházelo tak k chybám zaneseným do vyhodnocení vlivem např. změny objemu vzorku (odpaření vzorku při zpracování apod.), která by mohla být zanesena do vyhodnocení při použití metody vnějšího standardu.

Jako vnitřní standard volíme látku, která je eluována v blízkosti stanovované látky, ale zároveň musí mít dobré rozlišení.

Opět máme více variant provedení této metody:

➤ Metoda přímého porovnání

K roztoku vzorku i roztoku standardu je přidán stejný objem roztoku vnitřního standardu o známé koncentraci. Po analýze obou roztoků vyhodnotíme plochy píků obou roztoků (obr .7) a vypočítáme obsah stanovované látky ve vzorku (c_x) dle vzorce [10]:

$$c_x = (A_i/A_s) \cdot (A_{IS,S}/A_{IS,i}) \cdot c_s \quad [10]$$

A_i – plocha stanovované látky v roztoku vzorku

A_s – plocha standardu v roztoku standardu

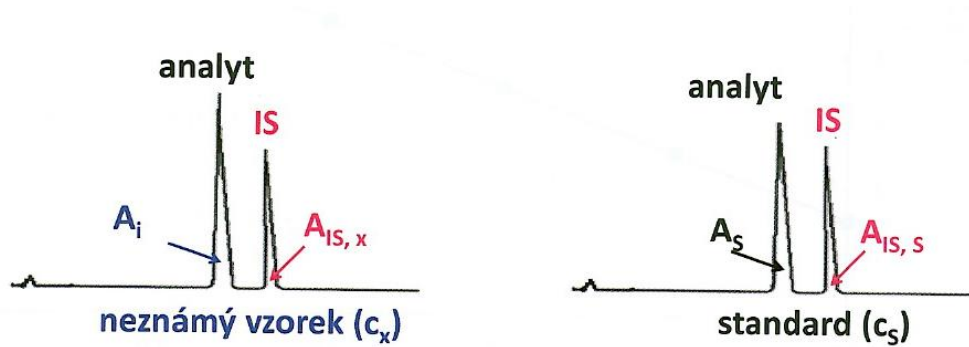
$A_{IS,S}$ – plocha vnitřního standardu v roztoku standardu

$A_{IS,i}$ – plocha vnitřního standardu v roztoku vzorku

c_s – koncentrace standardu v roztoku standardu

Pokud není možné přidat stejný objem vnitřního standardu k roztoku vzorku i standardu, musíme tento fakt zahrnout do výpočtu.

Obrázek 7 - Přímé porovnání pomocí metody vnitřního standardu

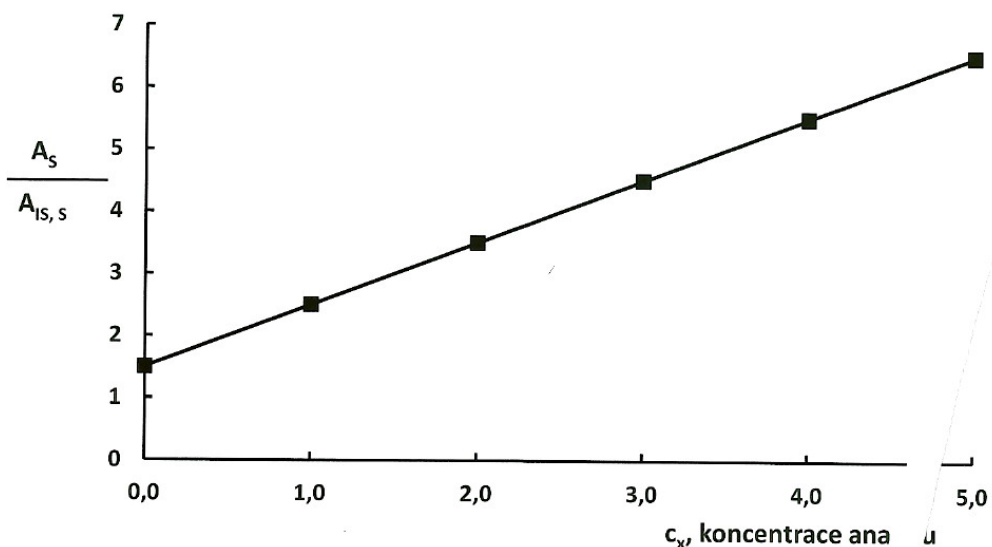


Zdroj: převzato (7)

➤ Metoda kalibrační křivky

Oproti metodě přímého porovnání je pro analýzu pomocí kalibrační křivky potřeba připravit více roztoků standardů v různých bodech koncentrace, ke kterým je přidán stejný objem vnitřního standardu o známé koncentraci. Stejný objem vnitřního standardu přidáme i k analyzovanému roztoku vzorku. Metoda kalibrační křivky při použití vnitřního standardu je obdobou metody kalibrační křivky s vnějším standardem. Vynesením do grafu, dostaneme závislost koncentrace analytu na poměru plochy standardu A_s a plochy vnitřního standardu v roztoku standardu $A_{IS,s}$ (obr. 8)

Obrázek 8 - Metoda vnitřního standardu s využitím kalibrační křivky



Zdroj: převzato (7)

Metodou lineární regrese vypočteme koncentraci vzorku (c_x), pro kalibrační přímku platí vztah [11] (7):

$$A_i/A_{IS,i}=a+b \cdot c_x \quad [11]$$

A_i – plocha stanovované látky v roztoku vzorku

$A_{IS,i}$ – plocha vnitřního standardu v roztoku vzorku

b – směrnice kalibrační přímky

a – posunutí na ose y

3.5.11.6 Metoda vnitřní normalizace

Základem metody vnitřní normalizace je stanovení hmotnostního korekčního odezvového faktoru (CRF). Jeho určení provedeme analýzou směsného roztoku analyzované látky o známé koncentraci (c_i) a standardu (c_s). Tím dostaneme plochu analytu (A_i) a plochu standardu (A_s). Odezvový faktor vypočteme podle vztahu [12]:

$$CRF=(A_i \cdot c_s)/(A_s \cdot c_i) \quad [12]$$

Místo korekčního odezvového faktoru lze použít hodnotu relativní molární odezvy (RMR), což je poměr mezi odezvou analyzované látky (i) a standardu (s) vztažený na látkové množství (n). Pak platí následující vztah [13]:

$$RMR=(A_i \cdot n_s)/(A_s \cdot n_i) \quad [13]$$

Pokud známe korekční odezvové faktory, koncentraci analytu (c_x) stanovíme podle jednoduché rovnice [14]:

$$c_x = \frac{A_x \cdot CRF_x}{\sum_{i=1}^n A_i \cdot CRF_i} \quad [14]$$

Výhodou této metody je stanovení koncentrace z jediného nástřiku vzorku, ale za podmínky, že známe korekční odezvové faktory. K jejich stanovení jsme tak nuceni identifikovat všechny látky ve vzorku = všechny píky na chromatogramu včetně nečistot apod. Jako výsledek dostaneme procentuální obsah stanovované látky ve vzorku vůči celku oproti běžnému výsledku koncentrace látky v roztoku jako u předchozích metod.

Metodu může komplikovat, pokud u některých složek nedojde k dobrému rozlišení píků, a nejde tak jednoznačně určit jejich plochy. Další problém může nastat s identifikací některých látek a tím pádem i nemožnosti určení CRF.

Tato metoda je velmi často využívána v rámci farmacie pro stanovení procentuálního obsahu farmaceutické substance, která se běžně udává v procentech.

Vzhledem ke stanovení procentuálního obsahu jednotlivých složek vůči celku, není tato metoda oproti předchozím zatížena chybou, která vzniká při navažování, pipetování či zpracování vzorku apod. (7)

3.5.12 Využití HPLC

Použití kapalinové chromatografie v praxi je velmi rozsáhlé a v současné době zároveň velmi časté pro její poměrně snadné použití, rychlost analýzy i automatické vyhodnocení díky automatickým chromatografickým softwarům. Zhruba 80 % organických sloučenin je možné analyzovat pomocí HPLC. Využití nachází jak v potravinářském průmyslu, tak ve farmacii či zdravotnictví. Patří mezi nejvíce používané analytické metody.

3.6 Terbinafin

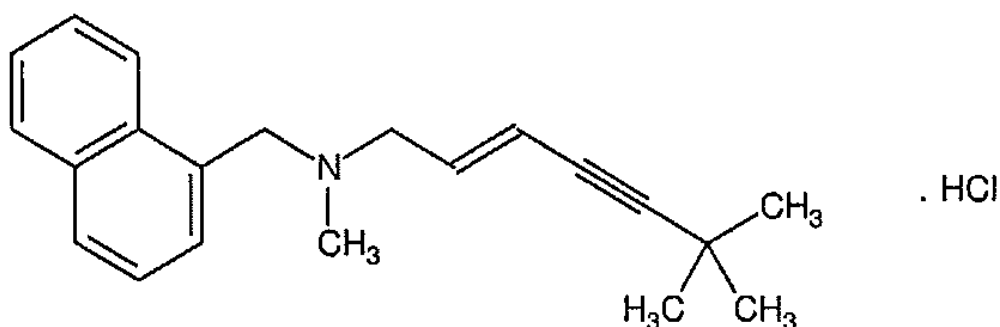
Chemický název léčivé látky terbinafinu je (2E)-N,6,6-trimethyl-N-(naftalen-1-ylmethyl)hept-2-en-4-yn-1-amin-hydrochlorid (obr. 9).

Jeho molární hmotnost je 327,90 g/mol. Stechiometrický vzorec je $C_{21}H_{26}ClN$.

Jedná se o bílý hygroskopický krystalický prášek, který se těžko rozpouští ve vodě a acetonu a lehce v methanolu nebo ethanolu. (8)

Obrázek 9 - Strukturní vzorec - terbinafin hydrochlorid

Zdroj: převzato (8)



Terbinafin se používá při léčbě mykotických infekcí kůže (tinea pedis, tinea corporis a tinea cruris) či nehtů (onychomykóza) způsobených dermatofyty (Epidermophyton, trichophyton, Microsporum). Naopak je téměř neúčinný na kvasinky rodu Candida. (9; 10)

Terbinafin je látka s fungistatickým až fungicidním účinkem. Patří do skupiny allylaminových antimykotik. Jeho účinek je založen na narušení buněčné membrány hub. Terbinafin inhibuje enzym skvalenepoxidázy, a tím narušuje syntézu ergosterolu v membráně mykotických buněk. (10; 11)

3.6.1 Stanovení obsahu terbinafinu

Z běžně používaných metod pro stanovení obsahu účinné látky terbinafin v léčivech se oficiálně používá potenciometrická titrace. Titrace je oproti metodice HPLC pracnější na přípravu roztoků i časově náročnější. Přechod na rutinní HPLC stanovení by jistě bylo úspornějším řešením v laboratořích, kde se běžně HPLC používá.

3.6.1.1 Stanovení obsahu lékopisnou metodou

Stanovení obsahu terbinafinu lékopisnou metodou (ČL 2009 – Doplnění 2013) se provádí pomocí potenciometrické titrace. Naváží se 0,250 g terbinafinu a rozpustí se v 50 ml ethanolu 96% R. Po přidání 5 ml kyseliny chlorovodíkové 0,01 mol/l VS se titruje hydroxidem sodným 0,1 mol/l VS za potenciometrické indikace bodu ekvivalence. Spotřeba se odečte mezi dvěma inflexními body. 1 ml hydroxidu sodného 0,1 mol/l VS odpovídá 32,79 mg $C_{21}H_{26}ClN$. (8)

4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 Chemikálie

- **Kyselina citronová:** Sigma-Aldrich (99,0 %); Kat.č. C8,315-5, 1 kg, šarže: S85464-409
- **Hydrogenfosforečnan sodný:** Sigma-Aldrich ($\geq 99,0$ %); Kat.č. S7907-500g, šarže: BCBM3738V
- **Acetonitril:** CHromasolv (for HPLC, gradient grade); Kat.č. 34851, 2,5 l, šarže: SZBA163S
- **Propylparaben:** interní standard; Dr. Kulich Pharma s.r.o. (Ph. Eur. 5.0, ČL 2005); 100 g, šarže: HF2051
- **Terbinafin (báze):** standard; připraveno na KFT, Farmaceutická fakulta UK Praha z komerčně dostupného terbinafinu hydrochloridu

4.2 Přístrojové vybavení

- **Váhy:** Sartorius analytic, Sartorius GMBH GOTTINGEN, typ A2003; Výrobní číslo: 3810040C, 4 desetinná místa (50 mg – 202 g)
- **pH metr:** WTW SERIES pH 720, INOLAB720; Elektroda: pH Eletrode SenTix 61 WTW, pH 0-14, 0-100 °C, 3 mol/l KCl, A063812020
- **Předkolona:** SUPELCO (Sigma Aldrich), ASCENTIS EXPRESS ES-CN; 0,5 cm x 4,6 mm, 2,7 μ m GUARD COLUMN; Katalogové číslo: 53 497-U, šarže: USMJH00100
- **Kolona:** SUPELCO (Sigma Aldrich), ASCENTIS EXPRESS ES-CN; 15 cm x 4,6 mm, 2,7 μ m; Katalogové číslo: 53 492-U, šarže: USZS001262

Shimadzu HPLC sestava:

- **Pumpa:** LC-10AD VP
- **Autosampler:** SIL-20A HT PROMINENCE
- **Termostat kolony:** CTO-10AC VP
- **Detektor:** UV- VIS – SPD-20A PROMINENCE
- **Komunikační modul:** CBM-20A

4.3 HPLC metoda

- Průtok: 0,9 ml/min
- Teplota kolony: 60 °C
- Nástřik vzorku: 5 µl
- Čas analýzy: 9,5 min
- Vlnová délka: 226 nm

4.4 Příprava roztoků

4.4.1 Zásobní roztok terbinafinu (Standard)

Byl připraven zásobní roztok terbinafinu o koncentraci 2,5 g/l do acetonitrilu (navážka 62,5 mg doplněna do 25 ml).

Byl připraven zředěný roztok terbinafinu o koncentraci 250 mg/l do mobilní fáze (10x zředěn zásobní roztok 2,5 g/l).

4.4.2 Roztok propylparabenu (Interní standard)

Byl připraven zásobní roztok propylparabenu o koncentraci 100 g/l do acetonitrilu (navážka 1,0013 g do 10 ml).

Byl připraven zředěný roztok propylparabenu o koncentraci 1 g/l do mobilní fáze (100x zředěn zásobní roztok 100 g/l).

4.4.3 Mobilní fáze HPLC

Byla připravena 0,1M kyselina citronová a 0,2M hydrogenuhličitan sodný – vodné roztoky. Pufry byly připraveny smícháním kyseliny citronové a hydrogenuhličitanu sodného v poměru: 10,9:9,1 a malými přídávky jednoho z roztoků bylo pH upraveno na 4,50. Mobilní fáze byla připravena smícháním pufru a acetonitrilu v poměru 60:40.

4.4.4 Kalibrační roztoky terbinafinu a interního standardu

Byla připravena koncentrační řada terbinafinu a interního standardu (IS) – směsi obou látek o koncentraci terbinafinu 25; 20; 15; 10; 5; 2,5 mg/l a koncentraci propylparabenu 15 mg/l.

4.4.5 Reálný vzorek

Bylo naváženo 20 mg vzorku a rozpuštěno v 1970 μl acetonitrilu. Tento zásobní roztok vzorku byl 100x zředěn. Před zředěním bylo přidáno 30 μl interního standardu (1 g/l) tak, že výsledná koncentrace IS po zředění v roztoku vzorku byla 15 mg/l.

5. VÝSLEDKY A DISKUZE

5.1 První experiment

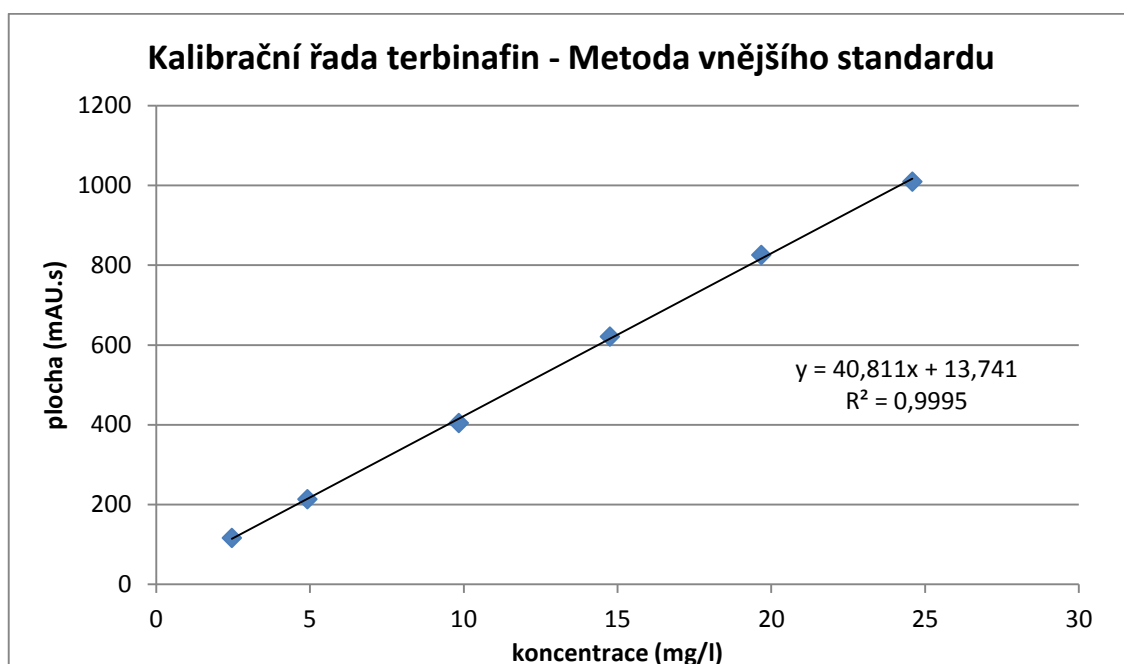
Experiment byl zaměřen na porovnání dvou metod vyhodnocení HPLC metody, metody s vnějším a vnitřním standardem na reálném vzorku terbinafinu o neznámé koncentraci.

Byla změřena kalibrační řada vzorků standardu terbinafinu a Interního standardu (tabulka 1). Z naměřených dat byl vytvořen graf lineární závislosti – kalibrační křivka pro metodu vnějšího standardu (graf 1) a pro metodu vnitřního standardu (graf 2).

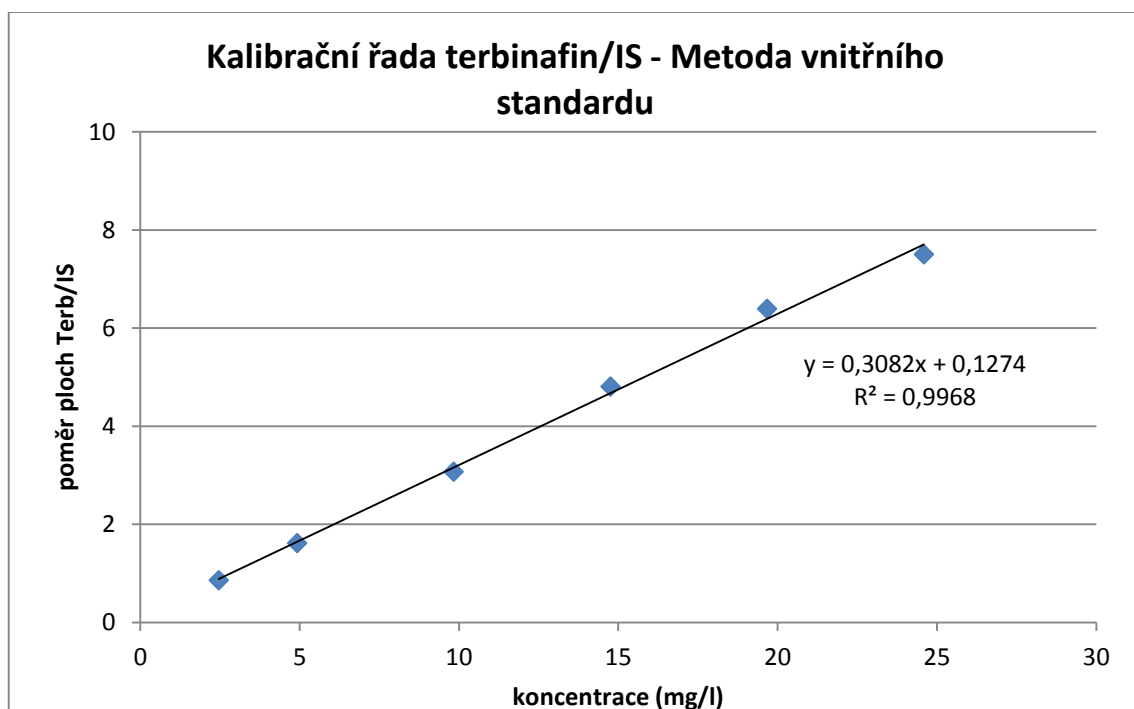
Tabulka 1 - Koncentrační řada terbinafinu a interního standardu

Interní standard			Terbinafin			Terb/IS
Koncentrace	Plocha	Průměr ploch	Koncentrace	Plocha	Průměr ploch	Poměr ploch
(mg/l)	(mAU.s)	(mAU.s)	(mg/l)	(mAU.s)	(mAU.s)	-
15,02	136,4	136,0	2,46	116,3	116,7	0,86
	135,6			117,5		
	136,0			116,4		
15,02	132,2	132,2	4,92	215,0	213,8	1,62
	131,5			213,9		
	132,8			212,6		
15,02	131,4	131,8	9,83	407,3	405,1	3,07
	131,3			403,3		
	132,7			404,5		
15,02	129,0	129,1	14,75	618,3	621,2	4,81
	129,0			624,7		
	129,4			620,7		
15,02	130,7	129,2	19,67	830,6	825,9	6,39
	128,1			821,7		
	128,7			825,5		
15,02	133,8	134,7	24,59	1007,9	1010,1	7,50
	134,3			1011,3		
	135,9			1011,1		

Graf 1 - Kalibrační řada - metoda vnější standard



Graf 2 - Kalibrační řada - metoda vnitřní standard



Dále byly změřeny tři různé vzorky terbinafinu a pomocí rovnic lineární regrese vyhodnoceny jak metodou vnějšího standardu, tak i metodou vnitřního standardu (tabulka 2).

Tabulka 2 - Porovnání metody vnějšího a vnitřního standardu

Vzorek		Interní standard		Terbinafin		Terb/IS	Stanovená koncentrace Terbinafinu	
Číslo vzorku	Navážka	Plocha	Průměr ploch	Plocha	Průměr ploch	Poměr ploch	Metoda vnější STD	Metoda vnitřní STD
-	(mg)	(mAU.s)	(mAU.s)	(mAU.s)	(mAU.s)	-	(mg/l)	(mg/l)
1	19,9	124,1	123,9	273,5	272,4	2,20	6,34	6,72
		124,6		273,0				
		122,9		270,9				
2	20,4	121,2	120,6	1349,4	1348,2	11,18	32,70	35,85
		119,8		1349,8				
		121,0		1345,4				
3	20,2	122,1	123,1	1020,7	1023,5	8,32	24,74	26,57
		123,5		1020,2				
		123,6		1029,7				

Z tabulek 1 a 2 je zřejmé, že plocha interního standardu v kalibrační řadě se pohybuje okolo 130 mAU.s, kdežto ve vzorku okolo 120 mAU.s, i když koncentrace interního standardu je v obou případech shodná 15 mg/l. Tento rozdíl by mohl být způsoben chybou při pipetování. Proto jsem se rozhodla po poradě s vedoucím své práce zopakovat přípravu kalibrační řady a přeměřit ji. Bohužel opakované měření vzorku již nebylo možné vzhledem k jeho nedostatečnému množství.

5.2 Opakovaný experiment

Výsledky opakovaného experimentu – kalibrační řady jsou shrnuty v tabulce 3.

Tabulka 3 - Koncentrační řada terbinafinu a interního standardu pro reálný vzorek - opakovaný experiment

Interní standard			Terbinafin			Terb/IS
Koncentrace	Plocha	Průměr ploch	Koncentrace	Plocha	Průměr ploch	Poměr ploch
(mg/l)	(mAU.s)	(mAU.s)	(mg/l)	(mAU.s)	(mAU.s)	-
14,40	130,5	131,2	2,52	86,0	88,9	0,68
	130,9			91,2		
	132,3			89,6		
14,40	131,3	130,5	5,03	190,6	190,3	1,46
	130,5			190,8		
	129,8			189,6		
14,40	129,9	129,7	10,06	388,6	388,6	3,00
	129,7			388,8		
	129,5			388,3		
14,40	130,2	130,4	15,10	580,4	581,2	4,46
	130,2			579,0		
	130,9			584,3		
14,40	127,9	129,0	20,13	771,4	773,2	5,99
	130,2			776,6		
	129,1			771,7		
14,40	129,9	130,2	25,16	957,7	955,4	7,34
	130,4			954,4		
	130,3			953,9		

Příprava roztoků pro kalibrační přímku v opakovaném experimentu probíhala ve větších objemech (10 ml a 25 ml odměrné baňky), aby byla co nejvíce eliminována chyba pipetování. U opakovaného experimentu se plocha interního standardu v kalibrační roztocích opět pohybovala okolo 130 mAU.s a to i přesto, že byla

koncentrace připraveného interního standardu lehce nižší (14,40 mg/l), než v prvním měření (15,02 mg/l).

Bohužel tato rozdílnost ploch interního standardu ve vzorku a kalibrační řadě způsobuje i rozdílnost vyhodnocení jednotlivých metod. Jak je patrné z tabulky 2, naměřená koncentrace terbinafinu vyhodnocená pomocí metody vnitřního standardu je vyšší než koncentrace terbinafinu vyhodnocená metodou vnějšího standardu. Tento rozdíl odpovídá rozdílu ploch interního standardu v kalibrační řadě a vzorku.

Výsledné koncentrace terbinafinu v jednotlivých vzorcích z metody vnějšího standardu z prvního měření jsou uvedeny v tabulce 4:

Tabulka 4 - Shrnutí výsledků stanovení obsahu terbinafinu ve vzorcích – metoda vnějšího standardu

Číslo vzorku	Obsah terbinafinu (100 x zředěno)	Obsah terbinafinu		
		(mg/ml)	(mg)	(%)
-	(mg/ml)	(mg/ml)	(mg)	(%)
Vzorek 1	6,34	633,92	1,27	6,4
Vzorek 2	32,70	3269,91	6,54	32,1
Vzorek 3	24,74	2474,25	4,95	24,5

Výsledné koncentrace terbinafinu v jednotlivých vzorcích z metody vnitřního standardu z prvního měření jsou uvedeny v tabulce 5:

Tabulka 5- Shrnutí výsledků stanovení obsahu terbinafinu ve vzorcích – metoda vnitřního standardu

Číslo vzorku	Obsah terbinafinu (100 x zředěno)	Obsah terbinafinu		
		(mg/ml)	(mg)	(%)
-	(mg/ml)	(mg/ml)	(mg)	(%)
Vzorek 1	6,72	672,18	1,34	6,8
Vzorek 2	35,85	3584,68	7,17	35,1
Vzorek 3	26,57	2657,05	5,31	26,3

Z uvedeného porovnání v tabulce 6 je patrný rozdíl mezi jednotlivými metodami stanovení. Opakovaným měřením jsem vyloučila chybu při přípravě roztoků v prvním experimentu. Otázkou tedy zůstává, čím je rozdílnost výsledků způsobena.

Tabulka 6 - Porovnání výsledků metod stanovení obsahu terbinafinu

Číslo vzorku	Metoda vnitřního standardu	Metoda vnějšího standardu	Rozdíl mezi metodami
-	(%)	(%)	(% body)
Vzorek 1	6,4	6,8	0,4
Vzorek 2	32,1	35,1	3,1
Vzorek 3	24,5	26,3	1,8

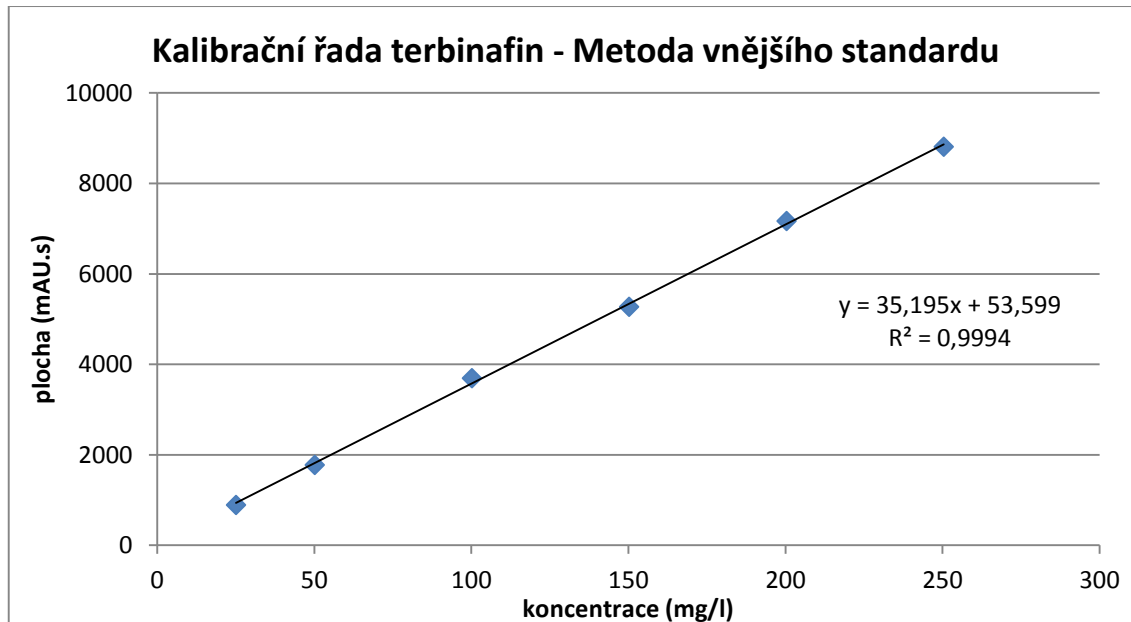
5.3 Pokusné experimenty v rámci šetření problému

V rámci šetření vzniklých komplikací bylo provedeno několik pokusných experimentů. Jednalo se o ověření vlivu navýšení koncentrace vzorku menším ředěním (navážka 25 mg do 25ml ředícího roztoku) a navýšení koncentrace interního standardu (591,72 mg/ml) v koncentrační řadě (tabulka 7) i u vzorku (tabulka 8) a tudíž i širší rozpětí koncentrační řady terbinafinu (25–250 mg/ml). Z naměřených dat byl vytvořen graf lineární závislosti – kalibrační křivka pro metodu vnějšího standardu (graf 3) a pro metodu vnitřního standardu (graf 4). Vyhodnocení koncentrace terbinafinu u jednotlivých vzorků ukazuje tabulka 9 a 10. Úprava koncentrací měla vliv na snížení rozdílů výsledků mezi jednotlivými metodami. Jak ukazuje tabulka 11, rozdíl mezi jednotlivými metodami se už pohybuje v řádu desetin procentních bodů (rozdíl 0,2 a 0,6), což by pro použitelnost obou metod bylo zanedbatelné. Bohužel vzhledem k nedostatku vzorků bylo provedeno ověření jen na dvou vzorcích. Dále nebylo již možno pokračovat a nelze tedy jednoznačně říci, že jsme našli příčinu problému.

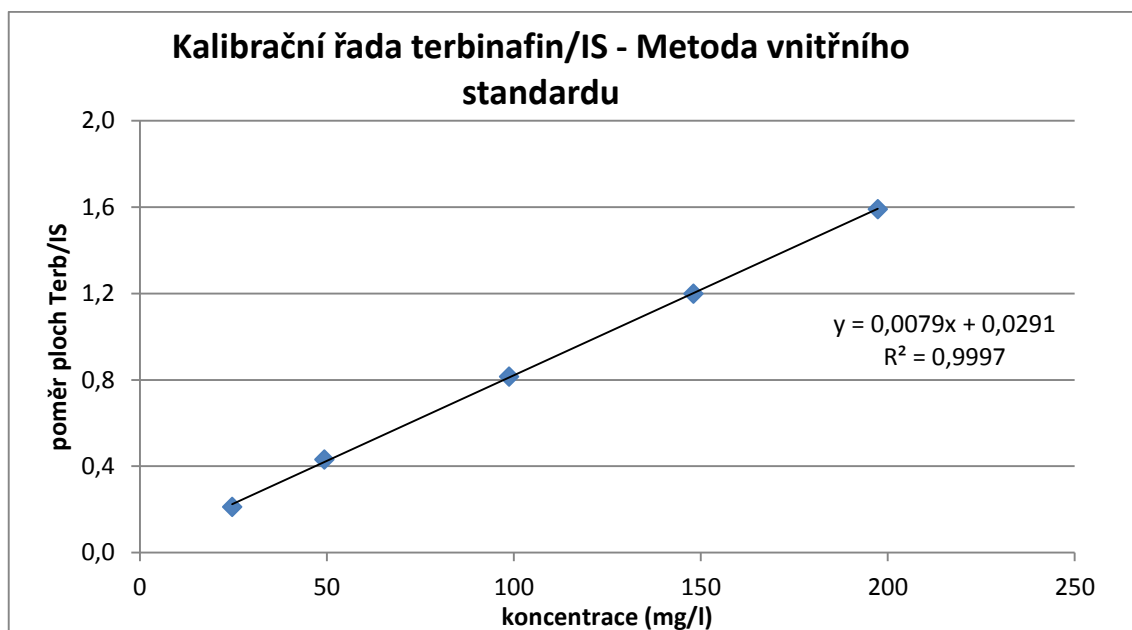
Tabulka 7 - Pokusné experimenty v rámci šetření - Koncentrační řada terbinafinu a interního standardu

Interní standard			Terbinafin			Terb/IS
Koncentrace	Plocha	Průměr ploch	Koncentrace	Plocha	Průměr ploch	Poměr ploch
(mg/l)	(mAU.s)	(mAU.s)	(mg/l)	(mAU.s)	(mAU.s)	-
591,72	4104,0	4121,5	24,67	869,0	873,5	0,21
	4139,0			878,0		
591,72	4099,0	4113,5	49,34	1775,0	1777,5	0,43
	4128,0			1780,0		
591,72	4452,0	4456,0	98,68	3636,0	3637,0	0,82
	4460,0			3638,0		
591,72	4409,0	4412,0	148,02	5293,0	5293,5	1,20
	4415,0			5294,0		
591,72	4448,0	4454,0	197,36	7077,0	7084,5	1,59
	4460,0			7092,0		
591,72	1770,0	1827,5	246,70	8696,0	8702,0	4,76
	1885,0			8708,0		

Graf 3 – Pokusné experimenty v rámci šetření - Kalibrační řada - metoda vnější standard



Graf 4 – Pokusné experimenty v rámci šetření - Kalibrační řada - metoda vnitřní standard



Tabulka 8 – Pokusné experimenty v rámci šetření - Porovnání metody vnějšího a vnitřního standardu - reálný vzorek

Vzorek		Interní standard		Terbinafin		Terb/IS	Stanovená koncentrace terbinafinu	
Číslo vzorku	Navážka	Plocha	Průměr ploch	Plocha	Průměr ploch	Poměr ploch	Metoda vnější STD	Metoda vnitřní STD
-	(mg)	(mAU.s)	(mAU.s)	(mAU.s)	(mAU.s)	-	(mg/l)	(mg/l)
1	25,0	4280	4285,0	4864	4865,5	1,14	136,72	139,62
		4290		4867				
2	25,9	4400	4400,5	4605	4610,5	1,05	129,48	128,55
		4401		4616				

Tabulka 9 - Vyhodnocení pokusných experimentů v rámci šetření - metoda vnějšího standardu

Číslo vzorku	Obsah terbinafinu (25 x zředěno)	Obsah terbinafinu		
		(mg/ml)	(mg)	(%)
-	(mg/ml)	(mg/ml)	(mg)	(%)
Vzorek 1	136,72	3418,07	6,84	27,3
Vzorek 2	129,48	3236,94	6,47	25,0

Tabulka 10 - Vyhodnocení pokusných experimentů v rámci šetření - metoda vnitřního standardu

Číslo vzorku	Obsah terbinafinu (25 x zředěno)	Obsah terbinafinu		
		(mg/ml)	(mg)	(%)
-	(mg/ml)	(mg/ml)	(mg)	(%)
Vzorek 1	139,62	3490,61	6,98	27,9
Vzorek 2	128,55	3213,76	6,43	24,8

Tabulka 11 - Porovnání výsledků metod stanovení obsahu terbinafinu v rámci šetření

Číslo vzorku	Metoda vnitřního standardu	Metoda vnějšího standardu	Rozdíl mezi metodami
-	(%)	(%)	(% body)
Vzorek 1	27,3	27,9	0,6
Vzorek 2	25,0	24,8	0,2

6. ZÁVĚR

Práce byla zaměřena na porovnání dvou metod v rámci vyhodnocení HPLC dat – metodu vnějšího a vnitřního standardu při měření obsahu terbinafinu v reálném vzorku.

Obě metody stanovení terbinafinu, jak pomocí metody vnějšího standardu, tak i pomocí metody vnitřního standardu, lze prohlásit za vhodné. Sama se přikláním spíše k metodě vnějšího standardu, která je jednodušší i rychlejší na přípravu roztoků i vzorku.

Vzhledem k výše uvedeným problémům při porovnání obou metod nelze metody v rámci stanovení obsahu terbinafinu jednoznačně srovnat a tudíž vyslovit jednoznačný a podložený názor, která z metod by byla vhodnější a proč. Z důvodu nedostatku vzorku nebylo možno již v experimentu dále pokračovat, ale na základě několika pokusných měření v rámci šetření je zřejmé, že by mělo stačit vhodně nastavit koncentraci standardů a jejich vzájemný poměr a vhodně zvolit navážku a ředění vzorku. Pak by i případná chyba při přípravě roztoků byla zanedbatelná a výsledky tak byly porovnatelné bez vnějších vlivů zanesených přípravou roztoků.

7. POUŽITÉ ZKRATKY

PC	Papírová chromatografie (Paper chromatography)
RF	Retardační faktor
TLC	Tenkvrstvá chromatografie (Thin layer chromatography)
GC	Plynová chromatografie (Gas chromatography)
HPLC	Vysokoučinná kapalinová chromatografie (High performance liquid chromatography)
A	Plocha píku
t_R	Retenční čas
V_R	Retenční objem
t_M	Mrtvý retenční čas
V_M	Mrtvý retenční objem
k'	Kapacitní faktor
A_s	Faktor symetrie
N	Počet teoretických pater
L	Délka kolony
H	Výškový ekvivalent teoretického patra
UV-VIS	Spektrofotometrie v ultrafialové a viditelné oblasti (Ultra-violet and visible spectrometry)
CRF	Hmotnostní korekční odezvoový faktor
IS	Interní standard

8. SEZNAM TABULEK

Tabulka 1 - Koncentrační řada terbinafinu a interního standardu	30
Tabulka 2 - Porovnání metody vnějšího a vnitřního standardu	32
Tabulka 3 - Koncentrační řada terbinafinu a interního standardu pro reálný vzorek - opakovaný experiment	33
Tabulka 4 - Shrnutí výsledků stanovení obsahu terbinafinu ve vzorcích – metoda vnějšího standardu	34
Tabulka 5- Shrnutí výsledků stanovení obsahu terbinafinu ve vzorcích – metoda vnitřního standardu	34
Tabulka 6 - Porovnání výsledků metod stanovení obsahu terbinafinu	35
Tabulka 7 - Pokusné experimenty v rámci šetření - Koncentrační řada terbinafinu a interního standardu	36
Tabulka 8 – Pokusné experimenty v rámci šetření - Porovnání metody vnějšího a vnitřního standardu - reálný vzorek	37
Tabulka 9 - Vyhodnocení pokusných experimentů v rámci šetření - metoda vnějšího standardu	38
Tabulka 10 - Vyhodnocení pokusných experimentů v rámci šetření - metoda vnitřního standardu	38
Tabulka 11 - Porovnání výsledků metod stanovení obsahu terbinafinu v rámci šetření	38

9. SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1 - Schéma HPLC	12
Obrázek 2 - Ukázka chromatogramu (Deriváty purinu).....	15
Obrázek 3 - Ukázka chromatogramu a jednotlivé charakteristiky	16
Obrázek 4 - Grafické vyjádření rozlišení	17
Obrázek 5 - Grafické vyjádření kalibrační křivky – závislost plochy píku na koncentraci analytu	19
Obrázek 6 - Grafické znázornění metody více přídavků standardu.....	21
Obrázek 7 - Přímé porovnání pomocí metody vnitřního standardu	23
Obrázek 8 - Metoda vnitřního standardu s využitím kalibrační křivky	23
Obrázek 9 - Strukturní vzorec - terbinafin hydrochlorid.....	25

10. SEZNAM GRAFŮ

Graf 1 - Kalibrační řada - metoda vnější standard	31
Graf 2 - Kalibrační řada - metoda vnitřní standard	31
Graf 3 – Pokusné experimenty v rámci šetření - Kalibrační řada - metoda vnější standard	36
Graf 4 – Pokusné experimenty v rámci šetření - Kalibrační řada - metoda vnitřní standard	37

11. CITOVANÁ LITERATURA

1. **Karlíček, Rolf.** *Analytická chemie pro farmaceuty*. 4. vyd. Praha : Karolinum, 2013. str. 281. ISBN 978-80-246-2202-6.
2. **SKLENÁŘOVÁ, Hana, Polášek, Miroslav a Matysová, Ludmila.** Instrumentální metody: Tenkovrstvá chromatografie. *Katedra analytické chemie, Farmaceutická fakulta, Univerzita Karlova*. [Online] Moodle pro výuku, 18. 10 2013. [Citace: 03. 03 2015.] <http://dl1.cuni.cz/mod/page/view.php?id=155446>.
3. **SKLENÁŘOVÁ, Hana, Polášek, Miroslav a Matysová, Ludmila.** Instrumentální metody: Vysokoučinná kapalinová chromatografie. *Katedra analytické chemie, Farmaceutická fakulta, Univerzita Karlova*. [Online] Moodle pro výuku, 18. 10 2013. [Citace: 03. 03 2015.] <http://dl1.cuni.cz/mod/page/view.php?id=164601>.
4. **Coufal, Pavel.** High Performance Liquid Chromatography, HPLC: Kapalinový chromatograf. *HPLC.cz*. [Online] 02. 03 1996. [Citace: 03. 03 2015.] <http://web.natur.cuni.cz/~pcoufal/hplc.html>.
5. **VŠCHT.** Plynová chromatografie. [Online] [Citace: 03. 09 2014.] http://old.vscht.cz/ktk/www_324/lab/texty/gc/GC02.pdf.
6. **FALLAH M.Z. EL., Martin M.** Separace na chromatografické koloně: Rozlišení. *HPLC.cz*. [Online] *Chromatographia*, 24, 115, 1987. [Citace: 03. 03 2015.] <http://www.hplc.cz/>.
7. **Nováková, Lucie a Douša, Michal.** *Moderní HPLC separace v teorii a praxi II*. 1. vyd. Praha 5 : Europrint a.s., 2013. str. 235. ISBN 978-80-260-4244-0.
8. **Český lékopis 2009 - Doplněk 2013.** Praha : Grada Publishing, a.s., 2013. str. 4354. ISBN 978-80-247-4679-1.
9. **TERBINAFIN ACTAVIS 250 MG.** *Státní ústav pro kontrolu léčiv*. [Online] [Citace: 03. 03 2015.] <http://www.sukl.cz/modules/medication/detail.php?code=0102524&tab=texts>.
10. **Terfimed 250. PRO.MED.CS Praha a. s.** [Online] 15. 12 2010. [Citace: 03. 03 2015.] <http://www.promed.cz/leky-na-lekarsky-predpis/terfimed-250>.
11. **TERBINAFIN ACTAVIS 250 mg tbl (bli.) 1x28 ks.** *ADC číselník*. [Online] [Citace: 03. 03 2015.] <http://www.adcc.sk/web/humanne-lieky/detail/terbinafin-actavis-250-mg-26340.html>.