

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE FARMACEUTICKÁ

FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

KATEDRA FARMACEUTICKÉ CHEMIE A KONTROLY LÉČIV

HPLC analýza léčiv XI.

Diplomová práce



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

Touto cestou bych chtěl poděkovat vedoucímu mé diplomové práce RNDr. Milanovi Mokrému, CSc. za všestrannou pomoc, cenné rady, připomínky a metodické vedení práce.

ABSTRAKT

Univerzita Karlova v Praze

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmaceutické chemie a kontroly léčiv

Kandidát: Štěpán Skopový

Konzultant: RNDr. Milan Mokrý, CSc.

Název diplomové práce: HPLC hodnocení vybraných léčiv XI.

Předmětem této diplomové práce bylo nalezení vhodných chromatografických podmínek pro HPLC analýzu látek fenofibrát a ketorolak. Na základě řešení práce byly navrženy podmínky pro analýzu fenofibrátu. Jako nejvhodnější se jeví kolona s náplní C₁₈ o rozměrech 250x4.6 mm a velikosti částic 5 μm (např. kolona Luna od firmy Phenomenex, Kromasil od Sigma-Aldrich, LiChrospher 60 RP-select B od firmy Merck, Zorbax od Agilent nebo Pinnacle od firmy Restek). Jako mobilní fáze byla navržena směs acetonitrilu a fosfátového pufru v objemovém poměru 50:50 nebo 60:40 a navržený způsob detekce je pomocí UV-VIS detektoru při vlnové délce okolo 286 nm. Pro analýzu ketorolaku byla zvolena kolona Discovery HS C18 HPLC Column od firmy Sigma-Aldrich (15 cm x 4.6 mm, velikost částic 5 μm). Jako optimální složení mobilní fáze byla zvolena směs acetonitril : roztok dihydrogenfosforečnanu draselného 0,01 mol/l okyselený kyselinou fosforečnou na pH 3,25; 40:60 (v/v). Teplota byla nastavena na 25°C, maximální tlak 20 MPa a průtoková rychlost na 1ml za minutu. Jako vnitřní standard byla zvolena kyselina tiaprofenová a detekce probíhala pomocí PDA detektoru (v nastaveném rozmezí vlnových délek 190-800 nm). Stejný způsob detekce i interní standard byly použity i pro chirální analýzu ketorolaku, při níž byla použita kolona CHIRALCEL®OD-R (0,46 cm x 25 cm, velikost částic) 10μm od firmy Daicel chem. industries, LTD. Jako mobilní fáze zde byla zvolena směs Acetonitril : chloristanový pufr o koncentraci 1 mol/l a pH 3,0; 40:60 (v/v). Rychlost průtoku mobilní fáze byla nastavena na 0,5 ml/min, maximální tlak na 16 MPa a teplota na 24°C.

ABSTRACT

Charles University in Prague

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Pharmaceutical Chemistry and Drug Control

Candidate: Štěpán Skopový

Consultant: RNDr. Milan Mokrý, CSc.

Title of Thesis: HPLC evaluation of some drugs XI.

The main focus of this diploma thesis was to find suitable chromatographic conditions for HPLC analysis of Fenofibrate and Ketorolac. Approximate chromatographic conditions for analysis of Fenofibrate were suggested based on review of previous research projects concerning HPLC analysis of this drug. As for the stationary phase, a C₁₈ column (250 x 4.6 mm, 5 μm particle size) was considered to be the most suitable. Suggested mobile phase is to be formed by mixture of acetonitrile and phosphate buffer (pH approximately 3,6) in the ratio 50:50 or 60:40. Detection could be carried out by an UV-VIS detector at 286 nm. For the analysis of ketorolac it was used Sigma-Aldrich's Discovery HS C18 HPLC column (150x4.6 mm, 5 μm). The mobile phase consisted of acetonitrile and 0,01 mol/l potassium dihydrogen phosphate buffer (pH 3.25) in the ratio 40:60 (v/v). Isocratic elution at a flow rate of 1 ml/minute was set at temperature 25°C and the maximum pressure was 20 Mpa. Thiaprofenic acid was used as internal standard and the detection was carried out by a PDA detector (model SPD-M20 A at the range of 190-800 nm). The same internal standard and the mode of detection was also used for the chiral analysis of Ketorolac, where a Daicel's CHIRALCEL®OD-R column (0,46x25 cm, 10 μm) was chosen as a stationary phase. The mobile phase consisted of acetonitrile and 1 mol/l chloristane buffer at ratio 40:60 (v/v). The flow rate was set at 0,5 ml/min, maximal pressure at 16 MPa and temperature at 24°C.

Obsah

1	Úvod	4
2	Cíl práce	4
3	Teoretická část	5
3.1	Historie	6
3.2	Definice a základní princip vysokoúčinné kapalinové chromatografie.....	6
3.3	Význam HPLC ve farmaceutické analýze	7
3.4	Instrumentace.....	7
3.4.1	Zásobníky mobilní fáze	7
3.4.2	Čerpadlo	7
3.4.3	Dávkovací ventil	7
3.4.4	Kolona	8
3.4.5	Detektor	8
3.4.6	Vyhodnocovací a kontrolní zařízení.....	10
3.5	Základní chromatografické veličiny	10
3.5.1	Retenční čas.....	10
3.5.2	Retenční faktor	10
3.5.3	Selektivita.....	11
3.5.4	Účinnost	11
3.5.5	Rozlišení.....	12
3.6	Hodnocení HPLC chromatogramu	12
3.6.1	Kvalitativní hodnocení	12
3.6.2	Kvantitativní hodnocení	13
3.6.3	Separční módy	14
3.7	Vývoj chromatografické metody	15
3.7.1	Získání a interpretace informací o fyzikálně-chemických vlastnostech analyzovaných látek	15
3.7.2	Úprava vzorku	15
3.7.3	Nalezení vhodných chromatografických podmínek.....	15
3.7.4	Výběr detektoru.....	17
3.7.5	Výběr kolony.....	17
3.7.6	Výběr mobilní fáze.....	18

3.7.7	Výběr módu eluce	18
3.7.8	Optimalizace metody.....	19
3.8	Validace chromatografických metod.....	19
3.8.1	Validační parametry	19
3.9	Úprava vzorku pro analýzu biologického materiálu.....	22
3.9.1	Deproteinace.....	23
3.9.2	Extrakce kapalina – kapalina.....	23
3.9.3	Extrakce na pevné fázi	23
3.9.4	Mikroextrakce	23
3.10	Moderní trendy v chromatografii.....	24
3.10.1	Rapid Resolution Liquid Chromatography (RRLC)	24
3.10.2	Ultra Performance Liquid Chromatography (UPLC).....	24
3.10.3	Ultra Fast Liquid Chromatography (UFLC)	25
3.10.4	Nano Liquid Chromatography (NLC).....	26
3.10.5	Srovnání moderních systémů kapalinové chromatografie	26
3.11	Vlastnosti zkoumaných látek	26
3.11.1	Fenofibrát	26
3.11.2	Ketorolak.....	29
4	Rešeršní část.....	31
4.1	Přehled prací zabývajících se HPLC analýzou fenofibrátu	32
4.1.13	Shrnutí	40
4.1.14	Stanovení fenofibrátu v kombinovaných lékových formách s rosuvastatinem..	41
4.1.15	Návrh vhodných chromatografických podmínek pro analýzu fenofibrátu	45
4.2	Přehled prací zabývajících se HPLC analýzou ketorolaku.....	45
4.2.14	Shrnutí	51
5	Experimentální část.....	52
5.1.1	Použité přístroje, materiál, pomůcky a chemikálie	53
5.1.2	Vypracování chromatografických podmínek pro HPLC analýzu ketorolaku	53
5.1.3	Vypracování chromatografických podmínek pro chirální HPLC analýzu ketorolaku.....	55
5.2	Výsledky a diskuze.....	55
5.2.1	Chromatografické podmínky pro HPLC analýzu ketorolaku.	55
5.2.2	Chirální analýza ketorolaku pomocí HPLC	57
6	Závěr.....	60

7	Zdroje	61
----------	---------------------	-----------

1 Úvod

Tato diplomová práce se zabývá analýzou vybraných léčiv pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie neboli HPLC (zkratka anglického High Performance Liquid Chromatography), což je v současné době jedna z nejpoužívanějších metod farmaceutické analýzy.

Jako léčiva, kterým se tato práce věnuje, byly zvoleny fenofibrát a ketorolak. Fenofibrát je látka ze skupiny antihyperlipidemik, která pomáhá snižovat hladinu cholesterolu (především LDL a VLDL) a triglyceridů. Zároveň přispívá ke zvýšení hladiny HDL, čímž pomáhá snížit riziko aterosklerózy a s ní spojených kardiovaskulárních onemocnění. Ketorolak patří mezi takzvaná nesteroidní antiflogistika a používá se ke krátkodobé léčbě středně silné až silné bolesti.

Tato práce se zaměřuje na nalezení vhodných podmínek pro HPLC analýzu těchto látek. Nejdříve byl proveden průzkum doposud vypracovaných prací na toto téma, z něhož byla vytvořena rešerše. Součástí této diplomové práce je také část experimentální, která obsahuje vývoj a testování chromatografických metod pro analýzu ketorolaku.

2 Cíl práce

Cílem této práce bylo v první fázi vypracování rešeršní práce na téma HPLC analýza fenofibrátu a ketorolaku a na jejím základě navrhnout vhodné chromatografické podmínky pro experimentální analýzu těchto látek. Cílem experimentální části bylo následně tyto podmínky otestovat, upravit a upřesnit a připravit tak podklady pro vývoj analytické metody.

3 Teoretická část

3.1 Historie

Průkopníkem, který se zasloužil o objevení chromatografie, byl ruský botanik Mikhail S. Tswett, který se počátkem 20. století zabýval separací pigmentů extrahovaných z rostlin za použití rozpouštědla a první improvizované kolony naplněné malými částicemi. Tswett naplnil skleněný sloupec uhličitanem vápenatým a oxidem hlinitým. Poté tímto sloupcem nechal protékat připravený extrakt homogenizovaných listů rostlin a následně sloupec promýval čistým rozpouštědlem. Výsledkem tohoto experimentu byl vznik oddělených barevných zón po separaci rostlinných pigmentů. Podle řeckého slova chroma (česky barva) byl poté pojmenován celý proces, jehož název se zachoval dodnes. (1)

Chromatografie se brzy ukázala být velice slibnou a progresivní analytickou technikou a začaly vznikat nové a dokonalejší metody. Nejdříve byly vyvinuty metody sloupcové chromatografie, chromatografie na tenké vrstvě a poté plynové chromatografie. Kapalinová chromatografie byla z počátku ve stínu těchto metod opomíjena, aby mohla být v 50-60tých letech minulého století znovuobjevena jako moderní, dynamicky se rozvíjející analytická technika, za kterou byla v roce 1952 udělena Nobelova cena dvojici vědců A.J.P. Martinovi a R.L.M. Syngemu z University v Cambridge. (2)

Od té doby urazila kapalinová chromatografie další velký kus cesty, ve které sehrál významnou roli maďarský inženýr chemie C. Horváth, který jako stacionární fázi použil malé porézní skleněné kuličky, které vykazovaly vyšší separační účinnost než do té doby využívané náplně. Nevýhodou této stacionární fáze však bylo výrazné zvýšení odporu pro pohyb mobilní fáze, kdy už síla gravitace přestala stačit. V té době (60. léta 20. století) byl tedy sestaven první HPLC chromatograf, čili přístroj schopný poskytovat konstantní tok mobilní fáze za vysokého tlaku. Od té doby se HPLC neustále vyvíjí, v současnosti se ubírá směrem co největší miniaturizace, automatizace a rychlosti analýzy o čemž pojednává kapitola moderní trendy v HPLC. (3)

3.2 Definice a základní princip vysokoúčinné kapalinové chromatografie

Vysokoúčinná kapalinová chromatografie je analytická metoda používaná k separaci různých komponent ve směsi látek, ať už k identifikaci či kvantitativnímu stanovení dané látky. Základním principem je průtok kapalného rozpouštědla (mobilní fáze), které obsahuje vzorek analyzovaných látek přes stacionární fázi, neboli kolonu, která obsahuje pevný adsorbční materiál. Každá komponenta ve vzorku interaguje s částicemi stacionární fáze odlišně, což způsobuje rozdílnou retenci těchto komponent, vedoucí k jejich rozdělení při průtoku kolonou. (1)

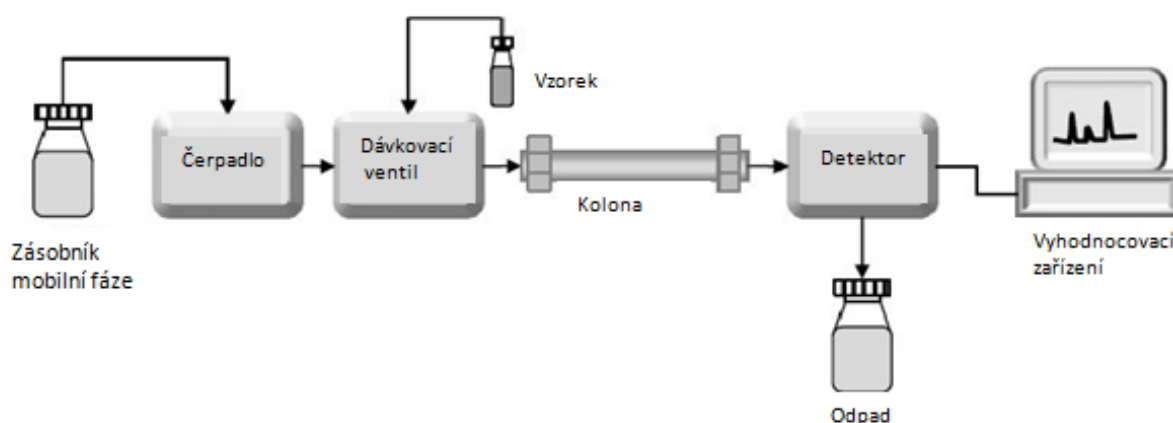
HPLC je v současné době jednou z nejpoužívanějších analytických metod. Jejimi hlavními přednostmi jsou univerzální využitelnost, citlivost, selektivita, rychlost a malá spotřeba analyzovaného vzorku.

3.3 Význam HPLC ve farmaceutické analýze

HPLC dnes patří mezi nezbytné nástroje farmaceutické analýzy. Tato technika je hojně využívána ve všech stádiích životního cyklu léčivého přípravku. Uplatňuje se už v preklinické fázi výzkumu při identifikaci potenciálních léčivých látek. Dále bývá používána ke zkouškám čistoty a stability připravených léčivých látek i hotových lékových forem. HPLC rovněž nachází využití ve farmakokinetických studiích. Tato metoda nachází uplatnění také v monitorování lékových hladin a individualizaci terapie. Významnou roli hraje také při vývoji generik, zejména při studiích disoluce a bioekvivalence. V neposlední řadě se také jedná o významný nástroj farmaceutické kontroly pro zajišťování jakosti výrobcem či kontrolními orgány a podílí se tak na zvyšování bezpečnosti farmakoterapie. (2)

3.4 Instrumentace

Kapalinový chromatograf se skládá ze zásobníků mobilní fáze, čerpadla, dávkovacího zařízení, kolony, detektoru a vyhodnocovacího zařízení. Základní schéma kapalinového chromatografu je zakresleno na obrázku. V následujících odstavcích budou jednotlivé součásti podrobněji rozepsány.



Obrázek 1 Schéma kapalinového chromatografu (4)

3.4.1 Zásobníky mobilní fáze

Jedná se obvykle o jednu až tři nádoby ze skla, kovu nebo plastu, které slouží k uchování mobilní fáze. Ta je odtud průběžně vedena do dalších částí chromatografického systému. (5)

3.4.2 Čerpadlo

Zajišťuje stálý tok mobilní fáze HPLC systémem. Vytváří pracovní tlak v rozmezí 1 – 60 Mpa. Většina moderních čerpadel umožňuje také kontrolované míchání různých mobilních fází z více zásobníků (gradientová eluce) (5)

3.4.3 Dávkovací ventil

Toto zařízení zprostředkovává vstřík analyzovaného vzorku do mobilní fáze před vstupem do kolony. Ve většině moderních systémů se jedná o automatické dávkovače, které lze

naprogramovat ke vstřikování definovaných objemů v daném čase z vialek umístěných ve speciálním zásobníku. (5)

3.4.4 Kolona

Kolona je „srdce“ HPLC systému. Je místem, kde dochází k separaci směsi analytů. Dochází zde ke kontaktu mobilní a stacionární fáze. Kolony se od sebe liší velikostí, která se pohybuje většinou mezi 150 až 300 mm s vnitřním průměrem 2,1-4,6 mm a zejména svou náplní, kterou tvoří tzv. sorbent, který může přímo fungovat jako stacionární fáze nebo jeho povrch může být modifikován jinou stacionární fází. Podle sorbentu se kolony dělí na náplňové a monolitické. (2)

3.4.4.1 Náplňové kolony

Náplň kolon je tvořena malými kulatými částicemi (většinou o velikosti 1,5 až 5 μm). Tyto částice jsou velice porézní, čímž se značně zvětšuje povrch stacionární fáze. Platí, že čím menší částice, tím je větší odpor vůči průtoku mobilní fáze. (3)

3.4.4.2 Monolitické kolony

Tyto kolony jsou naplněny celistvým kusem sorbentu, který obsahuje velké množství pórů o různé velikosti. Výhodou takových kolon je možnost dosažení většího intersticiálního prostoru a následná schopnost pojmout větší průtok mobilní fáze i při použití nižšího tlaku. (3)

3.4.5 Detektor

Funkcí detektoru je zaznamenat přítomnost analytu v eluátu, který vychází z kolony, a převést ho na elektrický signál. Ten je dále zpracován vyhodnocovacím zařízením a převeden na chromatografický signál (pík). Existuje několik různých typů detektorů, které se používají jako součást HPLC systému. Nejpoužívanější z nich jsou podrobněji přiblíženy v následujících odstavcích. (2)

3.4.5.1 Spektrofotometrické detektory (UV/VIS)

Jedná se o detektory, které jsou dnes běžným standardem pro kontrolu kvality substancí a léčivých přípravků. Principem této detekce je schopnost látek absorbovat UV záření, popřípadě záření o vlnové délce, která přísluší viditelné oblasti spektra. Jsou snadno využitelné v kvantitativní analýze, neboť zde lze aplikovat Lambert-Beerův zákon, kde odezva detektoru vykazuje lineární závislost na délce cely a koncentraci analytu. ($A = \epsilon \cdot l \cdot c$, kde A je absorbance, l je tloušťka absorbující vrstvy v cm, c představuje koncentraci analytu v mol/l a ϵ je molární absorpční koeficient). Zdrojem záření bývá nejčastěji deuteriová lampa (pro UV oblast spektra – 200-400 nm) nebo wolframová lampa (pro viditelnou oblast spektra). UV/VIS detektory se dále dělí na tři typy.

Nejstarší a nejjednodušší typ je detektor s fixní vlnovou délkou, který je v současnosti už překonán a téměř se nevyužívá. O poznání využívanější je detektor s proměnnou vlnovou délkou. Třetím typem jsou takzvané detektory s diodovým polem (DAD), které dokážou během analýzy zaznamenat celé spektrum v rámci nastaveného rozmezí. Tak lze zvolit vlnovou délku pro detekci různých píků individuálně a získat jejich UV spektrum.

Výhodou těchto detektorů je jejich vysoká citlivost pro látky, které obsahují chromofor, snadnost obsluhy a nízká citlivost odezvy vůči změnám složení mobilní fáze a teploty. (2,6)

3.4.5.2 Fluorimetrické detektory (FD)

Základním principem těchto detektorů je zaznamenání fluorescence analytu. Nejdříve je analyt vystaven excitačnímu záření a tato přijatá část energie je následně vyzářena jako emisní záření o vlnové délce vyšší než byla délka primárního záření. Oproti UV/VIS detekci má tento způsob výhodu ve vyšší citlivosti a selektivitě, ale je využitelný pouze pro látky, které vykazují fluorescenci nebo se dají derivatizací převést na fluoreskující produkt. (6)

3.4.5.3 Elektrochemické detektory (ECD)

Tento způsob detekce je založen na oxidačně-redukčních dějích. Proto lze takto detekovat pouze látky, které obsahují skupinu schopnou oxidace nebo redukce. Cílem detektoru obsahuje elektrody (různé druhy – např. uhlíková, stříbrná, zlatá nebo platinová), které zaznamenávají změnu elektrické veličiny, vyvolanou přítomností analytu v mobilní fázi. Existují dva typy těchto detektorů, a to ampérometrický, který měří elektrický proud při konstantním napětí a coulometrický, který zaznamenává změnu elektrického napětí za konstantního proudu a dochází při něm k úplné elektrolýze analytu. Tento detektor je vhodný při analýzách elektrochemicky aktivních látek, pro něž je vysoce citlivý a selektivní. Typicky jsou takto detekovány zejména katecholaminy, glykoproteiny a analyt obsahující fenolickou, amino, diazo nebo nitro skupinu. (2,6)

3.4.5.4 Radiometrické detektory (RAD)

Pomocí radiometrických detektorů se stanovují radioaktivně označené analyty, které emitují α , β nebo γ záření v důsledku jaderného rozpadu. Tento způsob detekce se využívá zejména pro experimentální studie distribuce léčivých látek u laboratorních zvířat, pro něž vykazuje vysokou selektivitu a citlivost. (2,6)

3.4.5.5 Refraktometrické detektory

Principem refraktometrických detektorů je měření rozdílu indexu lomu mezi samotnou mobilní fází a mobilní fází s obsahem analytu. Tento detektor je velmi univerzální, ale přesto nachází pouze malé využití z důvodu nízké citlivosti a závislosti na složení mobilní fáze (neumožňuje analýzy v gradientovém módu eluce). (2,6)

3.4.5.6 Detektory rozptylu světla

Výše popsané nedostatky refraktometrických detektorů částečně kompenzují detektory rozptylu světla. Mobilní fáze je při tomto způsobu detekce odpařena pomocí proudu dusíku a následně je měřen rozptyl světla na částicích netěkavých analytů. Výhodou tohoto detektoru je univerzálnost, možnost gradientové eluce a tolerance teplotních výkyvů. Jeho použití je vhodné u látek s absencí chromoforů. (6)

3.4.5.7 Aerosolový detektor nabitých částic (Corona-discharge detektor – CAD)

Eluát je zde po výstupu z kolony přeměněn na aerosol a mobilní fáze je poté odpařena ve speciální komoře. Analyt je takto převeden do plynné fáze, kde je smísen s pozitivně nabitým dusíkem, který svůj náboj odevzdá analytu. Ten poté putuje do kolektoru, kde vlivem tohoto náboje vzniká elektrický proud, který lze zaznamenat pomocí elektrometru. Výhodou tohoto

detektoru je opět velká univerzálnost, je totiž schopen detekovat téměř všechny analyty (musí být méně těžké než mobilní fáze). Je proto vhodnou alternativou k detekci analytů, které nemají ve svých molekulách žádný chromofor zaznamatelný pomocí UV/VIS detekce. (6)

3.4.5.8 Hmotnostní spektrometrie (MS detektor)

Spojení HPLC s MS detektorem je jedním ze současných moderních trendů ve farmaceutické analýze. Tato kombinace nalézá uplatnění zejména v kvalitativních i kvantitativních analýzách složitých směsí (především analýza léčiv a metabolitů v biologickém materiálu), kdy analytik získá z výstupu měření také informace o struktuře daných látek. Po výstupu z HPLC systému musí být vzorek ionizován (nejčastěji pomocí elektrospreje nebo chemicky za atmosferického tlaku). Ionty jsou posléze přivedeny do analyzátoru, kde jsou separovány podle poměru hmotnosti a náboje fragmentu (m/z). Poslední částí je vlastní detektor, kde dochází k detekci iontů. (2,7)

3.4.6 Vyhodnocovací a kontrolní zařízení

V podstatě jde o počítač, který hlídá a udržuje všechny parametry HPLC systému (složení mobilní fáze, teplotu, tlak, sekvenci dávkování vzorku atd.) a vyhodnocuje data získaná z detektoru, kdy zaznamenaný signál převádí do podoby, která umožňuje další interpretaci výsledků měření. (2)

3.5 Základní chromatografické veličiny

3.5.1 Retenční čas

Tato veličina udává vzdálenost maxima chromatografického píku od bodu nástřiku v časových jednotkách. Pro svou snadnou měřitelnost se pravděpodobně jedná o nejvíce využívaný deskriptor chování analytu, sloužící k jeho jednoznačné identifikaci konkrétním systémem. Jeho nevýhodou je malá univerzálnost, protože záleží na rychlosti toku mobilní fáze, velikosti kolony a typu sorbentu. (8,9)

3.5.2 Retenční faktor

Nízkou univerzálnost retenčního času kompenzuje veličina zvaná retenční faktor. Vypočítá se podle následujícího vzorce, kde t'_R je takzvaný redukovaný retenční čas, který lze vypočítat odečtením mrtvého retenčního času t_0 od retenčního času analytu t_R . Mrtvý retenční čas je definován jako retenční čas analytu, který není zadržován na koloně a je volně unášen proudem mobilní fáze. Retenční faktor je tedy bezrozměrná veličina, která popisuje retenční chování analyzované látky nezávisle na rychlosti toku mobilní fáze a rozměrech kolony. Umožňuje tak lepší srovnání v případě měření na různých přístrojích s využitím různých velikostí kolon (chromatografické podmínky jako složení mobilní fáze a typ sorbentu kolony však musí zůstat zachovány). (3,8)

$$k = \frac{(t_R - t_0)}{t_0} = \frac{t'_R}{t_0}$$

Rovnice 1 retenční faktor (12)

3.5.3 *Selektivita*

Tato veličina udává schopnost chromatografického systému odlišit dva analyty. Vypočítá se jako poměr retenčních faktorů nebo redukovaných retenčních časů dvou analytů, viz vzorec. Selektivitu ovlivňují zejména vlastnosti sorbentu a analytu. (3,8)

$$\alpha = \frac{k_2}{k_1} = \frac{t_{R2} - t_0}{t_{R1} - t_0}$$

Rovnice 2 selektivita (12)

3.5.4 *Účinnost*

Analyt je vstříknut na kolonu ve formě velmi malé zóny s jeho rovnoměrným rozložením po celé této oblasti. Při pohybu zóny kolonou dochází k jejímu rozšiřování. Stupeň tohoto rozmytí je udáván veličinou zvanou účinnost. K popisu tohoto jevu se vztahuje několik teorií. Nejvíce uznávaná je takzvaná teorie teoretických pater. Jejím principem je předpoklad neustále se obnovující rovnováhy mezi množstvím analytu přítomným na povrchu stacionární fáze a množstvím analytu ve fázi mobilní a zároveň existencí hypotetických oddělených vrstev v koloně. Každé takové patro má definovanou výšku (height equivalent to a theoretical plate, HETP), přičemž analyt se v ní vyskytuje v definovaném čase, který postačuje k ustálení rovnováhy. Malá výška teoretického patra nebo jejich vyšší počet pak vede k vyšší účinnosti přechodu analytu mezi dvěma fázemi, a tím k lepší separaci. Počet teoretických pater (N) lze vypočítat podle následujícího vzorce, kde t_R je retenční čas analytu a w_h je šířka píku v polovině jeho výšky vyjádřená časem. (3,8)

$$N = 5,545 \left(\frac{t_R}{w_h} \right)^2$$

Rovnice 3 počet teoretických pater (12)

Tato veličina je závislá zejména na kvalitě sorbentu, velikosti částic, průtoku mobilní fáze a technických parametrech použitého přístroje. Je velmi ovlivňována také délkou kolony. Pro lepší srovnání účinnosti při použití různé délky kolony je zde veličina výškový ekvivalent teoretického patra (H), která se vypočítá pomocí následujícího vzorce: (2,8)

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

Rovnice 4 výškový ekvivalent teoretického patra (12)

3.5.5 Rozlišení

Jak bylo zmíněno v předchozích odstavcích, vzdálenost maxim píků je vyjádřena selektivitou jejich rozmytí pomocí účinnosti. Další chromatografickou veličinou je rozlišení (R), které je definováno jako poměr vzdáleností mezi dvěma píky a průměrné šířky těchto píků, čili tento deskriptor v sobě zahrnuje jak selektivitu, tak i účinnost. Vypočítá se podle následujícího vzorce, kde t_{R1} , t_{R2} představují retenční časy píků a w_{h1} a w_{h2} jsou šířky píků v polovině výšky vyjádřené časem. Pro dosažení separace dvou píků na základní linii je obvykle dostačující hodnota rozlišení 1,5 (2,8)

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

Rovnice 5 rozlišení (12)

3.6 Hodnocení HPLC chromatogramu

Jak bylo zmíněno již v úvodu, pomocí HPLC lze provést jak identifikaci analytů, čili kvalitativní analýzu, tak i vyjádření jejich obsahu ve vzorku, neboli analýzu kvantitativní.

3.6.1 Kvalitativní hodnocení

Základní charakteristikou pro kvalitativní hodnocení je retenční čas, kdy se porovnává retenční čas daného analytu s retenčním časem standardu. Samozřejmě, jak již bylo zmíněno v předchozích kapitolách, retenční čas závisí na chromatografických podmínkách (mobilní fáze, kolona, rychlost toku, teplota...), proto je nutné pro obě analýzy použít totožné podmínky. Je nutné podotknout, že retenční čas není pro žádnou látku zcela unikátní, navíc může být ovlivněn koelucí dalších látek nebo maticí vzorku. Tento přístup tedy není příliš vhodný pro analýzu biologického materiálu a jiných vzorků, kde může docházet k těmto interakcím. Naopak u analýzy vzorků, kde je předpokládán majoritní obsah daného analytu je tento způsob vhodný (např. kvalitativní hodnocení látek při výrobě).

Při kvalitativní analýze složitějších vzorků je vhodné využít speciální detektory, které poskytují strukturní data (např. MS, PDA, NMR, IR). V současné době je nejpoužívanější spojení HPLC s MS, popř. detektoru s diodovým polem (PDA). (2,3)

3.6.2 Kvantitativní hodnocení

Kvantitativní analýza se provádí pomocí integrace píku. Plocha pod křivkou píku totiž roste s obsahem příslušné látky ve vzorku. Různými způsoby lze poté zjistit obsah analyzované látky ve vzorku. Tyto způsoby jsou podrobněji rozvedeny v následujících odstavcích.

3.6.2.1 Metoda vnějšího standardu

Při této metodě je koncentrace stanovované látky ve vzorku určena porovnáním plochy jejího píku a píku standardu, který je však analyzován samostatně. Plocha píku je přímo úměrná koncentraci látky u standardu ku vzorku. Vzhledem k tomu, že koncentraci standardu známe, lze vypočítat neznámou koncentraci vzorku za použití následujícího vzorce, kde A_{ST} a A_{VZ} jsou plocha píku standardu, resp. vzorku c_{ST} a c_{VZ} představují koncentrace standardu, resp. vzorku. (3,10,11)

$$c_{VZ} = \frac{A_{VZ}}{A_{ST}} c_{ST}$$

Rovnice 6 vnější standard (13)

3.6.2.2 Metoda vnitřního standardu

Předchozí způsob je mnohdy nevýhodný z důvodu nutnosti provádět analýzu zvlášť pro vzorek i pro standard, což stojí mnoho času a navíc je tato metoda zatížena chybou dvojího nástřiku. Tyto nedostatky jsou kompenzovány v metodě vnitřního standardu, kdy se ke známému objemu vzorku přidává definovaný objem vnitřního standardu a tato směs se nastříkuje po promíchání na kolonu. Tento způsob je náročnější na správnou volbu vnitřního standardu, který má být eluován v blízkosti píků analyzovaného vzorku, musí mít podobnou koncentraci jako hodnocené látky a měl by být chemicky inertní, aby se zabránilo nežádoucím interakcím. Neznámá koncentrace analytu ve vzorku (c_{VZ}) se následně vypočítá podle následujícího vzorce, kde A_{IS} představuje koncentraci interního standardu a ostatní neznámé jsou stejné jako ve vzorci u metody vnějšího standardu. (3,10,11)

$$c_{VZ} = \frac{\left(\frac{A_{VZ}}{A_{IS}}\right)}{\left(\frac{A_{ST}}{A_{IS}}\right)} c_{ST}$$

Rovnice 7 vnitřní standard (13)

3.6.2.3 Metoda normalizace

Při metodě normalizace se stanovovaná látka vyjadřuje jako procentuální podíl všech píků na chromatogramu, kdy jsou zanedbány píky pod limitem zanedbatelnosti a píky, které přísluší rozpouštědlům. Tato metoda je vhodná pro hodnocení stability, popřípadě čistoty. (2)

3.6.2.4 Kalibrační metoda

Při kalibrační metodě se nejprve určí závislost odezvy detektoru na koncentraci daného analytu. V praxi se na základě výsledků vytvoří kalibrační křivka, ze které lze vypočítat směrnice a následně se pomocí získané rovnice přímky (ve tvaru $y = ax + b$) vypočítá koncentrace stanovované látky. (3,10,11)

3.6.3 Separační módy

Podle použité stacionární a mobilní fáze se rozlišuje několik separačních módů, které budou podrobněji přiblíženy v následujících odstavcích.

3.6.3.1 Chromatografie na normálních fázích

Jedná se o historicky nejstarší separační mód. Využívá se zde polární stacionární fáze, kterou tvoří nejčastěji čistý silikagel nebo se může jednat o silikagel s chemicky modifikovaným povrchem (s navázanými polárními funkčními skupinami). Mobilní fázi zde tvoří nevodné směsi organických nepolárních rozpouštědel (nejčastěji hexan, dichlormethan nebo chloroform). K retenci na stacionární fázi dochází díky elektrostatickým interakcím (vodíkové vazby, dipól-dipól). Čím je mobilní fáze polárnější, tím jsou analyty rychleji vymývány z kolony. Dříve se tento způsob hojně používal zejména při analýze polárních látek jako například sacharidů, ale dnes už bývá nahrazován novějšími technikami. (2)

3.6.3.2 Chromatografie na reverzních fázích

Tento separační mód je dnes mnohem využívanější než jeho výše popsany předchůdce. Jak již název napovídá, fáze jsou zde obráceny, tedy stacionární fáze je nepolárního charakteru a je tvořena nejčastěji silikagelem s modifikovaným povrchem hydrofobními funkčními skupinami (nejčastěji dlouhé alkylové řetězce C_{18} a C_8 nebo např. fenyl). Mobilní fáze je naopak polárnější, obsahuje organickou (nejčastěji methanol, acetonitril nebo jejich směsi) a vodnou složku (roztoky pufrů). Mechanismus zadržování analytu stacionární fází jsou zde hydrofobní interakce. Méně polární látky jsou takto více zadržovány na stacionární fázi a pořadí retence je tedy obrácené oproti předchozímu módu. (2,14)

3.6.3.3 Chromatografie hydrofilních interakcí

U tohoto módu se používá jako stacionární fáze silikagel, čistý nebo modifikovaný polární funkční skupinou. Mobilní fáze je tvořena směsí acetonitrilu a vodného roztoku pufru. Principem je vytvoření tenké vodné vrstvy na povrchu stacionární fáze, do které pronikají analyty rozpuštěné v mobilní fázi. Tento způsob je dnes využíván jako alternativa pro chromatografii na normální fázi k analýze polárních látek. (16)

3.6.3.4 Iontově výměnná chromatografie

Stacionární fáze u tohoto módu musí obsahovat iontovou nebo ionizovatelnou skupinu. Tato skupina má opačný náboj než separovaný analyt. Mobilní fáze obsahuje ionty, které mají rovněž opačný náboj. Dochází tedy ke kompetici analytu a iontů mobilní fáze o vazebná místa

na stacionární fázi, což je princip retence u tohoto módu. Tento systém nachází využití zejména při analýze iontů nebo ionizovatelných látek. (3)

3.6.3.5 Chirální chromatografie

Chirální separace v poslední době nabývají stále většího významu z důvodu racionalizace terapie, pro níž je důležité od sebe rozlišit jednotlivé stereoizomery a sledovat jejich aktivitu či nežádoucí účinky. Enantiomery mají stejné fyzikálně-chemické vlastnosti, což klade vyšší nároky na chromatografický systém. Nejčastěji jsou dnes využívány následující dva způsoby chirální separace. (2)

3.6.3.5.1 Derivatizace

Principem tohoto způsobu je derivatizace enantiomerů opticky aktivním činidlem, čímž dojde ke vzniku diastereomerů, které už mají odlišné fyzikálně-chemické vlastnosti a lze je tedy od sebe rozlišit pomocí standardních HPLC metod. (2)

3.6.3.5.2 Nepřímý přístup

Při nepřímém přístupu chirální separace se využívají speciální enantioselektivní stacionární fáze, jejichž povrch bývá modifikován opticky aktivní látkou (např. cyklodextrin). Další možnost je zde také přidání opticky aktivního činidla do mobilní fáze, v tomto případě lze docílit separace i na achirální koloně. (2)

3.7 Vývoj chromatografické metody

Vývoj chromatografické metody spočívá v nalezení chromatografických podmínek vhodných k analýze konkrétního vzorku. Při vývoji metody je nutné zvážit mnoho faktorů.

V následujících odstavcích jsou jednotlivé kroky vývoje metody podrobněji přiblíženy.

3.7.1 Získání a interpretace informací o fyzikálně-chemických vlastnostech analyzovaných látek

Fyzikálně chemické vlastnosti hrají při vývoji metody významnou roli. Mezi nejdůležitější vlastnosti pro HPLC analýzu patří rozpustnost, polarita, pKa a pH analyzovaných látek.

Dobrá znalost těchto vlastností může analytikovi pomoci při výběru složení mobilní fáze, nalezení vhodné kolony a způsobu detekce.

3.7.2 Úprava vzorku

Příprava vzorku je důležitý krok při vývoji metody. V první fázi musí být připraven roztok, který je stabilní při normálních laboratorních podmínkách. Roztok vzorku by měl být dále přefiltrován za použití filtru s velikostí pórů 0.22 – 0.45 μm k odstranění nerozpuštěných nečistot. Často se také pracuje se vzorky biologického materiálu, kde je příprava poněkud složitější a je jí věnována kapitola 3.9. (19)

3.7.3 Nalezení vhodných chromatografických podmínek

Následující odstavce jsou věnovány jednotlivým chromatografickým podmínkám, jejichž výběr je při vývoji metody nutno zvážit.

3.7.3.1 Výběr pufru

Pufř je částečně neutralizovaná kyselina, která brání změnám pH v roztoku. Důležitou charakteristikou pufru a jeho schopnosti čelit změnám pH je veličina zvaná kapacita pufru. Tato veličina je charakterizována množstvím hydroxidu sodného, které je potřebné ke zvýšení pH roztoku o 1.0. Správná volba pufru je pro úspěšný vývoj metody velice důležitá. Je nutno zvážit vliv pH na retenci analytu, rozpustnost pufru v organickém modifikátoru, jeho koncentraci a vliv na detekci. Špatná volba pufru může vést k nedostatečné či nereprodukovatelné retenci. (19)

Hlavním vodítkem pro výběr správného pufru je požadované pH. U RP-HPLC se pH pohybuje nejčastěji v rozmezí 2-8. Je důležité, aby pKa pufru bylo blízko zamýšlenému pH roztoku, protože kapacita pufru je největší, když je jeho pKa co nejbližší zamýšleným hodnotám pH mobilní fáze. Hodnoty pak často využívaných pufrů a jejich využitelné rozmezí pH jsou uvedeny v tabulce. (20,21)

Tabulka 1 pufrů (23)

Pufř	pKa	Rozmezí pH
Octan amonný	4.8	3.8-5.8
Mravenčan amonný	3.8	2.8-4.8
KH ₂ PO ₄ /kyselina fosforečná	2.1	1.1-3.1
KH ₂ PO ₄ / K ₂ HPO ₄	7.2	6.2-8.2
Octan draselný/kyselina octová	4.8	3.8-5.8
H ₃ BO ₃ /Na ₂ B ₄ O ₇ · 10 H ₂ O	9.2	8.2-10.2
Hydroxid amonný/amoniak	9.2	8.2-10.2
Kyselina trifluoroctová	<2	1.5-2.5
Mravenčan draselný/ kyselina mravenčí	3.8	2.8-4.8

Při výběru pufru je třeba brát v potaz i další obecné zásady:

1. Fosfátový pufř je lépe rozpustný v mobilní fázi tvořené methanolem a vodou než ve fázi acetonitril/voda nebo THF/voda.
2. Některé pufrů tvořené solemi jsou hygroskopické, což se může negativně projevit na chromatografii (především tailing).
3. Amonné soli jsou lépe rozpustné v mobilních fázích tvořených organickým rozpouštědlem a vodou.
4. Trifluoroctová kyselina se po čase rozkládá, je těkavá a absorbuje UV záření o nízké vlnové délce.
5. U pufrůvaných mobilních fází, které neobsahují organický modifikátor (nebo pouze malé množství), často dochází k rychlému růstu mikrobů, což může znehodnotit chromatografický proces.
6. Při pH vyšším než 7 fosfátový pufř urychluje disoluci křemíku a významně snižuje životnost křemíkových kolon. Proto při pH vyšším než 7 je vhodné používat organické pufrů.
7. Pufrů by měly být po přípravě přefiltrovány pomocí 0.2 μm filtru a mobilní fáze odplyněna.

8. Kyselina fosforečná a její sodné nebo draselné soli (fosfátový pufr) jsou nejčastěji používaným pufrem u RP-HPLC. V případě analýzy organofosfátů může být fosfátový pufr nahrazen pufrem sulfátovým. (22)

3.7.4 Výběr detektoru

Detektor je velmi důležitá součást HPLC systému. Jeho výběr záleží na chemických vlastnostech analytů, potenciálních interakcích, požadovaném limitu detekce a v neposlední řadě na dostupnosti a ceně detektoru. UV/VIS detektor vyniká svojí univerzálností a poskytuje vysokou citlivost potřebnou pro identifikaci i nízkých koncentrací nečistot a kvantitativní analýzu. PDA detektor nabízí pokročilou detekci pro preparativní HPLC a LC/MS systémy. Jeho integrovaný software a optické inovace zajišťují vysokou chromatografickou a spektrální citlivost. RI detektor vyniká vysokou citlivostí, spolehlivostí a dobrou reprodukovatelností výsledků, což tento způsob detekce činí velmi výhodným pro analýzu látek s omezenou nebo nulovou absorbcí UV záření. Fluoresceční detektor zajišťuje vysokou citlivost a selektivitu detekce, dostatečnou pro kvantitativní stanovení i velmi nízkých koncentrací cílových látek. (26)

3.7.5 Výběr kolony

Kolona je ústředím HPLC systému. Její volba bude mít na výsledky analýzy největší vliv. Stacionární fáze je v koloně vázána na matici. Existuje několik typů těchto matic, většinou jsou tvořeny křemíkem, hliníkem či polymerem. Nejčastěji se lze setkat s maticemi na bázi křemíku, které vynikají snadnou výrobou a možností navázání stacionární fáze. Mezi jejich výhody patří také mechanická odolnost vůči vysokým tlakům a chemická stálost i vůči většině organických rozpouštědel i při nízkém pH. Jejich významnou nevýhodou je rozpouštění křemíku při pH vyšším než 7. V současnosti byl tento problém však již částečně odstraněn a byly vyvinuty i moderní křemíkové kolony pro použití v prostředí o vysokém pH. Na separaci analytů má vliv nejen stacionární fáze, která je na této matici navázaná, ale hraje zde roli i velikost a tvar částic matrice. Menší částice znamenají větší počet teoretických pater a zvýšenou účinnost separace, na druhou stranu také zvyšují protitlak v koloně, což může způsobit její ucpání. (25)

Při RP-HPLC je stacionární fáze nepolární a mobilní fáze polární, což způsobuje, že polární látky jsou eluovány dříve než nepolární. Pro vytvoření stacionární fáze pro RP-HPLC na křemíkové matici jsou reagovány volné silanoly matrice s chlorosilanem s navázanými hydrofobními skupinami, čímž vzniká nepolární vrstva. Vlivem sterického bránění však dochází k obsazení pouze zhruba jedné třetiny volných silanolů. Zbylé silanoly tak mohou reagovat s analyty a způsobovat tailing. Proto po derivatizaci kolony požadovanou stacionární fází jsou tyto volné silanoly dále neutralizovány chlortrimethylsilanem, aby nedocházelo k těmto interakcím a zvýšila se tak účinnost kolony. Nejčastěji používané stacionární fáze jsou C₄ (butyl), C₈(oktyl), C₁₈(oktadecyl), kyanopropyl a fenylpropyl. Obecně platí, že čím delší a hustěji koncentrované jsou alkylové řetězce stacionární fáze, tím větší je retence nepolárních analytů. (26)

Kolony s krátkými alkylovými řetězci (C_3 , C_4 a C_5) jsou využívány hlavně při ion-pairing chromatografii. Tyto kolony (konkrétně například Zorbax SB- C_3 , YMC-Pack C_4 a Luna C_5) jsou méně odolné vůči hydrolyze než kolony s delšími řetězci.

Kolony C_8 (např. Zorbax SB- C_8 , Luna C_8 a YMC-PACK-MOS) již nacházejí širší aplikovatelnost, způsobují sice menší retenci než kolony C_{18} , ale přesto nacházejí široké uplatnění ve farmaceutické analýze.

ODS kolony (C_{18}) (např. Zorbax SB- C_{18} , YMC Pack ODS a Luna C_{18}) jsou velmi často využívány pro analýzu nepolárních látek, zejména pro svou vysokou retenci.

Fenylové kolony (např. Zorbax SB-Phenyl, YMC-Pack Phenyl a Luna Phenyl-Hexyl) poskytují vysokou selektivitu a menší retenci než C_8 a C_{18} fáze. Jsou často používány pro analýzu aromatických látek.

CN kolony (např. Zorbax SB-CN, Luna-CN, and YMC-Pack CN) jsou polární a mohou být použity jak pro normální, tak i pro RP-HPLC. Často se používají pro zvýšení retence polárních analytů.

Existuje celá řada různých kolon. Výběr té vhodné je složitý proces, při němž se uplatňují zejména zkušenosti analytika a často probíhá metodou pokus-omyl. Pomocí důkladného zvážení charakteru analyzovaných látek, cíle analýzy a dalších okolností lze však okruh možných kolon zúžit a výběr tak usnadnit. (27, 28, 29)

3.7.6 Výběr mobilní fáze

Typ rozpouštědla (u RP-HPLC nejčastěji methanol, acetonitril a tetrahydrofuran) ovlivňuje rozlišení, selektivitu a účinnost separace. K výběru mezi methanolem a acetonitrem dochází zejména na základě rozpustnosti analytu a použitém pufru. Tetrahydrofuran je z těchto rozpouštědel nejméně polární, často způsobuje změny v selektivitě a je inkompatibilní s detekcí při nízkých vlnových délkách, která je pro analýzu většiny farmaceutik nezbytná.

Mobilní fáze používaná k RP-HPLC se tedy skládá z vodného pufru a z organického rozpouštědla s vodou mísitelného. Klíčem k úspěšnému vývoji analytické metody je nalezení vhodné organické a vodné fáze a jejich optimálního poměru v závislosti na hydrofilitě/hydrofobitě analyzovaných molekul. (32)

3.7.7 Výběr módu eluce

Při vývoji chromatografické metody jsou na výběr dva způsoby eluce mobilní fáze. Prvním způsobem je takzvaný isokratický mód, což znamená, že složení mobilní fáze je konstantní. Během celé analýzy jsou tedy stále stejné intrakce mezi analytem a rozpouštědlem a analytem a stacionární fází, tudíž je tento způsob předvídatelnější, ovšem za cenu nižší separační kapacity a separační síly (počet molekul které mohou být rozlišeny)

Druhým způsobem je takzvaný gradientový mód eluce. Při tomto způsobu dochází ke změnám ve složení mobilní fáze v průběhu separace. Hlavní výhodou je nárůst separační síly. Gradientová eluce se používá zejména při analýze vzorků obsahujících větší množství analytů, kdy není možné zajistit eluci všech komponent při retenčním faktoru mezi 1 až 10.

To proto, že neexistuje jedno nastavení chromatografických podmínek, při kterém by docházelo k eluci komponent v přijatelném čase za dostatečného rozlišení píků. Při rozhodování, zda použít isokratický či gradientový mód, lze nejdříve provést gradientový způsob a vypočítat poměr mezi celkovým časem analýzy a rozdílem mezi retenčním časem prvního a posledního komponentu. V případě, že poměr je menší než 0.25, postačí isokratický mód, v opačném případě je vhodné použít mód gradientový. (32)

3.7.8 Optimalizace metody

Chromatografické podmínky je třeba optimalizovat, aby bylo dosaženo požadovaných hodnot separace a citlivosti. Je důležité správně vyladit všechny parametry jako pH, složení mobilní fáze a poměr jejích komponent, gradient, rychlost toku, teplotu, množství vzorku a vstříkovaný objem.

3.8 Validace chromatografických metod

Validace analytické metody je proces, kterým se pomocí laboratorních studií stanovuje, že metoda splňuje požadavky pro její zamýšlené použití. Součástí validace je tedy hodnocení řady parametrů, které metoda musí splnit. Chromatografické metody lze validovat dle několika směrnic. Nejčastěji jde o směrnice Amerického Úřadu pro kontrolu potravin a léčiv (Food and Drug Administration, FDA), Směrnice Evropské lékové agentury (European Medicines Agency, EMA) a Směrnice Mezinárodní konference pro harmonizaci (International Conference on Harmonisation, ICH). Zatímco FDA a EMA směrnice slouží zejména k validaci bioanalytických metod, norma ICH se používá k validaci metod farmaceutické kontroly. Posledně zmiňovaná norma se týká tématu této práce a její parametry budou v práci dále využívány. Proto bude tato kapitola zaměřena právě na validaci dle ICH. (35)

3.8.1 Validační parametry

V následujících odstavcích jsou uvedeny parametry, které jsou nejčastěji měřeny při validaci analytické metody (dle ICH). Směrnice se zabývá čtyřmi hlavními typy testů, a to kvalitativní analýzou analytu ve vzorku, kvantitativním stanovením obsahu nečistot, limitními testy pro hodnocení nečistot a kvantitativním stanovením obsahu účinné látky či jiné složky v léčivém přípravku, přičemž některé parametry se mohou týkat pouze části zmíněných testů. (36)

3.8.1.1 Správnost

Správnost udává jak je naměřená hodnota blízká skutečné či akceptované hodnotě. Je určena tak, že je daná metoda aplikována ke stanovení vzorků se známým množstvím analytu. Samozřejmostí je použití standardu a prázdného vzorku z důvodu vyloučení interferencí. Správnost je poté vypočítána z výsledků analýzy jako procento, které bylo z celkového obsahu získáno. Hodnocení správnosti se vyžaduje na třech koncentračních úrovních, u každé z nich s minimálním počtem třech alikvotních vzorků. (31,36)

3.8.1.2 Přesnost

Přesnost analytické metody udává, do jaké míry jsou výsledky měření odlišné při použití metody k analýze několika vzorků odebraných z jednoho homogenního vzorku. Přesnost tedy

udává reprodukovatelnost dané analytické metody a skládá se z dalších dvou sledovaných parametrů, opakovatelnosti a mezilehlé přesnosti.

Opakovatelnost udává přesnost v rámci laboratoře v krátkém časovém intervalu u jednoho analytika a přístroje. Hodnotí se analýzou minimálně 9 vzorků - např. 3 koncentrační úrovně, každá po 3 vzorcích, nebo 6 vzorků na 100% koncentrační hladině. Mezilehlá přesnost je přesnost v rámci laboratoře, avšak v rozdílných dnech, u rozdílných analytiků a přístrojů. (31,36)

3.8.1.3 Specifita

Specifita znamená schopnost metody jednoznačně rozlišit daný analyt od dalších komponent ve vzorku, jako například nečistot a rozkladných produktů. (31,36)

3.8.1.4 Detekční limit

Detekční limit je nejnižší množství analytu ve vzorku, které je ještě pomocí dané metody detekovatelné. Nejčastěji se udává jako koncentrace analytu ve vzorku, při které je poměr signálu k šumu 3:1. (31,36)

3.8.1.5 Kvantifikační limit

Kvantifikační limit určité analytické metody udává minimální množství analytu ve vzorku, které může být kvantitativně stanoveno s dostatečnou správností a přesností. Nejčastěji je stanoven jako koncentrace analytu ve vzorku při poměru signálu k šumu 10:1 a bývá většinou potvrzen pomocí standardu, který dává tento poměr signálu k šumu a má akceptovatelnou relativní směrodatnou odchylku. (31,36)

3.8.1.6 Rozsah

Rozsah je definován jako interval mezi nejvyšší a nejnižší stanovenou koncentrací analytu ve vzorku. U tohoto parametru velmi závisí na zamýšleném využití metody. Např. u stanovení obsahu účinné látky v substanci nebo v léčivém přípravku postačuje rozsah v rozmezí 80-120% testované koncentrace, v případě hodnocení disoluce může být nezbytné metodu validovat v rozsahu 0-110% deklarované koncentrace. (31,36)

3.8.1.7 Linearita

Linearita odezvy detektoru je schopnost analytické procedury získat odpověď detektoru, která je přímo úměrná koncentraci analytu ve vzorku. Linearita se tedy charakterizuje jako rozsah koncentrací analytu, při kterém je odezva detektoru lineární. Sestavuje se kalibrační křivka za použití minimálně pěti standardů (dle směrnice ICH) (31,36)

3.8.1.8 Robustnost

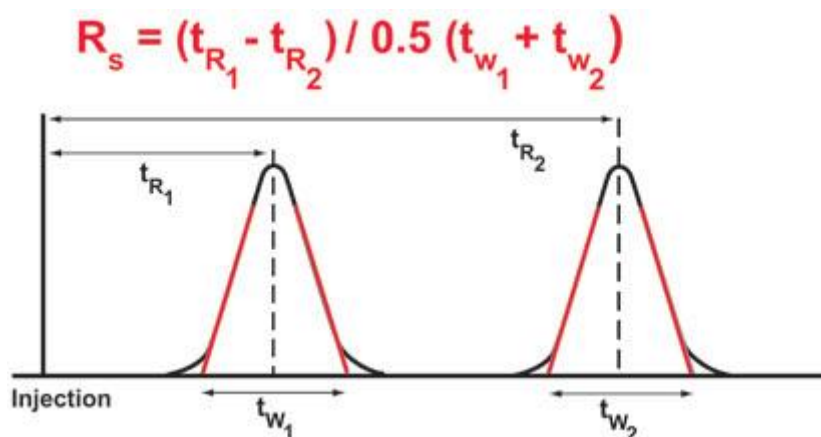
Robustnost je definována jako míra schopnosti metody zůstat neovlivněna malými, ale úmyslnými změnami parametrů metody (např. pH, složení mobilní fáze, teplota, nastavení přístroje) a slouží také jako indikátor spolehlivosti dané metody. Stanovení robustnosti je systematický proces, při kterém dochází ke změnám parametrů a měření jejich vlivu na způsobilost systému a vlastní analýzu. (31,36)

3.8.1.9 Test způsobilosti systému

Test způsobilosti je hodnocení komponent analytického systému s cílem prokázat, že jeho výkon splňuje standardy požadované pro danou metodu. Tento test se skládá z následujících parametrů.

3.8.1.9.1 Rozlišení

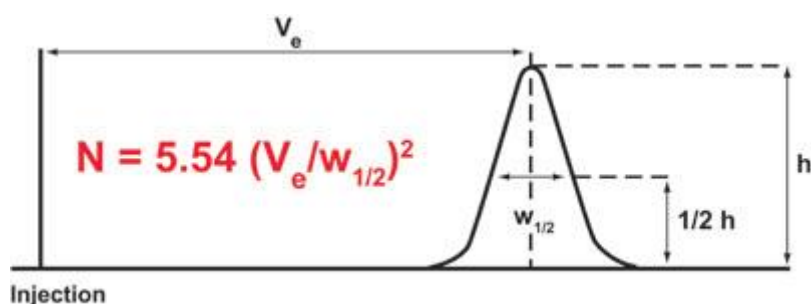
Rozlišení (R_s) je rozdíl mezi retenčními časy dvou sousedních píků (t_{R1} a t_{R2}) vydělený jejich průměrnou šířkou (t_{w1} a t_{w2}). Tento parametr slouží ke stanovení míry separace dvou píků. Pro dosažení separace dvou píků na základní linii je obvykle dostačující hodnota rozlišení 1,5. (32,36)



Rovnice 8 rozlišení (34)

3.8.1.9.2 Účinnost kolony

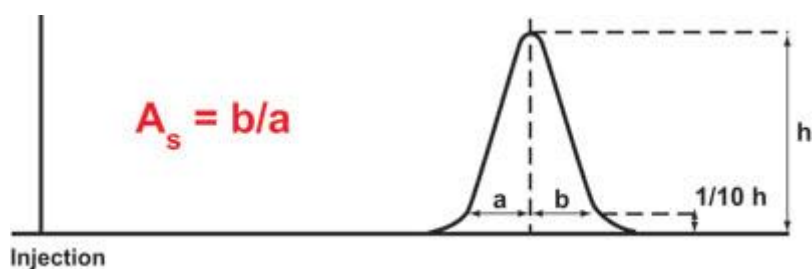
Účinnost kolony je definována jako stupeň rozšíření zóny analytu v důsledku jejího rozmytí při pohybu kolonou. Vyjadřuje se pomocí veličiny počet teoretických pater (N), přičemž platí, že čím menší rozmytí, tím větší počet teoretických pater a tudíž větší účinnost kolony. Počet teoretických pater lze vypočítat pomocí následujícího vzorce: (32,36)



Rovnice 9 účinnost kolony (34)

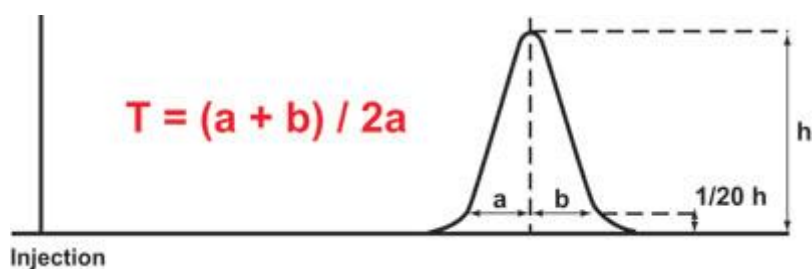
3.8.1.9.3 Faktor symetrie

Dalším ukazatelem výkonu systému je faktor symetrie. Ideálně by měl být pík zcela symetrický (faktor symetrie by byl roven jedné), v praxi však dochází k jeho částečné deformaci, která je popisována právě touto veličinou. Faktor symetrie lze vypočítat dle následujícího vzorce. (32,36)



Rovnice 10 faktor symetrie (34)

V praxi dochází k takzvanému chvostování píku, kdy je druhá polovina píku širší. Tento jev je popisován pomocí takzvaného tailingového faktoru. (37)



Rovnice 11 tailingový faktor (35)

3.8.1.10 Stabilitní studie

Principem těchto testů je záměrné vyvolání rozkladu analytu působením stresových podmínek a následná analýza vzniklých produktů degradace. Tyto studie slouží k hodnocení schopnosti metody ke stanovení aktivního metabolitu a jeho rozkladných produktů bez jejich vzájemných interakcí. Během validace metody je vzorek vystaven kyselému a bazickému prostředí, teplu, světlu a oxidačnímu činidlu, aby bylo dosaženo přibližně 10 – 30% rozkladu aktivní substance. Tyto studie také poskytují informace o degradačních cestách a možných produktech, vznikajících při skladování látky. Lze takto získat cenné informace o podmínkách skladování vzorku, zda stačí standardní podmínky nebo je-li vzorek třeba chránit před teplem či světlem. (33,35)

3.9 Úprava vzorku pro analýzu biologického materiálu

HPLC se používá velmi často k analýzám různých látek v biologickém materiálu. Uplatňuje se například ve farmakokinetických studiích, bioekvivalenčních studiích, při terapeutickém monitorování lékových hladin nebo v toxikologických analýzách. Tyto vzorky biologického materiálu jsou však velmi komplexního charakteru (obsahují proteiny, lipidy, cukry, soli apod.), navíc obvykle ve výrazném nadbytku oproti analyzovaným látkám. Ve většině případů nelze nastříkovat na kolonu tyto vzorky bez předchozích úprav, protože biologická matrice způsobuje nežádoucí ovlivnění stanovení analytu, ať už například koelucí balastů s hodnoceným analytem, narušením ionizace při použití MS detektoru, také může výrazně snížit životnost kolony, popřípadě ji zcela znehodnotit. V následujících odstavcích budou podrobněji přiblíženy hlavní metody úpravy biologického vzorku. (18)

3.9.1 Deproteinace

Principem této metody je vysrážení proteinů z biologického materiálu přidáním precipitačního činidla. Takto vysrážené proteiny lze poté od vzorku oddělit pomocí centrifugace. Jako precipitační činidla se nejčastěji používají organická rozpouštědla (acetonitril, methanol, aceton), silné kyseliny (HClO_4 – 6%, CCl_3COOH – 10%) nebo nasycené roztoky solí (ZnSO_4 v NaOH , CuSO_4 v Na_2WO_4). Vysrážené proteiny se po centrifugaci usazují na dně a horní vrstva tedy může být analyzována. Výhodou této metody je její rychlost a jednoduchost, nevýhodou je odstranění pouze proteinů, čili ostatní balastní látky v extraktu zůstávají. (3)

3.9.2 Extrakce kapalina – kapalina

Extrakce kapalina – kapalina neboli Liquid-liquid extraction – LLE je metoda, jejímž principem je extrakce léčiva z biologického vzorku do organického, s vodou nemísitelného rozpouštědla. Pro tuto extrakci je důležité správné nastavení hodnoty pH. K vyššímu výtěžku extrakce je třeba co nejvíce potlačit ionizaci analytu, aby se v co nejvyšší míře dostal do organické vrstvy. Pro vzorky kyselé povahy je tedy vhodné pH snížit (o dvě jednotky pod hodnotu pK_a) a pro analyty bazického charakteru je nutné pH upravit opačným směrem, tedy o dvě jednotky nad pK_a . Vzorek se tedy napipetuje do zkumavky, po upravení pH se přidá organické rozpouštědlo a obsah zkumavky se protřepe. Poté se obě vrstvy oddělí pomocí centrifugace, organická vrstva (obsahuje analyt) se odebere a zkoncentruje například proudem dusíku. Tento zbytek se následně naředí mobilní fází a může být analyzován. (3,18)

3.9.3 Extrakce na pevné fázi

Extrakce na pevné fázi neboli Solid-phase extraction – SPE je dnes velmi rozšířená metoda úpravy biologických vzorků. Základním principem této metody je použití speciální kolony, do které se aplikuje daný vzorek. Podobně jako při HPLC dochází k navázání analytu na sorbent kolony a balastní látky jsou vymyty ven z této kolony. SPE probíhá dle následujícího zjednodušeného postupu: Nejdříve se kolonka aktivuje promytím organickým rozpouštědlem, které je následně opět vymyto vodou nebo roztokem pufru. Poté se aplikuje vzorek biologického materiálu, při čemž se stanovovaná látka zachytí na kolonce a část balastů kolonkou volně proteče. Zbytek balastů se z kolony dále vymyje pomocí vody nebo roztoku pufru. V posledním kroku se do čisté zkumavky eluuje analyt pomocí vymytí kolony organickým rozpouštědlem (nejčastěji se používá methanol nebo acetonitril). Takto upravený vzorek je připraven k analýze, popř. se předtím ještě zkoncentruje proudem dusíku. (17)

3.9.4 Mikroextrakce

Trendem poslední doby je miniaturizace popsaných technik, za účelem zkrácení doby úpravy vzorku, zavedení automatizace, zlepšení reprodukovatelnosti, zvýšení selektivity, snížení množství použitých rozpouštědel a vzorku a zvýšení extrakční účinnosti. Hojně využívána je například metoda mikroextrakce tuhým sorbentem, která je analogická k SPE, s tím rozdílem, že sorbent je umístěn přímo v injekční stříkačce a celá extrakce probíhá za použití této stříkačky. Na podobném principu je založena také například Disposable pipette extraction (DPX), kdy je sorbent obsažen v pipetovací špičce. Existuje celá řada dalších technik miniaturizace, které zjednodušují a zdokonalují extrakční proces. (18)

3.10 Moderní trendy v chromatografii

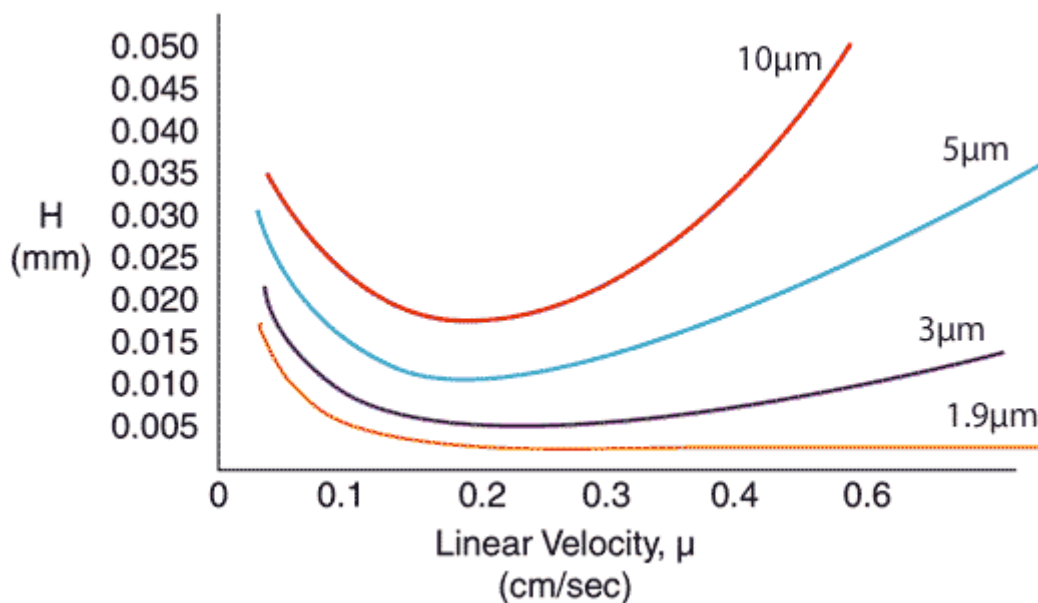
Chromatografické metody jsou dnes základem pro separaci látek v různých odvětvích vědeckého výzkumu i průmyslu a jsou hojně využívány ve všech laboratořích a výzkumných ústavech světa. Od té doby, co byl tento princip objeven a poprvé detailněji zkoumán a popsán ruským botanikem Mikhailem Tswettem v roce 1903, urazila chromatografie dlouhou cestu. Vývoj jde neustále kupředu a stále se objevují inovace, které přinášejí zvýšení účinnosti a rychlosti chromatografického procesu. V následujících odstavcích jsou podrobněji rozepsány vybrané směry v kapalinové chromatografii, kterými se v současné době vývoj ubírá.

3.10.1 *Rapid Resolution Liquid Chromatography (RRLC)*

RRLC systém byl vyvinut za účelem zrychlení analýzy při zachování co nejnižšího tlaku. V současné době se jedná o velmi využívanou metodu farmaceutického průmyslu, využívanou především v rutinních kontrolách kvality rostlinných léčivých přípravků. Zkrácení času analýzy je zde dosaženo díky použití kolon o kratších délkách. Tyto kratší kolony však vedou ke ztrátě teoretických pater a tudíž k nižšímu rozlišení, což může být na jednu stranu i výhodné v analýze komplexních vzorků. Aby se zabránilo přílišným ztrátám rozlišení, začaly se zde používat kolony s menšími velikostmi částic. Bylo zjištěno, že tyto kolony mají vyšší účinnost. Použitím kratších kolon s menší velikostí částic lze tedy výrazně zkrátit čas analýz bez ztráty rozlišení. (38,39,40)

3.10.2 *Ultra Performance Liquid Chromatography (UPLC)*

UPLC nad dosavadními systémy vyniká ve třech oblastech, a to v rozlišení, rychlosti a citlivosti analýzy. Technologický vývoj umožňuje konstrukci kolon s menšími a menšími velikostmi částic. Jeden ze základních principů chromatografie říká, že čím menší je velikost částic, tím roste rozlišení a účinnost kolony. U částic s velikostí pod 2.5 μm dochází k výraznému nárůstu účinnosti a zároveň tento nárůst není znehodnocován zvyšováním rychlosti toku mobilní fáze. Tento vztah je popsán tzv. Deemterovou křivkou, jejíž tvar je odlišný při použití částic o různém průměru, jak je patrné z grafu. Menší částice však kladou větší odpor průtoku mobilní fáze, tudíž dochází k nežádoucímu jevu, kterým je zvyšování zpětného tlaku na koloně.



Obrázek 2 Deemterova křivka (43)

Mezi hlavní výhody UPLC patří tedy rychlost analýzy, zvýšení separační účinnosti, nižší spotřeba vzorku a rozpouštědel, vyšší citlivost odezvy a snadný přenos metod vyvinutých pro klasické HPLC. Nevýhodou je zmíněný nárůst zpětného tlaku, což vyžaduje vyšší hardwarové požadavky. U klasického HPLC je instrumentace schopná analýzy za tlaku do 400 bar. Pro UPLC je vyžadován vyšší tlakový limit. V současnosti jsou dostupné systémy, které mohou pracovat při tlaku 1000-1300 bar. Tento tlakový limit se týká nejen pump, ale i ostatních součástí systému jako spojů, těsnění a samozřejmě i samotné kolony. Také automatický dávkovač vzorku musí být vzhledem k rychlejší analýze schopen rychlejšího nástřiku. Důraz je kladen rovněž na minimalizaci prostorů mimo kolonu, jsou využívány užší kapiláry a celkově je spojení částí systému navrženo tak, aby bylo dosaženo co nejmenšího objemu. Zbytečné zvětšení systému by totiž vedlo k negativnímu ovlivnění šířky píku a snížení separační účinnosti. Zkrácení doby analýzy a zvýšení její účinnosti rovněž vyžadují využití detektorů, které jsou schopny snímat data s vysokou frekvencí. UPLC v současné době nachází široké využití ve farmaceutickém výzkumu, od objevování nových látek, přes farmakokinetické a bioekvivalenční studie až po analýzu lékových forem a přírodních léčivých přípravků. (41,42)

3.10.3 Ultra Fast Liquid Chromatography (UFLC)

K další inovaci došlo v UFLC. Tento systém přináší až desetinásobné zrychlení analýzy oproti standardním HPLC systémům. Výhodou oproti UPLC je, že tento systém nezávisí na extrémním zvýšení tlaku. Toto zrychlení a také zvýšení separační účinnosti je dosaženo optimálním vyladěním celého systému, použitím vysokorychlostního automatického dávkovače, který minimalizuje nevyužitý čas mezi jednotlivými cykly, a v neposlední řadě také použitím moderních XR kolon, jejichž průměr částic se pohybuje mezi 1.7 – 2.2 μm . (44,46)

3.10.4 Nano Liquid Chromatography (NLC)

Tento chromatografický systém se vyznačuje vstřikováním velmi malých objemů vzorků (v řádu nl). Rychlost toku mobilní fáze se také pohybuje v řádu nl za minutu. Systém je schopen detekovat i vzorky o koncentraci v řádu ng/ml. Mezi hlavní výhody patří snížená spotřeba mobilní fáze a možnost analýzy i velmi malého objemu vzorku. Součástí tohoto systému je propojení s MS detektorem, což je další moderní trend, vyžívaný v HPLC. Tato kombinace se využívá ve strukturní analýze (při identifikaci neznámých látek), umožňuje určit izotopové složení i provádět stopové analýzy. (45)

3.10.5 Srovnání moderních systémů kapalinové chromatografie

Nároky na rychlost a separační účinnost analýzy se neustále zvyšují. Prostředkem inovací je zejména zkracování délky kolony a zmenšování velikosti částic stacionární fáze, což charakterizuje systémy RRLC a UPLC. Tyto zásahy však s sebou přinášejí také zvýšený tlak systému, což výrazně zvyšuje hardwarové požadavky na chromatografický systém. Trendem poslední doby jsou tedy zejména inovace, které na zvýšeném tlaku nezávisí, jako například UFLC a NLC. V následující tabulce jsou shrnuty přibližné charakteristiky rozebíraných systémů ve srovnání se základním HPLC systémem.

Tabulka 2 srovnání technologií (47)

Charakteristika	HPLC	RRLC	UPLC	UFLC	NLC
Vel. částic	3 -10 μm	1.8 μm	>2 μm	1.7 – 2.2 μm	1.7 – 3 μm
Příklady kolon	XTerraC18, Alltima C18	ZORBAX Eclipse XDB–C18 RRHT	Acquity UPLCbeh C18,C8,rp	Shim-pack XR-ODS column	Capillary HPLC, Micro HPLC
Rozměr kolony (délka x průměr)	150 x 3.2 mm	50 – 100 x 2.1-4.6mm	150 x 2.1 mm	75mm x 3.0 mm	125 mm x 0.05mm - 4.6mm
Teplota kolony	30°C	Do 100°C	65°C	40°C	25-35°C
Vstřikovaný objem	5 μL	1.5 μL	2 μL	0.1-100 μL	10nL- 125 μL
Rychlost toku	0.01-5mL/min	0.2-20 $\mu\text{L}/\text{min}$	0.2-20 $\mu\text{L}/\text{min}$	3.7 nL/min	20-200 nL/min

3.11 Vlastnosti zkoumaných látek

V následujících odstavcích jsou podrobněji přiblíženy vlastnosti látek, kterými se zabývá tato diplomová práce, fenofibrátu a ketorolaku.

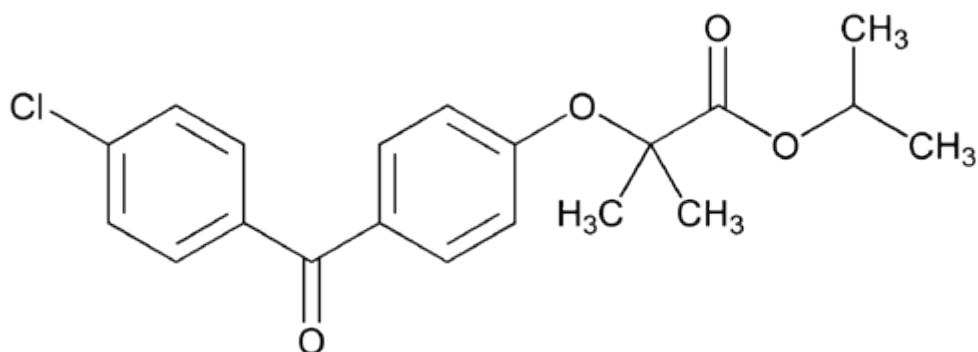
3.11.1 Fenofibrát

3.11.1.1 Historie

Fenofibrát byl poprvé syntetizován v roce 1974 jako derivát klofibrátu a brzy poté byl zaveden na francouzský trh. Původně byl pojmenován procetofen, později mu byl udělen mezinárodní nechráněný název fenofibrát kvůli dodržení směrnice WHO. Tato léčivá látka byla vyvinuta francouzskou skupinou Groupe Fournier SA. (48)

3.11.1.2 Fyzikálně chemické vlastnosti

Strukturní vzorec:



Obrázek 3 vzorec fenofibrát (49)

Sumární vzorec: C₂₀H₂₁ClO₄

Mr: 360,84

Vlastnosti: Bílý nebo téměř bílý krystalický prášek. Je prakticky nerozpustný ve vodě, velmi snadno rozpustný v dichlormethanu, těžce rozpustný v lihu 96% (11)

3.11.1.3 Farmakologické vlastnosti

3.11.1.3.1 Klinické využití

Fenofibrát je ze skupiny fibrátů v medicínské praxi nejpoužívanější léčivou látkou. Je indikován ke snížení hladiny cholesterolu jako prevence kardiovaskulárních příhod, zejména u pacientů s aterogenní dyslipidemií, kterou charakterizuje zvýšená koncentrace triglyceridů spolu s nízkou hladinou HDL cholesterolu a převahou LDL cholesterolu. Fibráty snižují triglyceridy o 30 až 50 procent a přispívají ke zvýšení ochranného HDL o 5 až 15 procent. Bylo prokázáno, že fenofibrát postprandiálně snižuje hladinu triglyceridů a tvorbu vysoce aterogenního apolipoproteinu B. Tyto lipidové částice obsahují zbytkový (remnantní) cholesterol a ten je označován za kauzální rizikový faktor ICHS. Snížení tohoto remnantního cholesterolu je pravděpodobně nejdůležitější účinek fenofibrátu.

Velmi často se výše popsaná porucha lipidového spektra vyskytuje u diabetiků 2. typu, má spojitost s nedostatečnou odpovědí organismu na působení inzulínu (inzulinovou rezistencí). V této souvislosti se fenofibrátu připisuje i účinek na snížení rizika vzniku mikrovaskulárních komplikací – diabetických retinopatií. Bylo prokázáno snížení počtu amputací dolních končetin a snížení progresu nefropatie v u této skupin pacientů v souvislosti s užíváním fenofibrátu.

Často se fenofibrát používá v kombinaci se statiny, protože potencuje jejich účinek bez zvýšení rizika závažných myopatií. (50)

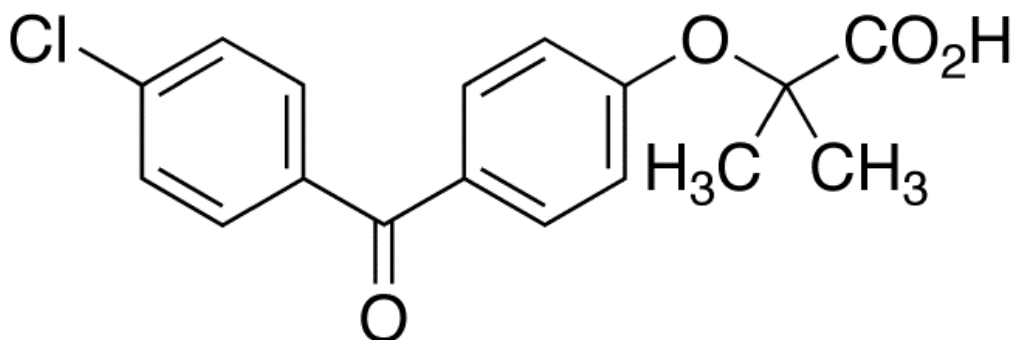
3.11.1.3.2 Mechanismus účinku

Aktivní forma fenofibrátu je fenofibrová kyselina (viz vzorec). Tento aktivní metabolit aktivuje receptor PPAR α (Peroxisome proliferator-activated receptor alpha). Tento receptor

aktivuje lipoproteinovou lipázu a snižuje hladinu apolipoproteinu CIII, což způsobí zvýšení lipolýzy a eliminaci triglyceridů z krevní plasmy. PPAR α rovněž zvyšuje hladinu apolipoproteinů AI a AII, čímž je redukována hladina VLDL a LDL (obsahují konkurenční apolipoproteiny B) a naopak zvyšuje hladinu HDL, které obsahují právě apolipoproteiny AI a AII. (51)

3.11.1.3.3 Farmakokinetika fenofibrátu

Fenofibrát je prolečivo aktivní formy fenofibrové kyseliny. Je na ní zcela převeden v těle pomocí esterové hydrolýzy esterázami.



Obrázek 4 vzorec kyselina fenofibrová (52)

Absolutní hodnota biodostupnosti fenofibrátu není známa, protože látka není rozpustná v žádném rozpouštědle vhodném pro intravenózní aplikaci. Fenofibrát je však dobře absorbován gastrointestinálním traktem po perorálním podání. (51)

3.11.1.3.4 Nežádoucí účinky

Mezi nejčastěji popisované nežádoucí účinky patří bolesti hlavy a zad, nasopharyngitida, nevolnost, průjem, zvýšená náchylnost k onemocněním dýchacích cest a bolesti kloubů. (53)

3.11.1.3.5 Kontraindikace

Mezi hlavní kontraindikace fenofibrátu patří selhání ledvin, závažná onemocnění jater (např. primární biliární cirhóza), onemocnění žlučníku, těhotenství a kojení a hypersenzitivita na fenofibrát. (54)

3.11.1.3.6 Lékové interakce

Fenofibrát by neměl být užíván společně s léčivými látkami, které váží žlučové kyseliny (např. cholestyramin), které se mohou navazovat na fenofibrát a snižovat jeho absorpci. Mezi podáním těchto léků by měl být dodržen minimální interval hodinu před a 4-6 hodin po. Další interakci představují imunopresiva (např. cyklosporin nebo takrolimus), které v kombinaci s fenofibrátem zvyšují riziko poruchy ledvin. Další poměrně závažnou interakcí jsou antikoagulanty kumarinového typu (warfarin), kdy se zvyšuje riziko nadměrného krvácení a proto je nezbytné upravit dávku tohoto antagonisty vitamínu K. (55)

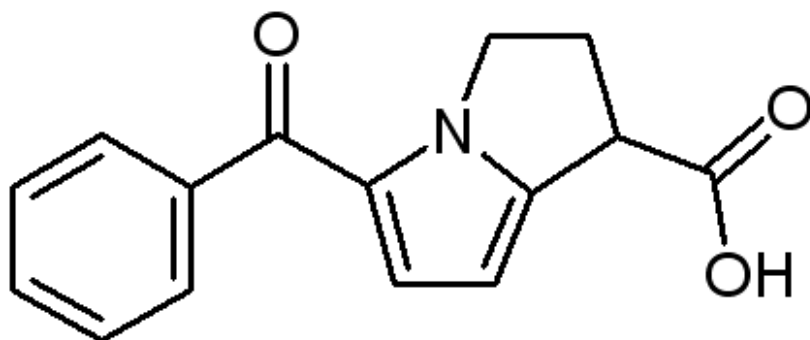
3.11.2 Ketorolak

3.11.2.1 Historie

Ketorolak byl vyvinut v roce 1989 skupinou Syntex Corp. a byl schválen FDA 30. Října 1989 pod obchodním názvem Toradol. Později byl schválen pro oční podání (1992) a v roce 2010 byl představen i nosní sprej obsahující tuto látku. V České republice není zatím registrován žádný léčivý přípravek obsahující tuto léčivou látku. (56)

3.11.2.2 Fyzikálně chemické vlastnosti

Strukturní vzorec:



Obrázek 5 vzorec ketorolac (57)

Sumární vzorec: C₁₅H₁₃NO₃

Mr: 255.27

Chemické vlastnosti: Ketorolak je isosterem ketoprofenu, přesněji se jedná o dihydropyrrolizinový derivát karboxylové kyseliny strukturně nejvíce příbuzný indometacinu. Molekula obsahuje jedno centrum chirality, vyskytuje se tedy ve dvou stereoizomerních formách s rozdílnou terapeutickou účinností. (56)

3.11.2.3 Farmakologické vlastnosti

3.11.2.3.1 Klinické využití

Ketorolak patří mezi nesteroidní antiflogistika (NSAID) a je používán při léčbě střední až silné bolesti. Často se vyskytuje v očních lékových formách, popř. i v kombinaci s antibiotiky, při terapii očních zánětů a bolesti v očích, především u pacientů s glaukomem. V lékových formách je použita jeho sůl s tromethaminem. (58)

3.11.2.3.2 Mechanismus účinku

Ketorolak je neselektivní inhibitor cyklooxygenázy, čímž způsobuje inhibici syntézy prostaglandinů a vyvolá protizánětlivý, antipiretický a analgetický účinek. (58)

3.11.2.3.3 *Farmakokinetika fenofibrátu*

Ketorolac je podáván pacientům jako jeho racemická směs, ve které se vyskytuje ve dvou stereoizomerních formách, přičemž bylo zjištěno, že S-enantiomer je mnohem více účinný než jeho R-forma. Má dobrou biodostupnost po perorálním podání, lze ho užívat i intramuskulárně, či ve formě očních nebo nosních kapek. (58)

3.11.2.3.4 *Nežádoucí účinky*

Nejčastějším nežádoucím účinkem ketorolaku je stejně jako u jiných nesteroidních antiflogistik jeho gastrotoxicita. Patří také mezi středně hepatotoxická NSAID. (58)

3.11.2.3.5 *Kontraindikace*

Ketorolac je kontraindikován u pacientů s aktivním peptickým vředem a krvácením z GIT a u pacientů s poruchami ledvin. Dále je pro zvýšení rizika krvácení kontraindikován u pacientů s poruchami hemostázy. Je kontraindikován také pro těhotné a kojící matky. (58)

3.11.2.3.6 *Lékové interakce*

Mezi nejzávažnější interakce patří kombinace s jinými NSAID, zejména aspirinem a koxiby. Dále je také nebezpečné současné užívání s antikoagulancii, například warfarinem. (59)

4 Rešeršní část

4.1 Přehled prací zabývajících se HPLC analýzou fenofibrátu

Následující odstavce jsou věnovány přehledu prací, které se zabývají HPLC analýzou fenofibrátu. Hlavní pozornost byla zaměřena na chromatografické podmínky použité v prováděné analýze, zejména tedy použité koloně, mobilní fázi a způsobu detekce. Jednotlivé práce byly chronologicky seřazeny od nejstarší. Samostatná kapitola byla věnována výzkumům, které se zabývaly stanovením fenofibrátu a rosuvastatinu v kombinovaných lékových formách, protože na toto téma se sešlo nejvíce prací. To umožnilo lépe porovnat použité metody z hlediska přesnosti, správnosti, citlivosti a rychlosti.

4.1.1 1996

Masnatta Lucas Daniel, Cuniberti Luis Alberto, Rey Ricardo Horacio a Werba José Pablo se ve svém výzkumu zabývali stanovením bezafibrátu, ciprofibrátu a fenofibrové kyseliny v lidské plazmě za použití HPLC. Analyty byly extrahovány do diethyletheru po okyselení kyselinou chlorovodíkovou. Byla použita C18 kolona, mobilní fáze byla připravena smísením acetonitrilu a 0,02 molární kyseliny fosforečné v objemovém poměru 55:45. Metoda byla shledána citlivou a přesnou, což z ní učinilo užitečný nástroj monitorování plazmatických hladin fibrátů jak v klinické praxi, tak pro výzkumné účely. (60)

4.1.2 1998

Lacroix, Pauline M, Dawson, Brian A., Sears, Roger W., Black, D.Bruce, Cyr, Terry D. a Ethier, Jean-Claude se ve svém výzkumu zabývali stanovením totožnosti a zkouškami na čistotu fenofibrátu jako hrubého produktu pomocí HPLC. Jako stacionární fáze byla použita Waters Symmetry ODS kolona (100×4.6 mm, velikost částic 3.5 μm). Mobilní fáze byla složena z acetonitrilu vody a kyseliny trifluoroctové v objemovém poměru 700:300:1. Rychlost toku byla nastavena na 1 ml za minutu a vlnová délka detekce UV detektoru byla nastavena na 280 nm. Tato metoda pomohla separovat jedenáct známých a šest neznámých nečistot od analytu. (61)

4.1.3 2003

Ionel Lovin, Florin Albu, Florentin Tache, Victor David a Andrei Medvedovici se ve svém výzkumu zabývali vlivem rozpouštědla a soli na přípravu vzorku ke stanovení fenofibrové kyseliny v lidské plazmě pomocí HPLC-DAD. Při deproteinaci byl ke směsi přidán chlorid sodný a jako rozpouštědlo byl použit methanol okyselený kyselinou fosforečnou. Cílem tohoto experimentu bylo dosažení větší návratnosti a selektivity oproti stávajícím metodám jako liquid-liquid extrakce a extrakce na pevné fázi. Vzorek byl analyzován pomocí systému Agilent 1100. Byla použita předkolona cartridge RP-18e, 10×4.6 mm a kolona Performance RP-18e (Merck), 100×4.6 mm. Jako mobilní fáze byla zvolena směs acetonitril a voda v gradientovém módu eluce s rychlostí toku 4 ml za minutu. Jako interní standard byl použit 4-chlorophenyl-4'-hydroxyphenylmethanon. Detekce proběhla pomocí DAD detektoru. Metoda byla shledána vhodnou pro stanovení fenofibrové kyseliny v lidské plazmě. (62)

4.1.4 2005

Alaa El-Gindy, Samy Emara, Mostafa K. Mesbah a Ghada M. Hadad ve svém výzkumu stanovovali fenofibrát a vinpocetin a jejich produkty hydrolýzy pomocí spektrofotometrie a

kapalinové chromatografie. Byla vyvinuta HPLC metoda s využitím ODS kolony. Jako mobilní fáze byla použita směs acetonitril - voda v objemovém poměru 80:20 okyselená kyselinou fosforečnou na pH 4. Detekce byla provedena pomocí UV detektoru při vlnové délce 287 nm. Navržená metoda byla shledána jako velmi specifická, jednoduchá, snadno opakovatelná, přesná a bez interakcí s částicemi použitých lékových forem, tudíž vhodná pro daný účel. (63)

4.1.5 2008

N. Jain, R. Raghuwanshi a Deepti Jain se ve svém výzkumu věnovali vývoji a validaci RP-HPLC metody pro současné stanovení atorvastatinu a fenofibrátu v kombinovaných lékových formách. Jako kolonu použili typ Luna C18 od firmy Phenomenex (250×4.6 mm i.d., velikost částic 5 μm) a jako mobilní fáze byla zvolena směs methanolu a octanového pufru (pH 3.7) v objemovém poměru 82:18. Rychlost toku byla nastavena na 1.5 ml za minutu a detekce pomocí UV detektoru byla provedena při vlnové délce 248 nm při teplotě 25°C. Naměřené retenční časy atorvastatinu a fenofibrátu byly 3.02±0.1 a 9.05±0.2 minut v uvedeném pořadí. Metoda byla shledána rychlou, přesnou a selektivní pro daný účel. (64)

Pasut Ratanabanangkoon, Hector Guzmán, Orn Almarsson, Dina Berkovitz, Stephanie Tokarczyk, Arthur B. Straughn a Hongming Chen se podíleli na vývoji nové kombinované lékové formy obsahující fenofibrát a omega-3-mastné kyseliny. Součástí tohoto výzkumu byly také testy stability pomocí HPLC. Jako stacionární fáze byla použita kolona Zorbax od firmy Agilent Technologies (250mm x 4.6mm, vel. částic 5 μm) jejíž teplota byla nastavena na 40°C. Byl použit gradientový mód eluce mobilní fáze ze dvou zásobníků, přičemž zásobník A obsahoval 0,05% roztok kyseliny fosforečné ve vodě a zásobník B 0,05% roztok kyseliny fosforečné v acetonitrilu. Počáteční poměr A:B byl 40:60 a finální 5:95. Retenční čas fenofibrátu byl 11.7 minut a kvantifikace fenofibrátu byla provedena pomocí UV detektoru při 288 nm. (65)

Markus Vogt, Klaus Kunath a Jennifer B. Dressman v roce 2007 zkoumali různé technologické způsoby zvyšování rozpustnosti fenofibrátu. Součástí jejich práce byla také HPLC analýza připravených produktů. Byla použita kolona 60 RP select B 125-3 (velikost částic 5μm) a mobilní fáze acetonitril:voda v objemovém poměru 40:60 o rychlosti toku 1.35 ml za minutu. K detekci byl použit detektor Merck Hitachi UV-Vis Detector L-4250 při vlnové délce 288 nm. Retenční čas fenofibrátu byl změřen přibližně na 3 minuty. (66)

Pawar H.I., Kothapalli Lata, Thomas Asha, Nanda R.K a Mare Shivaji se v roce 2008 zabývali vývojem RP-HPLC metody současného stanovení fenofibrátu a ezetimibu v jejich syntetických směsích. Jako kolona se nejvíce osvědčila C18 kolona (Kromasil, 4.6mm x 25 cm, velikost částic 5μm) a jako mobilní fáze byla zvolena kombinace acetonitrilu a 0.05 octanového pufru v objemovém poměru 85:15 za rychlosti toku 1.3 ml za minutu. Detekce byla provedena pomocí UV detektoru při vlnové délce 253.0 nm. Naměřený retenční čas fenofibrátu byl 6.03 ± 0.023 min. Metoda byla validována, kdy všechny parametry splňovaly přípustné limity. Rozsah linearit fenofibrátu byl 16-80 μg/ml a jeho výtěžnost 101%. (67)

4.1.6 2009

M.T. Zzaman, S.A. Khan, A. Arora a O. Ahmad se zabývali vývojem a validací HPLC metody stanovení fenofibrátu v lidské plazmě. K odebraným vzorkům plasmy byl přidán diazepam jako interní standard. Analyty byly po okyselení kyselinou chlorovodíkovou extrahovány do ethylacetátu. Organická vrstva byla po oddělení vysušena dusíkem a na závěr byly vzorky rekonstituovány naředěním mobilní fáze. K analýze byla použita kolona Lithosphere 60 RP-Select B (250x4mm, velikost částic 5 µm) s teplotou nastavenou na 35°C. Mobilní fáze se skládala z fosfátového pufru (pH 6.0) a acetonitrilu v objemovém poměru 70:30. Rychlost toku mobilní fáze se pohybovala v rozmezí 0.7 – 1.5 ml za minutu. K detekci byl použit UV detektor při vlnové délce 287 nm. Naměřené retenční časy se byly 5.5 – 6.5 minut pro fenofibrát a 4.5 - 5.5 minut pro IS. Metoda byla validována, přičemž všechny parametry byly v limitech tolerance. (68)

Yaping Chen ,Yi Lu , Jianming Chen, Jie Lai, Jing Sun, Fuqiang Hu a Wei Wu se zabývali zvyšováním rozpustnosti fenofibrátu pomocí liposomů obsahujících žlučové soli. Součástí výzkumu byla studie biologické dostupnosti fenofibrátu po perorálním podání. Byla stanovována hladina fenofibrové kyseliny (aktivní metabolit fenofibrátu) v psí plasmě. Analyt byl ze vzorku plasmy extrahován pomocí liquid – liquid extrakce. Poté byl vzorek analyzován pomocí HPLC systému. Byla použita kolona Diamonsil C18 (4.6mm x250mm, velikost částic 5µm), která byla chráněna před poškozením pomocí doplňkové předkolony Alltech C18 (2.0mm x 20mm) a zahřívána na 30°C. Mobilní fáze byla připravena z methanolu a 0.01M dihydrogenfosforečnanu draselného (pH upraveno na 2.5 pomocí kyseliny chlorovodíkové) v objemovém poměru 75:25 při rychlosti toku 1 ml za minutu. Fenofibrová kyselina byla detekována pomocí UV detektoru při maximu vlnové délky 287 nm. (69)

LI Jia-yu a DAI Zheng-lin se zabývali HPLC stanovením fonofibrátu v měkkých tobolkách. Byla použita kolona C18 (Inertsil ODS-35 µm,4.6 mm × 150 mm). Mobilní fáze se skládala z destilované vody a acetonitrilu v objemovém poměru 70:30, s pH upraveným pomocí kyseliny fosforečné na 2.5. K detekci byl použit UV detektor při vlnové délce 286 nm. Linearita odezvy detektoru byla zjištěna v rozsahu 40.7 - 407.1 µg/mL. Metoda byla sledována jednoduchou, rychlou, přesnou a spolehlivou. (70)

4.1.7 2010

Prashant R. Rathod, Sonali S.Askarkar a Krishna R. Gupta v roce 2014 vyvinuli novou metodu stanovení obsahu fenofibrátu v lékových formách pomocí HPLC. K HPLC separaci byla použita Phenomenex ODS 5µ C18 kolona (250 X 4.6 mm). Mobilní fáze byla připravena smísením acetonitrilu a vody v objemovém poměru 90:10 a její pH bylo upraveno pomocí 0.1M HCL na hodnotu 5. Tato metoda byla využita ke stabilitním studiím, kdy byly vzorky vystaveny stresovým podmínkám a umožnila analyzovat přítomnost rozkladných produktů. (71)

4.1.8 2011

Fathy M. M. Salama, Mohamed W. I. Nassar, Mohie M. K. Sharaf El-Din, Khalid A. M. Attia a Mohamed Yousri Kaddah provedli výzkum, jehož předmětem bylo stanovení fenofibrátu a jeho rozkladných produktů pomocí UV-spektrofotometrie a HPLC. Separace byla provedena

pomocí předkolony Pinnacle II phenyl (5 μ m, 10 \times 4 mm) a kolony Pinnacle II phenyl column (5 μ m, 250 \times 4.6 mm) od firmy RESTEK. Složení mobilní fáze bylo methanol a 0,1% kyselina fosforečná v objemovém poměru 60:40, a byla na kolonu čerpána rychlostí toku 2 ml za minutu. Teplota byla nastavena na 50°C a detekce pomocí UV detektoru proběhla při vlnové délce 302 nm. Jako interní standard byla použita kyselina salicylová. Tato metoda byla shledána vhodnou pro stanovení fenofibrátu a jeho rozkladných produktů jak v laboratorně připravených produktech, tak v komerčně dostupných lékových formách. (72)

T. Manish Kumar, Gurralla Srikanth, Vandana Pamulaparthi, J. Venkateshwar Rao a Prof. KRS. Sambasiva Rao se ve svém výzkumu zabývali vývojem a validací metody stanovení fenofibrátu v lidské plazmě pomocí HPLC. K vzorku plasmy byl přidán IS Nevirapin, analyty byly poté extrahovány do ethylacetátu. K HPLC separaci byla použita kolona Intensil C18 (4.6x250mmx5 μ m) a mobilní fáze byla složena z 20mM octanu amonného a acetonitrilu v objemovém poměru 60:40. Rychlost toku mobilní fáze byla nastavena na 1ml za minutu a detekce proběhla pomocí UV detektoru při 295 nm. Chromatogramy ukázaly dobré rozlišení, kdy retenční časy fenofibrátu a IS byly přibližně 6.6 minut a 5.2 minut v uvedeném pořadí. Tato metoda se osvědčila a byla použita ve farmakokinetických studiích. (73)

M. Sudheer, M. Siva Prakash, G. Rajashekar, K. V. Hima Vani, P. Ramalingam a Y. Padmanabha Reddy se zabývali vývojem metody pro zkoušky stability fenofibrátu v komerčně dostupných lékových formách pomocí HPLC s DAD detekcí. Jako mobilní fáze byl použit acetonitril a fosfátový pufr (pH 3.0) v poměru 70:30 v isokratikém módu eluce s rychlostí toku 1.5 ml za minutu. Jako stacionární fáze byla zvolena kolona Inetsil ODS C18(250mm \times 4.6mm, 5 μ m). Analyty byly vystaveny stresovým podmínkám (HCl, NaOH, 3% H₂O₂, hodinu při pokojové teplotě) a následně byly produkty analyzovány pomocí DAD detektoru. Píky analytu byly dobře rozlišitelné od píků rozkladných produktů, proto se tato metoda pro stabilitní studie osvědčila. (74)

Zengrong Jia, Ping Lin, Yu Xiang, Xueqing Wang, Jiancheng Wang, Xuan Zhang a Qiang Zhang se věnovali zvyšování biodostupnosti fenofibrátu po perorálním podání pomocí nanočásticových maticí obsahujících koloidní křemík a pH-senzitivní polymethylakrylát. Součástí výzkumu byla jak in vitro disoluční studie, tak i in vivo výzkum biodostupnosti. K in vitro analýze fenofibrátu byla použita BDS Hypersil C18 kolona (250 x 4.6 mm) při teplotě nastavené na 35°C. Jako mobilní fázi zvolili směs vody a methanolu v objemovém poměru 80:20 při rychlosti toku 1 ml za minutu. Stejně chromatografické podmínky byly použity i k analýze plasmy krys, kterým byla testovaná látka podána s tím rozdílem, že mobilní fáze byla nahrazena roztokem 0.02 molární kyseliny fosforečné s acetonitrilem v objemovém poměru 40:60. Metoda byla shledána přesnou, protože splňovala všechny validační parametry. (75)

Liandong Hu, Hongyu Wu, Feng Niu, Cuihong Yan, Xun Yang a Yanhong Jia se zabývali vývojem mikroemulze fenofibrátu za účelem zvýšení jeho biodustupnosti po perorálním podání. Součástí práce bylo také studium farmakokinetiky připraveného produktu pomocí HPLC analýzy plasmy psů, kterým byla mikroemulze podána. Extrakce analytu byla provedena pomocí liquid-liquid extrakce. K vlastní HPLC analýze byla použita kolona

Kromasil C-18 (250 mm x 4.6 mm, velikost částic 5 µm). Jako mobilní fáze byla zvolena směs acetonitril – voda v objemovém poměru 70:30, jejíž pH bylo upraveno na 2.5 pomocí kyseliny fosforečné. Rychlost toku byla nastavena na 1 ml za minutu a detekce fenofibrové kyseliny proběhla pomocí UV detektoru při maximu vlnové délky 287 nm. (76)

Daniel Juenemann , Ekarat Jantravid, Christian Wagner, Christos Reppas, Maria Vertzoni a Jennifer B. Dressman se v roce 2011 zabývali in vitro disolučními studii mikro a nano částic fenofibrátu. Vzorky z disolučních testů byly podrobeny kvantitativní analýze pomocí HPLC. K analýze byla použita kolona LiChroCART RP-18 (125x4 mm, velikost částic 5µm) od firmy Merck. Mobilní fáze byla tvořena roztokem acetonitrilu a vody v objemovém poměru 80:20 s pH upraveným pomocí kyselinou fosforečnou na hodnotu 2.5. Rychlost toku mobilní fáze byla nastavena na 0.85 ml za minutu. Výsledný retenční čas fenofibrátu byl 4.5 minuty. K detekci byl použit UV detektor při vlnové délce 254 nm. (77)

Bai Jie,Zhao Yan-yan, Su Fang, Han Yuan-yuan,Wang Cui-ling a Lo Yue-qiu se zabývali vývojem HPLC metody současného stanovení simvastatinu a fenofibrové kyseliny in vivo. K analýze byly použity vzorky lidského séra dobrovolníků, kterým bylo dané léčivo podáno. Po centrifugaci, precipitaci cyklohexan-dichlormenthanem (3:1) a vysušení rozpouštědla plynným dusíkem byl vzorek naředěn mobilní fází, složené z methanolu, vody a kyseliny fosforečné v objemovém poměru 85:14:1. Jako stacionární fáze byla použita VP-ODS analytická kolona (150 mm×4.6 mm) vyhřátá na teplotu 25°C. Rychlost toku mobilní fáze byla nastavena na 1 ml za minutu. K detekci analytů byl použit diode array detektor, fenofibrát byl detekován při maximu vlnové délky 300 nm. Rozsah linearit fenofibrátu byl 0.05-25 µg/ml (r=0.9999). Průměrná výtěžnost extrakce u fenofibrátu byla 91.80% a relativní směrodatná odchylka byla méně než 6.4%. Metoda byla shledána jednoduchou, přesnou, správnou a vhodnou pro stanovení daných látek v séru, může být použita ke studiu farmakodynamiky, farmakokinetiky a biodostupnosti analyzovaných látek. (78)

P.C.Bhamare, S. B. Bari, S.Natarajan, A.A.Patil, S.H.Patil a P.T.Shirode v roce 2011 vyvinuli metodu stanovení metforminu a fenofibrátu v čistých produktech i kombinovaných tabletách. Separace byla provedena pomocí kolony Inertsil octadecylsilane C18 (250 mm x 4.6 mm velikost částic 5 µm). Mobilní fáze byla tvořena acetonitrilem a vodou (s pH upraveným kyselinou fosforečnou na hodnotu 3) v objemovém poměru 70:30 a rychlostí toku 1 ml za minutu. Detekce UV detektorem byla provedena při 250 nm. Metoda byla validována s velmi dobrými parametry přesnosti a správnosti a byla úspěšně aplikována v rutinních kontrolách a kvalitativních analýzách zmíněných látek v kombinovaných lékových formách. (79)

4.1.9 2012

G. Saravanan, Md. Yunoos, A. Naveen Kumar a P. Pradeep Kumar se ve svém výzkumu zabývali stanovením cholin-fenofibrátu ve formě suroviny pro další zpracování i v lékových formách. Jako kolona byla použita Zorbax C18 column od firmy Agilent (4.6 mm x 15 cm, velikost částic 5 µm) za použití mobilní fáze, skládající se z fosfátového pufru o pH 6.8 a acetonitrilu v objemovém poměru 70:30 s rychlostí toku 0,8 ml/min. Analyt byl detekován za použití UV detektoru při 298 nm. Metoda byla shledána jako rychlá a přesná a byla

doporučena pro rutinní kvalitativní kontroly fenofibrátu jako suroviny i v lékových formách. (80)

Patel Archita, MaCwana Chhaya, Parmar Vishal a Patel Samir v roce 2012 vyvinuli jednoduchou, přesnou a citlivou metodu HPLC stanovení atorvastatinu, fenofibrátu a ezetimibu v kombinovaných lékových formách. K analýze byla použita RP C18 kolona (150 × 4.60 mm, velikost částic 5 µm), na níž byla rychlostí 1 ml za minutu čerpána mobilní fáze složená z methanolu acetonitrilu a vody v objemovém poměru 76:13:11. UV detekce byla provedena při 253 nm. Retenční čas fenofibrátu byl za daných podmínek 6.41 minut. Metoda byla validována dle ICH na linearitu, přesnost, správnost, detekční limit, kvantifikační limit a robustnost. Odezva byla pro fenofibrát lineární v rozsahu koncentrací 40–120 µg/mL ($r^2 = 0.998$). Metoda může být použita k rutinním zkouškám kvality daných látek v lékových formách. (81)

S. D. Bhinge, S. M. Malipatil, A. Jondhale, R. Hirave, a A. S. Savali v roce 2011 vyvinuli novou metodu současného stanovení atorvastatinu a fenofibrátu v kombinovaných lékových formách pomocí RP-HPLC. Byla použita Capcell Pak C8 DDS5 kolona (4.6 mm x 250 mm, velikost částic 5 µm). Mobilní fáze se skládala ze směsi acetonitril: dihydrogenfosforečnan draselný v objemovém poměru 72:28 o pH 4.1 o rychlosti toku 1.0 ml za minutu. Jako interní standard byl použit diklofenak a detekce proběhla pomocí UV/VIS detektoru LC-UV100 při vlnové délce 260 nm. Retenční čas fenofibrátu byl naměřen na 12.05 minut. Metoda byla validována dle parametrů ICH. (82)

4.1.10 2013

Fumiaki Uejo, Waree Limwikrant, Kunikazu Moribe a Keiji Yamamoto se ve svém výzkumu v roce 2013 zabývali zvyšováním rozpustnosti fenofibrátu pomocí jeho inkorporace do porózních křemíkových nanočástic. K následné HPLC analýze použili jako mobilní fázi methanol s fosfátovým pufrem o pH 2.9 v objemovém poměru 4:1 při průtokové rychlosti 1ml/min. Použili kolonu C18 (Xbridge C18, 5µm, 4.6 mm i.d. x 15cm, Waters) Teplota byla nastavena na 40°C. Vlnová délka detekce byla 285 nm a vstříkovaný objem 20 ml. (83)

Raman Suresh Kumar se zabýval návrhem, přípravou a hodnocením nanočástic obsahujících fenofibrát a rosuvastatin za účelem zvýšení biologické dostupnosti těchto léčiv. Součástí výzkumu byla analýza hladiny léčiva v králičí plazmě (zvířata byla rozdělena na dvě skupiny, jedné byl podán běžně na trhu dostupný léčivý přípravek a druhé připravený produkt, aby mohlo být porovnáno případné zvýšení biologické dostupnosti). Plazma byla nejdříve deproteinována a stanovovaná látka před analýzou extrahována na pevné fázi. Pro HPLC analýzu byly použity tyto chromatografické podmínky: Jako kolona byla zvolena Inertsil ODS, 250 x 4.6mm, velikost částic 5µm. Teplota byla nastavena na 25°C. Detekce proběhla pomocí UV detektoru při vlnové délce 286 nm. Použitá mobilní fáze se skládala z fosfátového pufru (pH 2.5) a acetonitrilu v objemovém poměru 30:70 a byla čerpána rychlostí 1ml/min. Tato mobilní fáze byla rovněž filtrována přes 0.45µm filtr (Sartorius, Germany) a odplyněna pomocí sonifikace probíhající 10 minut. (84)

Yang Fei, Edmund S. Kostewicz, Ming-Thau Sheu a Jennifer B. Dressman v roce 2013 publikovali práci na téma zvýšení biodostupnosti lipidových formulací s fenofibrátem po perorálním podání. Součástí výzkumu byla kvantitativní analýza vzorků z disolučních testů pomocí HPLC. Jako stacionární fáze byla použita kolona LiChroCART Purospher RP-18 (125x4 mm, velikost částic 5 µm). Použitá mobilní fáze se skládala z acetonitrilu a vody v objemovém poměru 80:20 (pH upraveno kyselinou fosforečnou na 2.5) a její rychlost toku byla nastavena na 0.85 ml za minutu. Vlnová délka detektoru byla nastavena na 254 nm. Fenofibrát měl při těchto chromatografických podmínkách retenční čas 4.5 minut. (85)

Dhiware Abhijit D., Deshpande Padmanabh B., Gandhi Santosh V., Nair Sujith a Vanjari Suvarna v roce 2013 vyvinuli metodu vysokoúčinné kapalinové chromatografie pro současné stanovení atorvastatinu, ezetimibu a fenofibrátu v kombinovaných lékových formách. Byl použit Jasco HPLC systém vybavený kolonou HiQ sil C18 HS (250 × 4.6 mm i.d.) a DAD detektorem. Mobilní fáze byla připravena z methanolu, acetonitrilu a 0.02M octanového pufru (pH10) v objemovém poměru 60:30:10. Detekce byla provedena při 240 nm. Rozsah linearit byl pro fenofibrát 10-60 µg/ml. Metoda byla validována a úspěšně aplikována v analýze lékových forem obsahujících dané látky. (86)

Vinjam Swathi, Nanda Kishore Agarwal a Kumari Jyothsna vyvinuli v roce 2013 novou metodu RP-HPLC analýzy fenofibrátu a atorvastatinu v kombinovaných lékových formách. V metodě byla použita kolona Thermohypersil BDS C18 (100 × 4.6 mm, velikost částic 5 µm). Mobilní fáze se skládala z methanolu a vody (s pH upraveným na hodnotu 2 pomocí kyseliny fosforečné) v objemovém poměru 40:60 o rychlosti toku 1 ml za minutu. Detekce byla provedena pomocí PDA detektoru při 274 nm. Retenční čas fenofibrátu byl naměřen na 2.949 minut. Metoda byla validována dle ICH a úspěšně aplikována v praxi v analýze lékových forem obsahujících fenofibrát a atorvastatin. (87)

4.1.11 2014

E. Samyukta and Prathima Srinivas se zabývali vývojem metody pro analýzu cholin-fenofibrátu v lékové formě za použití RP-HPLC. Jako stacionární fáze byla použita inertsil ODS kolona (150 x 4.6 mm, velikost částic 5µm). Mobilní fáze se skládala z fosfátového pufru a acetonitrilu v poměru 32:68. Eluce byla isokratická o rychlosti toku of 1.5mL/min za laboratorní teploty. Detekce pomocí UV/VIS detektoru proběhla při 300 nm. Tato metoda byla shledána snadnou, lineární, selektivní a vhodnou pro rutinní stanovení fenofibrátu v lékových formách. (88)

Oh Euichaul se zabýval vývojem a validací vysoce selektivní RP-HPLC metody pro kvantitativní stanovení čistého fenofibrátu jako suroviny a fenofibrátu obsaženého ve farmaceutických lékových formách. Analýza byla provedena na přístroji Agilent 1260 Infinity HPLC systém. Byla použita kolona Capcell PAK C18 (4.6 mm x 250 mm, velikost částic 5 µm). Mobilní fáze se skládala z acetonitrilu a 0.1% kyseliny fosforečné v objemovém poměru 75:25. Tato byla eluována v isokratickém módu rychlostí toku 2.5 ml za minutu. K detekci byl použit UV detektor a vlnová délka byla nastavena na 286 nm. Zkoušky na stabilitu prokázaly, že analyt ve vzorcích zůstal stabilní po celou dobu experimentu prováděného při laboratorní teplotě. Limity detekce a kvantifikace této metody byly lepší než u dřívě

provedených metod stanovení fenofibrátu. Také všechny ostatní validační parametry se vešly do příslušných limitů. (89)

Varghese Susheel John a Ravi Thengungal Kochupappy se zabývali kvantitativním stanovením fenofibrátu, atorvastatinu a ezetimibu v tabletách za použití RP-HPLC a HPTLC metod. Jako stacionární fáze pro HPLC analýzu byla použita Shim-pack C18 kolona (150 × 6 mm id) a mobilní fáze se skládala z 0,1 % kyseliny mravenčí a acetonitrilu v gradientovém módu eluce po dobu 25 minut s rychlostí toku mobilní fáze 1.5 ml za minutu. K detekci byl použit UV-detektor při vlnové délce 245 nm. Metoda byla validována dle validačních parametrů ICH. Metoda byla shledána jednoduchou, rychlou, přesnou a selektivní a byla úspěšně aplikovaná v analýze laboratorně připravených produktů. Nevyskytly se žádné chromatografické interference se složkami tablet, tudíž metoda je aplikovatelná pro současné stanovení fenofibrátu, atorvastatinu a ezetimibu v kombinovaných lékových formách. (90)

Mohamed M. Hefnawy, Mostafa S. Mohamed, Mohammed A. Abounassif, Amer M. Analazi a Gamal A. E. Mostafa se zabývali současným stanovením fenofibrátu a pravastatinu v kombinovaných lékových formách pomocí HPLC. Byla použita kolona phenylHYPERASIL C18 (125 mm × 4.6 mm i.d., velikost částic 5 μm) v isokratickém módu eluce za použití mobilní fáze složené z acetonitrilu a 0.1 % diethylaminu v objemovém poměru 50:50 a pH 4.5. Tato byla čerpána rychlostí 1 ml za minutu. Detekce byla provedena při vlnové délce 240 nm. Retenční čas fenofibrátu byl 5.79 minut a metoda byla shledána jako vhodná pro daný účel. (91)

Dillip Kumar Sahoo, Prafulla Kumar Sahu a Chandra Sekhar Patro v roce 2014 vyvinuli novou metodu HPLC pro stanovení obsahu fenofibrátu v lékových formách a v farmaceutických produktech pro další zpracování. Jako kolona byla zvolena Zorbax C-18 kolona (150cm x 4.6mm, velikost částic 5μm) Mobilní fáze obsahovala fosfátový pufr o pH 3 a acetonitril v objemovém poměru 30:70 a byla hnána na kolonu rychlostí 1 ml za minutu. K detekci byl použit DAD detektor při vlnové délce 286 nm. Naměřený retenční čas fenofibrátu byl 19.268 minut a mez linearitity byla zjištěna v rozsahu koncentrace 1-500 μg/ml. Relativní směrodatná odchylka byla méně než 2% a limity detekce a kvantifikace byly 0.229μg/ml a 0.765μg/ml v uvedeném pořadí. Metoda byla validována dle ICH na přesnost, správnost, linearitu, specifitu a citlivost. (92)

K. S. Kumar a P. B. Samnani v roce 2014 vyvinuli novou metodu současného stanovení esomeprazolu, venlafaxinu a fenofibrátu pomocí HPLC. K chromatografické separaci byla zvolena kolona C18 (150 cm x 4.6 mm, velikost částic 3.5 μm), od firmy Agilent. Analýza probíhala v gradientovém módu eluce, kdy mobilní fáze A byla tvořena acetonitrilem a 0.03% kyselinou mravenčí v objemovém poměru 25:75 a mobilní fáze B byla tvořena stejnými látkami v poměru 30:70. Detekce UV detektorem proběhla při 230 nm. Retenční čas fenofibrátu byl naměřen na 13.12 minut. Metoda byla validována dle ICH a byla shledána přesnou, rychlou, správnou a specifickou, tudíž vhodnou pro rutinní analýzu daných látek. (93)

Iltaf Shah, James Barker, Stephen J Barton a Declan P Naughton vyvinuli v roce 2014 novou metodu stanovení fenofibrové kyseliny v lidské plazmě za použití HPLC. Úprava vzorku

plazmy před vlastní analýzou zahrnovala liquid-liquid extrakci do ethylacetátu, oddělení organické vrstvy a její vysušení proudem dusíku při 40°C a závěrečnou rekonstituci naředím mobilní fází. Jako interní standard byl použit 4'-chloro5-fluoro-2-hydroxybenzophenon. K separaci byla použita kolona Symmetry Shield™RP18 (150×4.60 mm, velikost částic 5 µm). Mobilní fáze byla tvořena roztokem acetonitrilu a 0.02 M kyseliny fosforečné v objemovém poměru 50:50 a rychlost jejího průtoku byla nastavena na 1 ml za minutu. Retenční časy fenofibrové kyseliny a interního standardu byly 6.1 and 9.1 ± 0.5 min v uvedeném pořadí. Výtěžnost extrakce byla 79.8%. Metoda byla úspěšně aplikována ve farmakokinetických a bioekvivalenčních studiích Lipidil-Micro™kapslí a Lipidil-EZ™ tablet, obsahujících fenofibrát. (94)

Praful P. Dedhiya, Renu S. Chauhan, Shailesh A. Shah a Pratik M. Tailor se v roce 2014 zabývali stanovením fenofibrové kyseliny v komerčně dostupných lékových formách obsahujících fenofibrát pomocí RP-HPLC. K separaci byla použita kolona Grace Smart C18 column (250 mm x 4.6 mm, velikost částic 5 µm). Jako mobilní fáze byl použit roztok acetonitrilu ve vodě (o pH 2.5 upraveným pomocí kyseliny fosforečné) v objemovém poměru 70:30 o rychlosti toku 1 ml za minutu. Detekce byla uskutečněna pomocí UV detektoru při 286 nm. Metoda byla validována na specifitu, linearitu, přesnost a správnost a úspěšně aplikována v kvantitativní analýze fenofibrátu a fenofibrové kyseliny v lékových formách. (95)

4.1.12 2015

Nahla Nour El-Din a Ahmad Salama se zabývali vývojem a validací metody současného stanovení fenofibrátu, jeho metabolitů a současně podaných statinů v lidské plasmě pomocí TLC-densitometrie a HPLC. K HPLC analýze byla použita kolona C18 (250 x 4.6 mm, velikost částic 10 µm) jejíž teplota byla udržována na 25°C. Mobilní fáze se skládala ze směsi acetonitril-voda v objemovém poměru 82:18. K detekci byl použit UV-detektor při vlnové délce 254 nm. Rychlost toku mobilní fáze byla nastavena na 1:5 ml za minutu. Metoda byla validována na specifitu, linearitu, přesnost, správnost a robustnost. Všechna tato kritéria byla v mezích příslušných limitů. Rozsah linearity odezvy detektoru byl 5.0 - 50 µg/mL. (96)

4.1.13 Shrnutí

V předchozích odstavcích jsou uvedeny práce, které se HPLC analýzou fenofibrátu zabývají jako svým hlavním tématem (např. vývoje a validace chromatografických metod) i práce, u nichž byla analýza fenofibrátu pomocí kapalinové chromatografie provedena pouze v rámci důkazů zvyšování jeho rozpustnosti či biodostupnosti nebo ke zkouškám stability. Nejčastěji byla použita chromatografická metoda RP-HPLC, ve které se používá hydrofilní stacionární fáze. Nejvíce používány tedy byly různé typy kolon C18 od různých výrobců. Jako mobilní fáze byly ve většině případů použity roztoky acetonitrilu a vody nebo methanolu a vody, popřípadě roztoky všech tří složek s pH obvykle upraveným pomocí fosfátového či octanového pufru. K detekci byl obvykle použit UV/VIS detektor, nejčastěji při vlnové délce 286 nm.

4.1.14 Stanovení fenofibrátu v kombinovaných lékových formách s rosuvastatinem

U pacientů s vysokým kardiovaskulárním rizikem při smíšené dyslipidemii bývá fenofibrát někdy užíván v kombinaci se statiny. U pacientů s nízkým HDL cholesterolem a zvýšenou hladinou triglyceridů potencuje fenofibrát účinek statinů. Existují i kombinované lékové formy, v ČR jsou registrovány dva preparáty (kombinace fenofibrátu s pravastatinem a fenofibrátu se simvastatinem), v zahraničí se v praxi uplatňují kombinované preparáty fenofibrátu s rosuvastatinem. Tato kombinace se z hlediska myopatií, což je nejzávažnější nežádoucí účinek statinů, jeví jako nejbezpečnější. V posledních letech bylo vyvinuto několik metod HPLC analýzy těchto lékových forem. V následujících odstavcích budou jednotlivé metody podrobněji přiblíženy a na závěr porovnány.

Suresh Kumar vyvinul v roce 2010 jednoduchou, přesnou a spolehlivou metodu RP-HPLC pro současné stanovení rosuvastatinu a fenofibrátu v kombinovaných tabletových lékových formách. Byla použita kolona inertsil ODS (250 x 4.6 mm, velikost částic 5 μ m) a mobilní fáze byla připravena smísením vody a acetonitrilu v objemovém poměru 30:70. Rychlost toku mobilní fáze byla nastavena na 1.0 ml za minutu. Detekce fenofibrátu proběhla pomocí UV detektoru při vlnové délce 286 nm. Naměřený retenční čas fenofibrátu byl 20.5 minuty. Sledované validační parametry metody byly selektivita, linearita, přesnost, správnost a detekční a kvantifikační limit, jejichž hodnoty jsou uvedeny v tabulce. Metoda byla shledána vhodnou pro rutinní kontroly kvality tablet obsahujících rosuvastatin a fenofibrát. (97)

Současným stanovením rosuvastatinu a fenofibrátu se ve svém výzkumu v roce 2011 zabýval také Anandakumar Karunakaran. Ve své metodě použil kolonu Luna C18. Metoda byla validována dle parametrů ICH a byla úspěšně aplikována v praxi při stanovování daných látek. Parametry validace jsou uvedeny v souhrnné tabulce (viz. Tabulka 3 srovnání metod). (98)

Borole TC, Dewani MG, Gandhi SP a Damle MC v roce 2011 vyvinuli jednoduchou, přesnou RP-HPLC metodu pro současné stanovení rosuvastatinu a fenofibrátu v surovinách pro další zpracování i v hotových lékových formách. Byla použita kolona BDS C-18 (250x4.6 mm, velikost částic 5 μ m) a mobilní fáze acetonitril:voda v objemovém poměru 70:30. Teplota kolony byla nastavena na 40°C a rychlost toku mobilní fáze byla 1.5 ml za minutu. K detekci byl zvolen UV detektor a proběhla při 287 nm. Retenční čas fenofibrátu byl 8.5 minut. Další parametry jsou uvedeny v tabulce 3. (99)

Devika GS, Sudhakar M a Venkateshwara Rao J v roce 2011 vyvinuli novou RP- HPLC metodu současného stanovení uvedených látek v kombinovaných lékových formách. K analýze byla použita kolona Phenomenex C18 (250x4.6 mm, velikost částic 5 μ m) a mobilní fáze obsahující methanol a 0.02 M amonium dihydrogen fosfátový pufr v objemovém poměru 75:25 o rychlosti toku 1.0 ml za minutu. Detekce byla provedena pomocí UV detektoru při 272 nm. Retenční čas fenofibrátu byl 5.18 minut. Metoda byla validována, hodnoty validačních parametrů jsou uvedeny v tabulce 3. Navržená metoda byla úspěšně aplikována v praxi při stanovování daných látek v komerčně dostupných tabletách. (100)

Ladke Abhijeet v roce 2012 vyvinul metodu RP-HPLC pro testování stability kombinovaných lékových forem rosuvastatinu a fenofibrátu. V této metodě byl použit Jasco HPLC systém s HiQ sil C18 kolonou (250×4.6mm, velikost částic 5 µm). Použitá mobilní fáze byla připravena z acetonitrilu a vody v objemovém poměru 70:30 při rychlosti toku 1.5 ml za minutu. Eluáty byly detekovány UV detektorem při vlnové délce 287 nm. Naměřený retenční čas fenofibrátu byl 13.06 minut. Metoda prokázala dobré hodnoty linearity ($r^2 = 0.99$) v rozsahu koncentrace 1-10 µg/ml. Další hodnoty uvedeny v tabulce. Navržená metoda byla validována. Stresové zkoušky analytů byly provedeny za působení alkalického, kyselého, oxidativního, fotolytického a tepelného účinku. Obě sledované látky byly dobře odlišitelné od jejich rozkladných produktů, proto se metoda dobře osvědčila právě pro testování stability rosuvastatinu a fenofibrátu, ať už jako surovin pro další zpracování či v komerčně dostupných lékových formách. (101)

Současným stanovením fenofibrátu a rosuvastatinu v kombinovaných lékových formách se zabýval také Mohd. Moinuddin v roce 2012. Touto metodou se podařilo dosáhnout vhodné separace obou látek. Nejlepších hodnot rozlišení bylo dosaženo při použití kolony Hypersil C18 (250×4.6 mm, velikost částic 5 µm) a mobilní fáze složené z acetonitrilu a vody v objemovém poměru 90:10 o rychlosti toku 1.0 ml za minutu. Detekce byla provedena pomocí UV detektoru při vlnové délce 240 nm. Naměřený retenční čas fenofibrátu byl 4.92 minut. Metoda byla validována, parametry jsou uvedeny v tabulce. Metoda byla shledána vhodnou pro stanovení obsahu uvedených látek v komerčně dostupných lékových formách. (102)

Stejným tématem se zabývali i Sharma Sheetal a Bhandari Priyav roce 2012. Podařilo se jim vyvinout rychlou, citlivou a přesnou analytickou metodu pro stanovení uvedených látek pomocí RP-HPLC. Byla použita kolona Luna C18. Metoda byla validována podle ICH validačních parametrů. Jejich hodnoty jsou uvedeny v tabulce. Navržená metoda se osvědčila v praxi pro kvalitativní kontrolu kombinovaných lékových forem obsahujících rosuvastatin a fenofibrát. (103)

Swetha Ankireddy, Venkateswara Rao P, Sudhakar babu AMS a Pramod N vyvinuli v roce 2012 další kapalinově chromatografickou metodu stanovení uvedených látek v tabletových lékových formách. V této metodě se uplatnila kolona by X-TERRA RP-C18 (150×4.6 mm, velikost částic 3.5 µm). Jako mobilní fáze se nejlépe osvědčil roztok fosfátového pufru a acetonitrilu v objemovém poměru 35:75 s rychlostí toku 0.8 ml za minutu. K detekci byl použit UV detektor při vlnové délce 256 nm. Retenční čas fenofibrátu byl 3.865 minut. Metoda byla validována, validační parametry jsou uvedeny v tabulce. Tato metoda se osvědčila v praxi pro simultánní stanovení rosuvastatinu a fenofibrátu v tabletách. (104)

Bhavna Patel A, Sharddha Parmar J, Aanandi Captain se v roce 2013 věnovali stejnému tématu jako jejich kolegové výše. Jako kolonu zvolili Zorbax Eclipse plus C18 (100×4.6 mm, velikost částic 3.5 µm). Jako mobilní fáze byl použit roztok acetonitrilu a vody v objemovém poměru 90:10 při rychlosti toku 0.6 ml za minutu. Detekce pomocí UV detektoru proběhla při vlnové délce 243 nm. Naměřený retenční čas fenofibrátu byl 4.65 minut. Metoda byla

validována dle ICH validačních parametrů. Výsledky jsou uvedeny v tabulce. Metoda se osvědčila i v praxi při analýze komerčně dostupných lékových forem. (105)

Jajam Thriveni, Rambabu R, Venkateswara Rao J a Vidyadhara S v roce 2013 rovněž vyvíjeli metodu RP-HPLC pro stanovení rosuvastatinu a fenofibrátu v kombinovaných lékových formách. K separaci látek byla použita kolona Agilent ODS UG 5 (250×4.5 mm) a jako mobilní fáze byl vybrán roztok acetonitrilu, methanolu a vody v objemovém poměru 40:20:20. K detekci byl použit UV detektor při vlnové délce 252 nm. Retenční čas fenofibrátu byl naměřen na 5.0 minut. Tato metoda byla validována dle ICH, validační parametry jsou uvedeny v tabulce. Metoda byla shledána snadnou, specifickou a přesnou, tudíž vhodnou pro zamýšlený účel. (106)

Sumalatha M a Haritha Pavani K se v roce 2013 také zabývali vývojem a validací metody stanovení uvedených látek pomocí RP-HPLC. Jako stacionární fáze byla vybrána kolona Hypersil C18 od firmy Waters (4.6×250 mm, velikost částic 6.5 μm). Mobilní fáze byla připravena z ortofosforečnanového pufru (pH 3) a methanolu v objemovém poměru 65:35 a její rychlost toku byla nastavena na 1.2 ml za minutu. Látky v eluátu byly detekovány pomocí UV detektoru při vlnové délce 238 nm. Retenční čas fenofibrátu byl zaznamenán na 3.858 minut. Metoda byla validována dle parametrů ICH, parametry lze najít v tabulce. Metoda se jeví jako velmi přesná a specifická, bez chromatografických interakcí s dalšími složkami obsaženými v lékových formách. (107)

Thukabai S, Uma Maheshwara Rao V, Muhammad Rafi a Shaik se v roce 2013 zabývali stejným tématem jako jejich kolegové z předchozích odstavců. Byla použita kolona Agilent XDB C18(150×4.6 mm, velikost částic 5 μm) a mobilní fázi tvořil 0.01M dihydrogenfosforečnan draselný a methanol v objemovém poměru 55:45 o rychlosti toku 1 ml za minutu. Analyty byly detekovány UV detektorem při 220 nm. Retenční čas fenofibrátu byl 5.80 minut. Metoda byla validována dle ICH, parametry jsou uvedeny v tabulce. (108)

Tabulka 3 srovnání metod

Autoři	Retenční čas (min)		Rozsah linearity (µg/ml)	Správnost (%)	Přesnost (%RSD)
	ROS	FEN			
Suresh Kumar GV, 2010	3.6	20.5	1000-3000	99.00	0.61
Anandakumar Karunakaran, 2011	2.60±0.03	7.34±0.03	4-28	99.20-101.32	0.0782-0.6920
Devika GS, 2011	4.18	5.18	174-464	100.00	0.62
Mohd. Moinuddin, 2012	2.30	4.92	26.8-160.8	100.00	0.764
Swetha Ankireddy, 2012	2.006	3.856	160-800	99.90	0.21
Bhavna A Patel, 2013	1.93	4.65	14-112	99.78	0.90-1.89
Jajam Thriveni, 2013	2.3	5.0	8-40	98.9-99.9	0.815 0.751
M. Sumalatha, 2013	1.950	3.858	50-150	99.00	0.94
S. Thukabai, 2013	2.36	5.80	80-320	9.12-100.95	0.26

4.1.14.1 Shrnutí

Mezi roky 2010 a 2014 bylo provedeno celkem 12 různých výzkumů na téma stanovení rosuvastatinu a fenofibrátu v kombinovaných lékových formách nebo surovinách pro další zpracování pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie. Devět z nich bylo vybráno (u zbylých tří metod nebyly dostupné všechny potřebné údaje) a jejich parametry uvedeny v souhrnné tabulce pro lepší porovnání.

Nejvyšší přesnosti a správnosti dosáhla metoda vyvinutá S.Thukanaiem a jeho kolegy v roce 2013. Výhodou této metody jsou také poměrně nízké retenční časy analyzovaných látek. Byla při ní použita kolona Agilent XDB C18 a mobilní fáze 0.01M dihydrogenfosforečnan draselný:methanol v objemovém poměru 55:45.

Ze srovnání lze rovněž vyčíst, že mobilní fáze, skládající se z acetonitrilu, methanolu a vody v objemovém poměru 40:40:20, použité v metodě vyvinuté Anandakumarem Karunakaranem a jeho týmem v roce 2011 a Jajamem Thrivenin a spol. v roce 2013, přinesla větší citlivost s užším rozsahem linearit.

Jako nejrychlejší ze srovnání vychází metoda vyvinutá M. Sumalathou a jeho týmem v roce 2013, ve které byla použita kolona Hypersil C18 column a metoda Swetha Ankireddy a spol. z roku 2012, která využila kolonu Zorbax eclipse plus C18, kdy retenční časy fenofibrátu byly nejkratší.

4.1.15 Návrh vhodných chromatografických podmínek pro analýzu fenofibrátu

Na základě analýzy předchozích výzkumů byly navrženy chromatografické podmínky pro HPLC analýzu fenofibrátu. Jako kolona byla navržena kolona s náplní C₁₈ o rozměrech 250x4.6 mm a velikosti částic 5 μm (např. kolona Luna od firmy Phenomenex, Kromasil či Inertsil od Sigma-Aldrich, LiChrospher 60 RP-select B od firmy Merck, Zorbax od Agilent nebo Pinnacle od firmy Restek). Jako mobilní fáze byla navržena směs acetonitrilu a fosfátového pufru (o pH okolo 3,16) v objemovém poměru 50:50 nebo 60:40. Navrhovaný způsob detekce je pomocí UV-VIS detektoru při vlnové délce okolo 286 nm. Jedná se samozřejmě jen o návrh chromatografických podmínek, které bude nutno ověřit a upřesnit experimentální cestou.

4.2 Přehled prací zabývajících se HPLC analýzou ketorolaku

V následujících odstavcích je chronologicky seřazen přehled publikací, zabývajících se HPLC analýzou ketorolaku. Hlavní důraz byl kladen na zaznamenání chromatografických podmínek.

4.2.1 1994

M.H. Mills, L.E. Mather a X.S. Gu, J.L. Huang se v roce 1994 zabývali stanovením enantiomerů ketorolaku v plasmě pomocí enantioselektivní kapalinové chromatografie. Byla použita kolona Chiral AGP-CSP o rozměrech 100 x 4mm naplněná chirální stacionární fází založené na alfa-glykoproteinu. Jako mobilní fáze byla zvolena 4% směs propanolu s 0,1 molárním dihydrogenfosforečnanem draselným o pH 5,5, jejíž průtoková rychlost byla nastavena na 0,9 ml za minutu. Detekce byla provedena pomocí UV detektoru při 325 nm. Jako interní standard byl použit naproxen. Enantiomery se za těchto podmínek podařilo jednoznačně rozlišit, kdy jejich retenční časy byly 3,3 a 4,8 minut. (109)

D.J. Jones a A.R. Bjorksten se v roce 1994 rovněž zabývali chirální separací ketorolaku ve vzorku plasmy pomocí HPLC. Vzorky plasmy byly okyseleny a analyty extrahovány do diethyletheru. Byla použita stejná kolona jako v předchozím případě, tedy Chiral-AGP column. Jako mobilní fáze se nejlépe osvědčila směs propanolu s 20 mM fosfátovým pufrům o pH 7. Detekce proběhla UV detektorem při vlnové délce 320 nm. Jako interní standard byl zvolen rovněž naproxen. Metoda byla poté úspěšně aplikována při stanovení enantiomerů ketorolaku v plasmě po infuzi racemické směsi této látky a byla sledána rychlou a citlivou. (110)

4.2.2 1996

Irene Tsina, Yuen Ling Tam, Aileen Boyd, Cynthia Rocha, Ian Massey a Thomas Tarnowski se v roce 1996 zabývali vývojem přímé a nepřímé HPLC metody enantioselektivního stanovení ketorolaku v plasmě. V nepřímé metodě byly enantiomery ketorolaku derivatizovány pomocí (+)-R-1-(1-naftyl)ethylaminu na diastereotopické amidy. Separace těchto diastereomerů poté proběhla pomocí HPLC na normálních fázích pomocí kolony a Microsorb Silica, 150 mm x 4.6 mm, velikost částic 5 μm (Rainin Instrument Co., Emeryville, CA). Jako mobilní fáze byla použita směs ethylacetátu s hexanem v objemovém poměru 40:60 při rychlosti toku 1 ml za minutu. Vlnová délka detektoru byla nastavena na 317 nm.

V přímé metodě byla využita chirální kolona Chiral AGP, 100 mm x 4.0 mm, velikost částic 5 μ m (Chrom Tech, Apple Valley, MN), která byla chráněna pomocí předkolony Chiral AGP guard column (Chrom Tech, Apple Valley, MN). Mobilní fáze se skládala z 2-propanolu a fosfátového pufru (pH 5,5 koncentrace 0,05 mol/l) v objemovém poměru 5:95 a její rychlost toku byla nastavena na 0,4 ml/min. Detekce pomocí UV detektoru proběhla při vlnové délce 317 nm. Výsledky obou metod ukázaly velkou míru shody (korelační koeficient mezi 0,9740 a 0,9864 pro oba enantiomery. Obě metody byly shledány přesnými a správnými a tudíž vhodnými pro klinické využití při stanovení enantiomerů ketorolaku v plasmě po intramuskulárním, intravenózním i perorálním podání. Výhodou přímé metody je její snadnost a rychlost, avšak oproti nepřímé metodě je zde nutné využití dražší kolony s kratší životností. (111)

4.2.3 1997

M. A. Campanero, A. Lopez-Ocairiz, E. Garda-Quetglas, B. Sadaba a J. R. Azanza se v roce 1997 zabývali stanovením enantiomerů ketorolaku v plasmě s použitím kapalinové chromatografie. Byla použita kolona Chiral-AGP, (100 x 4 mm). Jako interní standard byl zvolen naproxen. Jako mobilní fáze byl použit 8,5% roztok propanolu ve fosfátovém pufru (o složení 0.09 M NaH₂PO₄.H₂O, 0.01 M Na₂HPO₄ a 0.002 M Dimethyloctylamin a pH 5.5). Touto metodou se oba enantiomery podařilo dobře rozlišit a nedochází při ní k racemizaci jako při nepřímých metodách. (112)

4.2.4 1999

K. H Amunen, E.-L. M Aunuksela, J. Sarvela, R. E. S. Bullingham a K. T. Olkkola se v roce 1999 zabývali studiem farmakokinetiky ketorolaku v lidské plasmě. Součástí jejich výzkumu byla také chirální analýza uvedené látky pomocí HPLC. K separaci byla použita chirální kolona AGP (Chrom Tech, 100 mm x 4 mm, velikost částic 5 μ m). Mobilní fáze byla připravena z 2-propanolu a 0,05 molárního fosfátového pufru o pH 5,5 v objemovém poměru 5:95. Detekce UV detektorem proběhla při 317 nm. (113)

4.2.5 2001

Zhao Wang, Richard M. Dsida a Michael J. Avramy v roce 2001 vyvinuli metodu stanovení ketorolaku v lidské plasmě za pomoci HPLC a použití extrakce na pevné fázi a detekce UV detektorem. Ke vzorku lidské plasmy pacienta, kterému byl podán ketorolak, byl přidán tolmetin jako interní standard a následně byl vzorek připraven pro HPLC analýzu pomocí extrakce na pevné fázi. K vlastní analýze byla použita Radial-Pak C₁₈ kolona (10cm x 38 mm, velikost částic 10 μ m). Mobilní fáze byla připravena z vody, acetonitrilu a 1 M dibutylamin fosfátu (pH 2,5) v poměru 30:20:1. K detekci byl použit UV detektor při vlnové délce 313 nm. Metoda byla shledána dostatečně citlivou ke stanovení ketorolaku pro farmakokinetické studie. Ketorolak a tolmetin byly dobře rozlišeny (s retenčními časy 6,5 a 9,4 v uvedeném pořadí) a přidáním dibutylamin fosfátu do mobilní fáze byl úspěšně eliminován tailing. (114)

4.2.6 2007

S. Demircan, F. Sayın, N. E. Bascı, N. Unlu a S. Kır publikovali v roce 2007 práci, ve které se zabývali stanovením ketorolaku tromethaminu pomocí HPLC ve vzorcích odebraných

z lidského oka. K analýze byla použita kolona Nucleosil 100-5 C 18 (50 mm x 4.6 mm, velikost částic 5 μ m). Složení mobilní fáze bylo acetonitril (obsahující 0.065% triethylamin) a 1.65% ledová kyselina octová (pH 4,3) v objemovém poměru 50:50. Rychlost toku mobilní fáze byla nastavena na 1 ml za minutu. Detekce proběhla pomocí PDA detektoru při vlnové délce 314 nm. Metoda umožnila úspěšné kvantitativní stanovení ketorolaku v oční tekutině po lokálním podání. (115)

4.2.7 2008

A. M. Qandil, B. M. Tashtoush, B. M. Al-Taani, S. M. Al-Nabulsi a F. Al-Zogou v roce 2008 publikovali práci na téma simultánní stanovení ketorolaku a jeho piperazinyalkylových esterových proléčiv pomocí RP-HPLC. Jako kolona byla použita Purospher RP-18C (125 x 4 mm, 5 μ m) od německé firmy Merck. Mobilní fáze byla tvořena 0.02 M fosfátovým pufrům (o pH 5.4) a acetonitrilem v objemovém poměru 65:35 v/v a rychlost toku byla nastavena na 1,5 ml za minutu. Detekce byla provedena pomocí UV detektoru při vlnové délce 314 nm. Metoda splnila validační parametry ICH. (116)

4.2.8 2010

María Ramos Payán, Miguel Ángel Bello López, Rut Fernández Torres, Mercedes Villar Navarro a Manuel Callejón Mochón se ve svém výzkumu v roce 2010 zabývali elektromembránovou extrakcí a HPLC stanovením nejčastěji používaných nesteroidních antiflogistik ve vzorkách odpadních vod. Mezi stanovovanými látkami byl i ketorolac. Byla použita kolona ChroCART® 75-4 Purosphere® STAR RP-18e, vel částic 3 μ m, o rozměrech rozměry 75mm×4.0mm od německé firmy VWR, Darmstadt. Tato kolona byla ještě chráněna pomocí předkolony Kromasil® 100A, C18, 5 μ m (15mm×4.6mm) od španělské firmy Scharlab S.L., Barcelona. Mobilní fáze se skládala z 0,1% kyseliny mravenčí o pH 2,6 a acetonitrilu v gradientovém módu eluce. Analýza byla provedena při teplotě 10°C. Detekce byla provedena pomocí DAD detektoru, kdy ketorolac absorboval při vlnové délce 315 nm. Metoda byla shledána citlivou a vhodnou pro stanovení NSAID v odpadních vodách. (117)

Loretta Franceschi, Sara D'aronco a Mario Furlanut se ve svém výzkumu, jehož výsledky byly publikovány v roce 2010 zabývali vývojem HPLC metody monitorování hladiny ketorolaku v synoviální tekutině u pacientů trpících revmatismem. Vzorky synoviální tekutiny byly upraveny pomocí SPE. Chromatografická separace byla dosažena pomocí kolony Beckman C18 (250 mm x 2.1 mm, velikost částic 5 μ m), která byla chráněna předkolonou LichroCART 4-4 RP-18 (Merck, Darmstadt, Německo). Mobilní fáze byla tvořena směsí methanolu, acetonitrilu, 2-propanolu a 0,02 molárního fosfátového pufru v objemovém poměru 10:25:5:60. Rychlost toku mobilní fáze byla nastavena na 0,2 ml/min. Detekce proběhla pomocí UV detektoru při 313 nm. Metoda se dobře osvědčila k danému účelu a vzhledem k vysoké citlivosti byla shledána vhodou i pro farmakokinetické studie. (118)

4.2.9 2011

Syed Naeem Razzaq, Muhammad Ashfaq, Islam Ullah Khana a Irfana Mariam se v roce 2011 zabývali vývojem HPLC metody pro současné stanovení ofloxacinu a ketorolaku ve farmaceutických lékových formách v rámci stabilitních studií. Jako kolona byla vybrána BDS Hypersil C8 kolona (250 x 4.6 mm, velikost částic 5 μ m) a mobilní fáze se skládala

z methanolu a fosfátového pufru o pH 3 v objemovém poměru 55:45. Rychlost toku mobilní fáze byla nastavena na 0,8 ml za minutu. Detekce proběhla pomocí DAD detektoru při absorpčním maximu ketorolaku 270 nm. Metoda byla úspěšně validována dle ICH. (119)

4.2.10 2012

Sunil K. Dubey, Jangala Hemanth, Chiranjeevi Venkatesh K., R.N. Saha a S. Pasha v roce 2012 vyvinuli novou metodu chirální RP-HPLC analýzy ketorolaku. Byla použita kolona chiral-AGP (100mm x 4.0mm, velikost částic 5 μ m, Chrom Tech Ltd., Švédsko) Optimální složení mobilní fáze tvořil 0,1 M sodnofosfátovýpufr (o pH 4,5) a 2-propanol v objemovém poměru 98:2 a její rychlost toku byla nastavena na 1 ml za minutu. Detekce pomocí UV detektoru proběhla při 322 nm. Metodou se podařilo dobře rozlišit oba enantiomery a prokázala dobré hodnoty linearitu, přesnosti a citlivosti a byla validována dle ICH. (120)

Dharti Patel, Mehul Patel a Ketan Patel v roce 2012 publikovali práci na téma současného stanovení moxifloxacinu HCl a ketorolaku tromethaminu v očních lékových formách. Jako kolona byla zvolena Hypersil BDS C18 kolona (250mm \times 4.6 mm, velikost částic 5 μ m). Mobilní fáze se skládala z octanového pufru, jehož pH bylo upraveno na hodnotu 4 pomocí kyseliny orthofosforečné a acetonitrilu v poměru 40:60. Metoda byla shledána dostatečně specifickou, lineární, správnou, přesnou a robustní a byla validována dle ICH. (121)

Syed Naeem Razzaq and Islam Ullah Khan, Muhammad Ashfaq a Irfana Mariam se v roce 2012 zabývali současným stanovením moxifloxacinu hydrochloridu a ketorolaku tromethaminu v kombinovaných lékových formách v rámci stabilitních studií. Byla použita kolona BDS Hypersil C8 (250 \times 4.6 mm, velikost částic 5 μ m). Mobilní fáze byla tvořena methanolem a fosfátovým pufrem (o pH 3) v objemovém poměru 55:45. Rychlost toku mobilní fáze byla 0,7 ml za minutu a analýza proběhla při teplotě 25 $^{\circ}$ C \pm 2 $^{\circ}$ C. Metoda se osvědčila jako schopná separovat píky aktivních ingrediencí a jejich rozkladných produktů, splnila validační parametry a byla úspěšně validována dle ICH. (122)

O' Connor N., Geary M., Wharton M. a Curtin L v roce 2012 vyvinuli rychlou metodu kapalinové chromatografie k analýze ketorolaku a jeho příbuzných nečistot. K analýze byla zvolena kolona X-bridge – C8 (3mm x 75mm, velikost částic 2.5 μ m) od firmy Waters. Mobilní fáze byla tvořena tetrahydrofuranem a 0,05 molárním dihydrogenfosforečnanem amonným o pH 3 v objemovém poměru 28:72 a její rychlost toku byla 1,7 ml za minutu. Detekce pomocí UV detektoru proběhla při vlnové délce 313 nm. Metoda byla validována dle ICH a byla shledána vhodou k rutinnímu stanovení obsahu ketorolaku a příbuzných látek v lékových formách. (123)

4.2.11 2013

B. Raja a A. Lakshmana Rao v roce 2013 publikovali práci zabývající se vývojem a validací metody současného stanovení febuxostatu a ketorolaku v kombinovaných lékových formách pomocí RP-HPLC. Byla použita C18 kolona (150 x 4.6 mm, 5 μ) a mobilní fáze byla tvořena fosfátovým pufrem a acetonitrem v objemovém poměru 50:50. Rychlost průtoku mobilní fáze byla 0,7 ml za minutu a detekce pomocí UV detektoru byla provedena při 299 nm.

Analýza proběhla při teplotě 30°C. Metoda splnila validační parametry dle ICH a byla úspěšně aplikována při rutinních kontrolách kvality tablet obsahujících dané látky. (124)

Rahul Singh, Ashish Pathak a Pooja Chawla v roce 2013 vyvinuli metodu současného stanovení ketorolaku a sparfloxacinu pomocí RP-HPLC. V této metodě byla použita Hypersil-Keystone C-18 kolona a mobilní fáze tvořená směsí methanolu a vody (s pH upraveným pomocí kyseliny fosforečné na 3,1) v objemovém poměru 60:40. K detekci byl použit UV detektor při vlnové délce 308 nm. Metoda byla validována dle ICH a byla shledána vhodnou k rutinním analýzám ketorolaku a sparfloxacinu v jejich farmaceutických lékových formách. (125)

S. K. Dubey, S. Duddelly, H. Jangala, a R. N. Saha se v roce 2013 zabývali vývojem metody stanovení ketorolaku v jeho lékových formách pomocí RP-HPLC. Byla použita kolona Oyster BDS (150×4.6 mm, velikost částic 5 µm). Mobilní fáze byla připravena z methanolu, acetonitrilu a 0,02 molárního dihydrogenfosforečnanu sodného o pH 5,5 v objemovém poměru 50:10:40 a rychlost jejího toku byla nastavena na 1 ml za minutu. Jako interní standard byl k roztokům vzorků přidán diklofenak. Ketorolak byl detekován UV detektorem při maximu vlnové délky 322 nm. Metoda byla validována dle ICH. (126)

4.2.12 2014

Pradipbhai D. Kalariya, Deepak Namdev, R. Srinivas a S. Ganadhamu v roce 2014 publikovali práci, ve které se zabývali nalezením vhodných RP-HPLC podmínek pro stanovení moxifloxacinu HCl a ketorolaku tromethaminu v očních kapkách. Jako kolona byla využita Grace Smart RP C 18 column (250mm x 4.6mm, velikost částic 5.0 µm). Použitá mobilní fáze se skládala z methanolu a fosfátového pufru o koncentraci 25 mmol/l s pH upraveným kyselinou fosforečnou na hodnotu 3,2 v objemovém poměru 60:40. Rychlost toku mobilní fáze byla nastavena na 1,2 ml/min a detekce pomocí UV detektoru proběhla při 308 nm. Při použití těchto podmínek bylo dosaženo dobrého rozlišení a čas analýzy byl pro obě látky nižší než 7 minut. Metoda byla validována dle ICH. (127)

B.Prathap, Akalanka Dey a G.H. Srinivaso Rao v roce 2014 publikovali práci na téma vývoj a validace metody současného stanovení febuxostatu a ketorolaku v krysí plasmě pomocí RP-HPLC. Jako kolona byla zvolena Symmetry C18 (150 X 4.6 mm), s velikostí částic 5µm. Mobilní fáze se skládala z acetonitrilu a triethylaminového pufru (s pH upraveným na 6 pomocí kyseliny orthofosforečné) v poměru 40:60. Rychlost toku mobilní fáze byla nastavena na 1,0 ml za minutu a eluát byl detekován PDA detektorem při 255 nm. Metoda byla shledána jednoduchou, přesnou, správnou a specifickou pro stanovení uvedených analytů v plasmě a byla validována dle ICH. (128)

Bhagyashree R. Dhumal¹, Kishor P. Bhusari¹, Madhukar R. Tajne², Mahavir H. Ghante¹ a Nishant S. Jain v roce 2014 publikovali práci zabývající se vývojem metody stabilitních studií stanovení ketorolaku tromethaminu a jeho rozkladných produktů ve farmaceutických lékových formách pomocí HPLC. Byla použita kolona PrincetonSPHER-100 C8 100A (250 x 4.6 mm, 5 µm) a mobilní fáze složená z pufru (tvořen vodou a ledovou kyselinou octovou) a methanolem v objemovém poměru 35:65 při rychlosti toku 1 ml za minutu. Za těchto

podmínek se ketorolak eluoval v přijatelném retenčním čase (5,321 min) a výsledkem byl ostrý symetrický pík. Detekce proběhla při vlnové délce 254 nm. Metoda ukázala dobrou separaci ketorolaku od jeho rozkladných produktů a byla validována dle parametrů ICH. (129)

V. Ramakrishna, P.V.V. Satyanarayana a B.Hari Babu v roce 2014 publikovali práci, ve které se zabývali vývojem a validací metody současného stanovení oflaxacinu a ketorolaku tromethaminu v kombinovaných lékových formách. Jako kolona byla v této metodě zvolena Thermo hypersil BDS C18 kolona (250mmx4.6mm, particle size 5µm). Mobilní fáze byla připravena z vody (jejíž pH bylo upraveno pomocí kyseliny orthofosforečné na hodnotu 2,8) a methanolu v objemovém poměru 60:40. Rychlost průtoku mobilní fáze byla nastavena na 1 ml za minutu a analýza probíhala při teplotě 30°C. Eluáty byly detekovány při vlnové délce 241 nm. Metoda byla validována dle ICH a byla shledána snadnou, rychlou a přesnou, tudíž vhodnou pro současné stanovení zmíněných látek v kombinovaných lékových formách. (130)

Dhiraj A. Khairnar, Chetan S. Chaudhari a Sanjay P. Anantwar v roce 2014 vyvinuli novou metodu stanovení ketorolaku v tabletových lékových formách pomocí RP-HPLC. Byla použita Grace C18 kolona (250 cm × 4.6 mm, velikost částic 5µ). Mobilní fáze byla připravena z methanolu a vody okyselené 0,01 % kyselinou orthofosforečnou v objemovém poměru 65:35 a rychlost jejího toku byla 1 ml za minutu. UV detekce byla provedena při 245 nm. Metoda byla validována dle ICH a byla shledána vhodnou k rutinním kvantitativním analýzám ketorolaku v tabletových lékových formách. (131)

4.2.13 2015

Bandala Kostewara Rao, Golkonda Ramu, Illuru Jyothsna Kumari a Chintala Rambabu v roce 2015 publikovali vědeckou práci, jejímž tématem bylo navržení nové RP-HPLC metody stabilitní studie ketorolaku tromethaminu ve farmaceutických lékových formách. V této metodě byla použita kolona inertsil ODS, C18 (150 mm × 4.6 mm × 5.0 µ) a mobilní fáze obsahující 100 mM fosfátový pufr o pH 4,5 a acetonitril v objemovém poměru 60:40. Rychlost toku mobilní fáze byla nastavena na 0,8 ml za minutu a analyty byly detekovány pomocí PDA detektoru při 316 nm. Pomocí této metody se podařilo separovat ketorolak od jeho rozkladných produktů a metoda prokázala dobré hodnoty validačních parametrů ICH, podle nichž byla také validována. (132)

Priyadarshani S Bansode, Chetan Singh Chauhan, Ravindra Kamble, Preeti Gopaliya a Chatrapal Singh v roce 2015 vyvinuli metodu stanovení moxifloxacinu a ketorolaku ve farmaceutických lékových formách pomocí RP-HPLC. Byla použita C₁₈ kolona a mobilní fáze se skládala z fosfátového pufru a acetonitrilu v poměru 60:40. K detekci byl zvolen UV detektor, kdy ketorolak projevil absorpční maximum při 245 nm. Tato metoda byla shledána přesnou, správnou, snadnou, selektivní, citlivou a poměrně rychlou a byla validována a doporučena k rutinní analýze při kontrolách kvality. (133)

Dave JB, Vyas PJ a Patel CN v roce 2015 vyvinuli novou HPLC metodu pro stanovení moxifloxacinu a ketorolaku v očních kapkách v rámci stabilitních studií. Pro analýzu byla zvolena ACE C₁₈ kolona (150 mm × 4.6 mm, velikost částic 5 µm). Mobilní fáze se skládala z 0,01 molárního fosfátového pufru o pH 4,6 a acetonitrilu v objemovém poměru 75:25 a

rychlost jejího toku byla nastavena na 1 ml za minutu. Detekce UV detektorem proběhla při maximu vlnové délky 307 nm. Metoda byla validována na linearitu, přesnost, správnost, robustnost, specifitu, limit detekce a limit kvantifikace. (134)

4.2.14 Shrnutí

Na dané téma byly nalezeny publikace od poloviny 90. let do současnosti. Velká pozornost vědců z mnoha pracovišť je věnována chirální analýze ketorolaku, kdy největší uplatnění nacházela AGP kolona (stacionární fáze obsahuje navázaný alfa-glykoprotein) a mobilní fáze se nejčastěji skládala z propanolu a fosfátového pufru v různých poměrech. Část prací se také věnovala stanovení ketorolaku ve farmaceutických lékových formách, kdy se často jednalo o formy kombinované (především kombinace s chinolonovými antibiotiky v očních kapkách). Bylo validováno několik metod vhodných k stabilitním studiím a kontrolám kvality. Jedná se o metody RP-HPLC, které využívají kolony C₁₈, popř. C₈ od různých firem o různých rozměrech. Jako mobilní fáze se ve většině případů uplatňuje acetonitril a fosfátový pufr o různých poměrech, výjimečně je použit i methanol. Bylo nalezeno také několik prací věnujících se analýze biologických vzorků, ať už se jedná o plasmu, synoviální tekutinu, či oční tekutinu. Vzorky byly nejčastěji upravovány pomocí SPE a k analýze byla opět využita výše zmíněná metoda RP-HPLC.

5 Experimentální část

5.1.1 Použité přístroje, materiál, pomůcky a chemikálie

5.1.1.1 Přístroje

Kapalinový chromatograf LC 20, Shimadzu, Japonsko

Analytické váhy KERN ALS-220-4N, Německo

Ultrazvuková lázeň K 10, Kraitek, Slovensko

Detektor PDA model SPD-M20A, Shimadzu, Japonsko

Acidimetr 333 Druopta Praha, Česká republika

5.1.1.2 Chromatografický materiál

Discovery® HS C18 HPLC Column, 15 cm × 4.6 mm, 5 μm, Sigma-Aldrich USA

CHIRALCEL®OD-R, 0,46 cm x 25 cm, 10μm, Daicel chem. industries, Japonsko

5.1.1.3 Pomůcky

Filtrační papír

Laboratorní sklo

Lžičky

5.1.1.4 Chemikálie

Acetonitril, Chromasolv, Sigma-Aldrich, USA

Dihydrogenfosforečnan draselný, Penta Chrudim, ČR

Chloristan sodný, Penta Chrudim, ČR

Ketorolak, Sigma Aldrich

Kyselina o-fosforečná 85 %, p.a., Penta Chrudim, ČR

Methanol, Chromasolv, Sigma-Aldrich, USA

Octan amonný, Balex, Pardubice – Rosice na L., Česká republika

Tiaprofenová kyselina, Sigma-Aldrich, USA

Voda čištěná reverzní osmózou

5.1.2 Vypracování chromatografických podmínek pro HPLC analýzu ketorolaku

Vypracování optimálních chromatografických podmínek spočívalo zejména v nalezení vhodné stacionární a mobilní fázi, výběru vnitřního standardu a zvolení ideální průtokové rychlosti a teploty.

5.1.2.1 Výběr stacionární a mobilní fáze

Na základě analýzy dostupných prací, zabývajících se analýzou ketorolaku byla pro analýzu vybrána kolona Discovery[®] HS C18 HPLC Column, 15 cm × 4.6 mm, velikost částic velikost 5 µm. Na této zvolené koloně byly následně vyzkoušeny následující mobilní fáze o různém složení.

Methanol : roztok octanu amonného 0,01 mol/l okyselený kyselinou octovou na pH 5,5; 50:50 (v/v)

Methanol : roztok dihydrogenfosforečnanu draselného 0,01 mol/l okyselený kyselinou fosforečnou na pH 3,5; 50:50 (v/v)

Methanol : roztok dihydrogenfosforečnanu draselného 0,01 mol/l okyselený kyselinou fosforečnou na pH 3,5; 40:60 (v/v)

Acetonitril : roztok octanu amonného 0,01 mol/l okyselený kyselinou octovou na pH 5,5; 50:50 (v/v)

Acetonitril : roztok dihydrogenfosforečnanu draselného 0,01 mol/l okyselený kyselinou fosforečnou na pH 3,25; 50:50 (v/v)

Acetonitril : roztok dihydrogenfosforečnanu draselného 0,01 mol/l okyselený kyselinou fosforečnou na pH 3,25; 40:60 (v/v)

5.1.2.2 Výběr vnitřního standardu

Jako interní standard byla zvolena kyselina tiaprofenová.

5.1.2.3 Další chromatografické podmínky

Teplota byla nastavena na 25°C, maximální tlak 20 Mpa a rychlost toku 1 ml za minutu.

5.1.2.4 Příprava mobilní fáze

Pro přípravu 1 l roztoku fosfátového pufru bylo naváženo 1,36 g dihydrogenfosforečnanu draselného a toto množství následně rozpuštěno v 1000 ml vody čištěné reverzní osmózou, pH tohoto roztoku bylo následně upraveno pomocí kyseliny fosforečné na hodnotu 3,5. Roztok byl poté smíchán s acetonitrem popřípadě methanolem v uvedeném poměru.

5.1.2.5 Příprava vzorků

Vorek č. 1 byl připraven rozpuštěním 3,8 mg ketorolaku v 10 ml methanolu v odměrné baňce o objemu 10 ml. Vzniknul tak roztok ketorolaku o koncentraci 10^{-3} mol/l, z něhož byl po důkladném rozpuštění za použití ultrazvukové lázně odebrán vzorek do skleněné vialky k HPLC analýze.

Vzorek č. 2 obsahoval IS, kyselinu tiaprofenovou. 2,6 mg této látky bylo rozpuštěno v metholu v 10 ml odměrné baňce. Vznikl takto roztok kyseliny tiaprofenové o koncentraci 10^{-3} mol/l. Po důkladném rozpuštění byla část vzorku odebrána do vialky a tím připravena k analýze v HPLC přístroji.

Vzorek číslo 3 se skládal z 1 ml vzorku číslo 1 a stejného množství vzorku číslo 2, které byly odebrány do vialky a důkladně promíchány. Vzorky byly na kolonu vstříkány v objemu 10 µl, resp. objemu dvojnásobném u vzorku č. 3.

5.1.3 Vypracování chromatografických podmínek pro chirální HPLC analýzu ketorolaku

Pro chirální analýzu ketorolaku byly použity stejné vzorky jako v předchozí části experimentu, tedy i stejný interní standard. Liší se tedy pouze použitá kolona, mobilní fáze a byly také mírně upraveny další chromatografické podmínky jako teplota, maximální tlak a rychlost toku mobilní fáze.

5.1.3.1 Výběr stacionární a mobilní fáze

Jako kolona byla použita chirální kolona od firmy Daicel chem. industries, LTD, CHIRALCEL®OD-R o rozměrech 0,46 cm x 25 cm o velikosti částic 10µm. Na této koloně bylo vyzkoušeno několik následujících mobilních fází o různém složení.

Methanol : chloristanový pufr o koncentraci 1 mol/l; 50:50 (v/v)

Acetonitril : chloristanový pufr o koncentraci 1 mol/l; 50:50 (v/v)

Acetonitril : chloristanový pufr o koncentraci 1 mol/l; 40:60 (v/v)

5.1.3.2 Příprava mobilní fáze

Pro přípravu 1l chloristanového pufru o koncentraci 1 mol/l bylo naváženo 146,4 g chloridu amonného, zředěno 1 l vody čištěné reverzní osmózou a následně okyseleno kyselinou chloristou na pH 3,16. Tento tlumivý roztok byl následně smíchán s methanolem nebo acetonitrilem v uvedených poměrech.

5.1.3.3 Další chromatografické podmínky

Vzhledem k použité koloně bylo nutné snížit rychlost průtoku mobilní fáze na 0,5 ml/min, maximální tlak na 16 MPa a teplotu na 24°C.

5.2 Výsledky a diskuze

5.2.1 Chromatografické podmínky pro HPLC analýzu ketorolaku.

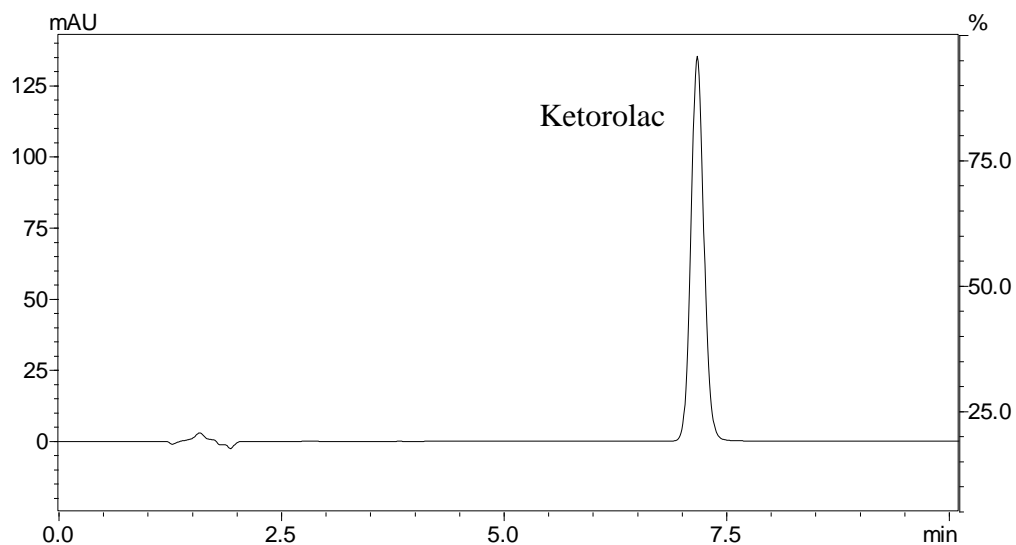
5.2.1.1 Stacionární a mobilní fáze

K analýze byla zvolena kolona Discovery® HS C18 HPLC Column, 15 cm × 4.6 mm, velikost částic velikost 5 µm, která byla vybrána na základě prostudování předchozích analýz ketorolaku, kde se tato (nebo velmi podobné kolony) nejvíce osvědčily.

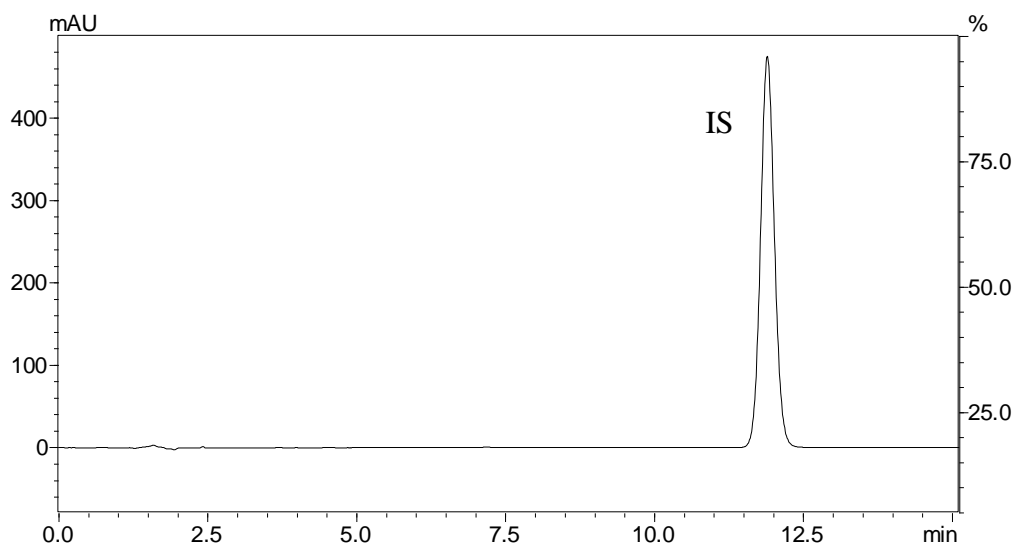
Dále byly zkoušeny mobilní fáze o různém složení. Vždy byly analyzovány všechny vzorky, tedy roztok ketorolaku, interního standardu i kombinace obou látek. Z organických fází se více než methanol osvědčil z hlediska retenčních vlastností, tvaru píku a celkové interpretivnosti chromatogramu acetonitril. A jako vodná fáze bylo lepších výsledků dosaženo při použití fofátového pufru oproti pufru octanového, zbývalo tedy nalezení co nejvhodnějšího poměru těchto látek.

Při poměru fosfátový pufr : acetonitril 50:50 byly retenční časy ketorolaku a IS zhruba 3,5 a 4 minut, což by bylo za normálních okolností z hlediska rychlosti analýzy výhodné. Zde se ovšem předpokládá budoucí využití metody při analýze biologického materiálu, kdy se v prvních minutách většinou eluují balastní látky, proto je lepší, aby retenční čas analytů byl vyšší, aby nedocházelo k překrývání píků.

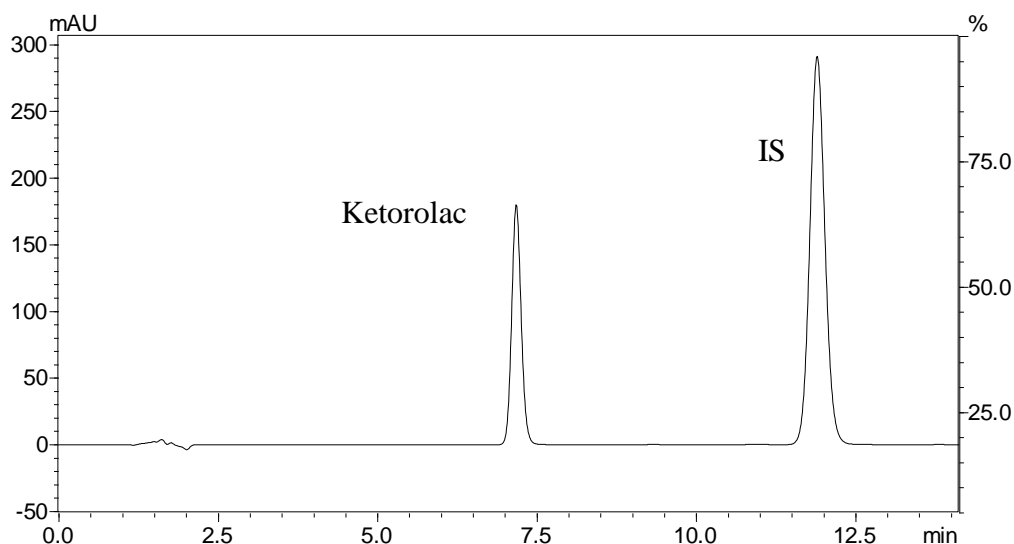
Jako optimální byl zvolen poměr acetonitrilu a fosfátového pufru 40:60, čímž došlo k posunutí retenčních časů ketorolaku a kyseliny tiaprofenové na cca 7,2 resp. 11,9 minut. Viz přiložené chromatogramy.



Obrázek 6 Chromatografický záznam vzorku č. 1, roztoku ketorolaku (10⁻³ mol/l). Chromatografické podmínky viz str. 52.



Obrázek 7 Chromatografický záznam vzorku č. 2, roztoku kyseliny tiaprofenové (10⁻³ mol/l). Chromatografické podmínky viz str. 52.



Obrázek 8 Chromatografický záznam vzorku č. 3, směsi roztoků ketorolaku (10-3 mol/l) a kyseliny tiaprofenové (10-3 mol/l) v poměru 1:1. Chromatografické podmínky viz str. 52.

5.2.1.2 Interní standard

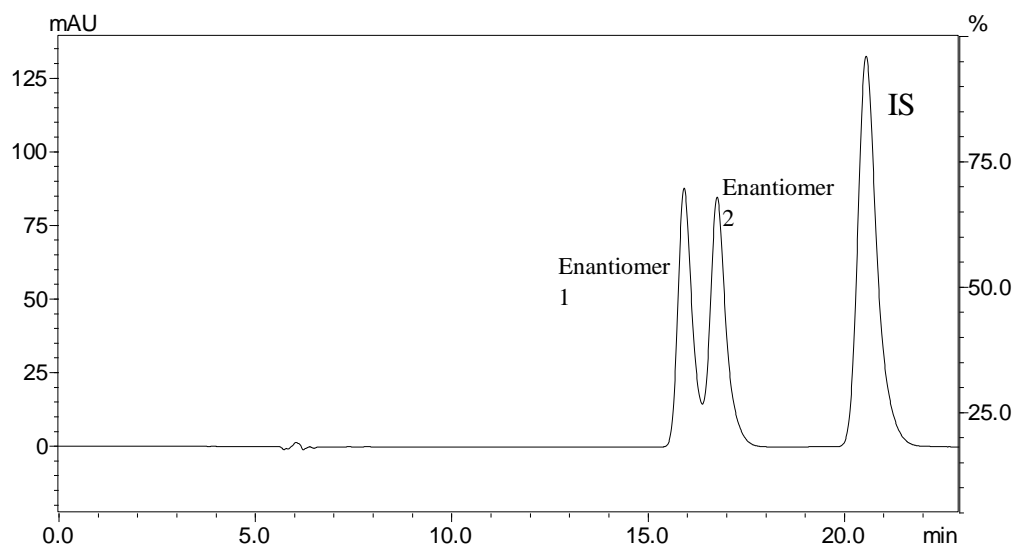
Interní standard se musí eluovat samostatně, nesmí reagovat se zkoušenou látkou, musí být stálý a nesmí obsahovat nečistoty s retenčním časem podobným retenčnímu času zkoušené látky. Všechny tyto vlastnosti zvolený vnitřní standard kyselina tiaprofenová splňuje. Navíc je strukturně blízká ketorolaku, tudíž se eluuje v dostatečné blízkosti analytu a poskytuje v daných podmínkách symetrický pík. Viz chromatogram. Zvolený vnitřní standard byl tedy shledán jako velmi vhodný.

5.2.2 Chirální analýza ketorolaku pomocí HPLC

5.2.2.1 Stacionární a mobilní fáze

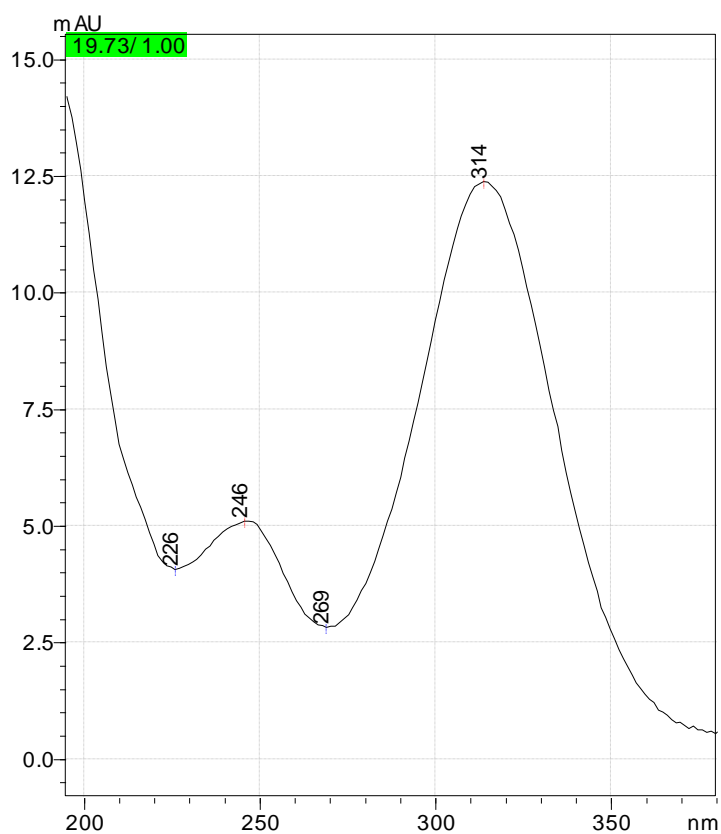
Byla použita kolona CHIRALCEL®OD-R o rozměrech 0,46 cm x 25 cm o velikosti částic 10 μ m od firmy Daicel chem. industries, LTD. Jedná se o moderní chirální kolonu, která se v chirální separaci ketorolaku osvědčila.

Jako mobilní fáze byly vyzkoušeny roztoky methanolu nebo acetonitrilu s chloristanovým pufrem o koncentraci 1 mol/l. Při použití methanolu nebylo dosaženo požadované separace, zatímco po použití acetonitrilu a tlumivého roztoku v poměru 40:60 byly od sebe oba enantiomery dostatečně separovány, jak je patrné z příloženého chromatografického záznamu. I zde se osvědčilo použití tiaprofenové kyseliny jako vnitřního standardu.



Obrázek 9 Chromatografický záznam chirální analýzy vzorku č. 3, směsi roztoků ketorolaku (10-3 mol/l) a kyseliny tiaprofenové (10-3 mol/l) v poměru 1:1. Chromatografické podmínky viz str. 53

K detekci byl použit detektor PDA model SPD-M20 A v nastaveném rozmezí vlnových délek 190-800 nm. Byla získána UV spektra obou enantiomerů (viz níže)

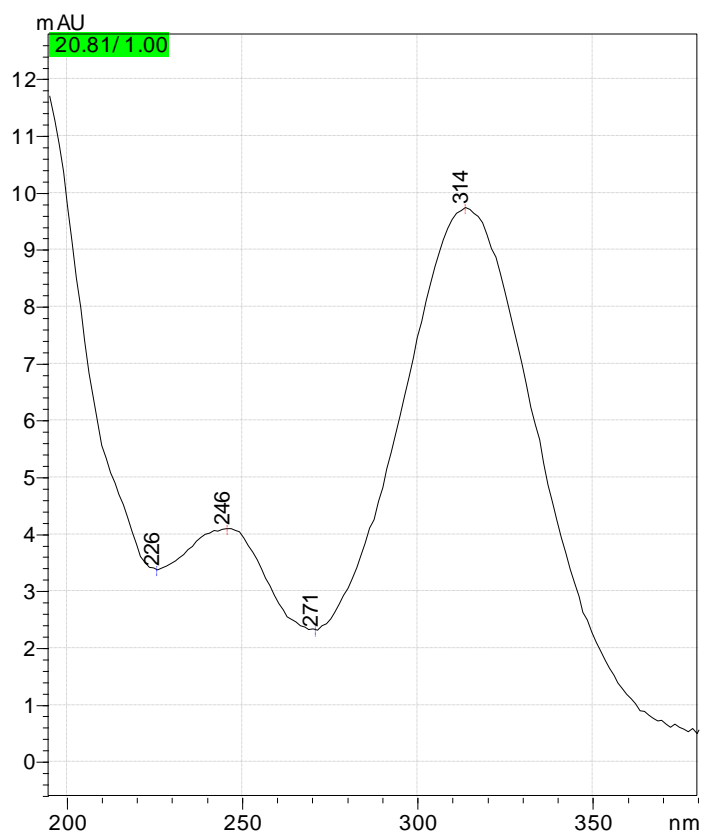


Obrázek 10 UV spektrum enantiomer č. 1

Absorpční maxima:

Tabulka 4 absorpční maxima enantiomer č. 1

Vlnová délka (nm)	Absorbance
226	4,02
246	5,04
269	2,98
314	12,45



Obrázek 11 UV spektrum enantiomer č. 2

Absorpční maxima:

Tabulka 5 absorpční maxima enantiomer č.2

Vlnová délka (nm)	Absorbance
226	3,41
246	4,12
271	2,32
314	9,62

6 Závěr

V této diplomové práci byla vypracována rešerše dostupných prací, zabývajících se HPLC analýzou fenofibrátu a ketorolaku. Většinou se jednalo o metody RP-HPLC, které využívaly kolony C₁₈, popř. C₈ a mobilní fáze složené z vody a acetonitrilu, popř. methanolu v různých poměrech a s použitím různých pufrů (nejčastěji pufr fosfátový). Na základě těchto zjištění byla poté navržena a vyzkoušena vlastní metoda HPLC analýzy jedné ze zkoumaných látek, a to ketorolaku. Byla zvolena kolona Discovery[®] HS C18, mobilní fáze acetonitril:fosfátový pufr v objemovém poměru 40:60 a jako interní standard byla zvolena kyselina tiaprofenová. Navržená metoda se osvědčila a v budoucnu by mohlo dojít k její validaci a aplikaci v praxi, především při stanovování lékových hladin ketorolaku.

Další zkoušenou metodou byla chirální analýza ketorolaku. Byla navržena metoda přímá, za použití chirální kolony CHIRALCEL[®]OD-R a mobilní fáze Acetonitril : chloristanový pufr o v objemovém poměru 40:60. I zde se jako interní standard osvědčila tiaprofenová kyselina. Pomocí této metody se úspěšně podařilo rozdělit oba enantiomery ketorolaku. Metoda má velký potenciál a mohla by být v budoucnosti validována a nalézt uplatnění v praxi, například ve studiích farmakokinetiky této látky. Ketorolak se dosud podává pacientům jako racemická směs, ačkoliv bylo zjištěno, že jeho S-forma je mnohem účinnější, pokud by v budoucnosti došlo k vývoji léčivých přípravků obsahujících pouze S-formu, mohla by tato metoda být aplikována ke kvalitativnímu hodnocení těchto léčivých přípravků.

Co se týče druhé látky, která byla předmětem zájmu této diplomové práce, a to fenofibrátu, na základě rešeršní práce byly navrženy chromatografické podmínky pro jeho analýzu. Jako kolona byla navržena kolona s náplní C₁₈ o rozměrech 250x4.6 mm a velikosti částic 5 μm (např. kolona Luna od firmy Phenomenex, Kromasil či Inertsil od Sigma-Aldrich, LiChrospher 60 RP-select B od firmy Merck, Zorbax od Agilent nebo Pinnacle od firmy Restek). Jako mobilní fáze byla navržena směs acetonitrilu a fosfátového pufru (o pH okolo 3,16) v objemovém poměru 50:50 nebo 60:40. Navrhovaný způsob detekce je pomocí UV-VIS detektoru při vlnové délce okolo 286 nm. Tyto podmínky je nutné ověřit, upravit a doplnit např. o teplotu, rychlost toku mobilní fáze a maximální tlak experimentální cestou. Vývojem konkrétní metody se bude zabývat další výzkum, jehož výsledky budou publikovány v případné rigorózní práci.

7 Zdroje

1. Leslie S. Ettre. M.S. Tswett and the Invention of Chromatography. *LC•GC Europe* [online]. 2003 [cit. 2015-03-22]. Dostupné z: http://images.alfresco.advanstar.com/alfresco_images/pharma/2014/08/22/4c389281-51ae-48c6-94e5-c533cbbbd574/article-69718.pdf
2. KAZAKEVICH, Yuri a Rosario LOBRUTTO. *HPLC for pharmaceutical scientists*. Hoboken, N.J.: Wiley-Interscience, 2007, s. 3-24. ISBN 0471681628.
3. Snyder, L. R., Kirkland, J. J. a Dolan, J. W. *Introduction to modern liquid chromatography*. Hoboken: John Wiley & Sons, 2010. ISBN 978-0-470-16754.
4. Chromatograf schéma [online]. [cit. 2015-03-22]. Dostupný z: http://www.intechopen.com/source/html/44034/media/image2_w.jpg
5. Moldoveanu, S. C. a David, V. *Essentials in modern HPLC separations*. Amsterdam : Elsevier, 2013. stránky 1-52. ISBN: 978-0-12-385013-3
6. Swartz, M. HPLC detectors: A brief review. *J. Liq. Chromatogr. Related Technol.* 2010, 33, s. 1130–115
7. Holčapek, M. Mass Spectrometry Group, Univerzita Pardubice. Hmotnostní spektrometrie v organické analýze [online]. [cit. 2015-03-20]. Dostupné z: <http://holcapek.upce.cz/vyuka-ms-org-anal.php>.
8. J. Klimeš a kol.: *Kontrola léčiv I.*, Karolinum, Praha 2002
9. M. Šaršúnová: *Základné pojmy vo vysoučinnnej kvapalinovej chromatografii*. In M. Šaršúnová, O. Manč: *Vysokoučinná kapalinová chromatografia vo farmácii abiochémii*, Osveta 1985
10. J. Klimeš: *Kontrola léčiv II*, Karolinum, Praha 2002
11. Kolektiv autorů. *Český lékopis 2009*. Praha : Grada publishing, 2009. ISBN 978-80-247-2994-7.
12. HPLC Basics: Introduction – Chromatographic descriptors. [HTTPS://CHROMBLOG.WORDPRESS.COM/](https://chromblog.wordpress.com/). *Advanced Chromatography Solutions* [online]. [cit. 2015-03-23]. Dostupné z: <https://chromblog.wordpress.com/2013/07/16/hplc-basics-introduction-chromatographic-descriptors/>
13. Petra Kovaříková, Ján Stariat. *Kvalitativní a kvantitativní analýza: Vývoj analytické metody* [online]. [cit. 2015-03-23]. DOI: CZ.1.07./2.2.00/28.0194. Dostupné z: http://dl1.cuni.cz/pluginfile.php/241561/mod_resource/content/5/Lekce%207_Kvalita%2C%20kvan-tita%2C%20vyvoj%20metody.pdf
14. G. Szepesi.: *How to use reverse phase HPLC*, VCH Publishers Inc., New York 1992.
15. Hansen, S. H., Pedersen-Bjergaard, S. a Rasmussen, K. E. *Introduction to Pharmaceuticalchemical analysis*. Chichester : John Wiley & Sons Ltd., 2012. s. 141-161. ISBN 978-0-470-66122-2.
16. Hemström, P a Irgum, K. Hydrophilic interaction chromatography. *J. Sep. Sci.* 2006, 29, s. 1784-1821.
17. Thurman, E. M. a Mills, M. S. *Solid-Phase Extraction, Principles and Practice*. New York : John Wiley & Sons, 1998. ISBN 978-0-471-61422-7.
18. Kole, P. L., a další. Recent advances in sample preparation techniques for effective bioanalytical methods. *Biomed. Chromatogr.* 2011; 25: 199-217.
19. Kaushal C, Srivastava B, *A Process of Method Development: A Chromatographic Approach*. *J. Chem. Pharm. Res.*, 2010, 2(2): 519-545.
20. *Buffers and pH Buffers* [online]. [cit. 2015-03-22]. Dostupné z: www.xtremepapers.com
21. *Understanding pH Buffers: which one to use, and at what concentration* [online]. [cit. 2015-03-22]. Dostupné z: www.laserchrom.co.uk.
22. *Technical Tips: Selecting Buffers pH in Reversed-phase HPLC* [online]. [cit. 2015-07-22]. Dostupné z: download.5117.com/data/file/30.pdf
23. *Reversed-phase HPLC Buffers: High Quality Buffers (solutions, solids or concentrates)* [online]. [cit. 2015-03-22]. Dostupné z: www.chem.pitt.edu/wipf/web/HPLC_RP_buffers.pdf
24. *Buffers and Buffering Capacity* [online]. [cit. 2015-03-22]. Dostupné z: www.bartek.ca

25. *HPLC Column Fundamentals 4: Method Development* [online]. [cit. 2015-03-26]. Dostupné z: <http://www.sigmaaldrich.com/video/analytical/hplc-fundamentals-method-development.html>
26. Kazakevich, Y. a LoBrutto, R. *HPLC for pharmaceutical scientists*. Hoboken : John Wiley & Sons, Inc., 2007. s. 77-80. ISBN 978-0-471-68162-5.
27. *Columns* [online]. [cit. 2015-03-27]. Dostupné z: <http://www.waters.com/watersdivision/pdf/lc3AC.pdf>
28. *Columns* [online]. [cit. 2015-03-27]. Dostupné z: <http://www.chem.agilent.com/en-US/Products-Services/Columns-Sample-Preparation/Pages/default.aspx>
29. *Columns* [online]. [cit. 2015-03-27]. Dostupné z: www.phenomenex.com
30. JEFFERY ., G.H.. 1989. *Vogel's textbook of quantitative chemical analysis*. 5th ed. Harlow: Longman Scientific. ISBN 05-824-4693-7.
31. KAZAKEVICH, Yuri a Rosario LOBRUTTO. *HPLC for pharmaceutical scientists*. Hoboken, N.J.: Wiley-Interscience, 2007, s. 77-80. ISBN 0471681628.
32. LINDHOLM, by Johan. *Development and validation of HPLC methods for analytical and preparative purposes*. Uppsala: Acta Universitatis Upsaliensis, 2004, s. 13-14. ISBN 9155460054. Bliesner D.M., Validating Chromatographic Methods, John Wiley & Sons, Inc. 2006; 88-92.
33. George Ngwa. Forced Degradation as an Integral Part of HPLC Stability-Indicating Method Development. *Drug Delivery Technology* [online]. [cit. 2015-04-22]. Dostupné z: http://www.particlesciences.com/docs/Forced_Degradation_Studies-DDT_June2010-rd3.pdf.
34. Tosoh Bioscience LLC: Technical Support. *System Suitability Calculations* [online]. [cit. 2015-06-15]. Dostupné z: <http://www.separations.us.tosohbioscience.com/ServiceSupport/TechSupport/ResourceCenter/ChromatographyCalculations/SystemSuitabilityCalculations.htm>
35. Reynolds DW, Facchine KL, Mullaney JF, Alsante KM, Hatajik TD, Mott MG. Available guidance and best practices for conducting forced degradation studies, *Pharm. Technol.* 2002, 26(2): 48–56.
36. *Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology: Text and Methodology* [online]. ICH. [cit. 2015-04-12]. Dostupné z: http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q2_R1/Step4/Q2_R1_Guideline.pdf.
37. John W. Dolan. *Peak Tailing and Resolution* [online]. [cit. 2015-04-02].
38. Yoshida T, Ronald E.M and Kumagai H, High-Speed Analyses using Rapid Resolution Liquid Chromatography on ZORBAX column packed 1.8 µm Particles, *Chromatography*, 28, 2007, 81-8
39. Maa YC, Wang XQ, Houa FF, Ma J, Luo M, Chena A, Jin P, Lua S, Xuaa I, Rapid resolution liquid chromatography (RRLC) analysis and studies on the stability of ShuangHuang-Lian preparations. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 2011, 54: 265–272.
40. Ian A, Darwin A, Eddie G, Christensen J, and Ryan M, Rapid Resolution Liquid Chromatography with Charged Aerosol Detection, Magellan Biosciences [online]. [cit. 2015-04-02]. Dostupné z: http://www.esainc.com/docs/spool/RRLC_CAD_Pittcon_2008.pdf
41. Sunil Kumar Reddy T, Balammal G and Saravana Kumar A, ULTRA PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY: AN INTRODUCTION AND REVIEW, *Int.J. Pharm. Res. An.*, 2012, 2: 24-31.
42. Van Demeter JJ, Zuiderweg EJ, Klinkenberg A. Longitudinal diffusion and resistance to mass transfer as causes of nonideality in chromatography. *Chem. Eng. Sci.*, 1956, 5: 271-289.
43. Van Deemter's curve [online]. [cit. 2015-04-02]. Dostupný z: http://www.restek.com/Technical-Resources/Technical-Library/Pharmaceutical/pharm_A016
44. *Ultra-fast liquid chromatography* [online]. [cit. 2015-04-13]. Dostupné z: <http://Schimadzu.co.uk>.
45. Chervet J.P., Ursem M., Salzmann. J.P., Instrumental requirements for nano-scale liquid chromatography. *Anal.Chem.*, 1996, 68: 1507-1512.
46. *Shimadzu Ultra Fast Liquid Chromatograph* [online]. [cit. 2015-04-13]. Dostupné z: http://www.ssi.shimadzu.com/products/literature/HPLC/SSI_Prominence_UFLC.pdf
47. Narayudu Yandamuri, K R Srinivas Nagabattula, Subrahmanya Swamy Kurra, Sahana Batthula, L P S Naines. Comparative Study of New Trends in HPLC: A Review. *Int.J. Pharm. Res.*

- An. [online]. 2013, 23(2): 52-57 [cit. 2015-05-04]. ISSN 0976 – 044X. Dostupné z: <http://globalresearchonline.net/journalcontents/v23-2/10.pdf>
48. Downing NS, Ross JS, Jackevicius CA, Krumholz HM. How Abbott's Fenofibrate Franchise Avoided Generic Competition. *Archives of internal medicine*. 2012;172(9):724-730. doi:10.1001/archinternmed.2012.187.
 49. Fenofibrate formula [online]. [cit. 2015-05-19]. Dostupný z: <http://www.drugfuture.com/Pharmacopoeia/USP32/pub/data/images/v32270/cas-49562-28-9.gif>
 50. VLČEK, Jiří, Daniela FIALOVÁ a Magda VYTRŽISALOVÁ. *Klinická farmacie*. 1. vyd. Praha: Grada, 2014, s. 120-121. ISBN 978-80-247-3169-8.
 51. STAELS, B., J. DALLONGEVILLE, J. AUWERX, K. SCHOONJANS, E. LEITERSDORF a J.-C. FRUCHART. Mechanism of Action of Fibrates on Lipid and Lipoprotein Metabolism. *Circulation* [online]. 1998, 98(19): 2088-2093 [cit. 2015-07-23]. DOI: 10.1161/01.CIR.98.19.2088. ISSN 0009-7322. Dostupné z: <http://circ.ahajournals.org/cgi/doi/10.1161/01.CIR.98.19.2088>
 52. Fenofibric acid formula [online]. [cit. 2015-05-19]. Dostupný z: <http://www.trc-canada.com/Structures/F248650.png>
 53. Fenofibrate Side Effects. <http://www.drugs.com/> [online]. [cit. 2015-05-23]. Dostupné z: <http://www.drugs.com/sfx/fenofibrate-side-effects.html>
 54. Fenofibrate Contraindications. <http://www.rxlist.com/> [online]. [cit. 2015-05-23]. Dostupné z: <http://www.rxlist.com/fenofibrate-drug/overdosage-contraindications.htm>
 55. Fenofibrate Drug Interactions. <http://www.drugs.com/> [online]. [cit. 2015-05-23]. Dostupné z: <http://www.drugs.com/drug-interactions/fenofibrate.html>
 56. Ketorolac: An Extensive History of Pain Relief. <http://www.sprix.com/> [online]. [cit. 2015-05-23]. Dostupné z: <http://www.sprix.com/Meet-SPRIX/Ketorolac-History.asp>
 57. Ketorolac formula [online]. [cit. 2015-05-25]. Dostupný z: <https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/6/63/Ketorolac.png/220px-Ketorolac.png>
 58. Intravenous Dilution Guidelines: Ketorolac tromethamine - Toradol®. <http://www.globalrph.com/> [online]. [cit. 2015-07-23]. Dostupné z: http://www.globalrph.com/ketorolac_dilution.htm
 59. Ketorolac Drug Interactions. <http://www.drugs.com/> [online]. [cit. 2015-05-23]. Dostupné z: <http://www.drugs.com/drug-interactions/ketorolac.html>
 60. CUNIBERTI, Luis Alberto, Ricardo Horacio REY a José Pablo WERBA. Determination of bezafibrate, ciprofibrate and fenofibric acid in human plasma by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. B* [online]. 1996, 687(2): 437-442 [cit. 2015-03-05]. ISSN 03784347. Dostupné z: [http://dx.doi.org/10.1016/S0378-4347\(96\)00254-XView_record_in_SciVerse_ScienceDirect_Journals_\(Elsevier\)](http://dx.doi.org/10.1016/S0378-4347(96)00254-XView_record_in_SciVerse_ScienceDirect_Journals_(Elsevier))
 61. DAWSON, Brian A., Sears, Roger W., Black, D. Bruce, Cyr, Terry D., Ethier, Jean-Claude. Fenofibrate raw materials: HPLC methods for assay and purity and an NMR method for purity. *J. Pharm. Biomed. Anal.* [online]. 1998, 18(3): 383-402 [cit. 2015-03-05]. ISSN: 07317085. Dostupné z: [http://dx.doi.org/10.1016/S0731-7085\(98\)00051-XView_record_in_SciVerse_ScienceDirect_Journals_\(Elsevier\)](http://dx.doi.org/10.1016/S0731-7085(98)00051-XView_record_in_SciVerse_ScienceDirect_Journals_(Elsevier))
 62. Lovin, I., Albu, F., Tache, F., David, V., & Medvedovici, A. Solvent and salting effects on sample preparation for the determination of fenofibric acid in human plasma by HPLC-DAD. *Microchem. J.* [online]. 2003, 75(3): 179–187 [cit. 2015-03-05]. Dostupné z: [http://doi.org/10.1016/S0026-265X\(03\)00093-6](http://doi.org/10.1016/S0026-265X(03)00093-6)
 63. EL-GINDI, A., Emara, S., Mesbah, M. K., & Hadad, G. M. Spectrophotometric and liquid chromatographic determination of fenofibrate and vinpocetine and their hydrolysis products. *Farmaco* [online]. 2005, 60(5): 425–438: [cit. 2015-03-05]. Dostupné z: <http://doi.org/10.1016/j.farmac.2005.01.013>
 64. JAIN, N., Raghuvanshi, R., & Jain, D.. Development and validation of RP-HPLC method for simultaneous estimation of atorvastatin calcium and fenofibrate in tablet dosage forms. *Indian J. Pharm. Sci.* [online]. 2008, 70(2): 263–265 [cit. 2015-03-05]. Dostupné z: <http://doi.org/10.4103/0250-474X.41473>

65. RATANABANANGKOON, P., Guzman, H., Almarsson, O., Berkovitz, D., Tokarczyk, S., Straughn, A. B., & Chen, H. A high-throughput approach towards a novel formulation of fenofibrate in omega-3 oil. *European J. Pharm. Sci.* [online]. 2008, 33(4-5): 351–360 [cit. 2015-03-05]. Dostupné z: <http://doi.org/10.1016/j.ejps.2008.01.005>)
66. VOGT, M., Kunath, K., & Dressman, J. B.. Dissolution enhancement of fenofibrate by micronization, cogrinding and spray-drying: Comparison with commercial preparations. *European J. Pharm. Biopharm.* [online]. 2008, 68(2): 283–288 [cit. 2015-03-05]. Dostupné z: <http://doi.org/10.1016/j.ejpb.2007.05.010>
67. PAWAR, H.I., Kothapalli Lata, Thomas Asha, Nanda R.K, Mare Shivaji. Simultaneous RP-HPLC Method for Estimation of Ezetimibe and Fenofibrate in Synthetic mixture. *Research J. Pharm. Tech.* [online]. 2008, 1(1): 25-28 [cit. 2015-03-06]. ISSN : 0974-360X. Dostupné z: <http://www.indianjournals.com/ijor.aspx?target=ijor:rjpt&volume=1&issue=1&article=006>
68. Zzaman, M.T. et al. Method Development And Validation Of Fenofibrate By HPLC Using Human Plasma. *El. J. of Biomed.*[online]. 2009, (3): 41-54 [cit. 2015-03-16]. ISSN 1697-090X. Dostupné z: <http://biomed.uninet.edu/2009/n3/zzaman.html>
69. CHEN, Y., Lu, Y., Chen, J., Lai, J., Sun, J., Hu, F., & Wu, W. Enhanced bioavailability of the poorly water-soluble drug fenofibrate by using liposomes containing a bile salt. *Int. J. Pharm.* [online]. 2009, 376(1-2): 153–160 [cit. 2015-03-06]. Dostupné z: <http://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2009.04.022>
70. LI Jia-yu and DAI Zheng-lin. Determination of Fenofibrate Soft Capsules by HPLC Method. *J. of Wuhan Inst. Tech.* [online]. 2009, (12): 7 [cit. 2015-03-07]. Dostupné z: http://en.cnki.com.cn/Article_en/CJFDTOTAL-WHHG200912007.htm
71. GUPTA, K. R., Askarkar, S. S., Rathod, P. R., & Wadodkar, S. G.. Validated spectrophotometric determination of Fenofibrate in formulation. *Pelagia Research Library* [online]. 2010, 1(1): 173–178 [cit. 2015-03-07]. Dostupné z: <http://pelagiaresearchlibrary.com/der-pharmacia-sinica/vol1-iss1/DPS-2010-1-1-173-178.pdf>
72. FATHY M. M. Salama, Mohamed W. I. Nassar, Mohie M. K. Sharaf El-Din, Khalid A. M. Attia, Mohamed Yousri Kaddah. Determination of Fenofibrate and the Degradation Product Using Simultaneous UV-Derivative Spectrometric Method and HPLC. *American J. Anal.Chem.*[online]. 2011, (2): 332-343 [cit. 2015-03-07]. Dostupné z: <http://doi:10.4236/ajac.2011.23042>
73. MANISH Kumar, Gurralla Srikanth, Vandana Pamulaparthi, J. Venkateshwar Rao, Prof. KRS. Sambasiva Rao. Development and validation of HPLC-UV method for the estimation of fenofibrate in human plasma. *J. Pharm. Res.*[online]. 2011, 4(10): 3735-3737 [cit. 2015-03-07]. ISSN: 0974-6943. Dostupné z: http://www.researchgate.net/publication/235708314_Development_and_validation_of_HPLC-UV_method_for_the_estimation_of_fenofibrate_in_human_plasma
74. Sudheer, M., Prakash, M. S., Rajashekar, G., Vani, K. V. H., Ramalingam, P., & Reddy, Y. P.. A Stability Indicating HPLC method with Diode Array Detection for the Determination of Atorvastatin Calcium and Fenofibrate in Commercial Tablets. *J. Pharm. Res.* [online]. 2011, 4(9): 3033–3036 [cit. 2015-03-07]. Dostupné z: <http://jpronline.info/index.php/jpr/article/view/9244>
75. JIA, Z., Lin, P., Xiang, Y., Wang, X., Wang, J., Zhang, X., & Zhang, Q. A novel nanomatrix system consisted of colloidal silica and pH-sensitive polymethylacrylate improves the oral bioavailability of fenofibrate. *Europ. J. Pharm. Biopharm.*[online]. 2011, 79(1): 126–134. Dostupné z: <http://doi.org/10.1016/j.ejpb.2011.05.009>
76. HU, L., Wu, H., Niu, F., Yan, C., Yang, X., & Jia, Y. Design of fenofibrate microemulsion for improved bioavailability. *Int. J. Pharm* [online]. 2011, 420(2), 251–255 [cit. 2015-03-07]. Dostupné z: <http://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2011.08.043>)
77. JUENEMAN, D., Jantratid, E., Wagner, C., Reppas, C., Vertzoni, M., & Dressman, J. B. Biorelevant in vitro dissolution testing of products containing micronized or nanosized fenofibrate with a view to predicting plasma profiles. *Europ. J. Pharm.Biopharm.* [online]. 2011, 77(2), 257–264 [cit. 2015-03-08]. Dostupné z: <http://doi.org/10.1016/j.ejpb.2010.10.012>)
78. BAI Jie, Zhao Yan-yan, Su Fang, Han Yuan-yuan, Wang Cui-ling, Lo Yue-qiu. Simultaneous determination of simvastatin and fenofibric acid in vivo by dual wavelength HPLC. *Chinese J.*

- Hosp. Pharm. [online]. 2011, (12): 998-2001 [cit. 2015-03-08]. Dostupné z: <http://caod.oriprobe.com/order.htm?id=32615151&ftext=base>
79. BHAMARE, P. C., Bari, S. B., Natarajan, S., Patil, A. A., Patil, S. H., & Shirode, P. T. (2011). Development and Validation of a precise single stability indicating HPLC method for determinations of Metformin hydrochloride and Fenofibrate in Pure form and in Pharmaceutical tablets, *Int.J.PharmTech Res.* [online]. 2011, 3(1): 505–515 [cit. 2015-03-08]. ISSN: 0974-4304. Dostupné z: [http://www.sphinxesai.com/Vol.3No.1/pharm_jan-mar11/pdf/JM11\(PT=83\)%20pp%20505-515.pdf](http://www.sphinxesai.com/Vol.3No.1/pharm_jan-mar11/pdf/JM11(PT=83)%20pp%20505-515.pdf)
 80. SARAVANAN et al. Development and validation of RP-HPLC method for the estimation of choline fenofibrate in bulk and its pharmaceutical dosage form. *Int.J.Pharm.Res.* [online]. 2012 3(11): 4489–4491 [cit. 2015-03-08]. Dostupné z: <http://doi.org/10.13040/IJPSR.0975-8232.5>
 81. PATEL Archita, MaCwana Chhaya, Parmar Vishal, Patel Samir. Simultaneous Determination of Atorvastatin Calcium, Ezetimibe, and Fenofibrate in a Tablet Formulation by HPLC. *J. Liq.Chrom. Rel.Tech.*, 35(4): [online]. 2013, 524-532(9) [cit. 2015-03-08]. Dostupné z: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/10826076.2011.601502#.VaemEvtmko>
 82. BHINGE, S., Malipatil, S., Jondhale, a, Hirave, R., & Savali. A New Approach to the RP-HPLC Method for Simultaneous Estimation of Atorvastatin Calcium and Fenofibrate in Pharmaceutical Dosage Forms. *E-Journal of Chemistry* [online]. 2013, 9(3): 1223–1229 [cit. 2015-03-08]. Dostupné z: <http://www.hindawi.com/journals/jchem/2012/171250/abs/>
 83. UEJO, F., Limwikrant, W., Moribe, K., & Yamamoto, K.. Dissolution improvement of fenofibrate by melting inclusion in mesoporous silica. *Asian J. Pharm. Sci.* [online]. 2013, 8(6): 329–335 [cit. 2015-03-08]. Dostupné z: <http://doi.org/10.1016/j.ajps.2013.11.001>
 84. KUMAR, R. S., & Prof, A.. Design, development and evaluation of fenofibrate and rosuvastatin nanodroplets. *Europ. Sci. J.* [online]. 2013. (4): 606–617 [cit. 2015-03-09]. ISSN: 1857- 7431. Dostupné z: <http://ejournal.org/index.php/esj/article/view/2516/2389>
 85. Feli, Y., Kostewicz, E. S., Sheu, M. T., & Dressman, J. B. Analysis of the enhanced oral bioavailability of fenofibrate lipid formulations in fasted humans using an in vitro-in silico-in vivo approach. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*[online]. 2013, 85(3): 1274–1284 [cit. 2015-03-08]. Dostupné z: <http://doi.org/10.1016/j.ejpb.2013.03.001>
 86. DHIWARE Abhijit D., Deshpande Padmanabh B., Gandhi Santosh V., Nair Sujith, Vanjari Suvarna. A Simple and Sensitive RP-HPLC Method for Simultaneous Estimation of Atorvastatin Calcium, Ezetimibe and Fenofibrate in Combined Tablet Dosage Form. *Res J. Pharm. Tech.*[online]. 2013, 10(6). 1085-1088 [cit. 2015-03-08]. ISSN: 0974-360X. Dostupné z: <http://www.indianjournals.com/ijor.aspx?target=ijor:rjpt&volume=6&issue=10&article=001>
 87. VINJAM Swathi, Nanda Kishore Agarwal, Kumari Jyothsna (2013). Novel RP-HPLC method development and validation of atorvastatin and fenofibrate in bulk and pharmaceutical dosage forms. *Indian J. Res. Pharm. Biotech.*[online]. 2014, ISSN: 2321-5674, 5674(10), 576–582 [cit. 2015-03-08]. Dostupné z: [http://ijrb.com/current%20issues/1/v1_is5/ijrb%201\(5\)%20%20swathi%20576-582.pdf](http://ijrb.com/current%20issues/1/v1_is5/ijrb%201(5)%20%20swathi%20576-582.pdf)
 88. PRADESH, A. Stability indicating method development and validation of choline- fenofibrate in pharmaceutical dosage forms by RP-HPLC. *Int. J. Pharm. Sci. Res.* [online]. 2014, 5(3), 849–854 [cit. 2015-03-08]. Dostupné z: <http://doi.org/10.13040/IJPSR.0975-8232>
 89. OH, Euichaul. Validation of a Highly Sensitive RP-HPLC Method for Quantification of Fenofibrate in Pure and Pharmaceutical Dosage Forms. *Current Pharm. I An.*[online]. 2014, 10(2): 1-8 [cit. 2015-03-08]. ISSN: 15734129. Dostupné z: <http://www.eurekaselect.com/119865/article>
 90. VARGHESE, Susheel John; Ravi, Thengungal Kochupappy. Quantitative simultaneous determination of fenofibrate, atorvastatin and ezetimibe in tablets using gradient high performance column liquid chromatography and high performance thin-layer chromatography. *J. Liq. Chrom. Rel.Tech.*[online]. 2014, 37(19): 2784-2799 [cit. 2015-03-08]. ISSN: 6076. Dostupné z: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/10826076.2013.873870#.VafFDfntmkp>
 91. HEFNAVY, M. M., Mohamed, M. S., Abounassif, M. a., Alanazi, A. M., & Mostafa, G. a. E. High-performance liquid chromatography and derivative spectrophotometry for simultaneous

- determination of pravastatin and fenofibrate in the dosage form. *Acta Pharmaceutica* [online]. 2014 , 64(4), 433–446 [cit. 2015-03-11]. Dostupné z: <http://doi.org/10.2478/acph-2014-0039>
92. SAHOO, D. K., Sahu, P. K., & Patro, C. S. New validated isocratic RP-HPLC method for assay of fenofibrate, *Int. J. Pharm. Sci.*[online]. 2014, 6(2), 2–5 [cit. 2015-03-11]. Dostupné z: <http://www.ijppsjournal.com/Vol6Suppl2/7918.pdf>
 93. K. S. Kumar, P. B. Samnani. Development and Validation of a New HPLC Method for Simultaneous determination of Esomeprazole, Venlafaxine HCl and Fenofibrate. *Int. J. ChemTech. Res.*[online]. 2014, 6(1): 838-844 [cit. 2015-03-11]. ISSN: 0974-4290. Dostupné z: [http://sphinxesai.com/2014/ChemTech/JM14CT51_100/CT=96\(838-844\)JM14.pdf](http://sphinxesai.com/2014/ChemTech/JM14CT51_100/CT=96(838-844)JM14.pdf)
 94. Stephen J Barton, J. B. A Novel Method for Determination of Fenofibric Acid in Human Plasma using HPLC-UV: Application to a Pharmacokinetic Study of New Formulations. *J. An. Bioan. Tech.* [online]. 2014, 12(1): 10–13 [cit. 2015-03-11]. Dostupné z: <http://doi.org/10.4172/2155-9872.S12-009>
 95. Dedhiya, P. P., Chauhan, R. S., Shah, S. A., & Tailor, P. M. (2014). Determination Of Fenofibric Acid (Related Substance) In Marketed Formulations Of Fenofibrate By RP-HPLC. *J. Pharm. Sci. Res.*[online]. 2014, 6(10), 313–320 [cit. 2015-03-11]. Dostupné z: <http://www.jpsr.pharmainfo.in/Documents/Volumes/Vol6Issue10/jpsr06101401.pdf>
 96. Nahla Nour El-Din Ahmad Salama, Simultaneous Determination of Fenofibrate, its Metabolite and Co- Formulated/Administered Statins Using Reverse Phase TLC-Densitometry and HPLC-UV Methods: Application in Human Plasma. *Current Chromatography* [online]. 2015, 1(2): 63-71 [cit. 2015-03-11],ISSN: 2213-2414. Dostupné z: <http://eurekaselect.com/124668>
 97. Suresh Kumar GV, Rajendraprasad Y, Development and validation of reversed-phase HPLC method for simultaneous estimation of Rosuvastatin and Fenofibrate in tablet dosage form. *Int. J. PharmTech. Res.*, 2010, 2: 2016-2021.
 98. Anandakumar Karunakaran, Vetsa Subhash, Ramu Chinthala, Jayamaryapan Muthuvijayan, Simultaneous estimation of Rosuvastatin calcium and Fenofibrate in bulk and in tablet dosage form by UV-Spectrophotometry and RP-HPLC. *Stamford J. Pharm. Sci.*, 2011: 58-63.
 99. Borole TC, Dewani MG, Gandhi SP, Damle MC, Simultaneous estimation of Rosuvastatin calcium and Fenofibrate in their combined dosage form by HPLC method. *Asian J. Res. Chem.*, 4, 2011, 1557-1561.
 100. Devika GS, Sudhakar M, Venkateshwara Rao J, A new improved RP-HPLC method for simultaneous estimation of Rosuvastatin calcium and Fenofibrate in tablets. *Int. J. Pharm. Sci.*, 2011, 3: 311-315.
 101. Ladke Abhijeet, Ingle Anita, Ranaware Pranjali, Damle Mrinalini, Development and validation of stability indicating HPLC method for Rosuvastatin calcium and Fenofibrate in combination. *Asian J. Res. Chem.*, 2012, 5: 606-610.
 102. Mohd Moinuddin SA, Rahaman, Ramakrishna Yadav B, Ramakrishna Battu, Development and validation of a reverse phase HPLC method for simultaneous estimation of Rosuvastatin calcium and Fenofibrate in tablet dosage form. *Int. J. Pharm. Sci.*, 2012, 4:150-154.
 103. Sharma Sheetal, Bhandari Priya, Simultaneous estimation of Rosuvastatin calcium and Fenofibrate in bulk and in tablet dosage form by UV-Spectrophotometry and RPHPLC. *J. Pharm. Res.*, 2012, 5: 2311.
 104. Swetha Ankireddy, Venkateswara Rao P, Sudhakar babu AMS, Pramod N, Simultaneous estimation of Rosuvastatin calcium and Fenofibrate in pharmaceutical dosage forms by using RP-HPLC method. *Int. J. Biolog. Pharm. Res.*, 2012, 3: 935 – 941.
 105. Bhavna Patel A, Sharddha Parmar J, Aanandi Captain D, Validated RP-HPLC method for simultaneous estimation of Rosuvastatin calcium and Fenofibrate in bulk and pharmaceutical dosage form. *Int. J. Mod. Pharm. Res.*, 2, 2013, 66-77.
 106. Jajam Thriveni, Rambabu R, Venkateswara Rao J, Vidyadhara S, Development and validation of RP-HPLC method for simultaneous estimation of Rosuvastatin calcium and Fenofibrate in bulk and pharmaceutical dosage forms. *Int. J. Res. Pharm. Chem.*, 2013, 3: 208-212.

107. Sumalatha M, Haritha Pavani K, Analytical method development and validation for the simultaneous estimation of Rosuvastatin and Fenofibrate in tablet dosage form by reverse phase high performance liquid chromatography. *Indian J. Res. Pharm. Biotech.*, 2013, 1: 850-856.
108. Thukabai S, Uma Maheshwara Rao V, Muhammad Rafi Shaik, Development and validation of RP-HPLC method for simultaneous estimation of Rosuvastatin and Fenofibrate in bulk and tablet dosage form. *Int. J. Pharm*, 2013, 3: 607-612.
109. M.H. Mills, L.E. Mather a X.S. Gu, J.L. Huang. Determination of ketorolac enantiomers in plasma using enantioselective liquid chromatography on an alpha 1-acid glycoprotein chiral stationary phase and ultraviolet detection. *J. Chromatogr. B*: 1994, 658(1): 177-182 Dostupné také z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7952121>
110. Jones, D.J. & Bjorksten, a. R. Detection of ketorolac enantiomers in human plasma using enantioselective liquid chromatography. *J. Chromatogr. B*: 1994, 661(1): 165–167.
111. Tsina, I. et al., 1996. An indirect (derivatization) and a direct HPLC method for the determination of the enantiomers of ketorolac in plasma. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 1996, 15(3): 403–417.
112. Campanero, M. a. et al. Determination of ketorolac enantiomers in plasma using enantioselective liquid chromatography. Application to pharmacokinetic studies. *Chromatographia*. 1998, 48(3-4): 203–208.
113. Hamunen, K. et al. Stereoselective pharmacokinetics of ketorolac in children, adolescents and adults. *Acta anaesthesiologica Scandinavica*. 1999, 43(10): 1041–1046.
114. Zhao Wang, Richard M. Dsida, Michael J. Avram. Determination of ketorolac in human plasma by high-performance liquid chromatography utilizing solid-phase extraction and ultraviolet detection. *J. Chromatogr. B*: 2001, 759(1): 383–386.
115. Demircan, Ş. et al. Determination of Ketorolac Tromethamine in Human Eye Samples by HPLC with Photo Diode-Array Detection. *Chromatographia*. [online]. 2007, 66(S1): 135–139. [cit. 2015-06-15]. Dostupné z: <http://link.springer.com/article/10.1365/s10337-007-0376-6>
116. Qandil, a. M. et al. Simultaneous RP-LC Determination of Ketorolac and its Piperazinylalkyl Ester Prodrugs. *Chromatographia* 2008, 67(3-4): 287–291.
117. Payán, M.R. et al. Electromembrane extraction (EME) and HPLC determination of non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) in wastewater samples. *Talanta*, 2011, 85(1): 394–399.
118. Franceschi, L., D'aronco, S. & Furlanut, M. A simple and sensitive HPLC method to monitor serum and synovial fluid concentrations of ketorolac in rheumatologic patients. *J. Pharm. Biomed.* 2010, 2(6): pp.121–124.
119. Razzaq, S.N. et al., 2012. Stability indicating HPLC method for simultaneous determination of moxifloxacin hydrochloride and ketorolac tromethamine in pharmaceutical formulations. *Química Nova* [online]. 2011, 35(6): 1216–1221 [cit. 2015-06-15]. Dostupné z: http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0100-40422012000600028&script=sci_arttext
120. Dubey, S.K. et al. New chiral reverse phase HPLC method for enantioselective analysis of ketorolac using chiral AGP column. *J. Pharm. An.* [online]. 2012, 2(6): 462–465 [cit. 2015-06-15]. Dostupné z: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jpha.2012.07.006>.
121. Dharti Patel, Mehul Patel, Ketan Pate. Simultaneous RP-HPLC Estimation of Moxifloxacin Hydrochloride and Ketorolac Tromethamine in Ophthalmic Dosage Forms. *Asian J. Research Chem* [online]. 2012, 5(5). [cit. 2015-06-15]. ISSN: 0974-4169. Dostupné z: http://www.researchgate.net/publication/232732241_Simultaneous_RP-HPLC_Estimation_of_Moxifloxacin_Hydrochloride_and_Ketorolac_Tromethamine_in_Ophthalmic_Dosage_Forms
122. Razzaq, S.N. et al., 2012. Stability indicating HPLC method for the simultaneous determination of ofloxacin and ketorolac tromethamine in pharmaceutical formulations. *Analytical Methods* [online]. 2012,, 4(7): 2121 [cit. 2015-06-15]. Dostupné z: <http://pubs.rsc.org/en/Content/ArticleLanding/2012/AY/c2ay05727a#!divCitation>
123. O'Connor, N. et al. Development and validation of a rapid liquid chromatographic method for the analysis of ketorolac tromethamine and its related production impurities. *J. Applied Pharm. Sci.* [online]. 2012,, 2(5): 15–21). [cit. 2015-06-15]. Dostupné z:

- <http://connection.ebscohost.com/c/articles/88991528/development-validation-rapid-liquid-chromatographic-method-analysis-ketorolac-tromethamine-related-production-impurities>
124. B. Raja, A. Lakshmana Rao. Analytical method development and validation for the simultaneous estimation of febuxostat and ketorolac in tablet dosage form by RP-HPLC. *Int. J. Pharm. Chem. Biol. Sci.* [online]. 2013, 3(3): 571–576 [cit. 2015-06-18]. ISSN: 2249-9504. Dostupné z: <http://www.ijpcbs.com/files/16-334.pdf>
125. Singh, R., Pathak, A. & Chawla, P., 2013. Method Development and Validation for Simultaneous Estimation of Ketorolac and Sparfloxacin by RP-HPLC. *Indian J. Pharm. Biolog. Res.* [online]. 2013, 1(4): 95–101 [cit. 2015-06-18]. ISSN: 2320-9267. Dostupné z: <http://citeseerx.ist.psu.edu/viewdoc/download?doi=10.1.1.403.9163&rep=rep1&type=pdf>
126. S. K. Dubey, S. Duddelly, H. Jangala, R. N. Saha. Rapid and Sensitive Reverse-phase High-performance Liquid Chromatography Method for Estimation of Ketorolac in Pharmaceuticals Using Weighted Regression. *Indian J. Pharm. Sci.* [online]. 2014, 75(1): 89–93 [cit. 2015-06-18]. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3719155/>
127. Kalariya, P.D. et al.. Application of experimental design and response surface technique for selecting the optimum RP-HPLC conditions for the determination of moxifloxacin HCl and ketorolac tromethamine in eye drops. *Journal Saudi Chem. Soc.* [online]. 2014, [cit. 2015-06-18]. Dostupné z: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jscs.2014.04.004>.
128. B. Prathap, Akalanka Dey, G.H. Srinivaso Rao. Analytical method development and validation for simultaneous estimation of febuxostat and ketorolac in bulk and pharmaceutical dosage form in rat plasma by RP-HPLC. *Indo American J. Pharm. Sci.* [online]. 2014, 4(2). ISSN: 2231-6876. [cit. 2015-06-18]. Dostupné z: <http://www.iajpr.com/archive/volume-4/april-2014/14april3.html>
129. Bhagyashree R. Dhumal, Kishor P. Bhusari, Madhukar R. Tajne, Mahavir H. Ghante, Nishant S. Jain. Stability indicating method for determining Ketorolac Tromethamine in pharmaceutical formulations by HPLC. *Indo American J. Pharm. Sci.* [online]. 2014, 4(2), ISSN: 2231-6876. [cit. 2015-06-18]. Dostupné z: <http://www.iajpr.com/archive/volume-4/july-2014/14july32.html>
130. V. Ramakrishna, P.V.V. Satyanarayana, B. Hari Babu. Development and Validation of Liquid Chromatographic Method for the Simultaneous Estimation of Ofloxacin and Ketorolac Tromethamine In Combined Dosage Form Tromethamine. *American J. Pharmtech. Res.* [online]. 2014, 4(2). ISSN: 2249-3387. [cit. 2015-06-18]. Dostupné z: http://www.researchgate.net/publication/267982293_Development_and_Validation_of_Liquid_Chromatographic_Method_for_the_Simultaneous_Estimation_of_Ofloxacin_and_Ketorolac_Tromethamine_In_Combined_Dosage_Form_V._Ramakrishna1_P.V.V.Satyanarayana1_B.Hari_Babu1%2A_1._Department_of_Chemistry_Acharya_Nagarjuna_University_Guntur_Andhra_Pradesh_INDIA
131. Khairnar DA, Chaudhari CS, Anantwar SP. Method development and validation of Ketorolac Tromethamine in tablet formulation by RP-HPLC method. *Int. J. Pharm. Sci. Res.* [online]. 2015; 5(9): 3696-03 [cit. 2015-06-18]. ISSN: 0975-8232. Dostupné z: <http://ijpsr.com/bft-article/method-development-and-validation-of-ketorolac-tromethamine-in-tablet-formulation-by-rp-hplc-method/>
132. Bandala Kostewara Rao, Golkonda Ramu, Illuru Jyothsna Kumari. A novel stability indicating RP-HPLC method for the determination of ketorolac tromethamine in pharmaceutical formulations. *Asian J. Pharm. Clin. Res.* [online]. 2015, 8(2): 354-359 [cit. 2015-06-18]. ISSN: 0974-2441. Dostupné z: <http://innovareacademics.in/journals/index.php/ajpcr/article/view/4992>
133. Bansode, P.S. et al. Method development and validation of quantitative analytical method for moxifloxacin and ketorolac combination in pharmaceutical dosage form by RP-HPLC. *World J. Pharm. Sci.* [online]. 2015, 4(03): 1402–1408 [cit. 2015-06-18]. ISSN 2278 – 4357. Dostupné z: <http://www.wjpps.com/download/article/1426500951.pdf>
134. Dave JB, Vyas PJ, Patel CN. A validated stability indicating high performance liquid chromatographic method for moxifloxacin hydrochloride and ketorolac tromethamine eye drops and its application in pH dependent degradation kinetics. *Chronicles of Young Scientists* [online]. 2015, 4(1): 24-31. [cit. 2015-06-18]. Dostupné z: <http://www.cysonline.org/article.asp?issn=2229-5186;year=2013;volume=4;issue=1;spage=24;epage=31;aulast=Dave>