

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



DIPLOMOVÁ PRÁCE

**VYUŽITÍ CORE-SHELL KOLON PRO STANOVENÍ
MIKONAZOLU**

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

Hradec Králové, 2015

Bc. Martina Hloušková

Poděkování

Děkuji svému školiteli Ing. Martinu Drastíkovi, Ph.D. za odborné vedení, konzultace a pomoc při vypracovávání diplomové práce. Ráda bych také chtěla poděkovat PharmDr. Evě Šnejdrové za přípravu vzorků na Katedře farmaceutické technologie.

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

V Hradci Králové

ABSTRAKT

Cílem práce byla optimalizace a validace HPLC metody pro stanovení obsahu mikonazolu ve vzorcích. Tyto vzorky byly připraveny na Katedře farmaceutické technologie a bylo zde sledováno postupné uvolňování mikonazolu z matrice v závislosti na použitém kopolymeru kyseliny glykolové a kyseliny mléčné.

Při HPLC analýze byla využita moderní core-shell kolona Ascentis Express RP-Amide, 10 cm x 3,0 mm; 2,7 μm . Optimalizované analytické podmínky byly: mobilní fáze methanol:voda 70:30, průtok 0,8 ml/min, teplota 45 °C, nástřik 5 μl a UV detekce 220 nm. Retenční čas mikonazolu byl 5,65 min. Celá analýza proběhla do 7 minut.

Když byly stanoveny optimální podmínky analýzy, metoda mohla být validována. Při validaci byly sledovány tyto parametry: linearita, selektivita, účinnost, LOD, LOQ, opakovatelnost a faktor symetrie. Všechny sledované parametry odpovídaly požadavkům Českého lékopisu.

ABSTRACT

The aim of this diploma thesis was the optimization and validation of a HPLC method for miconazole determination in samples supplied by the Department of Pharmaceutical Technology. A gradual miconazole release dependent on the composition of the copolymer of glycolic and lactic acid was studied.

HPLC analysis was performed using a modern core-shell Column Ascentis Express RP-Amide, 10 cm x 3.0 mm; 2.7 μm . Optimized analytical conditions were: mobile phase methanol:water 70:30, flow rate 0.8 ml/min, temperature 45 °C, injection 5 μl and UV detection at 220 nm. Miconazole retention time was 5.65 min. The entire analysis was carried out in 7 minutes.

When the optimal conditions of analysis were determined, the method could be validated. The following parameters were monitored during validation: linearity, selectivity, efficiency, LOD, LOQ, repeatability and tailing factor. All of the monitored parameters met the requirements of the Czech Pharmacopoeia.

OBSAH

1. Úvod	8
2. Cíl práce.....	9
3. Teoretická část	10
3.1 Antimykotika.....	10
3.1.1 Mikonazol	11
3.2 HPLC.....	14
3.2.1 Chromatografické kolony.....	15
3.2.2 Detektory v HPLC.....	17
3.2.3 Parametry v HPLC	19
3.3 Core-shell kolony	20
3.3.1 Core-shell kolony – struktura	20
3.3.2 Core-shell kolony - rychlost	23
3.3.3 Core-shell kolony – citlivost	24
3.3.4 Core-shell kolony – rozlišovací schopnost.....	25
4. Experimentální část	26
4.1 Přístrojové vybavení.....	26
4.2 Použité chemikálie	26
4.3 Příprava roztoků	27
4.3.1 Příprava roztoku standardu mikonazolu	27
4.3.2 Příprava kalibračních roztoků mikonazolu.....	27
4.3.3 Příprava citrát fosfátového pufru o pH 7,4.....	27
4.3.4 Příprava vzorků	28
5. Výsledky a diskuse.....	30
5.1 Vývoj chromatografické metody.....	30
5.1.1 Složení a optimalizace mobilní fáze.....	30
5.1.2 Optimální podmínky pro HPLC analýzu.....	34
5.1.3 Ověření správné eluce mikonazolu	35
5.2 Validace.....	36
5.2.1 Linearita	37
5.2.2 Selektivita.....	38
5.2.3 Faktor symetrie.....	38
5.2.4 Opakovatelnost.....	39
5.2.5 Zdánlivý počet teoretických pater	41
5.2.6 Limit of detection (LOD), Limit of quantification (LOQ)	41

5.3	Měření vzorků	42
6.	Závěr	45
7.	Použité zkratky	46
8.	Seznam obrázků.....	47
9.	Seznam tabulek	48
10.	Použitá literatura	49

1. ÚVOD

V současné době je v populaci zvýšen výskyt plísňových onemocnění především z důvodu užívání širokospektrých antibiotik, která se podílejí na hubení lidských saprofytů a jejich schopnosti předcházet plísňovým onemocněním. Antimykotika lze rozdělit na dvě třídy, podle rozsahu působení – lokální a systémová. Mezi systémová antimykotika patří azoly, triazoly a echinokandiny. Azoly a triazoly, mezi něž patří právě mikonazol, působí inhibici enzymů ergosterolu v membráně citlivých hub.

Mikonazol má účinek fungicidní až fungistatický. Jsou u něj prokázány časté vedlejší účinky, jež mohou vyústit až v anafylaktickou reakci, proto bývá upřednostňováno jiné antimykotikum podobných vlastností. Nyní je jeho použití převážně soustředěno na lokální léčbu kožních a slizničních mykóz a v České republice se podává pouze v kombinaci s metronidazolem. Jeho účinky jsou prokázány na dermatofyty, kvasinky, dimorfní houby, aktinomycety a různé plísně. Používá se pak převážně k terapii kožních mykóz, akné, seboroické dermatitidy a orofaringeálních kandidóz.

Ke stanovení mikonazolu je možné využití vysokoúčinné kapalinové chromatografie – HPLC. Tato metoda je v současnosti jedna z nejčastěji využívaných separačních metod, pro svou výhodu ve vysoké citlivosti, účinnosti, dobré opakovatelnosti, robustnosti a rychlosti. Další velkou výhodou je využití malého množství vzorku při zpracování. Využití této metody je převážně při určování čistoty, totožnosti látek, stanovení obsahu hledaných látek a k monitorování metabolitů a léčiv v tělních tekutinách.

2. CÍL PRÁCE

Cílem této diplomové práce bude vyvinout, optimalizovat a validovat metodu HPLC pro stanovení obsahu mikonazolu ve vzorcích. Bude využita tzv. core-shell kolona. Metoda bude optimalizována a to pomocí výběru správné mobilní fáze, optimálního průtoku, nástřiku, teploty a tlaku. Poté bude následovat validace metody a její aplikace na reálné vzorky, které budou připraveny na Katedře farmaceutické technologie disolucí matric, jež jsou tvořeny kopolymery kyseliny glykolové a mléčné.

3. TEORETICKÁ ČÁST

3.1 Antimykotika

Léčiva hrají významnou roli v lidském životě, jak při terapii, tak při prevenci onemocnění. Většina přípravků je vyráběna synteticky a v různých léčivých formách. Díky těmto různorodým lékovým formám je zamezeno toxicitě v důsledku silných vedlejších účinků, dochází ke zvýšení stability a lék se stává přijatelným pro tělo. Dále pak může být lék klasifikován právě podle účinné chemické látky, jež obsahuje, jako jsou právě léčiva účinná proti plísním a houbám – antimykotika.

V dnešní době je výskyt plísnových onemocnění velmi častý a liší se stupněm závažnosti. Častější výskyt je v současnosti především kvůli užívání širokospektrých antibiotik, která ničí saprofyty, a dále často u léčby cytostatiky a imunosupresivy. I při léčbě pomocí antimykotik se může rozvinout resistance. Antimykotika můžeme rozdělit podle jejich využití na antimykotika podávající se na celkovou (systémovou) léčbu nebo na lokální léčbu. (1)

Antimykotika pro systémovou léčbu se používají k celkové terapii, ne pouze lokální. Mezi tato antimykotika patří amfotericin B, azoly, triazoly a dále echinokandiny, jež jsou nekompetitivní inhibitory glukansyntázy. Účinek azolů a triazolů je fungistatický až fungicidní, mechanismem účinku je inhibice enzymů konečné fáze syntézy ergosterolu v membráně mikromycetů. Klíčovou roli zde hraje cytochrom P450 (CYP450). Vyskytují se zde možné nežádoucí účinky i přesto, že afinita azolů a triazolů k houbovému CYP450 je vyšší než afinita k lidskému CYP450. Mezi nežádoucí účinky patří zvracení, bolest břicha, průjemy a mohou se vyskytnout i alergické reakce. Antimykotika se mohou podávat perorálně i parenterálně. Absorpci z gastrointestinálního traktu zvyšuje podání tučné stravy. Účinek echinokandinů spočívá v inhibici polymerace glykanu. Glykan je hlavní složka buněčné stěny většiny patogenních hub. Jejich výhodou je, že dokážou bránit kandidám v tvorbě biofilmu na umělém povrchu, jako jsou například katétrů a mají výrazný postantifungální účinek. (1)

3.1.1 Mikonazol

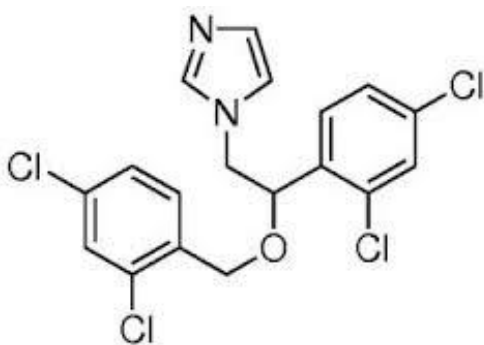
Mezi nejznámější azoly a triazoly patří ketokonazol, itrakonazol, flukonazol a mikonazol. Mikonazol patří mezi širokospektrá antimykotika a jeho účinky jsou fungicidní až fungistatické, působí i na grampozitivní bakterie. Na gramnegativní bakterie neúčinkuje. Vzhledem k jeho častějším a výrazným nežádoucím projevům, k nimž patří například časté gastrointestinální obtíže, různé alergické reakce, které mohou vyústit až v anafylaktický šok, je pro léčbu upřednostňován flukonazol a itrakonazol. Nyní se řeší, jestli nedochází i k interakcím mezi mikonazolem a léky používanými na ředění krve, jako je například warfarin a jiná antikoagulancia. Je podezření, že při současném užívání může docházet k větší slizniční krvácivosti a tvorbě modřin. (2), (3)

V současné době je jeho použití specializováno výhradně na lokální léčbu kožních a slizničních mykóz. V České republice je jeho výskyt omezen pouze na kombinaci s metronidazolem, zatímco v zahraničí se vyskytuje i ve formě gelu (orálního), bukálních tablet, kožních roztoků, krémů nebo i ve formě monokomponentních vaginálních čípků. (4)

- Struktura mikonazolu

Sumární vzorec mikonazolu je $C_{18}H_{14}Cl_4N_2O$ a jeho systematický název 1-[(2RS)-2-[(2,4-dichlorbenzyl)oxy]-2-(2,4-dichlorfenyl)ethyl]-1H-imidazol.

Při výrobě mohou vznikat specifikované nečistoty A, B, C, D, E, F a G, jež je potřeba dle lékopisu identifikovat k prokázání shody. (5)



Obr. 1: Vzorec mikonazolu (6)

- Mechanismus účinku a spektrum účinku mikonazolu

Jeho fungistatické účinky jsou v inhibici biosyntézy ergosterolu, který je obsažen v buněčné membráně hub. Azolová antimykotika inhibují aktivitu enzymu fungálního cytochromu P450-dependentní-C-14 α -demethylázy a to znemožňuje biosyntézu ergosterolu. Díky methylovaným sterolům, jež se hromadí v cytoplazmě, dochází k poruše tvorby membrány a k zastavení růstu. Mikonazol také inhibuje katalázu a peroxidázu, čímž dochází k hromadění reaktivních forem kyslíku a dochází tím pádem k poškození intracelulárních organel a nekróze buňky. (4), (7)

- Vlastnosti mikonazolu a jeho stabilita

Mikonazol a mikonazol–nitrát má podobu bílého nebo téměř bílého prášku a jeho disociační konstanta $pK_a = 6,7$. Mikonazol je velmi těžce rozpustný ve vodě, dobře rozpustný v organických rozpouštědlech, například v ethanolu (96%), propylenglykolu nebo methanolu. Naproti tomu se mikonazol–nitrát v organických rozpouštědlech nerozpouští lehce. (4), (8)

Mikonazol patří k relativně stabilním sloučeninám. Je stabilní v rozmezí pH 3–10. Díky tomuto širokému pH je stabilnější než klotrimazol. K jeho ztrátě nedochází při zahřívání po dobu 90 min při 180 °C v ricinovém nebo v podzemnicovém oleji. (4)

- Použití mikonazolu

Spektrum účinku u imidazolových antimykotik je velice široké. Mají jak účinky na celou řadu patogenních hub, tak působí antibakteriálně na grampozitivní bakterie. Jeho použití je v terapii kožních mykóz, orofaryngeálních kandidóz, akné a seboroické dermatitidě. Při léčbě orofaryngeálních kandidóz se používá orální gel, jenž vykazuje lepší účinnost než nystatin. Má účinek na všechny typy orálních kandidóz i chronické mukokutánní kandidózy. Pokud dochází k výskytu tzv. ústních koutků – chelitis angularis, lze využít též mikonazol a to pro jeho výborné antibakteriální účinky, jelikož jde o smíšené infekce jak bakteriálního, tak mykotického charakteru. Dá se použít ve formě injekcí, tablet, orálních gelů, krémů, mastí, pudrů a vaginálních čípků. (4)

U kožních mykóz je mikonazol používán ve formě roztoku, krému nebo mastí. Masti jsou vhodnější při hloubkových mykózách. Přípravek se může používat maximálně 10–14 dní. (4)

Při léčbě vaginálních mykóz se k terapii využívají krémy s obsahem 10 mg mikonazolu. Mohou být předepsány i vaginální čípky s obsahem 200 mg, které se používají v délce tří dnů.

U seboroické dermatitidy dochází díky dávkám mikonazolu ke snížení osídlení kvasinky rodu *Malassezia* a používá se nejčastěji v kombinaci s hydrokortisonem. Akné je léčeno mikonazolem v menší míře, avšak někdy je přesto použit pro své antiseptické účinky a zmírnění zánětlivé reakce. (4)

Účinky mikonazolu jsou pozorovány na dermatofyty (rodu *Trichophyton*, *Epidermophyton*, *Microsporum* a *Legornia soudanensis*). Dále na kvasinky (rodu *Candida*), na dimorfní houby (*Histoplasma capsulatum*, *Blastomyces brasiliensis*), fykomycety, aktinomycety a různé plísně. Antibakteriálně působí na *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes* a *Erysipelothrix insidiosus*. Mikonazol se používá i ve veterinární praxi k léčbě infekcí dermatofyty u velkých zvířat, jako například u plísňových onemocnění, pneumonií a keratitidách u koní, kvasinkové infekci odolné na nystatin u ptáků a aspergilózy u dravců. (4), (9)

- Zpracování léčivých přípravků

Léčivé přípravky mohou být buď jednofázové, nebo dvoufázové. Jednofázové přípravky jsou vyráběny rozpuštěním mikonazolu nebo mikonazol–nitrátu v příslušném rozpouštědlu. Je zde tedy důležité, aby byla zajištěna dostatečná rozpustnost mikonazolu. V léčebných dávkách je dobře rozpustný v makrogolech nebo v propylenglykolu. Jsou známy vodné nebo vodně alkoholové roztoky s využitím solubilizátorů. Existuje i vodný přípravek, ve kterém je mikonazol v 0,5% množství.

Vícefázové přípravky jsou nejčastěji ve formě hydrofilních gelů a mastí, oleomastí a vaginálních čípků. Jedná se o suspendované roztoky mikonazolu a mikonazol–nitrátu a nejlépe v mikronizované formě. U krémů dochází nejčastěji k rozetření substance v určitém množství rozpouštědla, kdy musí být zajištěno důkladné míchání.

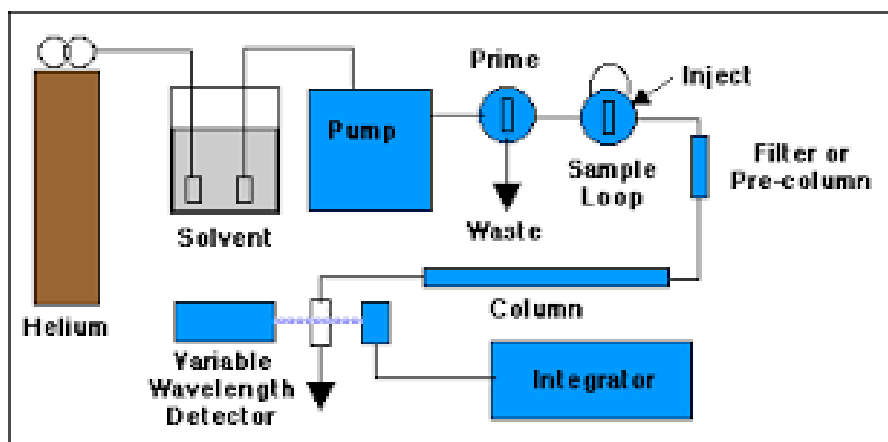
Hydrokrémy se připravují pomocí krémů, jež jsou běžně k sehnání. Tvoří základ, do kterého je přidána léčivá složka mikonazolu. U hydrofilních gelů dochází ke smísení např. s glycerolem. U čípků a globulí se nejčastěji využívá jako základ ztužený tuk. Složitější je výroba oleomastí, kdy je důležité smísení substance a kapalně složky, která je mísitelnější např. s parafinem. (4)

3.2 HPLC

Vysokoúčinná kapalinová chromatografie je v současné době jedna z nejčastěji používaných separačních metod. Výhodou je vysoká účinnost, dobrá opakovatelnost a robustnost. Tato metoda je využívána pro dělení méně těkavých organických látek a tuhých látek rozpustných v organických rozpouštědlech, vodě nebo zředěných rozpouštědlech. Je využívána v analýze léčiv např. při určování čistoty a totožnosti látek, monitorování metabolitů a léčiv v tělních tekutinách, stanovení obsahu látek.

Metoda je založena na separaci sloučenin mezi stacionární a mobilní fází. Stacionární fáze je pevně zakotvena v chromatografické koloně a mobilní fáze je vždy kapalného charakteru a prochází skrze stacionární fázi, kde dochází k separaci.

HPLC patří mezi nejvíce rozvíjející se analytické metody v současné době. Vývoj jde vpřed převážně ve výrobě stacionárních fází, účinnějších čerpacích systémů a zlepšení detekce. Tvoří analytickou páteř při vývoji nových léčiv. HPLC technika je vysoce flexibilní. A díky této metodě můžeme zajistit analytické podmínky pro každé léčivo. (10), (11)



Obr. 1: HPLC chromatograf (12)

3.2.1 Chromatografické kolony

Chromatografické kolony můžeme rozdělit na několik typů podle stacionární fáze, která je v nich ukotvena. V současné době je nejvíce využíváno malých rigidních částic nebo monolitů, a to pro jejich velkou plochu povrchu. Nejvíce se používají stacionární fáze na bázi silikagelu, ale můžeme se setkat i s jinými stacionárními fázemi např. na bázi oxidu zirkoničitého, hlinitého a jiné.

Silikagel využívaný pro HPLC je amorfní a má složení $\text{SiO}_2 \cdot x \text{H}_2\text{O}$. Voda je v této formě vázána v nestechiometrickém množství a dává vzniknout silanolovým skupinám. V současné době se nejvíce využívají porézní částice o velikosti v rozmezí 3–5 μm . Výhodné se ukázalo i použití částic pod 2 μm , tzv. sub-2-microne. Koncentrace silanolových skupin se pohybuje obvykle okolo 9,0 mol/m². Hlavním omezení při práci se silikagelem v kapalinové chromatografii je jeho rozpustnost nad pH 8–9, kdy dochází k rozpuštění silikagelové matrice, a také při pH nižším než 3, kdy dochází ke kyselé katalyzované hydrolýze silaxolové vazby mezi silikagelem a organosilanem. (13), (14)

Dále dochází k jeho degradaci při vyšší teplotě. V průběhu separace je kolona umístěna nejčastěji v termostatu, kdy je udržována konstantní teplota. Používá se teplota o něco vyšší, než je laboratorní teplota, kvůli zlepšení účinnosti. Teplota se pohybuje v rozmezí od 5 °C do 100 °C, přičemž platí, že čím je vyšší, tím rychleji se degraduje sorbent, což se projeví především při extrémních hodnotách pH.

Stacionární fáze můžeme dělit podle typu navázaného ligandu:

- polární charakter stacionární fáze
- nepolární charakter stacionární fáze
- středně polární charakter stacionární fáze
- iontový charakter
- chirální charakter

3.2.1.1 Polární charakter – stacionární fáze pro normální chromatografii

O normální chromatografii mluvíme v případě, že je stacionární fáze polárnější než mobilní. Využívání stacionárních fází pro normální chromatografii ustupuje v důsledku

využití spíše chromatografie na reverzních fázích a to především kvůli větší robustnosti reverzních fází a jejich využití. Kvůli vysoké povrchové aktivitě a kyselosti silikagelu byla pozorována zvýšená vlhkost a v důsledku toho docházelo k deaktivaci povrchu a k nevratným interakcím se silně bazickými analyty. Na silikagel jsou navázány určité skupiny, které ho chrání, aby fáze zůstala polární a nedošlo k porušení silanolových skupin. Tyto skupiny, které jsou navázané na silikagel, mohou být kyano, amino, hydroxyl, nitro a propylenglykol fáze. V současnosti jsou užívány i v reverzní chromatografii.

3.2.1.2 Stacionární fáze pro reverzní chromatografii

Nejčastěji využívané reverzní fáze na bázi silikagelu jsou získávány reakcí monofunkčního organosilanu se silikagelem. Je zde navázán postranní alifatický řetězec o 1–30 uhlících, nejčastěji se jedná o oktylovou skupinu nebo o oktadecylovou skupinu – oktadecylsilikagel – OSD o 18 uhlících. Delší řetězce zlepšují stabilitu a reprodukovatelnost. Je dokázáno, že v určitých situacích se může stát, že se zbytkové silanoly mohou spolupodílet na retenci analytů. To se projevuje chvostováním píků a snížením separační účinnosti. Můžeme tomu předcházet tzv. endcappingem, což znamená krytí silanolových skupin. (14)

Aby se předešlo těmto jevům a zlepšila se kvalita silikagelu, začaly se používat velmi čisté silikagely s homogenní distribucí asociovaných silanolových skupin a tím se předešlo problémům způsobeným interakcí zbytkových kovů. Tyto silikagely označujeme jako „base deactivated silica” nebo „type B silica”. (14)

Jak už bylo zmíněno, nejvíc se využívají kolony s postranním řetězcem o 8 nebo 18 uhlících. Díky neustálému vývoji technologie výroby kolon jsou k dispozici sorbenty s fenylovou skupinou, s fluorovaným alkylovým řetězcem, které mají jinou selektivitu než C18 modifikované stacionární fáze. Některé stacionární fáze se využívají jak pro normální, tak pro reverzní chromatografii a patří mezi ně například kyano a amino modifikované fáze.

3.2.1.3 Monolitické kolony

Monolitické kolony jsou v nynější době velmi využívány z důvodu umožnění většího průtoku kolonou, přitom tlaky jsou srovnatelné s kolonami na bázi silikagelu. Jedná se o

média, jež nemají interpartikulární prostory. Uvnitř monolitických kolon je náplň, která se liší od klasických kolon v tom, že obsahuje pouze jeden blok zhotovený z porézní hmoty. U partikulárních sorbentů je kolona naplněna velkým množstvím jednotlivých zrn vhodného materiálu. Monolity nemohou být připraveny přímo v chromatografické koloně, ale musí být nejprve připravena samostatně hmota, jež je následně vložena do kolony, vytvarována a chemicky modifikována podle účelu chromatografické kolony. Monolitické kolony podle náplně můžeme rozdělit na anorganické a organické. Hmota uvnitř monolitických kolon obsahuje množství makropor, což jsou velké póry o velikosti 1 μm a umožňují plynulý tok mobilní fáze a dále velké množství malých mezopór, o velikosti 12 nm. Díky makroporům a mezoporům je povrch monolitu značně zvětšený a díky tomu je i snadnější izokratická separace v reverzní chromatografii. (14), (15)

3.2.2 Detektory v HPLC

Detektorem rozumíme zařízení, jež monitoruje a vyhodnocuje změny složení mobilní fáze. A to buď měřením fyzikálních veličin, nebo chemických veličin. Volba detektoru, který bude při měření použit, závisí na několika faktorech. Jak na chemických vlastnostech analytu, požadovaném rozsahu koncentrací, složitosti matrice, tak i na chromatografickém systému, který pro daný analyt použijeme. Detektory můžeme rozdělit na více či méně selektivní nebo univerzální detektory, podle toho, na které analyty detektor reaguje. Detektor univerzální reaguje na všechny analyty, zatímco detektor selektivní pouze na určitou skupinu látek podobných vlastností. V současné době patří mezi hlavní požadavky, jež jsou kladeny na detektory ve vysokoúčinné kapalinové chromatografii, stabilita a reprodukovatelnost odezvy. To zajišťuje nízká hladina šumu a driftu, citlivost detektoru, široký lineární rozsah, rychlá odezva, robustnost vůči změnám tlaku, teploty a průtoku mobilní fáze a minimální rozmývání chromatografických zón v důsledku a minimálního objemu detekční cely.

Nejvíce využívaný detektor ve vysokoúčinné kapalinové chromatografii je UV/VIS spektrofotometrický detektor. Spektrofotometrický detektor je založen na interakci látek s elektromagnetickým zářením. Paprsek prochází skrze průtokovou celu, kde dochází ke změně jeho intenzity, a ta je potom zaznamenávána. V oblasti UV absorbuje většina organických látek. Jako zdroj se používá nízkotlaká rtuťová, kadmiová nebo zinková výbojka. Vzhledem k tomu, že ani jedna z těchto výbojek neposkytuje absolutně

monochromatické záření, je nutné použít filtr. Pokud mají detektory nastavitelnou vlnovou délku, je možný výběr z několika vlnových délek. (16)

Pomocí tohoto detektoru je měřena absorbance mobilní fáze v rozmezí od 190–400 nm (UV) a 400–800 nm (VIS) a velikost absorbance je dána pomocí Lambert-Beerova zákona

$$A = \varepsilon \cdot c \cdot l$$

kde A je absorbance, ε molární absorpční koeficient, c koncentrace absorbující složky a l je tloušťka absorbující vrstvy.

Mezi další často využívané spektrofotometrické detektory v HPLC patří DAD – detektor s diodovým polem, dále FD – fluorescenční detektor a stále častěji se používá MS – hmotnostní detektor. MS detektor má oproti jiným detektorům vyšší cenu, ale i přesto je v dnešní době stále více využíván pro svou vysokou detekční účinnost. Hmotnostní spektrometr pracuje za vysokého vakua, naproti tomu u HPLC jsou analyzované látky unášeny v proudu kapaliny při tlaku o velikosti jednotek až desítek MPa. Hlavním problémem ve spojení HPLC/MS bylo převedení analytu do plynné formy a odstranění nadbytku mobilní fáze. V počátcích měření byla u spojení HPLC/MS využívána elektronová ionizace (EI), v některých případech chemická ionizace (CI). Velké množství vnitřní energie získané při elektronové ionizaci a chemické ionizaci může vést k rozsáhlé fragmentaci a znemožňuje určení molekulové hmotnosti u některých typů látek, které jsou běžně analyzovány kapalinovou chromatografií. Oproti tomu má elektronová ionizace výhodu dostupnosti rozsáhlých knihoven hmotnostních spekter a jsou u ní dopodrobna popsána pravidla fragmentace jednotlivých tříd látek. V současnosti je upřednostňována metoda měkkých ionizačních technik, jako je např. ionizace elektrosprejem, chemická ionizace za atmosférického tlaku a další. Nepochází zde k tak rozsáhlé fragmentaci a můžeme tedy lépe určit molekulovou hmotnost. Nevýhodou je, kvůli malému množství fragmentovaných iontů, znesnadnění odvození struktury, čemuž se lze vyhnout v použití tandemu HPLC/MS/MS. Elektrochemický a amperometrický detektor se používá pouze v HPLC s reverzní fází a vodivostní detektory jsou využity při iontovýměnné chromatografii. (17)

Právě detektor je druhý nejdůležitější článek vysokoúčinného kapalinového chromatografického systému, hned za kolonou. Reaguje na změny a převádí je na elektrický signál, jenž je zaznamenán a zpracován a díky němuž jsou nám podávány informace o daném vzorku. Aby dané informace odpovídaly skutečnosti, musí systém vykazovat určité parametry a metoda musí být validována. (18)

3.2.3 Parametry v HPLC

Při detekci analytu může za určitých podmínek docházet k tzv. rozmývání píku. Toto rozmývání je nežádoucí jev, který negativně ovlivňuje reprodukovatelnost integrace píku a může být kvantifikováno **faktorem symetrie**. Pokud je hodnota faktoru symetrie menší než 1, dochází k tzv. frontingu – pík je rozmýván vpřed a pokud je jeho hodnota vyšší než 1, dochází k tailingu – chvostování píku. V ideálním případě, kdy se pík nerozmývá, je hodnota faktoru symetrie právě rovna 1.

Dalším parametrem při měření HPLC je **linearita**, kterou rozumíme lineární odezvu v rozmezí testovaných koncentrací. **Přesnost** měření můžeme interpretovat jako těsnost shody naměřených veličin při opakovaném získávání výsledků. Je zatížena pouze malou směrodatnou odchylkou při měření. Je důležité neplést si tento parametr se správností, někdy dochází k chybě, kdy se tyto dva parametry považují za synonyma. **Správnost** vyjadřuje shodu mezi aritmetickým průměrem nekonečného počtu opakovaných hodnot a referenční hodnoty veličiny. Důležitými parametry v detekci HPLC systému je citlivost, mez detekce a mez stanovitelnosti. **Citlivostí** rozumíme výšku píku dělenou koncentrací analytu. Detektory snímají signál buď při hmotnostním toku analytu v detektoru (mol/s), což je například detektor hmotnostní, nebo detekují koncentraci analytu v detektorové cele (mol/l) – optické detektory. **Mez detekce** (LOD, limit of detection) je minimální hranice detekovatelnosti analytu. Je to taková koncentrace analytu, pro kterou poskytne detektor signál trojnásobný oproti úrovni šumu. LOD je definován vztahem

$$\text{LOD} = 3 \cdot h_n / m$$

kde h_n je šum základní linie a m je směrnice kalibrační křivky.

Mez stanovitelnosti (LOQ, limit of quantification) je interpretována jako nejmenší množství analytu, jež lze stanovit. Nižší hodnoty LOD a LOQ lze získat tím, že bude výška píku co nejvyšší a šum co nejnižší. Šum můžeme charakterizovat jako časovou fluktuaci měřeného signálu bez přítomnosti analytu. (16), (18), (19), (20)

Dalšími sledovanými/vyhodnocovanými parametry u HPLC jsou opakovatelnost, reprodukovatelnost a selektivita, přičemž **selektivita** nám umožňuje určení správného analytu v přítomnosti interferujících látek. Zjednodušeně řečeno nás informuje o tom, jestli se na měřeném signálu může podílet i jiný faktor, nebo pouze měřený analyt. Pokud je u metody zjištěna malá selektivita, zvyšuje se možnost získání falešně pozitivního výsledku. Toho lze dosáhnout v měření i hysterezí, což je vliv minulých měření na současná měření. Je tedy důležité, aby hodnota selektivity byla vysoká. **Opakovatelnost** nepřímo vyjadřuje chybu, která byla provedena tou samou osobou, při stejném měření, na stejném místě, kdy byl použit stejný vzorek, pouze s časovým odstupem. Naproti tomu **reprodukovatelnost** nás informuje o chybě, jež vznikla při práci se stejným vzorkem a stejnou metodou analýzy, ale v jiné laboratoři. (20)

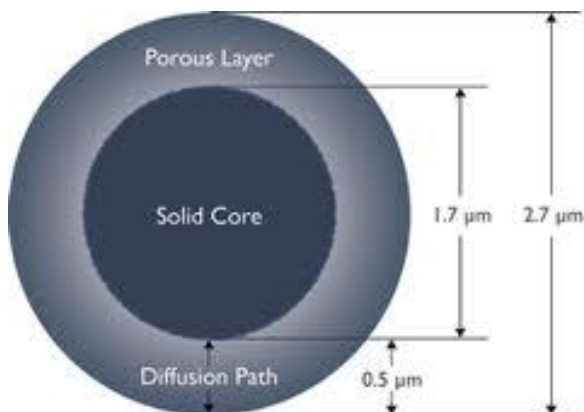
3.3 Core-shell kolony

Vývoj kolon pro HPLC jde stále vpřed. Byly vyvinuty částice o velikosti $<3\mu\text{m}$, které mají podobné výhody, jako částice menší $<2\mu\text{m}$, ale je u nich dosaženo nižšího tlaku při analýze, což umožňuje provádět rychlé a efektivní separace s vyšším rozlišením. (21)

3.3.1 Core-shell kolony – struktura

Core-shell kolony jsou plněné částicemi o přibližné velikosti $3\mu\text{m}$, jež jsou tvořeny pevným jádrem a porézním obalem (Obr. 2). Jsou složeny ze sférických polystyrenových částic pokrytých elektricky vodivým polymerem [3,4-(ethylendioxy)thiofen] tzv. PEDOT. Velikost jádra se pohybuje okolo $1,7\mu\text{m}$ a hloubka pláště okolo $0,3\text{--}0,5\mu\text{m}$. Core-shell částice mají oproti plně porézním částicím výhodu v tom, že analyty mají v těchto částicích kratší difuzní dráhu, právě z důvodu pevného jádra. Díky částečné pórovitosti je snížena axiální disperze analytů a minimalizováno rozmývání píku. Další výhodou je větší velikost částic, díky čemuž je možný cca o polovinu nižší tlak při stejné velikosti kolony i za stejných podmínek. Účinnost těchto kolon obsahujících core-shell částice je téměř dvakrát větší než u kolon plněných

částicemi o velikosti 3 μm a srovnatelná s kolonami o velikosti částic pod 2 μm . (22), (23)



Obr. 2: Core-shell částice (24)

Core-shell kolony jsou používány především v současné době, ale zájem o jejich strukturu byl už v 60. letech. Nejprve byly vyrobeny sférické skleněné částice, jež byly potaženy styren-divinylbenzenovou vrstvou a chovaly se jako iontoměniče. Mezi první takové kolony patřily např. Zipax a Corosil, jejich použití však nebylo moc úspěšné, navíc byl problém s dostupností materiálu, a tak zmizely brzy z trhu.

Během osmdesátých let byly vyvinuty částice o velikosti 50 μm se strukturou známou jako porézní materiál. Tento materiál byl dobře dostupný, ale bohužel u něj byla nízká kapacita vzorků. Částice tedy byly dále zmenšovány na velikost okolo 35 μm a byla u nich pozorována snížená doba separace oproti částicím z plně porézních materiálů. (21), (25)

Na trh byly v dalším desetiletí uvedeny částice o velikosti 5 μm , ale opět byly staženy z prodeje proto, že jejich využití bylo především pro analýzu peptidů a proteinů, ale pro analýzu biomolekul byly využívány jiné metody.

V současnosti jsou využívány částice o velikosti okolo 3 μm . Mezi nejvyužívanější druhy patří kolony Halo v provedení C18, C8, Hilic a Amide, dále kolony Kinetex – C18, C8, RP-Amide, fenylhexyl, F15 a peptide ES-C18. Mezi kolony s částicemi menšími než 3 μm můžeme zařadit např. SunShell, Acucorre nebo Eiroshell. Kolony rozlišujeme podle tloušťky vnější vrstvy, průměru jádra, celkovým průměrem částice,

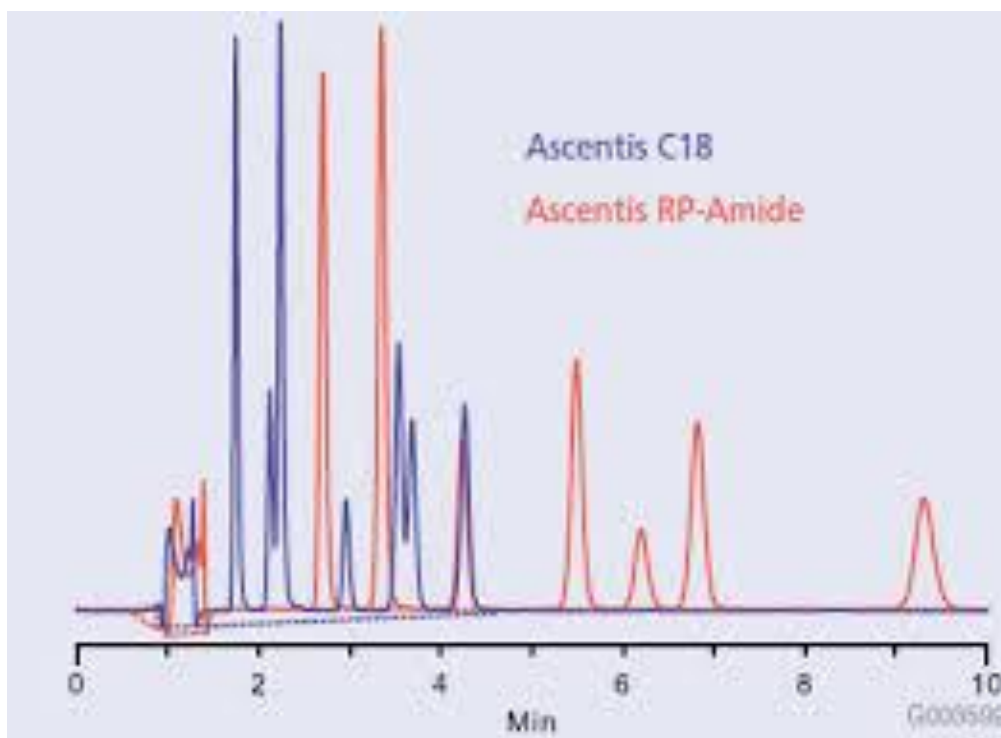
stupněm nerovnosti povrchu, průměrným objemem a standardními odchylkami těchto hodnot. (21), (26), (27)

Nejčastěji využívané core-shell kolony jsou plněny částicemi o celkovém průměru 2,7 μm a o velikosti pórů 90 \AA a specifickým povrchem 150 m^2/g . Pro jejich výrobu je nejčastěji využito ultra čistého oxidu křemičitého typu B. Jsou stabilní při pH 2–9 a maximální přípustný tlak je okolo 60 MPa. Kolony se mohou lišit podle výrobců svou účinností. Materiály pro výrobu sorbentů nejsou zcela stejné. Obtížné je i vyrobit kolony, jež by měly identické rozměry. Tím pádem se mohou lišit sorbenty svojí kvalitou a rozměry a účinnost jednotlivých kolon může být jiná. Proto je důležité, aby byla získaná data interpretována s rezervou. U core-shell částic je pozorována nižší schopnost retence, vzhledem k omezení difuzní dráhy pro zkoumaný analyt. V porovnání s kolonami, jež obsahují částice menší jak 2 μm je velikost hodnot přibližně o 15 % nižší. Retentivita se může také lišit v závislosti na průměru pórů, hustotě ligandů na povrchu, na obsahu uhlíku, kvalitě endcappingu a procesem při výrobě kolon. (25), (26), (27), (28)

Byla provedena studie na core-shell kolonách, kdy na nich byly analyzovány farmaceutické sloučeniny s neutrálními a kyselými mobilními fázemi. Při kyselém pH zůstávají silanoly neutrální a separace je prováděna s reverzní fází, naproti tomu pokud je pH neutrální, většina silanolů je v deprotonované formě. Tím dochází k retenci bazických sloučenin s nezměněnou silanolovou aktivitou. Proto byl u core-shell proveden endcapping, aby bylo zabráněno reakci silanolových skupin s analytem. (28)

Pokud jsou při analýze neutrálních nebo bazických látek získávány na kolonách C18 nebo C8 neostře píky, využívá se RP-Amide kolony. RP-Amide kolony se hodí též pro látky velmi dobře rozpustné ve vodě, jež potřebují mobilní fázi s velkým podílem vody. Jejich použití je vhodné i u polárnějších analytů, které tvoří vodíkové vazby, pro vyšší selektivitu. Amidová skupina těchto kolon vytváří větší selektivitu pro analyty tvořící vodíkové vazby s heteroatomy. Oproti neutrálním látkám mají aminy, karboxylové kyseliny, fenoly a alkoholy zvýšenou retenci na RP-Amide kolonách. Jako mobilní fáze se nejčastěji využívá voda ve směsi s methanolem nebo acetonitrilem. Lze použít i stoprocentně vodnou fázi, ale je doporučeno, aby bylo přidáno alespoň minimální množství organického rozpouštědla. Aby byly zachovány optimální vlastnosti kolony co nejdéle, neměla by pracovní teplota přesáhnout 60 $^{\circ}\text{C}$ a pracovní pH by mělo být

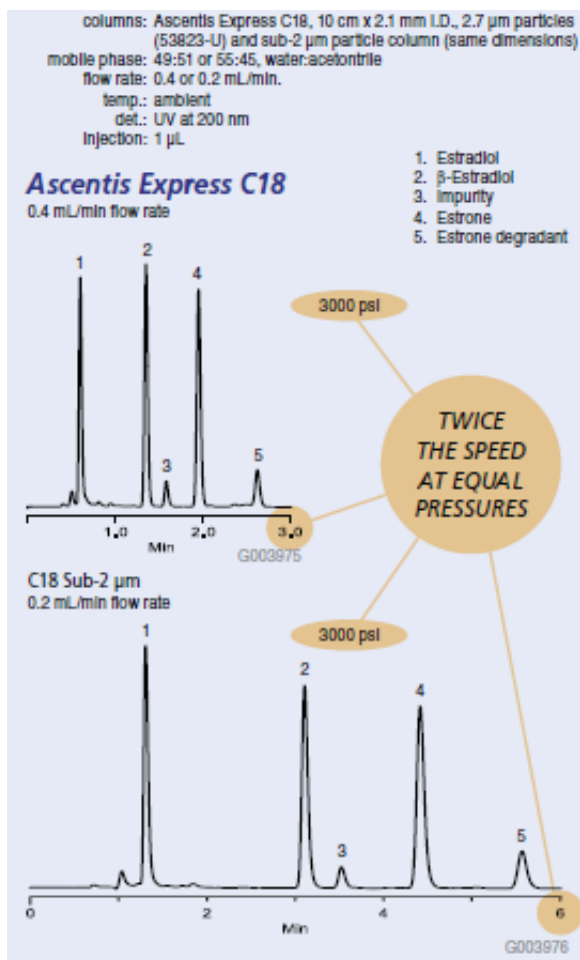
udržováno v rozmezí pH 2–9. Pro maximální stabilitu sloupce by měl být pracovní tlak udržován maximálně do 60 MPa. (22), (26), (29)



Obr. 3: Porovnání selektivity RP-Amide kolony a C18 kolony (22)

3.3.2 Core-shell kolony - rychlost

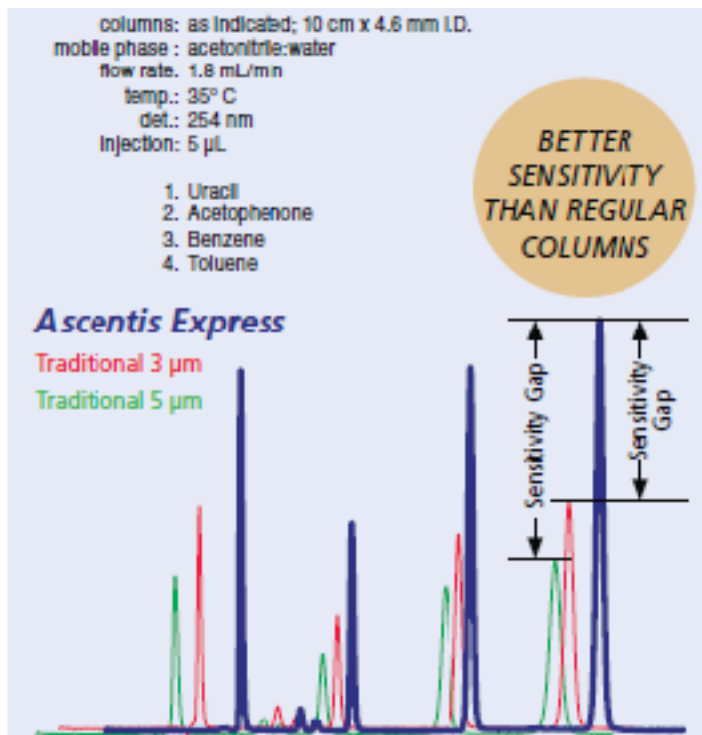
Hlavní výhodou při separaci pomocí core-shell je zvýšení rychlosti. Oproti částicím menším než 2 μm vytváří core-shell částice tlak o cca polovinu nižší a je tedy možné použití delších kolon i rychlejšího průtoku. To lze i za předpokladu, že jsou core-shell částice větší než typické porézní částice. Rychlost separace je tedy několikanásobně zvýšena díky většímu průtoku při stejném tlaku bez ztráty účinnosti (Obr. 4). (22)



Obr. 4: Rychlost separace (22)

3.3.3 Core-shell kolony – citlivost

Mezi další výhody core-shell částic patří vysoká citlivost. Píky vykazují vyšší poměr S/N oproti plně porézním částicím a jsou vyšší. Výhodou je velká odolnost, která je zajištěna pomocí částic, jež mají vyšší hustotu než plně porézní částice. Díky tomu nedochází k vytváření cestiček v lůžku (channeling) a analyty mohou bez problémů interagovat se stacionární fází (Obr. 5). (22)



Obr. 5: Porovnání citlivosti kolony (22)

3.3.4 Core-shell kolony – rozlišovací schopnost

Dobrou vlastností je i vysoká rozlišovací schopnost. Oproti částicím o velikosti 3 µm a 5 µm vykazují core-shell částice ostřejší pík. Díky větší propustnosti částic a nižšímu tlaku je možné pro lepší rozlišení využití i delších kolon. (22)

4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 Přístrojové vybavení

- Pumpa: Shimadzu LC-10AD VP
- Degaser: Shimadzu GT-154
- Směšovací jednotka: Shimadzu FCV-10AL VP
- Termostat: Shimadzu CTO-10ACVP
- Kolona: Ascentis Express RP-Amide; 10 cm x 3,0 mm; 2,7 µm
- UV/VIS detektor: Shimadzu SPD-20A
- Software: Clarity Lite version 3.0.5.505
- Laboratorní váhy: Sartorius GMBH – typ: A200S (Německo)
- Magnetická míchačka: MrHei-Mix S (Německo)
- Vakuové čerpadlo: Vace-space 20 (Slovensko)
- Sonifikátor: Bandelin Sonorex
- Stříkačkový filtr, MS Nylon, 0,22 µm
- pH konduktometr: InoLab pH / Cond 720

4.2 Použité chemikálie

- Purifikovaná voda, ultračistá (MiliQ H₂O Milipore)
- Methanol (Sigma Aldrich)
- Mikonazolium (Fagron a.s.)
- Kyselina citronová 0,1 mol/l (Sigma Aldrich)
- Hydrogenuhlíčan sodný 0,2 mol/l (Sigma Aldrich)

- Vzoroky:
 - 3T + 30% TEC – PLAC 5h
 - 3D + 30% TEC + 5% MIC 5h
 - PLGA A 1h, 3h, 24h, 48h, 3d, 7d
 - PLGA B 1h, 3h, 24h,48h, 3d, 7d
 - 3T-A 1h, 3h, 24h, 48h, 3d, 7d
 - 3T-B 1h, 3h, 24h, 48h, 3d, 7d

4.3 Příprava roztoků

4.3.1 Příprava roztoku standardu mikonazolu

Zásobní roztok mikonazolu o koncentraci 5 g/l byl připraven tak, že navážka 0,0500 g mikonazolu byla kvantitativně převedena do 10 ml odměrné baňky a doplněna methanolem po rysku. Tento roztok byl následně použit jako standard mikonazolu a pracovalo se s ním při ředění u kalibrační řady mikonazolu.

4.3.2 Příprava kalibračních roztoků mikonazolu

Při přípravě kalibračních roztoků byl použit zásobní roztok mikonazolu o koncentraci 5 g/l. Ten byl 10x zředěn methanolem na koncentraci 500 mg/l a z tohoto roztoku se vycházelo při tvorbě kalibrační řady o zaokrouhlených koncentracích 70 mg/l, 50 mg/l, 25 mg/l, 20 mg/l, 15 mg/l, 10 mg/l, 5 mg/l, 1 mg/l. Kalibrační roztoky byly ředěny směsí methanol:pufir 70:30.

4.3.3 Příprava citrát fosfátového pufru o pH 7,4

Pro přípravu citrát fosfátového pufru byla použita kyselina citronová o koncentraci 0,01 mol/l a hydrogenfosforečnan sodný o koncentraci 0,02 mol/l podle tabulek dle Merck. Při přípravě roztoku kyseliny citronové byla velikost navážky 53 mg na 25 ml vody a při přípravě roztoku hydrogenfosforečnanu sodného 712 mg soli na 100ml vody. Tyto dva roztoky byly smíchány v poměru 1:9,2. U výsledného roztoku bylo měřeno

pH, které by mělo odpovídat pH 7,4. Odchytky od požadovaného pH byly upraveny přidáním roztoku kyseliny nebo soli.

4.3.4 Příprava vzorků

Vzorky byly připraveny na Katedře farmaceutické technologie. Získány byly pomocí disolučního testu větveného PLGA (nosná matrice) s obsahem mikonazolu. Dodané vzorky obsahovaly disoluční pufr a v něm rozpuštěnou degradovanou matrici a mikonazol. Vzorky byly odebírány v pravidelných časových intervalech: 1 hodina, 3 hodiny, 24 hodin, 48 hodin, 3 dny a 7 dní. Tyto vzorky bylo nutno zpracovat před HPLC analýzou. Od odebrání až po předseparační úpravu byly vzorky uchovávané v lednici při teplotě okolo 4 °C. Bylo nutné je nejprve zředit nadbytkem methanolu, z důvodu vysrážení soli, přefiltrovat a dále naředit vodou ke konečnému poměru MeOH:vodná část 70:30. Každý vzorek byl měřen dvakrát. Nejprve bylo odebráno určité množství roztoku z vialky, zpracováno a následně byla provedena druhá příprava ze stěny vialky, protože se na ní část mikonazolu vysrážela.

Příprava roztoku odebraného ze vzorku

Množství disolučního média ve vialce bylo 15 ml. Nejprve bylo pracováno s nadbytkem methanolu v poměru 75:25, aby došlo k vysrážení soli, která byla následně odfiltrována. Pokud by se nepřidal nadbytek methanolu, mohlo by dojít k vysrážení soli na koloně. Z vialky bylo tedy odebráno 500 µl vzorku a doplněno 1500 µl methanolu na celkový objem 2 ml. Takto získaný zakalený roztok byl přefiltrován přes stříkačkový filtr MS Nylon (0,22 µm). Aby bylo dosaženo konečného poměru 70:30, muselo být odebráno 930 µl přefiltrovaného vzorku (v původním poměru MeOH:H₂O 75:25) a doplněno 70 µl vody na celkový objem 1 ml.

Příprava roztoku omytím stěny vialky, kde by mohl být vysrážen mikonazol

V první řadě byl zbytek vzorku (14,5 ml) přelit do jiné, čisté vialky. Opět se zde pracovalo s nadbytkem methanolu v poměru MeOH:H₂O 75:25, aby byla sůl primárně vysrážena a odfiltrována a zabránilo se tak vysrážení soli na koloně. Do vialky bylo vráceno 500 µl roztoku vzorku a doplněno 1500 µl methanolu. Byl nutný řádný oplach

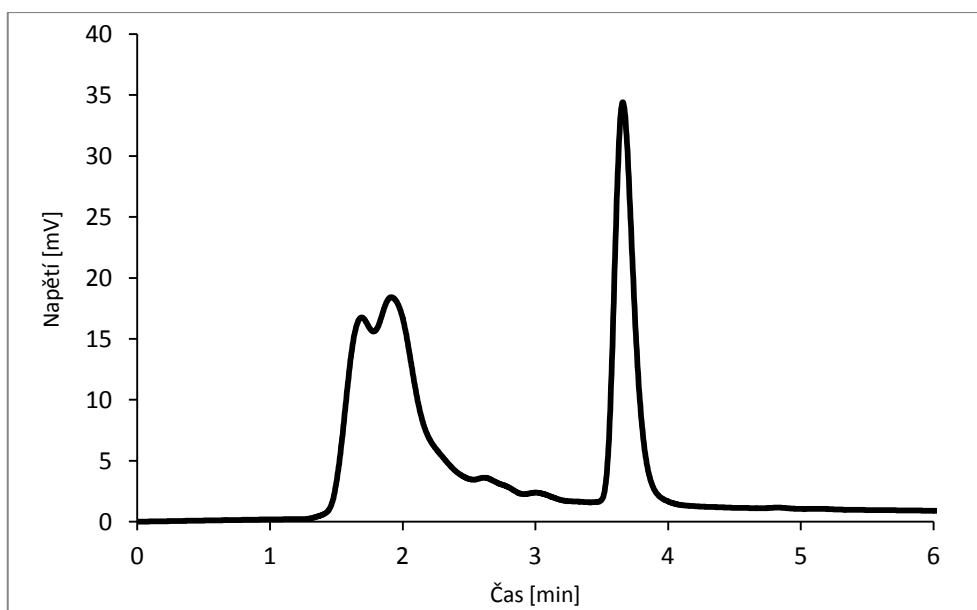
stěn pomocí methanolu a důsledné promíchání na vortexu, aby byl na stěnách vysrážený mikonazol převeden do roztoku. Postup byl dále stejný jako u předchozího vzorku. Byla provedena filtrace zakaleného roztoku a následně bylo odebráno 930 μ l přefiltrovaného vzorku (v původním poměru MeOH:H₂O 75:25) a doplněno 70 μ l vody, aby výsledný poměr odpovídal 70:30.

5. VÝSLEDKY A DISKUSE

5.1 Vývoj chromatografické metody

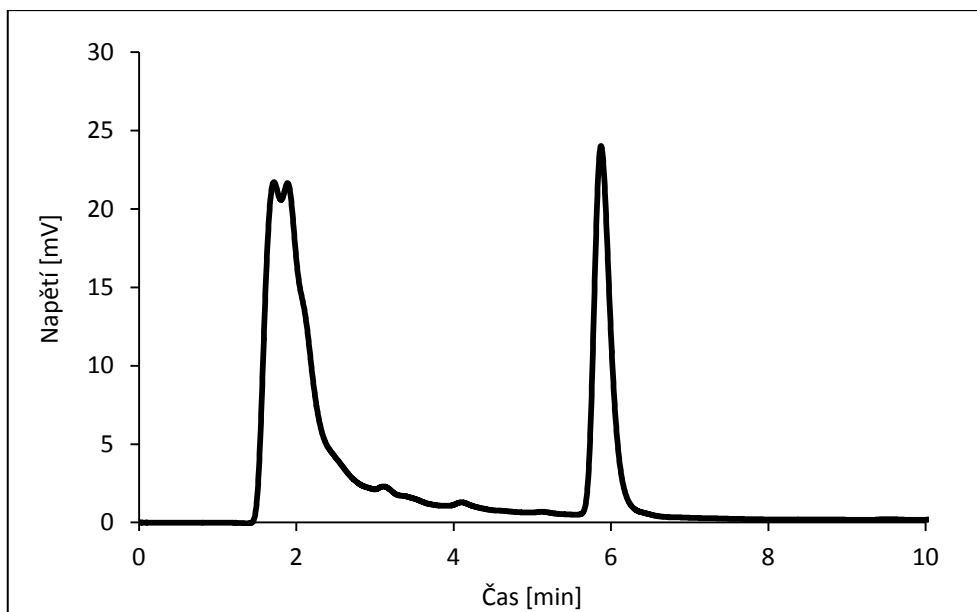
5.1.1 Složení a optimalizace mobilní fáze

Jako mobilní fáze byl použit methanol s vodou v různých poměrech, aby bylo možné zajistit co nejlepší podmínky, jako je dostatečné oddělení píku a rychlost analýzy. Nejprve byla použita mobilní fáze o poměru methanol – voda 90:10 (Obr. 6).



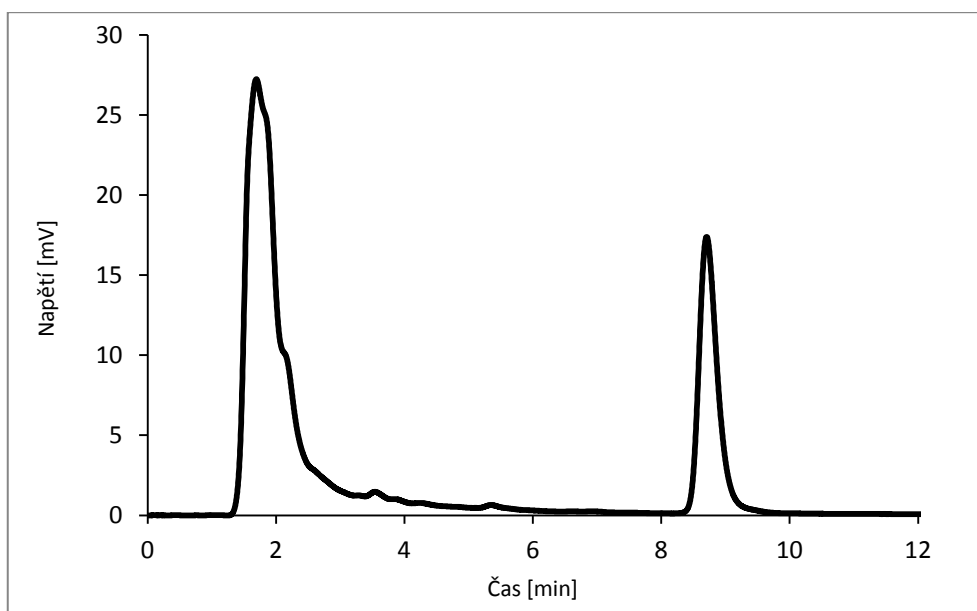
Obr. 6: Chromatogram vzorku mikonazolu, methanol:voda (90:10)

Další použitá mobilní fáze byla opět methanol:voda, tentokrát v poměru 80:20. Podmínky se oproti předchozí analýze nelišily, pouze se lišil poměr vodné a methanolové složky (Obr. 7).



Obr. 7: Chromatogram vzorku mikonazolu, methanol:voda (80:20)

Z chromatogramu je patrné, že snížením obsahu organické fáze se prodlužuje retenční čas mikonazolu. Nicméně stále nedošlo k dostatečnému oddělení nejdříve vymývaných nečistot od mikonazolu. Proto se zkoušelo dále zvýšit obsah vody v mobilní fázi. Další analýza probíhala opět za stejných podmínek, pouze při jiném poměru methanolu a vody – 75:25 (Obr. 8).

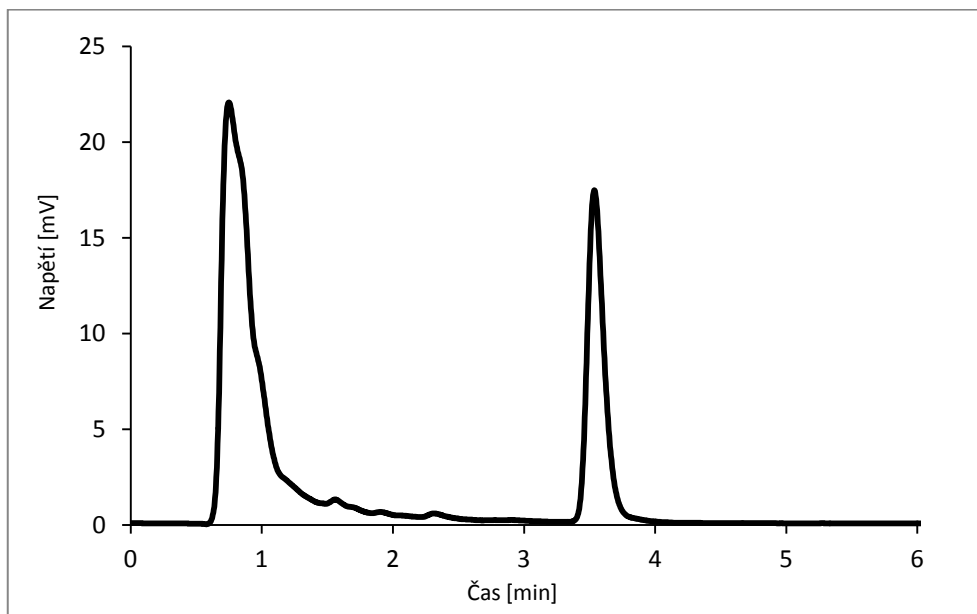


Obr. 8: Chromatogram vzorku mikonazolu, methanol:voda (75:25)

Došlo k již dostatečnému rozdělení nečistot od analytu, bylo však žádoucí celou analýzu zrychlit. Toho bylo dosaženo zvýšením průtoku při zachování poměru mobilní fáze

75:25. Aby při vyšším průtoku nebyl tlak příliš vysoký, musela být zvýšena teplota z 35 °C na 40 °C. Při této analýze nedošlo k návratu na baseline.

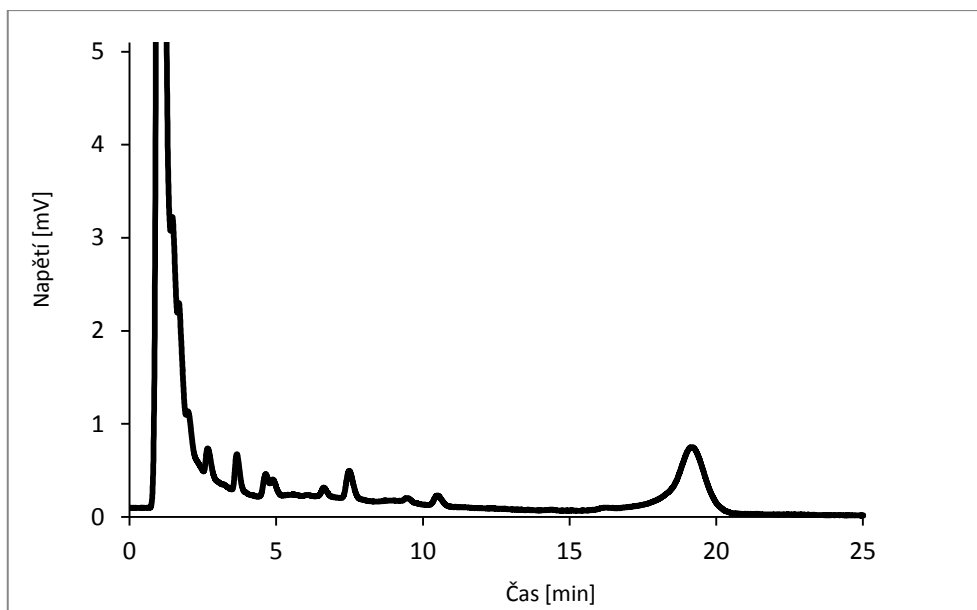
Obdobně tomu bylo i při stejném poměru mobilní fáze, ale dalším zvýšením teploty na 45 °C a zvýšením průtoku 0,7 ml/min. Tato analýza byla sice rychlá, ale nedošlo k dostatečnému rozdělení píku mikonazolu od nečistot (Obr. 9).



Obr. 9: Chromatogram vzorku mikonazolu, methanol:voda (75:25)

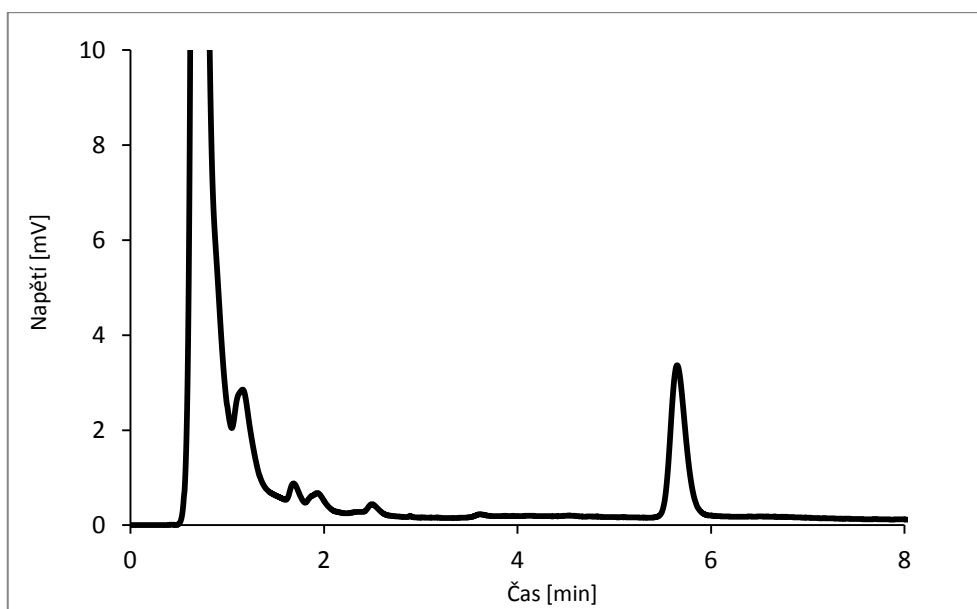
Průtok byl tedy snížen na 0,600 ml/min, poměr fází byl zachován, nedošlo však k návratu na baseline, nedošlo k dělení. Proto bylo nutné snížení poměru mobilní fáze na 60:40, při průtoku 0,5 ml/min, teplota zůstala stejná 45 °C. Při tomto měření však nedošlo ani ve 32. minutě k vymytí mikonazolu a měření bylo zastaveno.

Byly vyzkoušeny i jiné poměry mobilní fáze a to poměr methanol:voda 65:35 a 68:32, přesto byl nejvhodnější poměr mobilní fáze 70:30, protože u předchozích poměrů byl tvar píku moc široký, retenční čas byl velmi dlouhý a píky byly obtížně integrovatelné (Obr. 10).



Obr. 10: Chromatogram vzorku mikonazolu, methanol:voda (65:35)

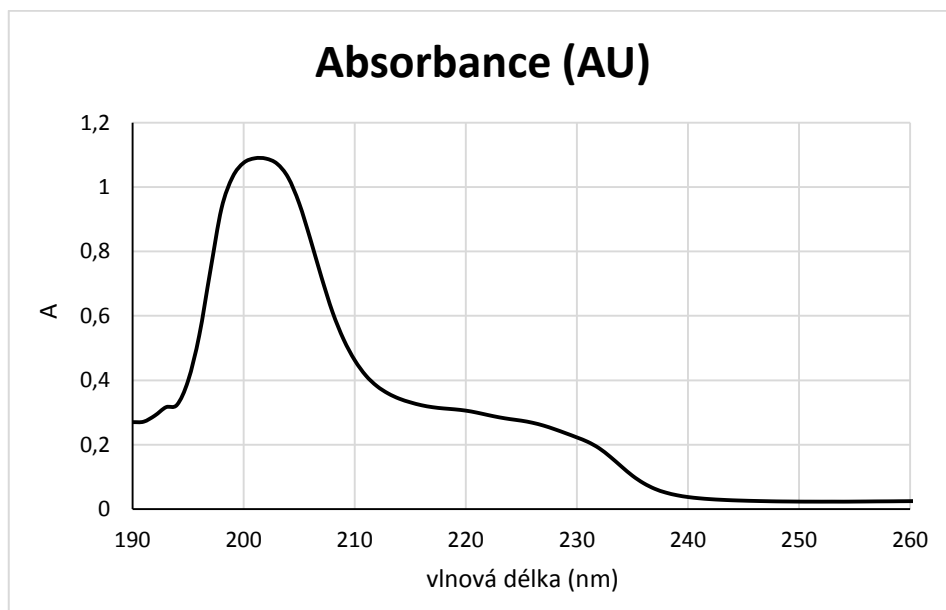
Jako výchozí poměr mobilní fáze byl zvolen tedy poměr methanol:voda 70:30. Aby byla analýza rychlejší, byl zvyšován průtok mobilní fáze a aby nedocházelo ke zvyšování zpětného tlaku, byla zvýšena i teplota z původních 35 °C na 45 °C. Velikost průtoku musela být kontrolována, aby tlak nepřerostl 25 MPa. Při průtoku 0,8 ml/min a teplotě 45 °C dosahoval zpětný tlak velikosti okolo 23 MPa (Obr. 11).



Obr. 11: Chromatogram vzorku mikonazolu, methanol:voda (70:30)

Optimální podmínky tedy byly methanol:voda 70:30, 45 °C, průtok 0,8 ml/min, nástřik 5 µl (Obr. 11).

Na základě literární rešerše probíhala všechna měření pod detekcí 254 nm. (30), (31) Tyto podmínky se zdály jako optimální, avšak při detekci 254 nm pík mikonazolu vykazoval o dva řády nižší absorbanci, než při 220 nm (Obr. 12). Proto byly podmínky detekce upraveny na 220 nm.



Obr. 12: Absorpční spektrum mikonazolu

5.1.2 Optimální podmínky pro HPLC analýzu

Pomocí značné řady měření byly zjištěny optimální podmínky pro analýzu mikonazolu pomocí HPLC. Byla použita core-shell kolona Ascentis Express RP-Amide; 10 cm x 3,0 mm; 2,7 µm.

Podmínky:

Mobilní fáze: Methanol: voda 70:30

Nástřik: 5 µl

Průtok: 0,800 ml/min

Teplota: 45 °C

Vlnová délka: 220 nm

Tlak:	22,8 MPa
Retenční čas mikonazolu:	5,65 min
Čas kompletní analýzy:	7 min

5.1.3 Ověření správné eluce mikonazolu

Před vytvořením kalibrační řady roztoků bylo nutné připravit několik vzorků, pomocí nichž bylo možno ověřit, zda se v čase mikonazolu neeluje jiná látka, která by mohla zkreslit výsledky analýzy. Kromě eluce jiné látky bylo nutné ověřit, zda není mikonazol zadržován na filtru a nejsou eluovány další látky z pufru či filtru, které by analýzu mikonazolu mohly negativně ovlivnit. Vzorky obsahovaly vysokou koncentraci soli, která se po smísení s mobilní fází v poměru 70:30 (MeOH:voda) vysrážela a vzorky nemohly být nastříknuty přímo na kolonu. Sůl musela být vysrážena předem a výsledný roztok přefiltrován. Vysrážení soli před nástřikem na kolonu bylo docíleno pomocí zředění v nadbytku methanolu. Nadbytek methanolu byl v poměru methanol:voda 80:20. Filtrací přes 0,22 μm stříkačkový filtr byla odstraněna vysrážená sůl a doplněním přefiltrovaného roztoku vodou bylo dosaženo konečného poměru methanol:voda 70:30.

První vzorek byl připraven v poměru methanol:voda 70:30, kdy bylo použito 1400 μl methanolu a 600 μl vody. Nebylo zde nutné pracovat s nadbytkem methanolu, protože nebyl přidáván pufr a nemělo se tedy co vysrážet a filtrovat. Při tomto měření vyšla rovná baseline přímka, jelikož ve vzorku nebyl mikonazol, ani nečistoty z pufru.

Další vzorek byl opět methanol s vodou v poměru 70:30, ale po přípravě byl vzorek přefiltrován, aby se zjistilo, jestli se z filtru uvolňují nečistoty. Opět zde nebylo nutné použít nadbytek methanolu, jelikož zde šlo pouze o zjištění uvolňování nečistot z filtru a nepřidával se pufr. Bylo pozorováno jen malé množství uvolněných nečistot mimo retenční čas mikonazolu.

Třetí vzorek obsahoval methanol a pufr v poměru 70:30. Zde však už byl nejprve připraven roztok s nadbytkem methanolu 80:20, aby se vyloučila možnost, že by po nástřiku vzorku na kolonu došlo k vysrážení soli. Bylo odebráno 2400 μl čistého methanolu a 600 μl pufru a přefiltrováno pomocí stříkačkového filtru. Aby byl výsledný poměr 70:30, muselo být odebráno 1750 μl z přefiltrovaného roztoku (z původního roztoku s nadbytkem methanolu v poměru 80:20) a doplněno 250 μl H_2O . Toto měření

bylo provedeno proto, aby se zjistilo, že v retenčním čase mikonazolu se neeluuje žádná další látka z pufru, což bylo potvrzeno.

U předposledního vzorku byl opět poměr methanolu a vody 70:30, ale stejně jako u předchozího vzorku bylo použito nadbytku methanolu v poměru 80:20. Oproti předchozímu vzorku bylo pracováno s vodou místo pufru. Roztok vzorku, jenž byl použit, byl vytvořen ze 160 μl zásobního roztoku mikonazolu o koncentraci 500 mg/l a 3840 μl čistého methanolu. Poté byl doplněn 1000 μl H_2O , pro zachování poměru methanol:voda 80:20. Tento roztok byl přefiltrován. Dále byl převeden na roztok o poměru 70:30 smícháním 2630 μl přefiltrovaného roztoku a 370 μl H_2O . Bylo provedeno vícečetné měření. Nejprve byl roztok měřen 4krát filtrovaný a později 4krát nefiltrovaný z důvodu porovnání nečistot, které se při filtraci uvolňují. Nefiltrovaný roztok byl vytvořen z 875 μl methanolu (odebráno z roztoku s nadbytkem methanolu v poměru 80:20, připraveného při tvorbě filtrovaného vzorku) a 125 μl vody. Průměr ploch mikonazolu u nefiltrovaného vzorku byl 3601 a u filtrovaného vzorku 3579, lišily se od sebe tedy pouze o 0,61 %, z čehož bylo usouzeno, že k sorpci mikonazolu v nějaké relevantní míře nedochází. U tohoto předposledního vzorku byl na konci analýzy vidět pík v retenčním čase mikonazolu, ale nebyly zde žádné nečistoty způsobené pufrem. Pík mikonazolu byl však kvůli nepřítomnosti pufru rozpítý.

U posledního vzorku byla příprava obdobná jako u předchozího vzorku, jen byl místo vody použit pufr. Na chromatogramu z tohoto měření byl pozorován pík mikonazolu i nečistoty způsobené přidáním pufru. Tento poslední vzorek byl připraven ještě jednou, také v nadbytku methanolu, ale v jiné koncentraci. Místo původního poměru 80:20 byl použit poměr 75:25. Na konci měření musela být spočítána a ověřena koncentrace, je-li stejná jak u vzorku s nadbytkem methanolu při poměru MeOH:H₂O 80:20, tak u vzorku s nižším nadbytkem methanolu v poměru MeOH: H₂O 75:25. Plochy píků mikonazolu byly u obou vzorků prakticky stejné. Těmito pokusy bylo ověřeno, že je možné takto připravit roztoky pro body kalibrační přímky.

5.2 Validace

Validací zjišťujeme správnou funkčnost systému a ověřujeme chromatografickou metodu. Pro tato ověření byl použit roztok mikonazolu o koncentraci 10 mg/l, který byl připraven ze zásobního roztoku.

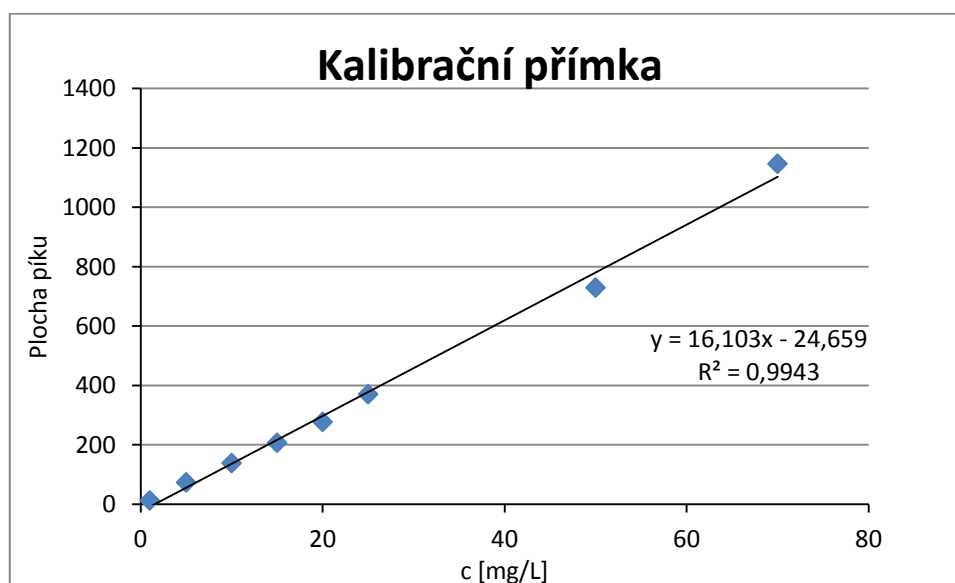
5.2.1 Linearita

Zásobní roztok mikonazolu byl naředěn a bylo třeba zjistit odezvu detektoru u těchto naředěných vzorků. Následovalo vytvoření kalibrační přímky. Díky kalibrační přímce je možné zjistit obsah mikonazolu v neznámých vzorcích.

Kalibrační přímka byla vytvořena z roztoků standardu mikonazolu o koncentracích: 70 mg/l, 50 mg/l, 25 mg/l, 20 mg/l, 15 mg/l, 10 mg/l, 5 mg/l, 1 mg/l. Všechny kalibrační roztoky byly změřeny 3krát.

c (mg/l)	Ø A _s
70	1146,9
50	729,9
25	370,9
20	277,7
15	207,4
10	138,9
5	74,1
1	13,2

Tabulka 1: Plocha pod píkem v závislosti na koncentraci



Obr. 13: Plochy píků v závislosti na koncentraci

$$y = 16,103x - 24,659$$

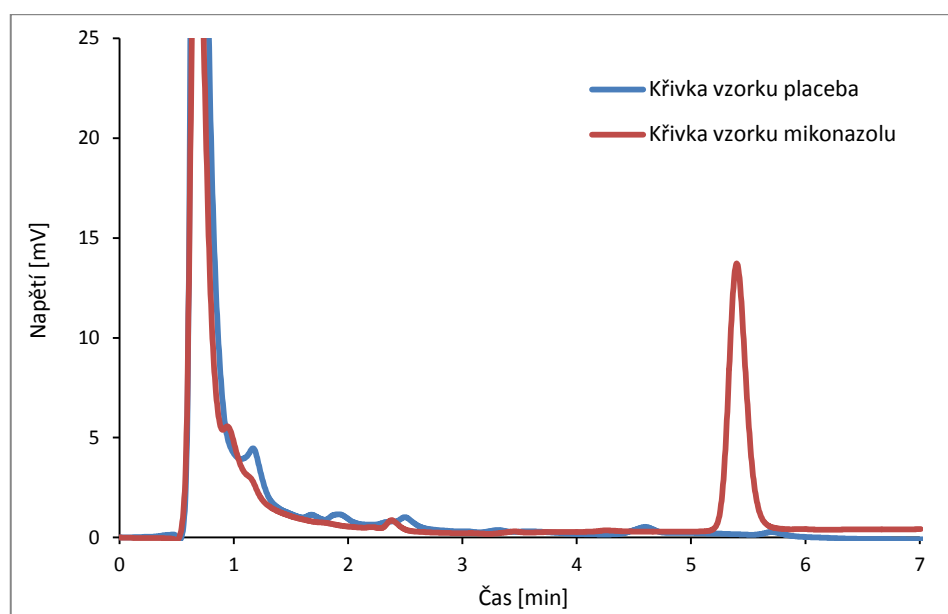
$$R^2 = 0,9943$$

Požadavek kladen na koeficient determinace je takový, aby jeho hodnoty byly blízké 1, což daný koeficient s hodnotou $R^2 = 0,9943$ splňuje.

5.2.2 Selektivita

Aby mohla být ověřena selektivita, musí být použit vzorek, jenž neobsahuje žádný mikonazol – tedy placebo. Pomocí selektivity je zjišťováno, jestli se v retenčním čase mikonazolu neeluuje ještě nějaká jiná látka než mikonazol. Pokud by tomu tak bylo, mohlo by dojít k ovlivnění plochy píku v retenčním čase mikonazolu a ke zkreslení výsledků.

Na Obr. 14 je tedy vidět, že v retenčním čase mikonazolu u vzorku placebo není eluce žádné jiné látky, kvůli které by mohlo dojít ke zkreslení výsledků.



Obr. 14: Chromatogram porovnání vzorku mikonazolu a placebo

5.2.3 Faktor symetrie

Faktor symetrie (A_s), jinak také faktor chvostování píku, se vypočítává podle vzorce:

$$A_s = w_{0,05} / 2d$$

kde $w_{0,05}$ – šířka píku v jedné dvacetině jeho výšky, d – vzdálenost mezi kolmicí, která je spuštěna z vrcholu píku a vzestupnou částí píku v jedné dvacetině jeho výšky.

Ideální symetrie píku je při hodnotě 1. Podle Českého lékopisu je uznávána hodnota v rozmezí **0,8–1,5**. (5)

Počet měření	A_s
1	1,160
2	1,170
3	1,196
4	1,170
5	1,181
6	1,181

Tabulka 2: Hodnota faktoru symetrie píku - A_s

$\bar{A}_s = 1,176$

Z průměru A_s zjistíme hodnotu, která musí odpovídat normám Českého lékopisu, které se pohybují v rozmezí 0,8–1,5 a to hodnota 1,176 splňuje.

5.2.4 Opakovatelnost

Opakovatelnost odezvy je vyjádřena jako odhad relativní směrodatné odchylky (RSD) v procentech pro řadu následných měření porovnávacího roztoku. Vzorec pro její výpočet:

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

kde y – značí jednotlivé hodnoty vyjádřené jako plocha píku, \bar{y} – značí průměr jednotlivých ploch, n – počet jednotlivých hodnot. (5)

n	A _s	T _r (min)
1	142,1	5,39
2	143,0	5,40
3	143,4	5,39
4	143,1	5,40
5	143,5	5,38
6	143,1	5,38

Tabulka 3: Opakovatelnost

Počet měření: n = 6

$\bar{A}_s = 143,03$

SD = 0,497

RSD_% = 0,35 %

Výpočet dovolené relativní standardní odchylky se vypočítá podle Českého lékopisu dle následujícího vzorce:

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

kde K – konstanta (0,349), jež je získaná ze vztahu:

$$K = \frac{0.6}{\sqrt{2}} \cdot \frac{t_{90\%,5}}{\sqrt{6}}$$

V němž:

$$\frac{0.6}{\sqrt{2}}$$

přestavuje požadovanou RSD pro 6 nástřiků a pro B = 1; B – horní limit, jež je uvedený v jednotlivých lékopisných člancích minus 100 %; n – počet opakovaných nástřiků porovnávacího roztoku ($3 \leq n \leq 6$); $t_{90\%, n-1}$ – Studentův parametr t při 90 % pravděpodobnosti pro n-1 stupňů volnosti. Hodnota relativní směrodatné odchylky pro 6 měření, při B = 1 se rovná RSD_{max} = 0,42 %. (5)

Relativní směrodatná odchylka RSD_% = 0,35 % nepřevyšuje maximální dovolenou relativní odchylku dle Českého lékopisu RSD_{max} = 0,42 %.

5.2.5 Zdánlivý počet teoretických pater

K vypočítání účinnosti kolony je možné použít zdánlivý výpočet teoretických pater (N):

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

t_R – značí retenční čas nebo vzdálenost podél základní linie od bodu nástřiku ke kolmici spuštěné z vrcholu píku odpovídajícího dané složce; w_h – odpovídá šířce píku v polovině jeho výšky

Účinnost kolony roste s počtem teoretických pater. Zdánlivý počet teoretických pater se mění s retenčním časem, dále s kolonou a se stanovovanou složkou. (5)

n	T_r	w_h	N
1	5,39	0,17	5569
2	5,40	0,17	5590
3	5,39	0,17	5569
4	5,41	0,17	5611
5	5,38	0,17	5549
6	5,38	0,17	5549

Tabulka 4: Zdánlivý počet teoretických pater

Ø N = 5573

Tato hodnota odpovídá požadavkům na účinnost kolony, jež mají být $N > 1500$.

5.2.6 Limit of detection (LOD), Limit of quantification (LOQ)

- $LOD = 3 \cdot h_n/m$
- $LOQ = 10 \cdot h_n/m$

h_n – šum základní linie

m – směrnice kalibrační křivky

$LOD = 0,045 \text{ mg/L}$

$LOQ = 0,150 \text{ mg/L}$

5.3 Měření vzorků

Vzorky připravené na Katedře farmaceutické technologie byly po vyjmutí z chladničky vytemperovány na laboratorní teplotu a dále byly připraveny podle výše popsaného postupu (viz 4.3.4 Příprava vzorků). Hotové vzorky, připravené k měření, byly po 1 ml odebrány do vialek a 5 μ l bylo nastříknuto na kolonu. S použitím softwaru Clarity byly integrací zjištěny plochy píků mikonazolu. Každý vzorek byl měřen třikrát a následně byl spočítán průměr těchto hodnot. Hodnoty byly přepočítány podle rovnice kalibrační přímky na koncentraci a následně byla spočítána hmotnost mikonazolu v každém vzorku.

Nejprve byla spočítána koncentrace jednotlivých vzorků pomocí kalibrační přímky.

Vzorek PLGA-A	Tr (min)	A	c (mg/l)
1h	6,03	3,25	3,86
1h(stěna)	6,01	4,07	4,09
3h	6,05	2,08	3,53
3h(stěna)	6,05	1,74	3,46
24h	6,06	0,34	3,04
24h(stěna)	6,07	9,66	5,66
48h	6,06	15,35	7,26
48h(stěna)	6,07	699,61	199,52
3D	5,31	3,23	3,86
3D(stěna)	5,31	1089,73	309,13
7D	5,30	11,02	6,04
7D(stěna)	5,31	56,47	18,81

Tabulka 5: Zjištěná koncentrace u vzorku PLGA-A

Vzorek PLGA-B	Tr (min)	A	c (mg/l)
1h	–	0,00	0,00
1h(stěna)	5,23	0,70	3,14
3h	–	0,00	0,00
3h(stěna)	5,19	1,02	3,23
24h	5,16	0,98	3,22
24h(stěna)	5,17	6,75	4,84
48h	5,12	20,53	8,72
48h(stěna)	5,13	9,35	5,58
3D	5,28	3,74	4,00
3D(stěna)	5,27	19,18	8,34
7D	5,29	2,80	3,73
7D(stěna)	5,27	31,88	11,91

Tabulka 6: Zjištěná koncentrace u vzorku PLGA-B

Vzorek 3T-A	Tr (min)	A	c (mg/l)
1h	5,7	1,89	3,48
1h(s)	5,7	0,73	3,15
3h	0,00	0,00	0,00
3h(s)	5,63	0,93	3,21
24h	–	0,00	0,00
24h(s)	5,6	1,76	3,44
48h	–	0,00	0,00
48h(s)	5,58	1,02	3,23
3D	5,28	0,47	3,08
3D(stěna)	5,30	7,97	5,17
7D	5,28	0,84	3,18
7D(stěna)	5,29	5,97	4,63

Tabulka 7: Zjištěná koncentrace u vzorku 3T-A

vzorek 3T-B	Tr (min)	A	c (mg/l)
1h	4,75	0,30	3,03
1h(s)	4,73	1,56	3,39
3h	4,74	21,61	9,02
3h(s)	4,75	36,27	13,14
24h	4,76	21,37	8,95
24h(s)	4,76	14,01	6,88
48h	4,75	3,16	3,84
48h(s)	4,74	67,06	21,79
3D	5,29	1,65	3,41
3D(stěna)	5,27	4,86	4,31
7D	5,27	18,96	8,28
7D(stěna)	5,27	10,58	5,92

Tabulka 8: Zjištěná koncentrace u vzorku 3T-B

Díky zjištěné koncentraci a znalosti odebíraného objemu byla spočítána hmotnost mikonazolu v každém vzorku. Z naměřených výsledků je patrné, že uvolňování mikonazolu je u každého typu matrice značně rozdílné. Z matrice PLGA-A a PLGA-B je nejvyšší přibližně po 2 až 3 dnech. Zatímco u vzorků s matricí 3T-A a 3T-B je uvolňování mikonazolu nejrychlejší v prvních hodinách.

Množství uvolněného mikonazolu (mg)				
	PLGA-A	PLGA-B	3T-A	3T-B
1h	0,058	0,003	0,052	0,045
3h	0,051	0,003	0,003	0,139
24h	0,049	0,005	0,003	0,132
48h	0,300	0,128	0,003	0,076
3D	0,363	0,064	0,048	0,052
7D	0,103	0,064	0,049	0,122
Součet	0,924	0,331	0,159	0,566

Tabulka 9: Obsah mikonazolu ve vzorcích

6. ZÁVĚR

Cílem byla optimalizace a validace metody HPLC pro stanovení mikonazolu. Vyvinutá metoda probíhala za těchto optimálních podmínek, jež bylo třeba před měřením zjistit.

Mobilní fáze:	Methanol:voda 70:30
Nástřík:	5 μ l
Průtok:	0,800 ml/min
Teplota:	45 °C
Vlnová délka:	220 nm
Tlak:	22,8 MPa
Retenční čas mikonazolu:	5,65 min
Čas kompletní analýzy:	7 min

Při validaci byly splněny podmínky dané pro chromatografický systém. Pomocí ověření selektivity bylo zjištěno, že v daný okamžik eluce mikonazolu se neeluje žádná jiná látka. Hodnota faktoru symetrie byla 1,176, což odpovídá rozmezí v Českém lékopise. Relativní směrodatná odchylka $RSD_{\%} = 0,35 \%$ není vyšší než maximální dovolená relativní odchylka požadována Českým lékopisem. Zdánlivý počet teoretických pater, čímž je vyjádřena účinnost, musí být podle pravidel Českého lékopisu větší než 1500 a naměřená hodnota je 5573. Metoda tedy vyhovuje požadavkům Českého lékopisu. Z naměřených výsledků je patrné, že uvolňování mikonazolu z matrice PLGA-A a PLGA-B je nejvyšší přibližně po 2 až 3 dnech. Zatímco u vzorků s matricí 3T-A a 3T-B je rychlost uvolňování nejvyšší v prvních hodinách.

7. POUŽITÉ ZKRATKY

C18	oktadecylový uhlíkový řetězec
C8	oktylový uhlíkový řetězec
CI	chemická ionizace
CYP 450	cytochrom P450
DAD	diode-array detektor
EI	elektronová ionizace
FD	fluorescenční detektor
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
HPLC/MS	tandemově spřažená HPLC s hmotnostním detektorem
MeOH	methanol
OSD	oktadecylsilil
PLGA	poly(laktid- <i>co</i> -glykolid)
RP	reverzní fáze
S/N	poměr signálu k šumu
UV/VIS detektor	detektor snímající v ultrafialové a viditelné délce světla
UV	ultrafialová oblast světla
VIS	viditelná oblast světla

8. SEZNAM OBRÁZKŮ

Obr. 1: HPLC chromatograf (12).....	14
Obr. 2: Core-shell částice (24).....	21
Obr. 3: Porovnání selektivity RP-Amide kolony a C18 kolony (22).....	23
Obr. 4: Rychlost separace (22)	24
Obr. 5: Porovnání citlivosti kolony (22).....	25
Obr. 6: Chromatogram vzorku mikonazolu, methanol:voda (90:10)	30
Obr. 7: Chromatogram vzorku mikonazolu, methanol:voda (80:20)	31
Obr. 8: Chromatogram vzorku mikonazolu, methanol:voda (75:25)	31
Obr. 9: Chromatogram vzorku mikonazolu, methanol:voda (75:25)	32
Obr. 10: Chromatogram vzorku mikonazolu, methanol:voda (65:35)	33
Obr. 11: Chromatogram vzorku mikonazolu, methanol:voda (70:30)	33
Obr. 12: Absorpční spektrum mikonazolu.....	34
Obr. 13: Plochy píků v závislosti na koncentraci	37
Obr. 14: Chromatogram porovnání vzorku mikonazolu a placebo.....	38

9. SEZNAM TABULEK

Tabulka 1: Plocha pod píkem v závislosti na koncentraci	37
Tabulka 2: Hodnota faktoru symetrie píku - A_s	39
Tabulka 3: Opakovatelnost	40
Tabulka 4: Zdánlivý počet teoretických pater	41
Tabulka 5: Zjištěná koncentrace u vzorku PLGA-A	42
Tabulka 6: Zjištěná koncentrace u vzorku PLGA-B	43
Tabulka 7: Zjištěná koncentrace u vzorku 3T-A	43
Tabulka 8: Zjištěná koncentrace u vzorku 3T-B	44
Tabulka 9: Obsah mikonazolu ve vzorcích.....	44

10. POUŽITÁ LITERATURA

1. **Martínková, Jiřina, a další.** *Farmakologie pro studenty zdravotnických oborů.* Praha : Grada Publishing, 2007. str. 380. ISBN 978-80-247-1356-4.
2. **Říhová, Eva, a další.** *Uveitidy.* Praha : Grada Publishing, 2009. str. 136. ISBN 978-80-247-2897-1.
3. **Pray, W. Steven.** *Nonprescription Product Therapeutics.* United States : Lippincott Williams and Wilkins, 2005. str. 920. ISBN 9780781734981.
4. **Hašek, Jan.** Nové léčivé látky v magistraliter receptuře. *Praktické lékarenství.* Solen medical education, 2013, Sv. 9, 4-5, stránky 192-195.
5. *Český lékopis.* Praha : Grada Publishing, 2009. ISBN 978-802-4729-947.
6. abcam. [Online] [Citace: 27. leden 2015.] <http://www.abcam.com/Miconazole-ab143414.html?refer404=catalogue%20143414>.
7. **Krausová, Lucie, Pávek, Petr a Grim, Jiří.** Azolová antimykotika: mechanismy lékových interakcí. *Klinická farmakologie a farmacie.* 2009, Sv. 23, 2, stránky 86-89.
8. **Alargasamy, V.** *Textbook Of Medizinal Chemistry.* Amsterdam : Elsevier Health Sciences, 2010. str. 552. ISBN 9788131221907.
9. **Schaechter, Moselio.** *Desk Encyclopedia of Microbiology.* Waltham : Academic Press, 2010. str. 1200. ISBN 9780080961286.
10. **Vickrey, Thomas M.** *Liquid Chromatography Detectors.* London : CRC Press, 1983. str. 448. ISBN 9780824719166.
11. **Ahuja, S a Rasmussen, H.** *HPLC Method Development for Pharmaceuticals.* Waltham : Academic Press, 2007. str. 532. ISBN 9780080554198.
12. **Zellmer, David L. a Williams, Robert.** [Online] 1. květen 1997. [Citace: 5. únor 2015.] <http://www.lifescience.ca/products/1-chromatography-sample-prep.html>.
13. **Mendez, Alberto, a další.** Comparison of the acidity of residual silanol groups in several liquid chromatography columns. *Journal of Chromatography A.* 2003, Sv. 986, 1, str. 33.
14. **Sýkora, David, a další.** Moderní stacionární fáze pro RP-HPLC. *Chemické listy.* 2007, Sv. 101, stránky 190-199.
15. **Kazakevich, Yuri a Lobrutto, Rosario.** *HPLC for Pharmaceutical Scientists.* New Jersey : John Wiley & Sons, 2007. ISBN 9780470087947.

16. **Cvačka, Josef.** Detekce ve vysokoúčinné kapalinové chromatografii. *web.natur.cuni.cz*. [Online] 24. listopad 2010. [Citace: 6. leden 2015.] <http://web.natur.cuni.cz/~analchem/bosakova/hplc3.pdf>.
17. **Holčápek, Michal a Jandera, Pavel.** Spojení kapalinové chromatografie a hmotnostní spektrometrie (HPLC/MS). *Chemické listy*. 1998, Sv. 92, stránky 278-286.
18. **Katz, Elena, a další.** *Handbook of HPLC*. New York : Marcel Decker Inc., 1998. str. 989. ISBN 0-8247-9444-3.
19. **Ebel, S., Kühnert, H. a Mück, W.** Limits of determination and calibration in HPLC. *Chromatographia*. 1987, Sv. 23, 12, stránky 934-938.
20. **Pohanka, Miroslav.** Základy statistiky laboratorních experimentů. *Vojenské zdravotnické listy*. 2010, Sv. 79, 2, stránky 61-63.
21. **Fekete, S, Oláh, E a Fekete, J.** Fast liquid chromatography: The domination of core-shell and very fine particles. *Journal of Chromatography A*. 2012, Sv. 1228, stránky 57-71.
22. Sigma-Aldrich Co. [Online] 2015. [Citace: 9. únor 2015.] <http://www.sigmaaldrich.com/analytical-chromatography/hplc/columns/ascentis-express.html>.
23. **Hamáček, Aleš, a další.** Electrical conductivity in thin films fabricated from nanoparticles of a polymeric composite based on PEDOT. *Materials Science-Poland*. 2009, Sv. 27, 3, stránky 769-780.
24. Canadian Life Science. [Online] 2015. [Citace: 9. únor 2015.] <http://www.lifescience.ca/products/1-chromatography-sample-prep.html>.
25. **Marková, Jitka.** *Diplomová práce - HPLC analýzy anthelmintik s využitím core-shell kolon*. Hradec Králové : Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, 2012.
26. **Ali, Imran, AL-Ohtman, Zeid A. a AL-Za'abi, Mohammed.** Superficially porous particles columns for super fast HPLC separations. *Biomedical Chromatography*. 2012, Sv. 26, 8, stránky 1001-1008.
27. **Gritti, Fabrice, a další.** Physical properties and structure of fine core-shell particles used as packing materials for chromatography Relationships between particle characteristics and column performance. *Journal of Chromatography A*. 2010, Sv. 1217, 24, stránky 3819-3843.
28. **Ruta, Joséphine, a další.** Evaluation of columns packed with shell particles with compounds of pharmaceutical interest. *Journal of Chromatography A*. 2012, Sv. 1228, stránky 221-231.

29. RP-Amide Column - Care and Use Sheet. *lifescience.ca*. [Online] [Citace: 10. únor 2015.] http://www.lifescience.ca/DATA/CATALOGUE/185~v~HALO_RP-Amide_Care___Use.pdf.

30. **Akay, Cemal, a další.** Simultaneous determination of metronidazole and miconazole in pharmaceutical dosage forms by RP-HPLC. *Il Farmaco*. 2003, Sv. 57, 11, stránky 953-957.

31. **Dayyih, Wael Abu, a další.** Development and validation of HPLC method for some azoles in pharmaceutical preparation. *International journal of pharmaceutical science and research*. 2012, Sv. 3, 10, stránky 3686-3692.