

**UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE**

**FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ**

**KATEDRA ANALYTICKÉ CHEMIE**



Bakalářská práce

Stanovení nečistot v léčivých přípravcích metodou HPLC

Aneta Dundová

Vedoucí bakalářské práce: Ing. Renata Hájková

Vedoucí katedry: Doc. RNDr. Petr Solich, CSc.

Hradec Králové 2007

Úvodem své bakalářské práce bych chtěla poděkovat všem, kteří mi vytvořili podmínky pro její vypracování, zejména vedoucí a konzultantce Ing. Renatě Hájkové za její velkou trpělivost a odborné konzultace při sepisování. V neposlední řadě děkuji rodičům za jejich důvěru a podporu při studiu.

Aneta Dundová

# Souhrn

Tato bakalářská práce se zabývá separační metodou HPLC a blíže stanovením daných nečistot ve třech léčivých přípravcích metodou HPLC na různých pracovištích. V České republice je pracovištěm, které se zabývá stanovením těchto nečistot, Farmaceutická fakulta Hradec Králové, kterou porovnávám s jinými farmaceutickými fakultami a pracovišti ve světě (Slovensko, USA, Japonsko, Egypt, Řecko aj.).

Jedná se o léčivý přípravek Ketoprofen gel 2,5 %, používaný jako antiflogistikum, u něhož se stanovují nečistoty 3-acetylbenzofenon (nečistota A ketoprofenu) a 2-(3-karboxyfenyl) propionová kyselina (nečistota C ketoprofenu). Léčivý přípravek Terbinafin krém, který se používá jako antimykotikum, ve kterém se stanovují nečistoty 1-methyl-amino-methylnaphtalen,  $\beta$ -terbinafin, Z-terbinafin a 4-methyl-terbinafin a léčivý přípravek Estrogel krém, používaný v hormonální terapii, ve kterém se stanovují nečistoty  $\Delta^{9(11)}$ -Estradiol, Estron,  $\Delta^{9(11)}$ -Estron, Ethynylestradiol,  $\alpha$ -Estradiol hemihydrát, Estradiol 3-methyl-ether a Estradiol 17-acetát.

Bakalářská práce obsahuje 8 kapitol, z nichž hlavní část tvoří kapitoly 4 – 6 včetně. V kapitole 4 je pojednáno o stanovení nečistot v přípravku Ketoprofen gel 2,5 % společně s porovnáním stanovení nečistot na výše uvedených pracovištích (viz. 4.11). Kapitola 5 pojednává o stanovení společně s porovnáním nečistot v přípravku Terbinafin krém (viz. 5.3.) a kapitola 6 se zabývá nečistotami přípravku Estrogel krém (viz. 6.3.). Kapitola 3 jsem obohatila o fotodokumentaci převzatou ze zdrojů-viz.citace (kap. 8). Význam této práce spočívá v porovnání výsledků stanovení výše zmiňovaných nečistot.

# Abstract

This baccalaureate work is deals with separative method HPLC and more closely assesment given to impurities in three curative preparations by method HPLC on different workplaces. In Czech republic is as only workplace, that the deals with assesment these impurities, Faculta of Pharmacy Hradec Králové, that the weigh against with by other pharmaceutical faculties and workplace in the world (Slovakia, USA, Japan, Egypt, Greece ect. ).

Acts about medicine Ketoprofen gel 2,5 %, used like antiflogistikum, and 3- acetyl - benzophenone (impurity A ketoprofenu) and 2-(3- carboxyfenyl) propionic acid (impurity C ketoprofenu) are determinated in it. . Medicine Terbinafin cream that the employs like antifungal agent, are determinated 1- methyl- amine- methylnaphtalene ,  $\alpha$  - terbinafine , Z- terbinafine and 4- methyl- terbinafine as its impurities and medicine Estrogel cream, used in hormonal therapy, in which are determinated  $\Delta^9$  Estradiol , estrone,  $\Delta^{9(11)}$  – Estrone, Ethynylestradiol,  $\alpha$  - Estradiol hemihydrate, Estradiol -3- methyl- ether and Estradiol 17 - acetate.

Baccalaureate work includes 8 capitol, from mains forms chaps 4 – 6 inclusive. In chapter 4 is entertain about assesment impurities in prep Ketoprofen gel 2,5 % along with comparison assesment impurities above - mentioned workplaces (see. 4.11). Chapter 5 handles about assesment along with comparison impurities in prep Terbinafin cream (see. 5.3.) and chapter 6 deal with impurities prep Estrogel cream (see. 6.3.). Chapter 3 I am enrich about photo - documentation assumed from the sources- see.quotation (chap . 8) . Meaning those work rests in comparison results assesment height alluded impurities.

# OBSAH

PODĚKOVÁNÍ.....	1
SOUHRN.....	2
ABSTRACT.....	3
OBSAH.....	4
PŘEHLED ZKRATEK.....	7
1 ÚVOD.....	8
2 CÍL PRÁCE.....	9
3 SEPARAČNÍ METODY.....	10
3.1. Úvod <sup>[2]</sup> .....	10
3.1.1. Separace.....	10
3.1.2. Dělení separačních metod.....	10
3.2. Termodynamika a účinnost separace.....	11
3.2.1. Distribuční konstanta $K_D$ .....	12
3.3. Chromatografické metody.....	14
3.3.1. Chromatografie.....	14
3.3.2. Základní pojmy a rozdělení chromatografických metod <sup>[2]</sup> .....	14
3.3.3. Princip chromatografické separace <sup>[3]</sup> .....	15
3.4. Vysokoúčinná kapalinová chromatografie.....	
3.4.1. Princip separace látek <sup>[1]</sup> .....	16
3.4.2. Kapalinový chromatograf <sup>[3].[4]</sup> .....	17
4 STANOVENÍ SLOŽEK V PŘÍPRAVKU KETOPROFEN GEL 2,5 % (KETALGEN GEL).....	21
4.1. Účinná látka.....	21
4.1.1. Název <sup>[6]</sup> .....	21

4.1.2. Vzorec a molekulová hmotnost <sup>[6]</sup>	21
4.1.3 Charakteristika <sup>[9]</sup>	21
4.1.4. Vlastnosti <sup>[6]</sup>	22
4.2. Metody stanovení ketoprofenu v přípravku Ketoprofen gel 2,5%	22
4.2.1. Lékopisné stanovení <sup>[6]</sup>	22
4.2.2. Stanovení pomocí HPLC	22
4.2.3. Další metody stanovení ketoprofenu	25
4.3. Methylparaben	26
4.3.1. Název <sup>[6]</sup>	26
4.3.2. Vzorec a molekulová hmotnost <sup>[6],[9]</sup>	26
4.3.3 Charakteristika <sup>[6]</sup>	27
4.3.4. Vlastnosti <sup>[6]</sup>	27
4.4. Metody stanovení methylparabenu v přípravku Ketoprofen gel 2,5%	27
4.4.1. Lékopisné stanovení <sup>[6]</sup>	27
4.4.2. Stanovení pomocí HPLC	27
4.4.3. Další metody stanovení methylparabenu	31
4.5. Propylparaben	32
4.5.1. Název <sup>[6]</sup>	32
4.5.2. Vzorec a molekulová hmotnost <sup>[6],[9]</sup>	32
4.5.3 Charakteristika <sup>[6]</sup>	32
4.5.4. Vlastnosti <sup>[6]</sup>	33
4.6. Metody stanovení propylparabenu v přípravku Ketoprofen gel 2,5%	33
4.6.1. Lékopisné stanovení <sup>[6]</sup>	33
4.6.2. Stanovení pomocí HPLC	33
4.6.3. Další metody stanovení propylparabenu	36
4.7. Nečistota A ketoprofenu	37
4.7.1. Název <sup>[7]</sup>	37
4.7.2. Vzorec <sup>[7]</sup>	37
4.8. Metody stanovení nečistoty A	37
4.8.1. Stanovení pomocí HPLC	37
4.8.2. Stanovení obsahu nečistoty A v gelu <sup>[7]</sup>	39

4.9. Nečistota C ketoprofenu.....	40
4.9.1. Název <sup>[7]</sup> .....	40
4.9.2. Vzorec <sup>[7]</sup> .....	40
4.10. Metody stanovení nečistoty C .....	40
4.10.1. Stanovení pomocí HPLC .....	40
4.10.2. Stanovení obsahu nečistoty C v gelu .....	42
4.11. Souhrn rešerže.....	43
5 STANOVENÍ NEČISTOT V PŘÍPRAVKU TERBINAFIN HBF KRÉM.....	44
5.1. Nečistoty látky Terbinafin krém.....	44
5.1.1. Názvy <sup>[43]</sup> .....	44
5.1.2. Vzorce <sup>[43]</sup> .....	44
5.2. Metody stanovení nečistot v přípravku Terbinafin krém.....	45
5.2.1. Stanovení nečistot pomocí HPLC .....	45
5.2.2. Další metody stanovení nečistot.....	47
5.3. Souhrn rešerže.....	48
6 STANOVENÍ NEČISTOT V PŘÍPRAVKU ESTROGEL HBF.....	49
6.1. Nečistoty látky Estrogel HBF krém	
6.1.1. Názvy <sup>[50]</sup> .....	49
6.1.2. Vzorce <sup>[50]</sup> .....	49
6.2. Metody stanovení nečistot v přípravku Estrogel HBF.....	50
6.2.1. Stanovení nečistot pomocí HPLC.....	50
6.3. Souhrn rešerže.....	54
7 ZÁVĚR.....	55
8 LITERATURA .....	56

# Přehled zkratk

HPLC	vysokoučinná kapalinová chromatografie
IS	vnitřní standard
ČL	Český lékopis
Ph. Eur.	Evropský lékopis
MS	hmotnostní spektrometrie
NSAIDS	nesteroidní antiflogistikum
GLC	plynová rozdělovací chromatografie
GC	plynová chromatografie
LC	kapalinová chromatografie
LSC	kapalinová absorpční chromatografie
IEC	iontovýměnná chromatografie
GPC	gelová permeační chromatografie
LLC	kapalinová rozdělová chromatografie
AAS	atomová absorpční spektrometrie
AES	atomová emisní spektrometrie
UV / VIS detektor	detektor využívající ultrafialové a viditelné světlo
TEAA	acetonitril-triethylaminoacetát
SDS	dodecylsulfát sodný
SPE	extrakce s pevnou fází
HPLC- MS	HPLC metoda tandemově spojená s hmotnostní spektrometrií
ODS	octadecylsilikagel
MEKC	micelární elektrokinetická chromatografie
SPME	mikroextrakce s pevnou fází
DAD detektor	detektor s diodovým polem



# 1 Úvod

**Ketoprofen gel 2,5%** (2-(3benzoylfenyl)propanová kyselina) je nesteroidní antiflogistikum ( Non- Steroidal Antiinflammantory Drug, NSAID), patří do skupiny derivátů kyseliny propionové. Používá se u zánětlivých a degenerativních chorob pohybového aparátu. Může být aplikován jak lokálně (krémy, gely) nebo systémově (tablety, kapsle, čípky, injekce). Mezi vedlejší účinky Ketoprofenu patří gastrointestinální toxicita, snížení adhezivity a agregability krevních destiček což vede ke zvýšené krvácivosti.<sup>1</sup>



## **Terbinafin krém**

(E)- N- (6,6- dimethyl 2- hepten-4- inyl)-N-methyl-1-naphtalenmethanamin je jeden z allylamin. derivátů se širokým spektrem antimykotické aktivity. Terbinafin společně s jeho analogy jsou považovány za potenciální inhibitory skvalenových epoxidáz v buňkách hub, savčích důležitých pro biosyntézu buňkách, systémech ergosterolu. Podávání terbinafinu může být orální v podobě hydrochloridu, který je určen pro léčbu infekcí kůže a nehtů nebo subkutánně při léčbě dermatofitózy, pitiriasis versicolor a kožních kandidóz. Je aplikován v podobě krému, gelu, tablet nebo roztoku.<sup>1</sup>



## **Estrogel HBF krém**

Estradiol 1, 2, 5 (10) – estratrien- 3, 17  $\beta$  – diol je účinný estrogen ze skupiny endogenních, steroidních estrogenů, zahrnující estron a estriol. Estradiol je fyziologicky zodpovědný za růst prsu, kostí, vývoj sekundárních pohlavních znaků. Estradiol a jeho polo- syntetické deriváty slouží pro hormonální terapii hypogonadismu nebo poruch ovárií. Jsou především používány jako látky, zmírňující symptomy vyskytující se v období menopauzy nebo pro ochranu kardiiovaskulárních chorob a osteoporózy.<sup>1</sup>



<sup>1</sup> Použité zdroje: [56], [57], [43], [50], [62], [63], [64]

## 2 Cíl práce

Cílem této bakalářské práce bylo nalézt a porovnat stanovení nečistot v přípravku Ketoprofen gel 2,5%, Terbinafin krém a Estrogel metodou HPLC a vypracovat přehled výsledků rešerže.

# 3 Separční metody

## 3.1. ÚVOD

### 3.1.1 Separace

Stanovení jedné složky ve složitějším vzorku není možné provést přímo po převedení vzorku do roztoku. Většinou je nutné před vlastní analýzou oddělit stanovovanou složku od ostatních nebo oddělit složky, které stanovení ruší. K tomuto účelu se používá separace, kterou můžeme definovat jako operaci, při které se vzorek dělí alespoň na dva podíly odlišného složení. Separční metody se obecně používají k izolaci chemických individuí ze směsi buďto z přírodních látek nebo produktů syntéz. Z užšího analytického hlediska je separace jedna obvykle první a velmi významná fáze analýzy, na které závisí přesnost a spolehlivost výsledku celé analýzy. <sup>[1]</sup>

Separace využívá různých fyzikálních, fyzikálně chemických a chemických vlastností složek vzorku k tomu, aby byl vzorek rozdělen alespoň na dva podíly odlišného složení. Lze ji charakterizovat selektivitou, rozsahem použitelnosti a frakcionační kapacitou. <sup>[2]</sup>

### 3.1.2 Dělení separačních metod <sup>[2]</sup>

Separčních metod je značné množství, ty nejdůležitější můžeme rozdělit do dvou velkých skupin:

- 1) Metody založené na rozdílech v rovnovážné distribuci složek mezi dvě fáze
- 2) Metody založené na rozdílech v rychlosti pohybu složek
  - a) separace membránové
  - b) separace polem

Tabulka č.1: Dělení separačních metod

<i>1) Metody založené na rozdílech v rovnovážné distribuci složek mezi dvě fáze</i>	
Fázová rovnováha	Příklady separačních metod
Plyn-kapalina	Destilace, plynová chromatografie (GLC)
Plyn- pevná látka	Sublimace, plynová chromatografie (GLC)
Kapalina- kapalina	Extrakce, kapalinová chromatografie (HPLC)
Kapalina - pevná látka	Frakční krystalizace, kapalinová chromatografie, molekulová síta, extrakce na pevnou fázi
<i>2) Metody založené na rozdílech v rychlosti pohybu složek</i>	
Separace membránové	Ultrafiltrace
Separace polem	Elektroforéza, ultracentrifugace

### **3.2 Termodynamika a účinnost separace**

objem stacionární fáze  $V_s$  [ml]

objem mobilní fáze  $V_m$  [ml]

objemový průtok mobilní fáze  $F_m$  [ml. min<sup>-1</sup>]

lineární rychlost mobilní fáze  $u$  [cm. min<sup>-1</sup>]

retenční objem  $i$ -tého analytu  $V_{R,i}$  [ml]

retenční čas  $i$ -tého analytu  $t_{R,i}$  [min]

mrtvý objem kolony  $V_M$  [ml]

mrtvý čas kolony  $t_M$  [min]

redukovaný retenční objem  $V'_{R,i}$  [ml]

$$V_M = F_m \cdot t_M = V_m$$

$$V'_{R,i} = V_{R,i} - V_M$$

$$V_{R,i} = F_m \cdot t_{R,i}$$

$$t'_{R,i} = t_{R,i} - t_M$$

$$u = \frac{L}{t_M}$$

$$V'_{R,i} = F_m \cdot t'_{R,i}$$

Retenční objem je objem mobilní fáze, který musí projít kolonou, aby se příslušný analyt dostal od počátku ke konci separační kolony. Retenční čas je celkový čas, který příslušný analyt stráví v separační koloně. Mrtvý objem kolony je objem eluentu, který musí projít kolonou, aby se nezadržovaný analyt dostal od počátku ke konci kolony. Mrtvý čas kolony je retenční čas analytu, který není v koloně zadržován, tj. analytu, který se pohybuje kolonou stejnou rychlostí jako mobilní fáze. Všechny analyty stráví v mobilní fázi stejný čas - mrtvý čas kolony. Redukovaný retenční čas je čas, který příslušný analyt stráví ve stacionární fázi.

### 3.2.1 Distribuční konstanta

Většina separačních metod používaných v analytické chemii je založena na rovnovážné distribuci složek vzorku mezi dvě fáze. Po dosažení rovnováhy může být distribuce složky  $i$  vyjádřena distribuční konstantou  $K_{D(i)}$ , což je poměr celkových koncentrací ve dvou daných fázích např. fázi  $s$  a  $m$ :

$$K_{D,i} = \frac{(c_i)_s}{(c_i)_m} = \frac{(n_i)_s}{(n_i)_m} \cdot \frac{V_m}{V_s}$$

## RETENČNÍ FAKTOR (KAPACITNÍ FAKTOR, KAPACITNÍ POMĚR)

$$k_i = \frac{(n_i)_s}{(n_i)_m} = K_{D,i} \cdot \frac{V_s}{V_m}$$

$$k_i = \frac{t_{R,i} - t_M}{t_M} = \frac{t'_{R,i}}{t_M}$$

$$k_i = \frac{V_{R,i} - V_M}{V_M} = \frac{V'_{R,i}}{V_M}$$

$K_{D,i}$  a  $k_i$  charakterizují selektivitu, tj. jak moc se analyty na koloně zdržují a zpožďují.

## ZÁKLADNÍ ROVNICE CHROMATOGRRAFIE

$$V_{R,i} = V_M + K_{D,i} \cdot V_s$$

platí především pro rozdělovací chromatografii

$$V'_{R,i} = K_{D,i} \cdot V_s$$

$$t_{R,i} = \frac{V_{R,i}}{F_m} = \frac{V_M + K_{D,i} \cdot V_s}{F_m}$$

$$t'_{R,i} = \frac{V'_{R,i}}{F_m} = \frac{K_{D,i} \cdot V_s}{F_m}$$

### **3.3. Chromatografické metody**

#### **3.3.1 Chromatografie**

Chromatografie je jedna z nejvýznamnějších analytických separačních metod. Umožňuje dělení, identifikaci a stanovení velkého počtu organických a anorganických látek.<sup>[3]</sup> Využívá dělení látek mezi dvěma fázemi, z nichž jedna je mobilní a druhá stacionární.<sup>[2]</sup>

#### **3.3.2 Základní pojmy a rozdělení chromatografických metod<sup>[2]</sup>**

Mobilní fáze = pohyblivá (plyny nebo kapalina)

Stacionární fáze = nepohyblivá nebo může nabývat nejrůznějších forem. Někdy to jsou částičky pevné hmoty, jindy je to tenká vrstvička kapaliny nanesená na pevných částicích, nebo to může být tenký film kapaliny na vnitřní stěně kapiláry.

Sorbent = jakákoliv forma fáze stacionární: je to náplň kolony, přes kterou postupuje fáze mobilní.

Vzorek = směs látek k rozdělení

Chromatograf = přístroj, na němž se separace provádí

Chromatogram = záznam chromatografické separace

V dnešní době existují různá hlediska dělení chromatografických metod: např.<sup>[3]</sup>

- 1) povaha mobilní fáze : plynová (GC), kapalinová (LC)
- 2) způsob provedení : kolonová (sloupcová), plošná (planární)
- 3) princip separace : rozdělovací, adsorpční, iontově výměnná, gelová, afinitní
- 4) pracovní způsob : eluční (analytická ch.), frontální, vytěšňovací
- 5) účel : analytická, preparativní (preparační)

## PŘEHLED CHROMATOGRAFICKÝCH TECHNIK

### **Mobilní fáze : plyn (plynová chromatografie) GC**

Stacionární fáze : kapalina → plynová rozdělovací chromatografie GLC  
tuhá látka → plynová adsorpční chromatografie GSC

### **Mobilní fáze : kapalina (kapalinová chromatografie) LC**

#### Kolonová

Stacionární fáze :	<i>kapalina</i>	→ kapalinová rozdělovací chromatografie	LLC
		→ gelová permeační chromatografie	GPC
	tuhá látka	→ kapalinová adsorpční chromatografie	LSC
		→ iontově výměnná chromatografie	IEC

#### Planární

Stacionární fáze :	<i>kapalina</i>	→ papírová rozdělovací chromatografie	PC
		→ tenkovrstvá rozdělovací chromatografie	TLC
	tuhá látka	→ tenkovrstvá adsorpční chromatografie	TLC

### 3.3.3. Princip chromatografické separace <sup>[3]</sup>

Při všech chromatografických metodách se mnohonásobně ustavuje rovnováha součástí analyzované směsi mezi dvěma vzájemně nemísitelnými fázemi. Probíhá v separační koloně, která obsahuje stacionární (nepohyblivou) fázi = sorbent a mobilní (pohyblivou) fázi = eluent.

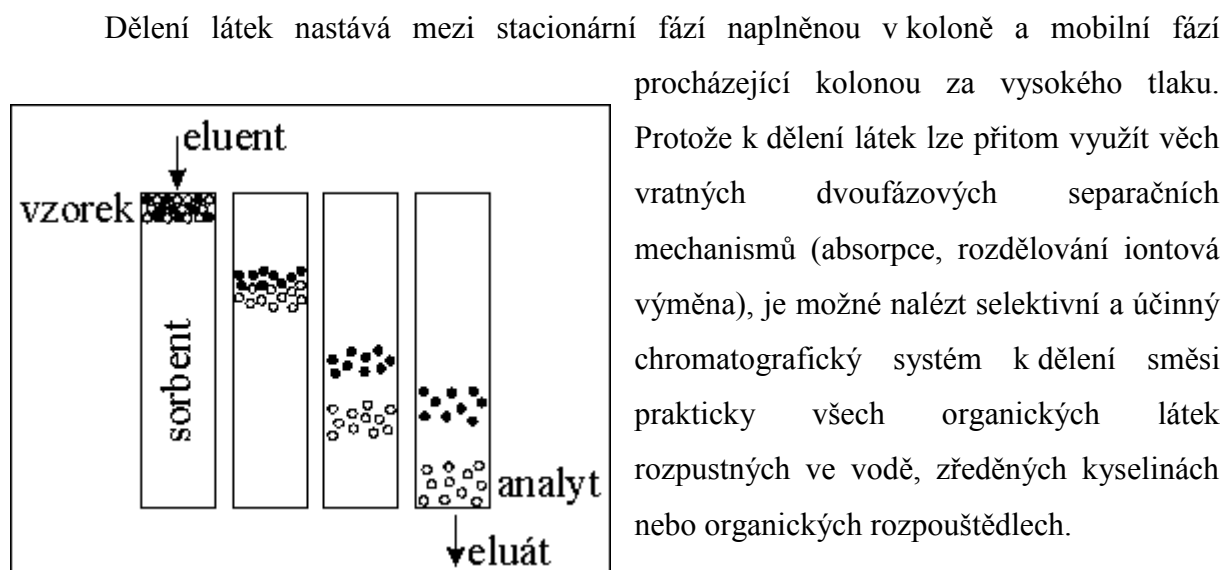
Rozdílné analyty (dělené látky) mají rozdílnou afinitu ke stacionární fázi. Různé analyty podléhají různé distribuci (rozdělování) mezi mobilní a stacionární fázi. Rozdílné analyty jsou rozdílně zadržovány a rozdílně zpožděovány (retardovány).



### 3.4. VYSOKOÚČINNÁ KAPALINOVÁ CHROMATOGRRAFIE, HPLC

HPLC je vysoce instrumentálně pokročilá technika kapalinové chromatografie. Vysoké činnosti separačního procesu je dosaženo použitím kolon plněných stacionární fází o malé a dobře definované velikosti částic. Pro dosažení dostatečného průtoku mobilní fáze je potřeba aplikovat tlak jednotek až desítek MPa (40MPa) [3].

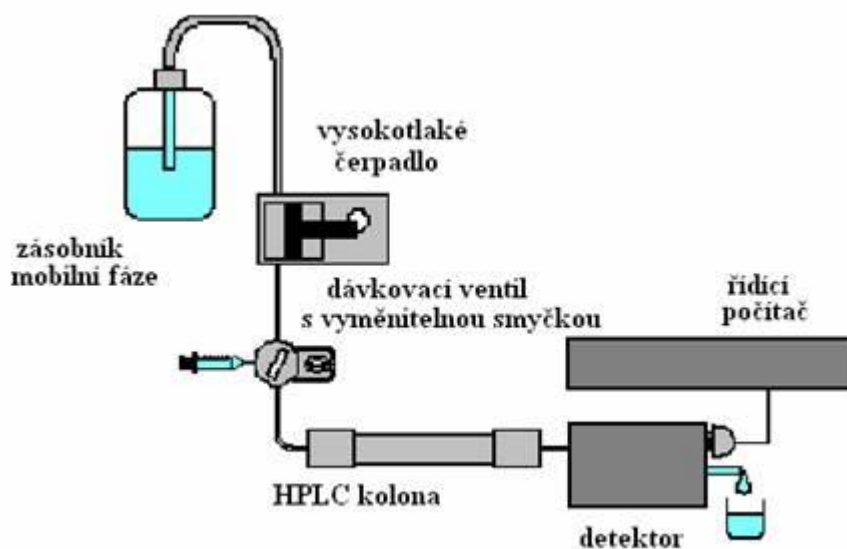
#### 3.4.1 Princip separace látek [1]



Obrázek č.1: Separace v chromatografické koloně

### 3.4.2 Kapalinový CHROMATOGRAF<sup>[3], [4]</sup>

Základní součásti kapalinového chromatografu jsou zásobníky mobilní fáze, vysokotlaké čerpadlo, dávkovací zařízení (autosampler, ruční), kolona, detektor a zapisovací zařízení (počítač).



**Obrázek č.2: Schéma kapalinového chromatografu<sup>[58]</sup>**

*Chromatografické kolony:*

Chromatografické kolony jsou rovné skleněné trubice o různých délkách (od několika cm po desítky cm), vnitřním průměrem 3, 4 nebo 4,6 mm naplněné sorbentem o průměru zrn 3, 5 nebo 10  $\mu\text{m}$ , který je držen v koloně pomocí frit.



**Obrázek č.3: Ukázky chromatografických kolon<sup>[59], [60]</sup>**

- účinnost kolony závisí na použité stacionární fázi, na délce kolony, na jejím tvaru, na materiálu kolony, na úpravě vnitřního povrchu kolony a na množství spojovacích částí
- chromatografické kolony se zhotovují z nerezové oceli nebo ze skla
- nejvýhodnější jsou kovové kolony, jejichž vnitřní povrch je poražen vrstvou skla
- v současnosti se obvykle používají kolony o různých délkách
- průměr analytických kolon bývá v řádu jednotek milimetrů
- v současnosti se jako velice nadějně jeví použití kapilárních kolon, jejichž průměr je srovnatelný s velikostí částic náplně

### *SEPARAČNÍ MECHANISMY u HPLC*

příčiny zadržování a dělení separovaných látek

#### *Gelová permeační chromatografie (GPC)*

- využívá mechanického dělení molekul analytů v pórech gelu na základě jejich rozdílné velikosti.

#### *Rozdělovací chromatografie (LLC)*

- využívá rozdílné rozpustnosti (a tudíž i rozdílné distribuce) molekul analytů mezi dvěma zcela nemísitelnými kapalinami.

#### *Adsorpční chromatografie (LSC)*

- využívá rozdílné adsorpce molekul analytů na povrchu tuhé fáze s aktivními centry.

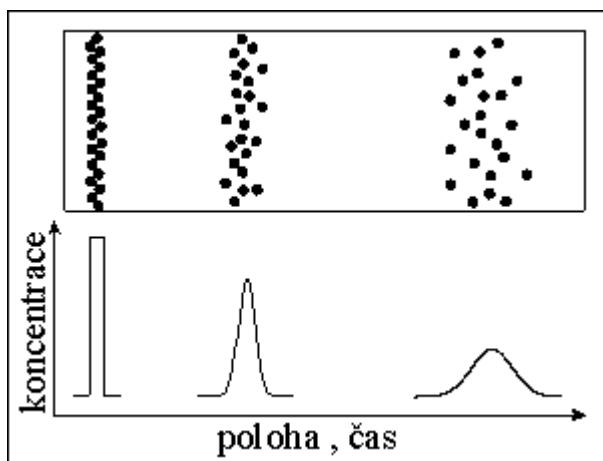
#### *Iontově výměnná chromatografie (IEC)*

- využívá rozdílné výměnné adsorpce analytů (iontů) na povrchu iontového měniče.

### *KINETIKA SEPARACE*

Zóny dělených látek (analytů) se během postupu kolonou rozšiřují.

Zóně analytu v chromatogramu odpovídá pík neboli eluční křivka, která charakterizuje koncentrační profil analytu v zóně.

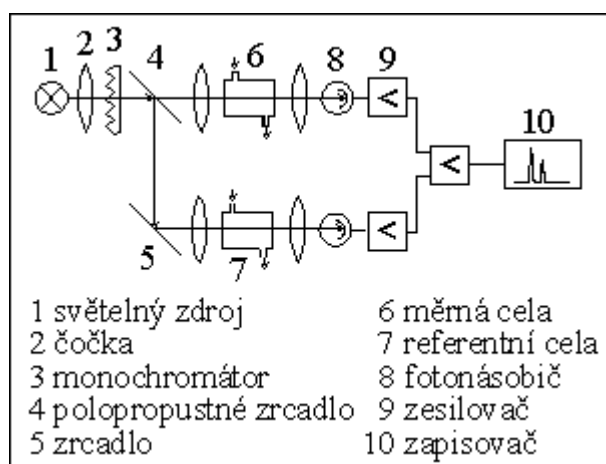


**Obrázek č.4: Tvary elučních křivek**

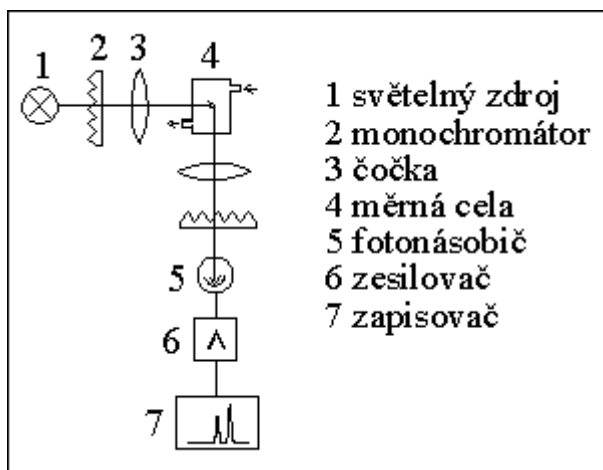
### DETEKTORY v HPLC

- detektory v HPLC jsou obecně složitější a rozmanitější než detektory v GC
- detektor musí být kompatibilní s viskózními systémy s malými difúzními koeficienty
- detektor musí poskytovat odezvu dostatečně rychle
- detektor může být univerzální nebo selektivní
- univerzální detektor reaguje na vlastnosti systému jako celku (refraktometrický)
- selektivní detektor reaguje na určitou selektivní vlastnost analytu (fluorescenční)
- detektor může být destruktivní (AAS, AES) nebo nedestruktivní (UV/VIS)
- detektory lze vhodně kombinovat (vícenásobná detekce)

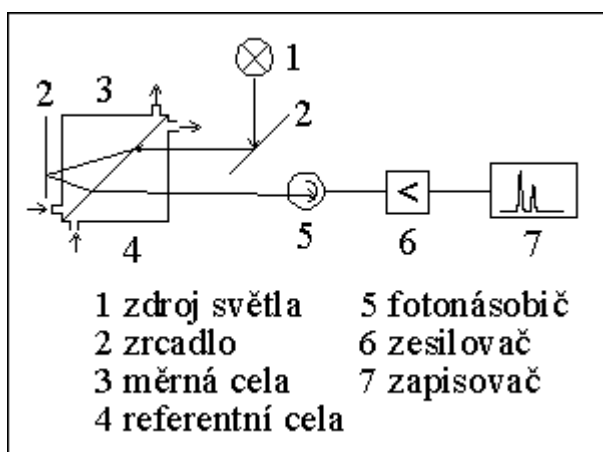
**Obrázek č. 5: Ukázky chromatografických detektorů:**



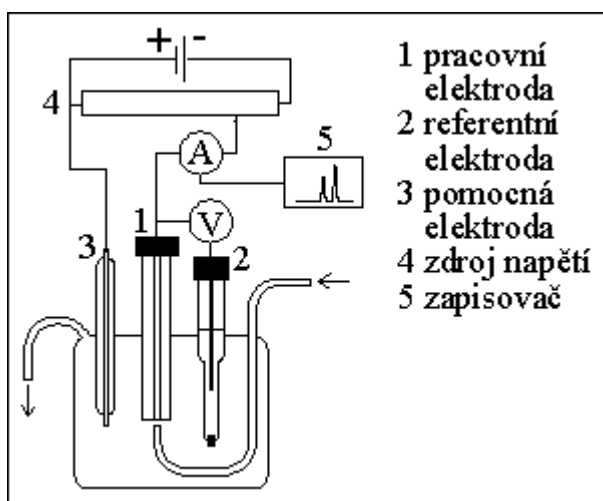
**a) absorpční fotometrický detektor**



*b) fluorimetrický detektor (fluorescenční det.)*



*c) refraktometrický detektor*



*d) amperometrický detektor*

*e) vodivostní detektor*

*f) detektor s diodovým polem (DAD)*

# 4 Stanovení složek přípravku Ketoprofen gel 2,5% (Ketalgen gel)

## 4.1. Účinná látka

### 4.1.1. Název<sup>[6]</sup>

Latinský název ČL 2005: Ketoprofenum

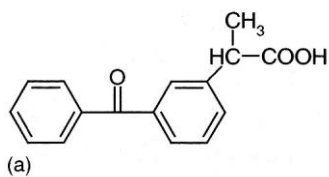
Anglický název Ph. Eur.4: Ketoprofen

Český název ČL 2002: kys.(2 RS)-2-(3-benzoylphenyl)propanová

### 4.1.2. Vzorec a molekulová hmotnost<sup>[6],[7]</sup>

Sumární vzorec:  $C_{16}H_{14}O_3$  -počítáno na vysoušenou látku, obsahující 99,6% až 100,5% sloučeniny  $C_{16}H_{14}O_3$

Strukturní vzorec.



Molekulová hmotnost: Mr : 254,28

### 4.1.3. Charakteristika<sup>[6]</sup>

Řadí se mezi třídu propanových kyselin nesteroidních antiflogistik s protizánětlivým a analgetickým účinkem. Působí inhibičně na produkci prostaglandinů.

#### 4.1.4. Vlastnosti <sup>[6]</sup>

Bílý nebo téměř bílý prášek (krystalický), je prakticky nerozpustný ve vodě, snadno rozpustný v acetonu, etanolu 96% a dichlormethanu.

## 4.2. Metody stanovení ketoprofenu v přípravku Ketoprofen gel 2,5%

### 4.2.1. Lékopisné stanovení <sup>[6]</sup>

0,200 g se rozpustí v 25 ml ethanolu 96% R, přidá se 25 ml vody R a titruje se NaOH 0,1 mol/l VS za potenciometrické indikace bodu ekvivalence.

1ml NaOH 0,1mol/l VS odpovídá 25,43 mg  $C_{16}H_{14}O_3$  .

### 4.2.2. Stanovení pomocí HPLC <sup>[7]</sup>

Příprava vzorku: do centrifugační zkumavky V = 50 ml se odváží množství gelu odpovídající 12,5 mg ketoprofenu (asi 0,5g), přidá se 20,00 ml roztoku interního standardu ethylparabenu v acetonitrilu (IS) o koncentrace  $c = 1\text{mg}/100\text{ ml}$  směs se umístí po dobu 10 min do ultrazvukové lázně. Po uplynutí této doby se směs centrifuguje 15 min při rychlosti 3000g, supernatant je poté dávkován autosamplrem přímo na kolonu.



**Obrázek č. 6: Ukázka kapalinového chromatografu (sestava Shimadzu LC – 2010C) <sup>[6]</sup>**

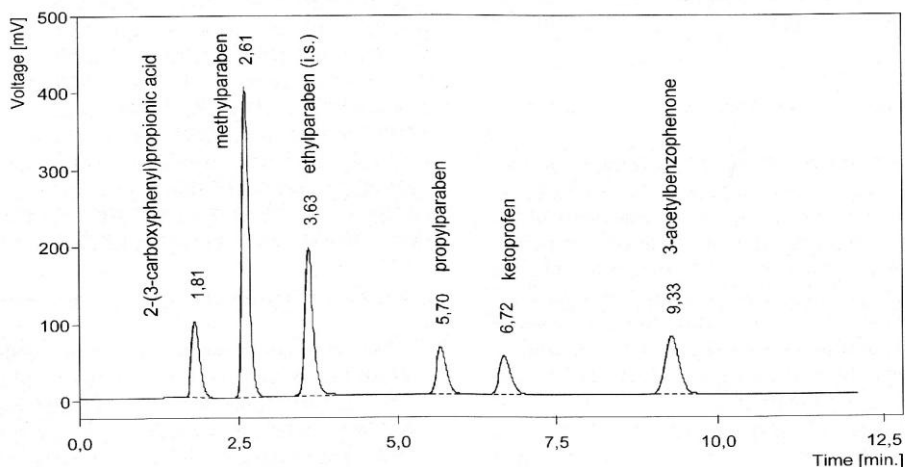


Fig. 2. Chromatogram of separation of standard solution for all compounds.

**Obrázek č. 7 Chromatogram separace jednotlivých komponent Ketoprofen gel 2,5%<sup>[7]</sup>**

**Tabulka č.2: Stanovení ketoprofenu a jeho degradačních produktů v přítomnosti konzervačních látek ve farmaceutickém přípravku pomocí HPLC. Farmac.fak. HK/**

přípravek	Ketoprofen gel 2,5 %
Stacionární fáze	Supelco Discovery C18(Sigma-Aldrich), kondiciovaná mobilní fází, délka 125 mm, vnitřní průměr 4 mm , 5 $\mu$ m, předkolona Supelguard Discovery C18, délka 20 mm
Mobilní fáze	acetonitril-voda fosforečnanový pufr pH = 3,5 (40:58:2, v/v/v)
Detekce /detektor	UV detekce 233nm
průtok	F <sub>M</sub> = 1,0 ml.min <sup>-1</sup>
Retenční čas	6,07 min
citace	[7]

**Tabulka č.3: Chirální separace ketoprofenu s použitím kolony C8 metodou HPLC s látkou norvancomycin přidanou k mobilní fází. /Hengshui Uni. China/**

Stanovovaná látka	Stacionární fáze	Mobilní fáze	Citace
ketoprofen	Achiral Hypersil BDS C8 (150 mm*4,6 mm i.d, 5 $\mu$ m)	acetonitril-triethylaminacetát(TEAA), pufr pH = 5,2 , 20 mM)(35:65,v/v) obsahující 2,0 mM norvancomycin	[8]



**Tabulka č.4: HPLC metoda platná pro stanovení 5 modelových složek- antipyrin, metoprolol, ketoprofen, furosemid a fenol-red jako zařízení pro standardizaci s použitím časově závislé detekce při dlouhých vlnových délkách./ Dr. Reddy's lab. Indie/**

stacionární fáze	mobilní fáze	detekce/detektor	průtok	retenční čas	citace
Symetry Shield C-18	vodný dihydrogen orthofosfát (pH = 5,5, 0,01m), methanol	210-600 nm	1,5 ml.min <sup>-1</sup>	13 min	[9]

**Tabulka č.5: Srovnání mezi látkami dodecylsulfátem a cetyltrimethylammonium bromidem použitými jako mobilní fáze v micelární kapalinové chromatografii pro stanovení látek v nesteroidních protizánětlivých přípravcích. /Farm. fak. Valencie, Španělsko/**

Stanovovaná složka	Stacionární fáze	Mobilní fáze	průtok	Citace
ketoprofen	Kromasil C18	micelární mobilní fáze-a) dodecylsulfát sodný (SDS), pH = 3 s 10% 1-propanol, b) cetylmethylammonium bromid (CTAB)	1 ml.min <sup>-1</sup>	[10]

**Tabulka č.6: Stanovení hyoscyne butylbromidu a ketoprofenu ve farmaceutických přípravcích spektrofotometrií a kapalinou chromatografií /Cairo univ, farm. fak, Egypt/**

Mobilní fáze	detekce	citace
0,05 ammonium dihydrogen fosfát-acetonitril-methanol (20+30+6,v/v/v)	UV 220 nm	[11]

**Tabulka č.7: Stanovení ketoprofenu, pantoprazolu, a valsartanu v plazmě metodou HPLC../Farm. fak., Marmara Univ., Istanbul, Turecko/**

přípravek	Stacionární fáze	Mobilní fáze	detektor	průtok	Citace
plazma	Kromasil C18 (250 mm*4,6 mm i.d, 5µm)	směs 0,02 M podium dihydrogen fosfát, pufr pH = 3,15, acetonitril (58:42 v/v)	Diode Array detektor, 225 a 272 nm	1 ml.min <sup>-1</sup>	[12]

#### 4.2.3. Další metody stanovení ketoprofenu:

Plynová chromatografie-ion trap tandem MS <sup>[13]</sup> /Univ. Victoria., Victoria, Canada/

Klasická spektrofotometrie- používá „peak-peak“(P-P) and „peak –zero(P-O)

měření, měří koncentrace v rozmezí 2,0-

12,0µg.ml<sup>-1</sup> <sup>[14]</sup> /Farm. fak., Lublin., Polsko/

SPE sorbent Strata X- používající plynovou chromatografii-MS detekci, limit

detekce 2-6 ng.l<sup>-1</sup> <sup>[15]</sup> /Farm. fak., Ljubljana, Slovensko/

Průtoková injekční UV spektrofotometre- použití pro gel a citrátový pufr pH =

6,5 pro ampule s detekcí při 261nm. ,

detekční limit pro gel a ampulky je od

0,436-0,303 µg.ml<sup>-1</sup> , průtok

13,8ml/min, pro ketoprofen je

koncentrační rozmezí od 7,5-5µg.ml<sup>-1</sup> <sup>[16]</sup>

/Farm. fak., Gazi univ., Ankara, Turecko/

SPE s použitím Oasis HLB(polystyrendivinylbenzen –N-vinyl pyrrolidone

toppolymer-cartridge

kvantitativní terminací pomocí GS-MS  
kvantitativní limit je od 1,0-8,0 ng.l<sup>-1</sup> [17]  
/National Central univ., Taiwan/

Kapilární zónová elektroforéza- borátový pufr (60mmol/l, pH = 8,5, zahrnující  
13%(v/v)methanolu , při detekci 200nm,  
detekční limit pro ketoprofen 20μmol.l<sup>-1</sup> [18]  
/College of Pharmacy, Kaohsiung, Taiwan/

GCMS – s použitím Waters Oasis HLB SPE, deprivatizovaná s N,O-bis (Trimethylsilyl  
trifluoracetamid (BSTFA) a analýzou prováděnou pomocí  
GC-MS [19] /Georgie Mason univ., Virginie, USA/

## 4.3.Methylparaben

### 4.3.1. Název<sup>[6]</sup>

Latinský název ČL 2005: Methylparabenum (Methylis parahydroxybenzoas)

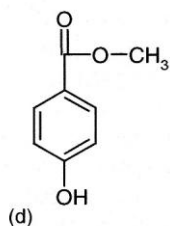
Anglický název Ph. Eur.4: Methylparabenum

Český název ČL 2005: methylparaben

### 4.3.2. Vzorec a molekulová hmotnost<sup>[6] [7]</sup>

Sumární vzorec: C<sub>8</sub> H<sub>8</sub> O<sub>3</sub>

Strukturní vzorec:



Molekulová hmotnost: Mr = 152,15

### 4.3.3. Charakteristika<sup>[6]</sup>

Je to methyl-4-hydroxybenzoát. Počítáno na vysušenou látku, obsahuje 98% až 102% sloučeniny  $C_8H_8O_3$ .

### 4.3.4. Vlastnosti<sup>[6]</sup>

Bílý krystalický prášek nebo tvoří bezbarvé krystaly. Velmi těžce rozpustný ve vodě, snadno rozpustný v lihu 96% a v methanolu.

## 4.4 .Metody stanovení methylparabenu

### 4.4 .1. Lékopisné stanovení<sup>[6]</sup>

K 1,000 g se přidá 20,0ml NaOH 1mol/l VS, zahřívá se 1 hod při 70<sup>0</sup>C a pak se rychle ochladí v ledové lázni. Stejně se připraví kontrolní roztok. Proveďte se titrace roztoku za pokojové teploty. Nadbytek NaOH se titruje kyselinou sírovou 0,5 mol/l VS do 2. bodu inflexe za potenciometrické indikace bodu ekvivalence.

1 ml NaOH 1mol/l VS odpovídá 152,1 mg  $C_8H_8O_3$ .

### 4.4.2. Stanovení pomocí metody HPLC<sup>[7]</sup>

Příprava vzorku: do centrifugační zkumavky  $V = 50\text{ml}$  se odváží množství gelu odpovídající 12,5 mg ketoprofenu, (asi 0,5g), přidá se 20,00 ml roztoku interního standardu ethylparabenu v acetonitrilu (IS) o koncentraci  $c = 1\text{mg}/100\text{ml}$  směs se umístí po dobu 10 min do ultrazvukové lázně. Po uplynutí této doby se směs centrifuguje 15 min při rychlosti 3000g, supernatant je dávkován autosamplerem přímo na kolonu.

**Tabulka č.8: Stanovení ketoprofenu a jeho degradačních produktů v přítomnosti konzervačních látek v farmaceutickém přípravku pomocí HPLC./ Farm. fak., HK/**

Stanovovaná složka	Methylparaben
Stacionární fáze	Supelco Discovery C18(Sigma-Aldrich), kondiciovaná mobilní fází, délka 125 mm, vnitřní průměr 4 mm , 5 $\mu$ m, předkolona Supelguard Discovery C18, délka 20 mm
Mobilní fáze	acetonitril-voda fosforečnanový pufr pH = 3,5 (40:58:2, v/v/v)
Detekce /detektor	UV detekce 233nm
průtok	$F_M = 1,0 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$
Retenční čas	2,54 min
citace	[7]

**Tabulka č.9: Stanovení sedmi ftalátů a 4 parabenů v kosmetických přípravcích metodou HPLC – DAD a GC- MS metodou./ Institute of technology, univ. Ningbo., China/**

Stanovovaná složka	Přípravek	Detekce/detektor	Citace
methylparaben	kosmetické produkty (spray na vlasy, parfém, deodorant, krémy, tělové mléko)	Diode Array detekce, GC- MS	[20]

**Tabulka č.10: Kombinace chemometrie, spektrofotometrie a kapalinové chromatografie pro stanovení dvou multisložkových směsí skládající se z bronchodilatačních léčiv./ Farm.fak., Suez Canal univ., Egypt/**

Stanovovaná složka	přípravek	Stacionární fáze	Mobilní fáze	Detekce/detektor	Detekční limit	Citace
methylparaben	bronchodilatační léky-směs 1	RP 18	acetonitril 0,05 M dihydrogen fosforečnan draselný, pH = 4,3 (60:40, v/v)	UV 243 nm	1-5 $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$	[21]

methylyparaben	bronchodilatační léky- směs 2	RP 18	acetonitril 0,05 M dihydrogen fosforečnan draselný, pH = 3 (50:50,v/v)	UV 245 nm	1-5 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$	[21]
----------------	-------------------------------	-------	--	-----------	---	------

**Tabulka č.11: Stanovení panthotenátu vápenatého a dvou konzervačních látek methylyparabenu v krému pomocí metody HPLC. /Farm. fak., HK/**

Přípravek	Stacionární fáze I	Stacionární fáze II	Mobilní fáze	Detektor	Citace
konzervační prostředky krému	2 typy: a)Supelco Discovery C18(125 mm×4,0 mm, 5 $\mu\text{m}$ ), b) Zorbax SB-CN)150 mm×4,6 mm, 5 $\mu\text{m}$ )	Zorbax TSM (250 mm ×4,6 mm, 5 $\mu\text{m}$ ), hypersil ODS )250 mm×4,6 mm, 5 $\mu\text{m}$ )	methanol, fosforečná kyselina, pH = 2,5, 65:35 v/v)	UV 214 nm	[22]

**Tabulka č. 12: Kombinace chemometrie, spektrofotometrie a kapalinové chromatografie pro stanovení šesti složek farmaceutických přípravků./ Farm. fak., Suez Canal univ., Egypt/**

Stanovovaná složka	přípravek	Stacionární fáze	Mobilní fáze	Detekce/detektor	Citace
methylyparaben	farmaceutický sirup	obrácená fáze C18	25 mM $\text{KH}_2\text{PO}_4$	UV 222 nm	[23]

**Tabulka č.13: Kombinace chemometrie, spektrofotometrie a kapalinové chromatografie pro analýzu dvou multisložkových směsí obsahující léčiva potlačující kašel./Farm. fak., Suez Canal univ., Egypt/**

Stanovovaná složka	Přípravek	Stacionární fáze	Mobilní fáze	Detekce/detektor	Citace
methylparaben	směs- benzoát sodný, efedrin hydrochloridbenzoová kyselina	Oktadecylsilikagel (ODS)	acetonitril-fosfát.pufri pH = 2,7 (40+60,v/v,5μm, heptasulfonan sodný	UV 214 nm	[24]

**Tabulka č.14: Stanovení oxeladinu citrátu a chloridu oxybutidinu a jejich degradačních produktů metodou HPLC. / Farm. fak., Suez Canal univ., Egypt/**

Stacionární fáze	Mobilní fáze	Detekce/detektor	Citace
Nucleosil C18	acetonitril 0,1 % fosforečná kyselina (60:40 v/v)	UV detekce 220 nm	[25]
VP –ODS C18	acetonitril-0,1 M dihydrogen fosforečnan draselný, /diethylamin (60:40:0,2)	UV detekce 220 nm	[25]

**Tabulka č.15: Stanovení sanidinu, methylparabenu, propylparabenu v přípravku ústní vody metodou gradientové HPLC . /Duality kontrol department, Athény, Řecko/**

přípravek	Stacionární fáze	Mobilní fáze	Detekce/detektor	Citace
ústní voda, konzervační prostředky	Nucleosil C18	směs amonium acetátový roztok(0,5 M), acetonitril a methanol s gradientovou elucí	UV detekce 254 nm	[26]

**Tabulka č.16: Stanovení konzervačních prostředků (benzoová kyselina, methylparaben, sorbová kyselina, propylparaben. /School of Chemical Sciencis, Penang ,Malajsie/**

Stanovovaná složka	Mobilní fáze	Detekce/detektor	Citace
methylparaben	methanol : acetát. pufr pH = 4,4 (50:50, v/v)	UV detekce 254 nm	[27]

#### 4.4.3. Další metody stanovení methylparabenu:

UPLC-kolony s malým průměrem, je srovnávána s LC systémem, použitá kolona Acquity UPLC BEH C 18 (2,1×50mm,1,74μm) a (2,1×100mm,1,7μm) srovnávána s kolonou pro HPLC: Purospher RP 18e (125×4,0mm, 5μm), Zorbax Eclipse XDB C 18 (75×4,6mm, 3,5 μm), Zorbax Eclipse SB C 18 (50×4,6mm, 1,8μm) jako monolitická kolona (Chromolith Performance RP- 18e (100×4,6mm) [28]/*Farmac.fak. HK/*

SFE kombinovaná s LC-MS- analyty jsou separovány na C 18 reverzibilní fázi, kolony používající methanol jako mobilní fázi a kvantifikovány pomocí MS [29] /*National Chung – Hsing univ., Taiwan/*

SIA- sekvenční injekční analýza- reverzní fáze sekvenční injekční analýzy SIC techniky UV detekcí, stacionární fáze- Chromolith SpeedROD RP- 18e, 50-4,6mm kolona 10mmpředkolonou a Fialab 3000systém s 6 portovou separací, jako mobilní fáze slouží směs acetonitrilu-tetrahydrofuran-0,05 M octová kyselina(10:10:90v/v/v) pH = 3,75, průtok 0,48ml/min, UV detekce při 245nm, tyto SIC metody byly srovnávány s HPLC metodou určení methylparabenu [30]/*Farm. fak., HK/*

SPME- solid phase microextrakce spojená s iontopohyblivou spektrometrií(IMS) [31] /*Seton Hall univ., South Orange, New Jersey/*



MEKC- micellární elektrokinetická chromatografie- silikonová kapilára (60cm×75µm i.d)  
při 25kV s UV detekcí při 212nm<sup>[32]</sup>/Farm. fak.HK/

## 4.5 Propylparaben

### 4.5.1.Název<sup>[6]</sup>

Latinský název ČL 2002: Propylparabenum (Propylis parahydroxybenzoas)

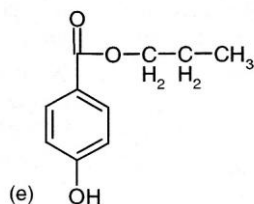
Anglický název Ph. Eur.4: Propylparabenum

Český název ČL 2002: Propylparaben (propyl -4- hydroxybenzoát)

### 4.5.2 Vzorec a molekulová hmotnost<sup>[6] [7]</sup>

Sumární vzorec : C<sub>10</sub> H<sub>12</sub> O<sub>3</sub>

Strukturní vzorec:



Molekulová hmotnost: M<sub>r</sub> = 180,20

### 4.5.3.Charakteristika<sup>[6]</sup>

Je to propyl -4-hydroxybenzoát. Počítáno na vysušenou látku, obsahuje 98% až 102% sloučeniny C<sub>10</sub> H<sub>12</sub> O<sub>3</sub>.

#### 4.5.4. *Vlastnosti* <sup>[6]</sup>

Bílý krystalický prášek, velmi těžce rozpustný ve vodě, snadno rozpustný v lihu 96% a v methanolu.

### 4.6. *Metody stanovení propylparabenu*

#### 4.6.1. *Lékopisné stanovení* <sup>[6]</sup>

K 1,000 g se přidá 20,0 ml NaOH 1 mol/l VS zahřívá se 1 hod při 70` C a pak se rychle ochladí v ledové lázni. Stejně se připraví kontrolní roztok. Provede se titrace roztoku za pokojové teploty. Nadbytek NaOH se titruje kys. sírovou 0,5 mol/l VS do 2. bodu inflexe za potenciometrické indikace bodu ekvivalence.

1 ml NaOH 1 mol/l VS odpovídá 180,2 mg C<sub>10</sub> H<sub>12</sub> O<sub>3</sub>.

#### 4.6.2. *Stanovení pomocí HPLC* <sup>[7]</sup>

Příprava vzorku: do centrifugační zkumavky objemu 50ml se odváží množství gelu odpovídající 12,5 mg ketoprofenu, (asi 0,5g), přidá se 20,00ml roztoku interního standartu ethylparabenu v acetonitrilu (IS) o koncentraci  $c = 1\text{mg}/100\text{ml}$  a směs je umístěna po dobu 10 min do ultrazvukové lázně. Po uplynutí této doby je směs centrifugována 15 min při rychlosti 3000g a poté je supernatant dávkován autosamplermem přímo na kolonu.

**Tabulka č.17: Stanovení ketoprofenu a jeho degradačních produktů v přítomnosti konzervačních látek ve farmaceutickém přípravku pomocí HPLC./Farm. fak HK/**

Stanovovaná složka	propylparaben
Stacionární fáze	Supelco Discovery C18(Sigma-Aldrich), kondiciovaná mobilní fází, délka 125 mm, vnitřní průměr 4 mm , 5 $\mu$ m, předkolona Supelguard Discovery C18, délka 20 mm
Mobilní fáze	acetonitril-voda fosforečnanový pufr pH = 3,5 (40:58:2, v/v/v)
Detekce /detektor	UV detekce 233nm
průtok	$F_M = 1,0 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$
Retenční čas	5,26 min
citace	[7]

**Tabulka č.18: Kombinace chemometrie, spektrometrie a kapalinové chromatografie pro stanovení dvou multisložkových směsí skládající se z bronchodilatačních léčiv. / Farm.fak., Suez Canal univ., Egypt/**

Stanovovaná složka	Stacionární fáze	Mobilní fáze	Detekce/detektor	Detekční limit	Citace
propylparaben	RP 18	acetonitril : 0,05 M dihydrogen fosfát draselný, pH = 4,3 (60:40,v/v)	UV 243 nm	1-5 $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$	[21]
propylparaben	RP 18	acetonitril : 0,05 M dihydrogen fosfát draselný, pH = 3 (50:50,v/v)	UV 245 nm		[21]

**Tabulka č.19: Stanovení domperidonu (DP), methylparabenu (MP), propylparabenu (PP) metodou HPLC. /Jamoom Pharmaceuticals, Jeddah, Saudi Arabia/**

přípravek	Stacionární fáze	Mobilní fáze	Detekce/detektor	citace
ústní suspenze	Octylsilyl, Optima, OP C8, 150 mm $\times$ 4,6 mm, 5 $\mu$ m	izokratic. mobilní fáze-0,5% , vodný amonium acetátový pufr: methanol 40:60 (v/v)	UV detekce 280 nm	[33]

**Tabulka č.20: Stanovení metronidazolu, benzoanu a diloxanidu jako léčiv v suspenzích metodou HPLC s reverzní fází./Hukma Pharmaceuticals, Amman, Jordán/**

Stanovovaná složka	Stacionární fáze	Mobilní fáze	průtok	Detekce/detektor	citace
propylparaben	Supelco LC-18 DB (15 cm *4,6 mm), 5µm	pufr-acetonitril. směs (70:30,v/v), pH = 2,5	2,0 ml.min <sup>-1</sup>	UV detekce 254 nm	[34]

**Tabulka č.21: HPLC metoda pro stanovení benzokainu, propylparabenu a benzylalkoholu v bioadhezivním gelu. /School of Pharmacy, , Univerzita of Barcelona, Barcelona/**

Přípravek	Stacionární fáze	Mobilní fáze	průtok	Detekce/detektor	Citace
bioadheziv. gel	Nucleosil 120 C18, gradientová eluce	směs methanolu a ledové kyseliny octové (10%, v/v)	2,0 ml.min <sup>-1</sup>	DAD detektor, 258 nm	[35]

**Tabulka č.22: Stanovení p- hydroxybenzoové kyseliny a konzervačních produktů v kapalných farmaceutických přípravcích pomocí HPLC./ Fleet Laboratoriem, Watford, UK/**

Stanovovaná složka	Stacionární fáze	Mobilní fáze	Detekce/detektor	Citace
propylparaben	Spherisorb C18 (250 mm×4,6 mm)	pufr fosforečnan draselný pH = 7,05 : methanol (47,5:52,5, v/v)	UV detekce 254 nm	[36]

**Tabulka č.23: Stanovení methylparabenu, propylparabenu, hydrokortison acetátu a jeho degradačních produktů v krému metodou HPLC na reverzní fází. /Farm. fak., HK/**

přípravek	Stacionární fáze	Mobilní fáze	Detekce	Citace
Hydrocortison cream 1%	Supelco Discovery C18 (125 mm×4,6 mm, 5µm)	směs methanolu, acetonitrilu a vody (15:27:58, v/v/v)	UV spektrofotometrická	[37]

### 4.6.3. Další možnosti stanovení propylparabenu

HPLC- s diode array detekcí a GC-MS <sup>[38]</sup> /Analysis and Testiny Center Zhejiang Univ., Ningbo/

SIA- sekvenční injekční analýza- reverzní fáze sekvenční injekční analýzy SIC techniky s UV detekcí, stacionární fáze-Chromolith SpeedROD RP- 18e, 50-4,6mm kolona 10mm předkOLONOU a Fialab 3000systém s 6 portovou separací, jako mobilní fáze slouží směs acetonitrilu-tetrahydrofuranu-0,05 M octová kyselina(10:10:90, v/v/v) pH = 3,75, průtok 0,48ml/min, UV detekce při 245nm, tyto SIC metody byly srovnávány s HPLC metodou stanovení propylparabenu. <sup>[39]</sup> /Farm. fak. HK/

UPLC-kolony s malým průměrem, je srovnávána s LC systémem, použita kolona Acquity UPLC BEH C 18 (2,1×50mm,1,74 μm) a (2,1×100mm,1,7μm ) srovnávána s kolonou pro HPLC: Purospher RP 18e (125×4,0mm, 5μm), Zorbax Eclipse XDB C 18 (75×4,6mm, 3,5 μm), Zorbax Eclipse SB C 18 (50\*4,6mm,1,8μm) jako monolitická kolona (Chromolith Performance RP- 18e (100×4,6mm) <sup>[28]</sup> /Farm. fak. HK/

SFE kombinovaná s LC-MS- analyty jsou separovány na C 18 reverzibilní fázi kolony používající methanol jako mobilní fázi a kvantifikovány pomocí MS <sup>[29]</sup> /Farm. fak. HK/

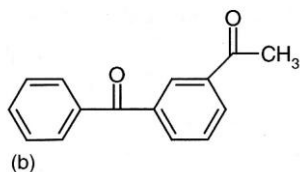
MEKC – používá 30mM fosfátový pufr (pH = 7,2)- složený z 30mM SDS, při 10kVa separace při 40<sup>0</sup>C <sup>[40]</sup> /Fakulta of Science, Burapha Univ., Chonburi, Thailand/

## 4.7. Degradační produkt 3-acetylbenzofenon (nečistota A ketoprofenu)

### 4.7.1. Název<sup>[7]</sup>

Latinský název: 3-acetylbenzofenon (nečistota A ketoprofenu)

### 4.7.2. Vzorec<sup>[7]</sup>



## 4.8. Metody stanovení 3-acetylbenzofenonu

### 4.8.1. Stanovení pomocí HPLC<sup>[7]</sup>

Příprava vzorku: do centrifugační zkumavky V = 50ml se odváží množství gelu odpovídající 12,5 mg ketoprofenu (asi 0,5g), přidá se 20,00ml roztoku interního standartu ethylparabenu v acetonitrilu (IS) o koncentraci  $c = 1\text{mg}/100\text{ml}$  a směs se umístí po dobu 10 min do ultrazvukové lázně. Po uplynutí této doby se směs centrifuguje 15 min při rychlosti 3000g a poté je supernatant dávkován autosamplerem přímo na kolonu.

**Tabulka č.24: Stanovení ketoprofenu a jeho degradačních produktů v přítomnosti konzervačních látek ve farmaceutickém přípravku pomocí HPLC. /Farm. fak. HK/**

Stanovovaná složka	3 - acetylbenzofenon
Stacionární fáze	Supelco Discovery C18(Sigma-Aldrich), kondiciovaná mobilní fází, délka 125 mm, vnitřní průměr 4 mm , 5 $\mu\text{m}$ , předkolona Supelguard Discovery C18, délka 20 mm
Mobilní fáze	acetonitril-voda fosforečnanový pufr pH = 3,5 (40:58:2, v/v/v)
Detekce /detektor	UV detekce 233nm
průtok	$F_M = 1,0\text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$
Retenční čas	8,62 min
citace	[7]

**Tabulka č.25: Validovaná HPLC metoda pro stanovení indomethacinu a jeho dvou degradačních produktů v gelu. /Farm. fak. HK/**

Stanovovaná složka	Stacionární fáze	Mobilní fáze	Detekce/detektor	průtok	citace
3-acetylbenzofenon	Zorbax –fenyl analytická kolona (75 mm*4,6 mm, 3,5 μm)	acetonitril + 0,2 % fosforečná kyselina (50:50, v/v)	UV detekce 237 nm	0,6 ml.min <sup>-1</sup>	[41]
3-acetylbenzofenon	Zorbax SB-CN (150 mm*4,6 mm, 5μm)	acetonitril + 0,2 % fosforečná kyselina (50:50, v/v)	UV detekce 237 nm	1,2 ml.min <sup>-1</sup>	[41]

**Tabulka č.26: Porovnání použití C 18 monolitické kolony a C 18 částicové kolony v HPLC u stanovení Estrogeneru a Ketoprofen gelu. /Farm. fak. HK/**

Stanovovaná složka	Stacionární fáze	Mobilní fáze	průtok	Citace
3-acetylbenzofenon	monolitická kolona Chromolith Flash RP-18e	směs acetonitrilu, vody, fosfátového pufru o pH = 3,5 (30:68:2, v/v/v)	2,0 ml.min <sup>-1</sup>	[42]
3-acetylbenzofenon	ChromolithSpeedROD RP-18e	směs acetonitrilu, vody, fosfátového pufru o pH = 3,5 (35:68:2, v/v/v)	3,0ml.min <sup>-1</sup>	[42]

#### 4.8.2. Stanovení obsahu nečistoty A(3-acetylbenzofenonu) v gelu <sup>[7]</sup>

- a) Připraví se roztoky standardů v acetonitrilu s obsahem 0,5mg/100ml nečistoty A a 1 mg/100ml ethylparabenu (IS) ze 2 samostatných navážek. Každý roztok se změří třikrát.
- b) provedou se 2 nezávislé analýzy vzorku podle kompletního postupu uvedeném v kap.4.8.1. (viz.citace[7]). Supernatant odpovídající příslušné navážce vzorku se změří třikrát.
- c) Výpočet obsahu nečistoty A(% ketoprofenu) se provede podle vzorce:

$$c_i = \frac{A_V / A_{IS} \cdot m_S \cdot F \cdot 4000}{A_S / A_{IS} \cdot m_V \cdot Z}$$

$c_i$  = obsah stanovované nečistoty v % ketoprofenu

$A_V, A_S$  = plocha píku vzorku, standardu

$A_{IS}$  = plocha píku vnitřního standardu ethylparabenu

F = faktor korekce na obsah referenční látky

Z = faktor zředění (Z = 5)



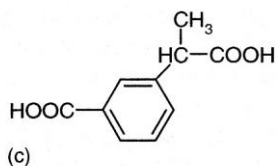
## 4.9. Degradační produkt kyselina

### 2-(3-karboxyfenyl)propionová (nečistota C ketoprofenu)

#### 4.9.1. Název<sup>[7]</sup>

Český název : kyselina 2-(3-karboxyfenyl)propionová

#### 4.9.2. Vzorec<sup>[7]</sup>



## 4.10. Metody stanovení 2-(3-karboxyfenyl)propionové kyseliny

### 4.10.1. Stanovení pomocí HPLC<sup>[7]</sup>

Příprava vzorku: do centrifugační zkumavky V = 50ml se odváží množství gelu odpovídající 12,5 mg ketoprofenu, (asi 0,5g), přidá se 20,00ml roztoku interního standardu ethylparabenu v acetonitrilu (IS) o koncentrace  $c = 1\text{mg}/100\text{ml}$  a směs se umístí po dobu 10 min do ultrazvukové lázně. Po uplynutí této doby se směs centrifuguje 15 min při rychlosti 3000g, supernatant je dávkován autosamplrem přímo na kolonu.

**Tabulka č.27: Stanovení ketoprofenu a jeho degradačních produktů v přítomnosti konzervačních látek v farmaceutickém přípravku pomocí HPLC. /Farm. fak. HK/**

Stanovovaná složka	2-(3-karboxyfenyl)propionová kyselina
Stacionární fáze	Supelco Discovery C18(Sigma-Aldrich), kondicionovaná mobilní fází, délka 125 mm, vnitřní průměr 4 mm , 5 $\mu\text{m}$ , předkolona Supelguard Discovery C18, délka 20 mm
Mobilní fáze	acetonitril:voda: fosforečnanový pufr pH = 3,5 (40:58:2, v/v/v)
Detekce /detektor	UV detekce 233nm
průtok	$F_M = 1,0\text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$
Retenční čas	1,8 min
citace	[7]

**Tabulka č.28: Validovaná HPLC metoda pro stanovení indomethacinu a jeho dvou degradačních produktů v gelu. /Farm. fak. HK/**

Stanovovaná složka	Stacionární fáze	Mobilní fáze	Detekce/detektor	průtok	citace
2-(3-karboxyfenyl)propion. Kyselina	Zorbax –fenyl analytická kolona (75 mm×4,6 mm 3,5 μm)	acetonitril + 0,2 % fosforečná kyselina (50:50, v/v)	UV detekce 237 nm	0,6 ml.min <sup>-1</sup>	[41]
2-(3-karboxyfenyl)propion. kyselina	Zorbax SB-CN (150 mm×4,6 mm, 5μm)	acetonitril + 0,2 % fosforečná kyselina (50:50, v/v)	UV detekce 237 nm	1,2 ml.min <sup>-1</sup>	[41]

**Tabulka č.29: Porovnání použití C 18 monolitické kolony a C 18 částicové kolony v HPLC u stanovení Estrogeneru a Ketoprofen gelu. /Farm. fak. HK/**

Stanovovaná složka	Stacionární fáze	Mobilní fáze	průtok	Citace
2-(3-karboxyfenyl)propion. kyselina	monolitická kolona Chromolith Flash RP-18e	směs acetonitrilu, vody, fosfátového pufru o pH = 3,5 (30:68:2, v/v/v)	2,0 ml.min <sup>-1</sup>	[42]
2-(3-karboxyfenyl)propion. kyselina	Chromolith Speed ROD RP-18e	směs acetonitrilu, vody, fosfátového pufru o pH = 3,5 (35:68:2, v/v/v)	3,0ml.min <sup>-1</sup>	[42]

#### 4.10.2. Stanovení obsahu nečistoty C(2-(3 karboxyfenyl)propionové kyseliny v gelu <sup>[7]</sup>

a) Připraví se roztoky standardů v acetonitrilu s obsahem 0,5mg/100ml nečistoty C a 1mg/100ml ethylparabenu (IS) ze 2 samostatných navážek. Každý roztok se změří třikrát.

b) provedou se 2 nezávislé analýzy vzorku podle kompletního postupu uvedeném v kap.4.10.1.(viz.citace <sup>[7]</sup>). Supernatant odpovídající příslušné navážce vzorku se změří třikrát.

c) Výpočet obsahu nečistoty C (% ketoprofenu) se provede podle vzorce:

$$c_i = \frac{A_V / A_{IS} \cdot m_S \cdot F \cdot 4000}{A_S / A_{IS} \cdot m_V \cdot Z}$$

$c_i$  = obsah stanovované nečistoty v % ketoprofenu

$A_V, A_S$  = plocha píku vzorku, standardu

$A_{IS}$  = plocha píku vnitřního standardu ethylparabenu

F = faktor korekce na obsah referenční látky

Z = faktor zředění (Z = 5)

#### *4.11.Souhrn rešerže*

HPLC stanovení ketoprofenu, methylparabenu a propylparabenu již bylo v literatuře popsáno, ale našla jsem pouze jednu metodu současného stanovení účinné látky, konzervačních látek a obou uvedených nečistot vyskytujících se ve farmaceutickém přípravku, což je metoda vyvinutá na katedře analytické chemie Farmaceutické fakulty v Hradci Králové [7].

Ke stanovení léčivých přípravků, které obsahují nečistoty 3- acetylbenzofenon a 2-(3-karboxyfenyl)propionovou kyselinu, se používá metoda HPLC s UV detekcí, mobilní fází je směs acetonitrilu, vody a kyseliny fosforečné ( pH = 3,5) v poměru 40:58:2, jako vnitřní standard se používá ethylparaben.

Jiné metody pro stanovení nečistot ketoprofenu jsem v dostupné literatuře nenalezla.

# 5 Stanovení nečistot v přípravku

## Terbinafin krém

### 5.1. Nečistoty látky Terbinafin krém

#### 5.1.1 Název <sup>[43]</sup>

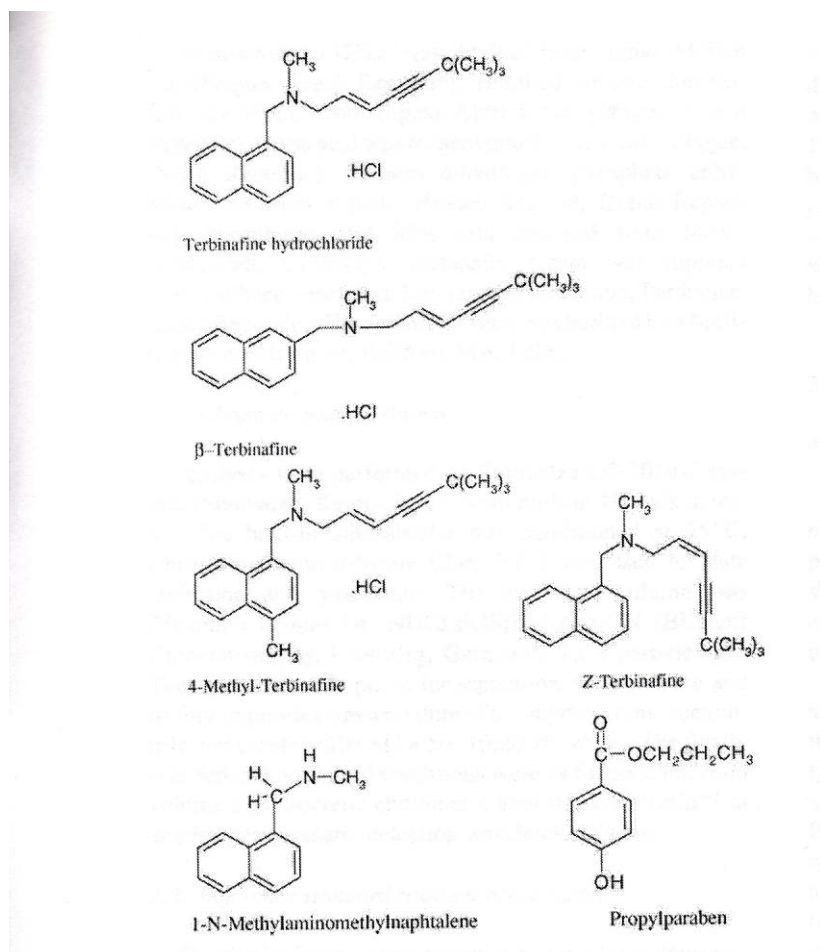
Anglický název: 1-methylaminomethylnaphtalene

Anglický název:  $\beta$ - terbinafine

Anglický název: Z- terbinafine

Anglický název: 4-methyl-terbinafine

#### 5.1.2. Vzorce <sup>[43]</sup>



## 5.2. Metody stanovení nečistot v přípravku Terbinafin HBF krém

### 5.2.1 Stanovení nečistot pomocí HPLC <sup>[43]</sup>

Příprava vzorku: Do centrifugační zkumavky objemu 50 ml se odváží množství krému odpovídající 5,0 mg terbinafinu (asi 0,5 g), přidá se 20,00 ml roztoku interního standardu propylparabenu v acetonitrilu (IS) o koncentraci  $c = 25 \text{ mg}/100 \text{ ml}$  a 50  $\mu\text{l}$  85% kyseliny fosforečné a směs se umístí po dobu 15 min do ultrazvukové lázně. Po uplynutí této doby je směs centrifugována 15 min při rychlosti 6000 otáček/ min. Supernatant je dávkován autosamplermem přímo na kolonu.

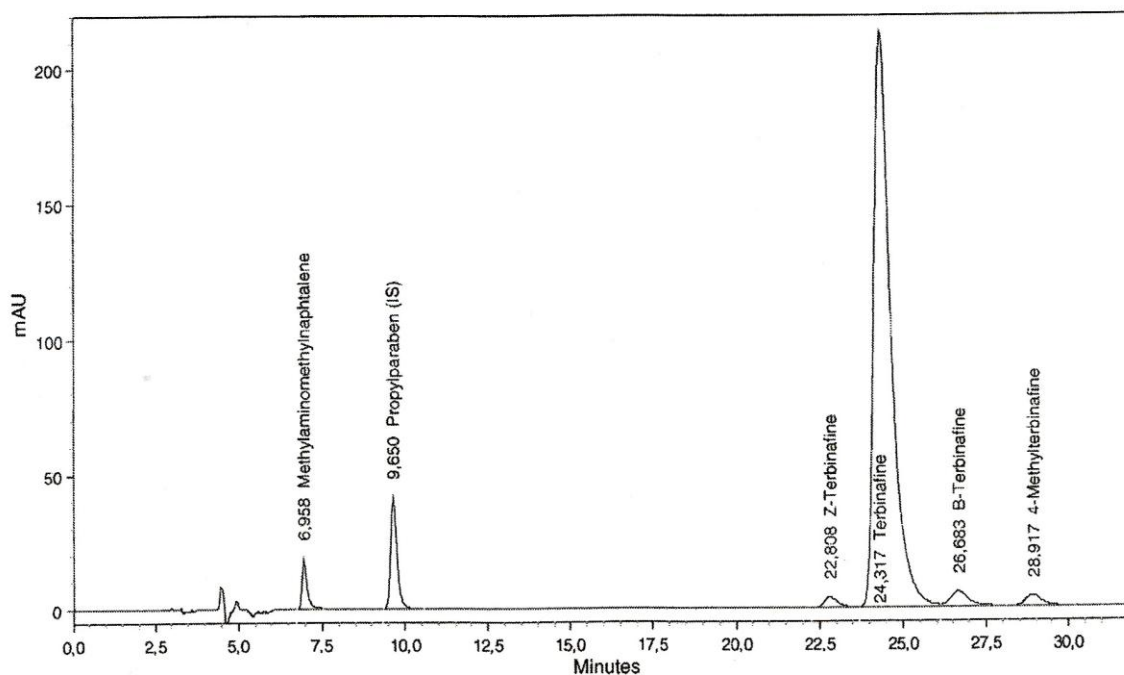


Fig. 2. Chromatogram of standard solution of terbinafine ( $250 \mu\text{g ml}^{-1}$ ) and its degradation products – 1-*N*-methylaminomethylnaphtalene, Z-terbinafine, terbinafine,  $\beta$ -terbinafine and 4-methyl-terbinafine – with the internal standard (propylparaben,  $250 \mu\text{g ml}^{-1}$ ); UV detection at 226 nm.

### Obrázek č. 8: Chromatogram separace standardů <sup>[43]</sup>

**Tabulka č.30: Stanovení terbinafinu a jeho čtyř nečistot s použitím HPLC metody na reverzní fázi. /Farm. fak. HK/**

Stanovovaná složka	Stacionární fáze	Mobilní fáze	Detekce/detektor	průtok	Citace
1- methylaminomethylnaftalen, β- terbinafin, Z- terbinafin, 4-methyl-terbinafin	NUCLEOSIL 100-5-CN	směs tetrahydrofuranu, acetonitrilu a citrát. pufru o pH = 4,5 (10:20:70,v/v/v)	UV detekce 226 nm	0,8 ml.min <sup>-1</sup> ,	[43]

**Tabulka č.31: Stanovení terbinafinu ve tkáních. /Department of Pharmacy, Univ. of Sydney/**

Přípravek	Stacionární fáze	Mobilní fáze	Detekce/detektor	Citace
tkáň potkana	C(18), obrácená fáze kolony	acetonitril + voda (40:60), obsahující orthofosforečnou kyselinu (0,02 M) a triethylamin (0,01 M)	UV detekce 224 nm	[44]

**Tabulka č.32: Stanovení terbinafinu a pěti metabolitů v plazmě a moči metodou HPLC s in-line SPE. /Sandoz Pharma, Basel, Switzerland/**

přípravek	Stacionární fáze	Detekce/detektor	Citace
plazma člověka	fenyl.kolona s on-line SPE	UV detekce 224 nm	[45]
moč	fenyl.kolona s on-line SPE	UV detekce 224 nm	[45]

**Tabulka č.33: Stanovení terbinafinu a jeho desmethyl. metabolitů v plazmě metodou HPLC. /Department of Human Pharmacology, Lab. Sandoz, France/**

Stanovovaná složka	Mobilní fáze	Limit kvantifikace	Detekce/detektor	Citace
Terbinafin, desmethylmetabolity	acetonitril + 0,012 M triethylamin- 0,020 M ortofosforečná kyselina (50:50,v/v)	2 ng . ml <sup>-1</sup>	UV detekce 224 nm	[46]

### *5.2.2.. Další metody stanovení nečistot v přípravku Terbinafin HBF krém*

kapalinová chromatografie s pozitivní ionizací elektrosprejem tandemové s MS <sup>[47]</sup>

/Cartesius Analytical Unit, Sao Paulo, Brazil/

HPLC a GC- použity pro stanovení terbinafinu- hydrochloridu v kočičí srsti <sup>[48]</sup>

/Univerzity of Ljubljana, Veterinary Fac., Ljubljana, Slovensko/

HPLC metoda s elektrochemickou detekcí- pro terbinafin a jeho desmethylderivát v plazmě

UV detekcí- pro karboxy terbinafin <sup>[49]</sup> /Sandoz Forschungsinstitut, Vinna,  
Austria/



### 5.3. Souhrn rešerže

Ke stanovení léčivých přípravků, které obsahují nečistoty 1-methylaminomethylnaftalen,  $\beta$ -terbinafin, Z-terbinafin a 4-methyl-terbinafin se používá metoda HPLC s UV detekcí vyvinutá na katedře analytické chemie Farmaceutické fakulty v Hradci Králové. Tato metoda byla validována s použitím propylparabenu jako vnitřního standardu. Metoda je aplikována pro rutinní stanovení terbinafinu a jeho všech degradačních produktů s dostatečnou selektivitou, přesností a správností.

Mobilní fázi je směs tetrahydrofuranu, acetonitrilu a citrátového pufru o pH = 4,5 v poměru 10:20:70. Metoda umožňuje současně stanovit nejen uvedené nečistoty, ale i účinnou látku terbinafin, nečistotu 1-methylaminomethylnaftalen a tři degradační produkty-  $\beta$ -terbinafin, Z-terbinafin, 4-methyl-terbinafin vyskytující v přípravku Terbinafin krém.

Jinou metodu pro stanovení sledovaných nečistot jsem v dostupné literatuře nenalezla.

# 6 Stanovení nečistot v přípravku Estrogel HBF krém

## 6.1. Nečistoty přípravku Estrogel HBF krém

### 6.1.1. Názvy: [50]

Anglický název:  $\Delta^{9(11)}$ -Estradiol

Anglický název: Estrone

Anglický název:  $\Delta^{9(11)}$ -Estrone

Anglický název: Ethynylestradiol

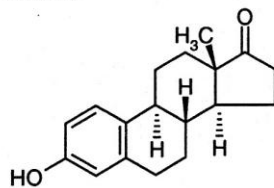
Anglický název:  $\alpha$ -Estradiol hemihydrate

Anglický název: Estradiol 3- methyl ether

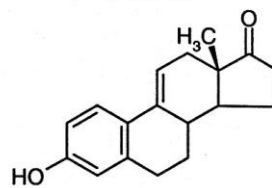
Anglický název: Estradiol 17- acetate

### 6.1.2. Vzorce: [50]

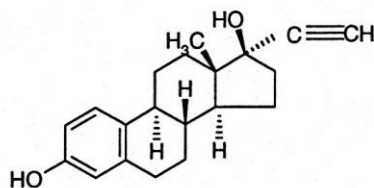
Estrone



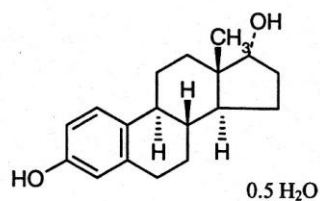
$\Delta^{9(11)}$ -Estrone



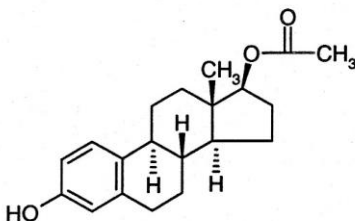
Ethynylestradiol



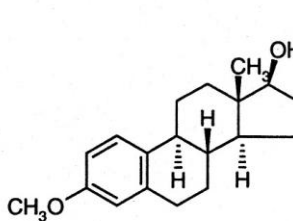
$\alpha$ -Estradiol hemihydrate



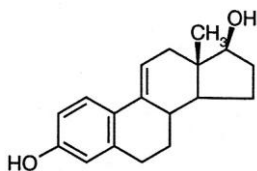
Estradiol 17-acetate



Estradiol 3-methyl ether



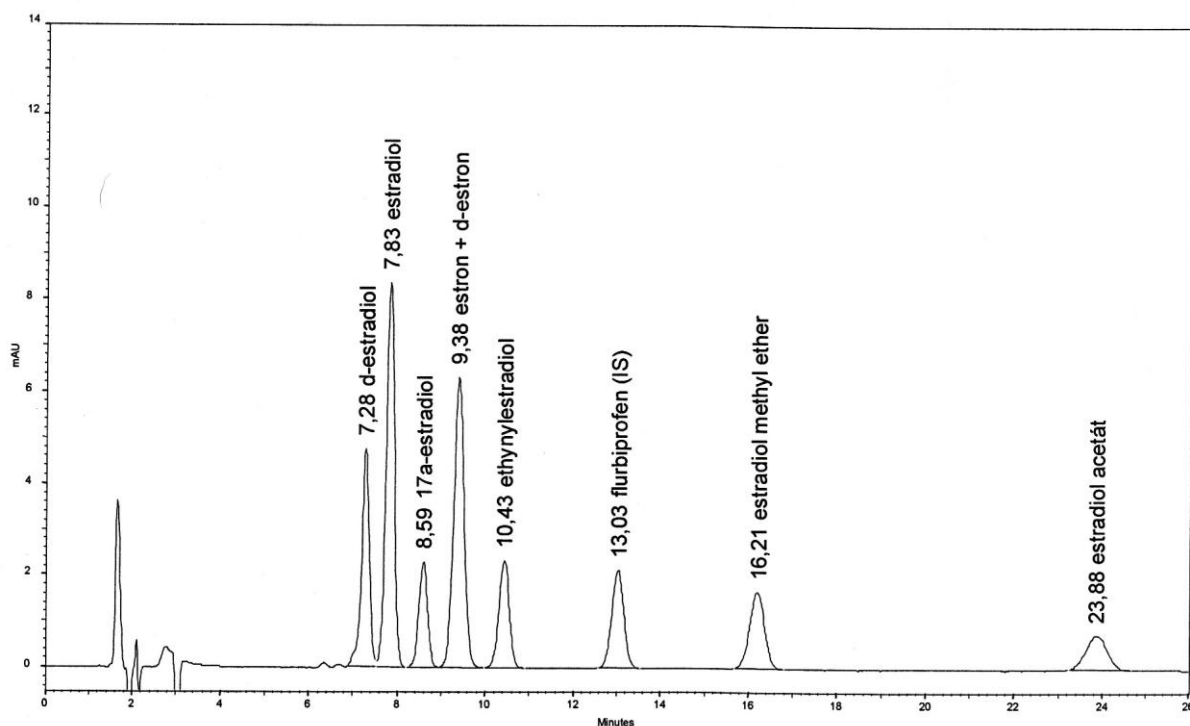
$\Delta^{9(11)}$ -Estradiol



## 6.2. Metody stanovení nečistot v přípravku Estrogel HBF

### 6.2.1. Stanovení nečistot pomocí HPLC <sup>[50]</sup>

Příprava vzorku: Do centrifugační zkumavky objemu 50 ml se odváží množství gelu odpovídající 0,1 mg jednotlivých nečistot (asi 0,5 g), přidá se 20,00 ml roztoku interního standardu flurbiprofenu v acetonitrilu (IS) o koncentraci  $c = 0,5 \text{ mg/100 ml}$  a směs se umístí po dobu 10 minut do ultrazvukové lázně. Po uplynutí této doby se směs centrifuguje 15 min při rychlosti 3000 otáček/min. Supernatant je poté dávkován autosamplerm přímo na kolonu.



**Obrázek č. 9: Chromatogram standardů: estradiol a nečistoty s vnitřním standardem flurbiprofenem <sup>[50]</sup>**

**Tabulka č. 34: Stanovení estradiolu a jeho degradačních produktů metodou kapalinové chromatografie /Farm. fak. HK/**

Stanov. složka	Stac. fáze	Mob. fáze	detekce	průtok	t <sub>R</sub> (min)	citace
$\Delta^{9(11)}$ - Estradiol	Zorbax SB- CN (150 mm ×4,6 mm , 5 $\mu$ m )	acetonitril: fosforečná kyselina 0,085 %: tetrahydrofuran (27: 63: 10 , v/v/v )	UV detekce při 225 nm	1,0 ml. min <sup>-1</sup>	7,28	[50]
Estron	Zorbax SB- CN (150 mm ×4,6 mm , 5 $\mu$ m )	acetonitril, fosforečná kyselina 0,085 %, tetrahydrofuran (27: 63: 10 , v/v/v )	UV detekce při 225 nm	1,0 ml. min <sup>-1</sup>	9,38	[50]
$\Delta^{9(11)}$ - Estron	Zorbax SB- CN (150 mm ×4,6 mm , 5 $\mu$ m )	acetonitril, fosforečná kyselina 0,085 %, tetrahydrofuran (27: 63: 10 , v/v/v )	UV detekce při 225 nm	1,0 ml. min <sup>-1</sup>	9,38	[50]
Ethynylestradiol	Zorbax SB- CN (150 mm ×4,6 mm , 5 $\mu$ m )	acetonitril, fosforečná kyselina 0,085 %, tetrahydrofuran (27: 63: 10 , v/v/v )	UV detekce při 225 nm	1,0 ml. min <sup>-1</sup>	10,43	[50]
$\alpha$ - Estradiol hemihydrát	Zorbax SB- CN (150 mm ×4,6 mm , 5 $\mu$ m )	acetonitril, fosforečná kyselina 0,085 %, tetrahydrofuran (27: 63: 10 , v/v/v )	UV detekce při 225 nm	1,0 ml. min <sup>-1</sup>	8,59	[50]
Estradiol 3- methyl ether	Zorbax SB- CN (150 mm ×4,6 mm , 5 $\mu$ m )	acetonitril, fosforečná kyselina 0,085 %, tetrahydrofuran (27: 63: 10 , v/v/v )	UV detekce při 225 nm	1,0 ml. min <sup>-1</sup>	16,21	[50]

Estradiol 17-acetát	Zorbax SB- CN (150 mm ×4,6 mm , 5µm )	acetonitril, fosforečná kyselina 0,085 %, tetrahydrofuran (27: 63: 10 , v/v/v )	UV detekce při 225 nm	1,0 ml. min <sup>-1</sup>	23,88	[50]
---------------------	---------------------------------------	---	-----------------------	---------------------------	-------	------

**Tabulka č. 35 : Stanovení estramustin fosfátu a jeho čtyř metabolitů v plazmě metodou LC-MS /Pharmacokinetics, Pharmacia Italia, Nerviano, Italy/**

přípravek	Stanovovaná složka	Stacionární fáze	Mobilní fáze	detekce	Citace
plazma	Estron	Zorbax SB C18, (150× 4,6 mm, 5µm) s reverzní fází	amonium acetátový pufr (pH = 6,8), acetonitril	MS, ionizace elektrosprejem	[51]
plazma	Estradiol (účinná složka)	Zorbax SB C18, (150× 4,6 mm, 5µm) s reverzní fází	amonium acetátový pufr (pH = 6,8), acetonitril	MS, ionizace elektrosprejem	[51]

**Tabulka č. 36: HPLC stanovení estradiolu, jeho degradačních produktů a konzervačních látek v přípravku Estrogel HBF. /Farm. fak. HK/**

Stanovovaná složka	Stacionární fáze	Mobilní fáze	detekce	průtok	Citace
Estradiol	Supelco Discovery C18 (250 mm×3,0 mm, 5 µm)	acetonitril+ methanol+voda (23: 24: 53,v/v)	UV při 225 nm	0,9 ml. min <sup>-1</sup>	[52]
Estron	Supelco Discovery C18 (250 mm×3,0 mm, 5 µm)	acetonitril+ methanol+voda (23: 24: 53,v/v)	UV při 225 nm	0,9 ml. min <sup>-1</sup>	[52]

**Tabulka č. 37: Stanovení norethindronu a ethinyl-estradiolu v lidské plazmě metodou HPLC-MS./Development of Bioanalytical Chemistry, Kinsman Blvd. Madison, USA/**

Stanovovaná složka	Stacionární fáze	Mobilní fáze	průtok	Citace
Ethinyl-estradiol	Genesis RP- 18 (50 mm×4,6 mm, 3 μm)	acetonitril, voda, formoová kyselina	1,0 ml. min <sup>-1</sup>	[53]

**Tabulka č. 38: Stanovení steroidních hormonů v antikoncepčních přípravcích metodou HPLC./Departamento de Farmacia, Universidade de Sao Paulo, Brazil/**

Stanovovaná složka	Stacionární fáze	Mobilní fáze	detekce	průtok	Citace
Ethinyl-estradiol	LiChrospher 100 RP- 8 (5 μm, 125×4 mm)	acetonitril: voda (60:40 v/v)	UV při 215 nm	0,8 ml. min <sup>-1</sup>	[54]

**Tabulka č. 39: HPLC stanovení 17β- estradiol-3- acetátu, 17β- estradiolu v intravaginálních přípravcích./School of Pharmacy, The Queen's Univ. of Belfast, UK/**

Stanovovaná složka	Stacionární fáze	Mobilní fáze	detekce	Citace
17β- estradiol-3- acetát	C18 s reverzní fází	acetonitril- voda (50:50, v/v)	UV při 281 nm	[55]
17β- estradiol	C18 s reverzní fází	acetonitril- voda (50:50, v/v)	UV při 281 nm	[55]

### 6.3. Souhrn rešerže

Ke stanovení léčivých přípravků, které obsahují nečistoty  $\Delta^{9(11)}$  - Estradiol , Estron,  $^{9(11)}$  – Estron, Ethynylestradiol,  $\alpha$ - Estradiol hemihydrát, Estradiol 3- methyl ether, estradiol 17- acetát se používá metoda HPLC s UV detekcí vyvinutá na katedře analytické chemie Farmaceutické fakulty v Hradci Králové. Mobilní fázi je směs acetonitril, kyselina fosforečná 0,085 %, tetrahydrofuran v poměru 27: 63: 10. Metoda umožňuje současně stanovit nejen uvedené nečistoty, ale i účinnou látku estradiol které se vyskytují v přípravku Estrogel HBF.

Jinou metodu pro stanovení sledovaných nečistot jsem v dostupné literatuře nenalezla.

## 7 Závěr

Cílem této práce bylo nalézt a porovnat možnosti stanovení nečistot ve třech přípravcích - Ketoprofen gel 2,5 %, používaný u zánětlivých a degenerativních chorob pohybového aparátu, Terbinafin HBF krém, využívaný k léčbě mykotických onemocnění a přípravku Estrogel HBF krém, který se používá v hormonální terapii.

Na základě výsledků podrobné rešerže, kterou jsem provedla jsem zjistila, že u přípravku Ketoprofen gel 2,5 % se dané nečistoty stanovují pouze na pracovišti v Hradci Králové, na Farmaceutické fakultě, kde byla pro analýzu použita separační metoda vysokoúčinné kapalinové chromatografie HPLC, a to s dostatečnou přesností a specifičností pro dané nečistoty. U přípravku Terbinafin HBF krém jsem porovnávala metodu pro stanovení nečistot na pracovišti v Hradci Králové s výsledky získanými na pracovištích ve Švýcarsku, Francii a Austrálii, ale tato zahraniční pracoviště se zaměřují pouze na stanovení účinné látky terbinafinu. U posledního výše jmenovaného přípravku jsou výsledky stanovených nečistot různorodé. Farmaceutická fakulta v Hradci Králové se zabývá všemi sedmi nečistotami, kdežto v ostatních případech jde o stanovení pouze některých nebo jen samotné účinné složky přípravku - estradiolu. U stanovení stejných složek se výsledky liší použitím různé stacionární a mobilní fáze.

Z těchto výsledků lze usuzovat, že Farmaceutická fakulta v Hradci Králové důkladněji zkoumá chemické složení těchto léčiv a brání tak vzniku nežádoucích účinků.



# 8 Literatura

- [1] Karlíček R., a kol.: Analytická chemie pro farmaceuty , Praha, Karolinum 2001
- [2] Popl M., Kubát J., Separace látek, Praha 1986 SNTL- Nakladatelství technické literatury
- [3] <http://www.natur.cuni.cz/pcoufal/hplc.html> – 11/2006
- [4] Drbal K., Křížek M., Analytická chemie, 1999
- [5] [http://bf.jcu.cz/tix/sima/analyticka\\_chemie/separ\\_met\\_I.html](http://bf.jcu.cz/tix/sima/analyticka_chemie/separ_met_I.html) – 12/2006
- [6] ČESKÝ LÉKOPIS 2005 (ČL 2005), Grada Publishing a. s., Praha, 2002
- [7] Dvořák J., Hájková R., Matysová L., Nováková I., Koupparis M. A., Solich P., J. Pharm Biomed Anal. 2004 Nov 15;36(3):625-9.
- [8] Z. Guo, H. Wang, Y. Zhang, J. Pharm Biomed Anal. 2006 Apr 11; 41 (1) : 310- 4. Epub 2005 Dec.
- [9] S. Chabla, S. Ghosh, V. Sihorkar, R. Nellone, TR. Kumar, NR. Srinivas, Biomed Chromatogr. 2006 Apr;20(4):349-57.
- [10] Martinez- Algaba C, Escuder- Gilabert L., Sagrado S., Villanueva- Camanas RM., Medina- Hernanndez MJ., J. Pharm Biomed Anal. 2004 Oct 29; 36(2): 393- 9.
- [11] El- Sahary YS., Metwally FH., Refaat M., El- Khateeb SZ., J AOAC Int. 2007 Jan-Feb;90(1):102-12.
- [12] Kocyigit- Kaymakcoglu B., Unsalan S., Rollas S., Pharmazie. 2006 Jul ; 61(7) : 586- 9.
- [13] Verenitch SS., Lowe CJ., Mazumder A., J. Chromatofor A. 2006 May 26; 1116(1- 2): 193-203.Epub 2006 Mar 20.
- [14] Pomykalski A., Hopkala H., Acta Pl Pharm. 2005 May- Jun; 62(3) : 171- 6.
- [15] Kosjek T., Heath E., Krbavcic A., Environ Int. 2005 Jul; 31(5) : 679- 85.
- [16] Ozlu C., Basan H., Satana E., Ertas N., Goger NG., J. Pharm Biomed Anal. 2005 Sep 15; 39(3- 4) : 606- 11.
- [17] Lin WC., Chen HC., Ding WH., J. Chromatogr A. 2005 Feb 18; 1065(2) : 279- 85.
- [18] Chen YL., Wu SM., Anal Bioanal Chem. 2005 Feb; 381 (4) : 907- 12. Epub 2005 Jan 18.
- [19] Thomas PM., Foster GD., J Environ Sci Health A tox Hazard Zábst Environ Eng. 2004; 39(8) : 1969- 78.
- [20] Shen HY., Jiang HL., Mao HL., Pan G., Zhou L., Cao YF., J Sep Sci. 2007 Jan ; 30(1) : 48- 54.
- [21] El- Gindy A., Emíra S., Shaaban H., J Pharm Biomed Anal. 2007 Feb 19; 43(3) : 973- 82. Epub 2006 Oct 13.

- [22] Havliková L., Matysová L., Nováková L., Solich P., J Pharm Biomed Anal. 2006 May 3; 41(2) : 671- 5. Epub 2006 Feb 13.
- [23] El- Gindy A., Emíra S., Mostary A., Pharm Biomed Anal. 2006 May 3; 41(2) : 421- 30. Epub 2006 Jan 18.
- [24] El- Gindy A., Emíra S., Mesbah MK., Hadad GM., J AOAC Int. 2005 Jul- Aug; 88(4) : 1069- 80.
- [25] El- Gindy A., Farmaco. 2005 Aug; 60(8) : 689- 99.
- [26] Kokoletsi MX., Kafkala S., Tsiaganic M., Pharm Biomed Anal. 2005 Jul 15; 38(4) : 763- 7. Epub 2005 Mar 23.
- [27] Saad B., Bari MF., Saleh MI., Ahmad K., Talib MK., J Chromatogr A. 2005 May 6; 1073(1- 2) : 393- 7.
- [28] Nováková L., Solichová D., Solich P., Sep Sci. 2006 Nov; 29(16) : 2433- 43.
- [29] Lee MR., Lin CY., Li ZG., Tsai TF., J Chromatogr A. 2006 Jul 7; 1120(1- 2) : 244- 51 Epub 2006 Feb 28.
- [30] Šatínský D., Huclová J., Ferreira RL., Montenegro MC., Solich P., J Pharm Biomed Anal. 2006 Feb 13; 40(2) : 287-93 . Epub 2005 Sep 13.
- [31] Lokhnauth JK., Snow NH., Anal Chem. 2005 Sep 15; 77(18) : 5938- 46.
- [32] Hamoudová R., Pospíšilová M., Kavalírová A., Solich P., Šicha J., J Pharm Biomed Anal. 2006 Jan 23; 40(1) : 215- 9 . Epub 2005 Aug 10.
- [33] Ali MS., Gori M., Khatri AR., J Pharm Biomed Anal. 2006 May 3; 41(2) : 358- 65. Epub 2006 Feb 7.
- [34] Michal A., Sober D., J Pharm Biomed Anal. 2005 Sep 15; 39( 3- 4) : 819- 23.
- [35] Perz- Lozano p., Garcia- Montova E., Orriols A., Minarro m., Tico JR., Sune- Negre JM., Pharm Biomed Anal. 2005 Oct 4; 39(5) : 920- 7. Epub 2005 Jul 20.
- [36] Shabir GA., J Pharm Biomed Anal. 2004 Jan 27; 34(1) : 207- 13.
- [37] Hájková R., Solich P., Dvořák J., Šicha J., Pharm Biomed Anal. 2003 Aug 8;32(4- 5):921-7.
- [38] Shen HY., Juany HL., Mao HL., Pan G., Zhou L., Cao YF., Sep Sci .2007 Jan; 30(1) : 48- 54.
- [39] Šatínský D., Chocholouš P., Salačová M., Solich P., J Sep Sci. 2006 Nov; 29(16) : 2494- 9.
- [40] Sirichai S., Hasajitto C., Anal Sci. 2004 Dec; 20(12) : 1741- 4.
- [41] Nováková L., Matysová L., Havliková L., Solich P., J Pharm Biomed Anal. 2005 Apr 29;37(5):899-905.

- [42] Nováková L., Matysová L., Solichová D., Koupparis MA., Solich P., J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci. 2004 Dec 25;813(1-2):191-7.
- [43] Matysová L., Solich P., Marek P., Havlíková L., Nováková L., Šícha J., Talanta 68 (2006) 713- 720.
- [44] Yeganeh MH., McLachlan AJ., Biomed Chromatogr. 2000 Jun;14(4):261-8.
- [45] Zehender H., Denouel J., Roy M., Le Saux L., Schaub P., J Chromatogr B Biomed Appl. 1995 Feb 17;664(2):347-55.
- [46] Denouel J., Keller HP., Schaub P., Delaborde C., Hubert H., J Chromatogr B Biomed Appl. 1995 Jan 20;663(2):353-9.
- [47] de Oliveira CH., Barrientos- Astigarraga RE., de Mores MO., Bezerra FA., de Moraes ME., de Nucci G., Ther Drug Monit. 2001 Dec;23(6):709-16.
- [48] Kuzner J., Kozuh Erzen N., Drobnic- Kosorok M., Biomed Chromatogr. 2001 Dec;15(8):497-502.
- [49] Schatz F., Haberl H., Arzneimittelforschung. 1989 Apr;39(4):527-32.
- [50] Havlíková L., Nováková L., Matysová L., Šícha J., Solich P., J Chromatogr A. 2006 Jun 30; 1119(1- 2) : 216- 23. Epub 2006 Feb 8.
- [51] Breda M., Basileo G., James CA., Biomed Chromatogr. 2004 Jun; 18(5) : 293- 301.
- [52] Nováková L., Solich P., Matysová L., Šícha J., Anal Bional Chem. 2004 Jul; 379(5- 6): 781- 7. Epub 2004 Mar 3.
- [53] Li W., Li YH., Li AC., Zhou S., Naidong W., J Chromatogr B Analys Technik Biomed Life Sci. 2005 Oct 25; 825(2) : 223-32.
- [54] Ines M., Santoro RM., Kassab NN., Hasegawa M., Kedor- Hackmann ER., Drug Dev Ind Pharm. 2002 Jul; 28(6) : 741- 7.
- [55] Russell JA., Malcolm RK., Campbell K., Woolfson AD., J Chromatogr B Biomed Sci Appl. 2000 Jul 7; 744(1) : 157- 63.
- [56] Kol. autorů Remedia kompendium 2. vydání Panax, Praha 1997, 439- 452
- [57] Hrdina R. a kol. : Farmakologický slovník, Maxdorf, Praha 1997, 144
- [58] [tomcat.bf.jcu.cz/.../separa.htm](http://tomcat.bf.jcu.cz/.../separa.htm) - 4/2007
- [59] [www.hamiltoncompany.com/HPLC/revPhase.asp](http://www.hamiltoncompany.com/HPLC/revPhase.asp) - 4/2007
- [60] [www.chromtech.net.au/glass\\_columns.cfm](http://www.chromtech.net.au/glass_columns.cfm) - 4/2007
- [61] [www.innovations-report.de/.../bericht-7822.html](http://www.innovations-report.de/.../bericht-7822.html) - 4/2007
- [62] [www.markpharmaceutics.ro/index\\_pop.php?nState](http://www.markpharmaceutics.ro/index_pop.php?nState) – 5/2007
- [63] [www.nobelpharma.bg/tr/display.php?article=30](http://www.nobelpharma.bg/tr/display.php?article=30)– 5/2007.
- [64] [www.amazon.com/.../detail/-/B00014TH9K?v=glance](http://www.amazon.com/.../detail/-/B00014TH9K?v=glance) – 5/2007

