

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE  
FARMACEUTICKÁ FAKULTA  
V HRADCI KRÁLOVÉ

KATEDRA ANALYTICKÉ CHEMIE

# DIPLOMOVÁ PRÁCE

SEPARACE A STANOVENÍ BETAMETHASONU A  
CHLORAMFENIKOLU VE SLOŽENÝCH  
FARMACEUTICKÝCH PŘÍPRAVCÍCH POMOCÍ  
MONOLITNÍCH SORBENTŮ ZAPOJENÝCH V  
SYSTEMU SEKVENČNÍ INJEKČNÍ ANALÝZY

VEDOUCÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE : Mgr. Dalibor Šatínský, PhD.

Hradec Králové 2007

Markéta Salabová

Velice děkuji Mgr. Daliborovi Šatínskému, PhD. za zadání a odborné vedení diplomové práce, za ochotu, pomoc a konzultace po celou dobu jejího zpracování. Děkuji také grantové agentuře Univerzity Karlovy (projekt GA UK 315/2005/B-CH/FaF) za finanční podporu při vypracování této diplomové práce, která byla součástí řešeného projektu.

# OBSAH

<b>1. ÚVOD A CÍL PRÁCE</b>	6
1.1. ÚVOD PRÁCE	7
1.2. CÍL PRÁCE	8
<b>2. TEORETICKÁ ČÁST</b>	9
2.1. STANOVOVANÉ LÁTKY	10
2.2. METODY STANOVENÍ	14
2.3. MONOLITICKÉ KOLONY CHROMOLITH (™)	15
2.4. SEKVENČNÍ INJEKČNÍ ANALÝZA (SIA)	18
2.5. SEKVENČNÍ INJEKČNÍ CHROMATOGRFIE (SIC)	20
<b>3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST</b>	21
3.1. POUŽITÉ PŘÍSTROJE, CHEMIKÁLIE A PŘÍPRAVA VZORKŮ	22
3.2. VÝVOJ A OPTIMALIZACE SEPARAČNÍHO PROCESU I (HPLC)	25
3.2.1. Výběr mobilní fáze	25
3.2.2. Výběr vnitřního standardu	32
3.2.3. Výběr vlnové délky detekce	35
3.3. VÝVOJ A OPTIMALIZACE SEPARAČNÍHO PROCESU II (SIA)	36
3.4. VYTVOŘENÍ A OPTIMALIZACE PROGRAMU ANALÝZY NA SIA	38
3.5. TEST VHODNOSTI CHROMATOGRFICKÉHO SYSTÉMU	39
3.5.1. Retenční čas a retenční objem	39
3.5.2. Rozlišení píkŮ	39
3.5.3. Faktor symetrie píku	39
3.5.4. Dělicí účinnost monolitické kolony a zdánlivý počet teoretických pater	39
3.6. VALIDACE OPTIMALIZOVANÉ METODY	41
3.6.1. Stanovení limitu detekce a limitu kvantifikace	41
3.6.2. Stanovení linearoty odezvy	42
3.6.3. Opakovatelnost měření	46
3.6.4. Selektivita	51

3.6.5. Přesnost	52
3.6.6. Výtěžnost	53
<b>4. VLASTNÍ STANOVENÍ VE FARMACEUTICKÉM PŘÍPRAVKU</b>	<b>54</b>
4.1. STANOVENÍ VE FARMACEUTICKÉM PŘÍPRAVKU – OČNÍ KAPKY BETABIOPTAL®	55
4.2. STANOVENÍ BETABIOPTAL® METODOU SIC	56
4.3. STANOVENÍ BETABIOPTAL® METODOU HPLC	59
<b>5. ZÁVĚR</b>	<b>61</b>
<b>6. SEZNAM LITERATURY</b>	<b>64</b>

## SEZNAM ZKRATEK

BE – betamethason

CL – chloramfenikol

MP – methylparaben

EP – ethylparaben

PP – propylparaben

FIA - Průtoková injekční analýza (Flow Injection Analysis)

SIA – Sekvenční injekční analýza (Sequential Injection Analysis)

SIC - Sekvenční injekční chromatografie (Sequential Injection Chromatography)

HPLC – Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (High Performance Liquid Chromatography)

GC – Plynová chromatografie (Gas Chromatography)

CE – Kapilární elektroforéza (Capillary Electrophoresis)

RSD – Relativní směrodatná odchylka

ATB – Antibiotika

A – Absorbance

c – Koncentrace

# **1. ÚVOD A CÍL PRÁCE**

## 1.1. ÚVOD PRÁCE

Metoda sekvenční injekční analýzy (SIA) představuje počítačem řízené automatizované zpracování vzorku, které nahradilo manuální úkony tradičních analytických postupů rychlým, přesným, jednoduchým a efektivním způsobem. Tím byl zdroj chyb minimalizován. Pracuje se zde se zmenšeným objemem vzorků a mobilní fáze, což pomohlo v neposlední řadě i k redukci odpadu. Protože tato moderní technologie dovoluje systém kombinovat i s dalšími postupy používanými v analytické chemii, je možno v této práci nahlédnout na smělou konkurenci, nyní nejvíce používané klasické separační metody HPLC, kterou je spojení průtokové metody SIA s monolitickou vysoce porézní chromatografickou kolonou. Ta v posledních letech pro svoje vynikající separační vlastnosti částečně nahrazuje běžně používané HPLC kolony částicového charakteru, jež jsou limitovány svým vysokým odporem proti průtoku mobilní fáze. Monolitické kolony poskytují excelentní separace ve zlomku času, nutného k separaci na klasické částicové koloně. Protože pořizovací cena nové metody tzv. Sekvenční injekční chromatografie (SIC) i náklady spojené s analýzou jsou podstatně nižší, při srovnatelných výsledcích obou metod, než náklady HPLC, je otázkou času, kdy SIC vejde do povědomí analytiků jako nová separační metoda a rozšíří se do analytických laboratoří.

## 1.2. CÍL PRÁCE

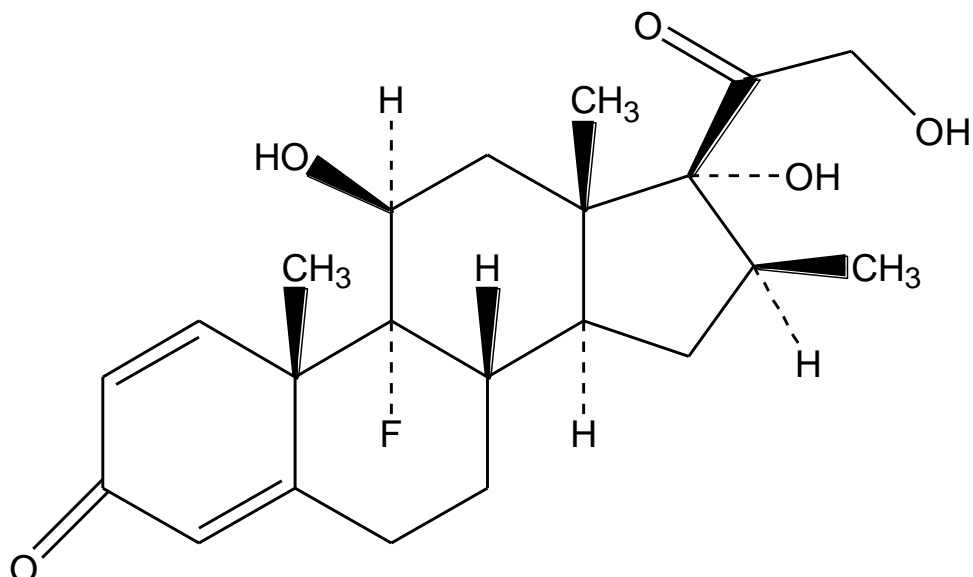
Cílem této diplomové práce bylo optimalizovat podmínky pro separaci a stanovení účinných látek (betamethason a chloramfenikol) ve farmaceutickém přípravku (oční kapky BETABIOPTAL<sup>®</sup>) nedávno vyvinutou nízkotlakou metodou sekvenční injekční analýzy se zapojenou monolitickou kolonou a porovnat výsledky s analýzou provedenou pomocí HPLC.



## **2. TEORETICKÁ ČÁST**

## 2.1. STANOVOVANÉ LÁTKY

**BETAMETHASONUM** (9-fluor-11 $\beta$ ,17,21-trihydroxy-16 $\beta$ -methylpregna-1,4-dien-3,20-dion)



Obrázek 1 – Vzorec betamethasonu

Sumární vzorec:  $C_{22}H_{29}FO_5$

Molekulová hmotnost:  $M_r = 392,47$

Fyzikálně - chemické vlastnosti: Bílý krystalický prášek. Prakticky nerozpustný ve vodě, mírně rozpustný v ethanolu. <sup>1</sup>

Charakteristika: Betamethason je fluorovaný glukokortikoid prakticky bez mineralokortikoidního efektu. Při lokálním použití působí antiflogisticky, antipruriginózně, antialergicky, vazokonstrikčně a potlačuje tvorbu autoprotiláték. <sup>7</sup>

Farmakokinetika: Korové steroidy jsou malé lipofilní molekuly pronikající přes membrány cílových buněk jednoduchou difúzí. Snadno se vstřebávají z trávicího traktu i z jiných míst aplikace. <sup>4</sup>

Mechanismem účinku je tvorba komplexů se specifickými receptory v cytoplasmě, proniknutí do buněčného jádra, navázání se na DNK (chromatin), stimulace transkripce mRNA a tím syntéza různých enzymů odpovědných za protizánětlivé působení místně aplikovaných glukokortikoidů, které se projevuje inhibicí různých projevů zánětu, jako jsou edémy, odbourávání fibrinu, dilatace kapilár, shromažďování fagocytů v poškozené tkáni a jejich aktivaci. Glukokortikoidy inhibují i pozdější projevy zánětu, jako jsou zmnožení kapilár, depozice kolagenu a vytváření keloidů.

Asi 64 % betamethasonu se váže na plazmatické bílkoviny. Betamethason je metabolizován primárně v játrech a metabolity jsou z větší části vylučovány ledvinami a z menší části žlučí. <sup>7</sup>

Indikace: Je podáván při autoimunitních poruchách, v revmatologii, u dermatóz, u konjunktivitid.

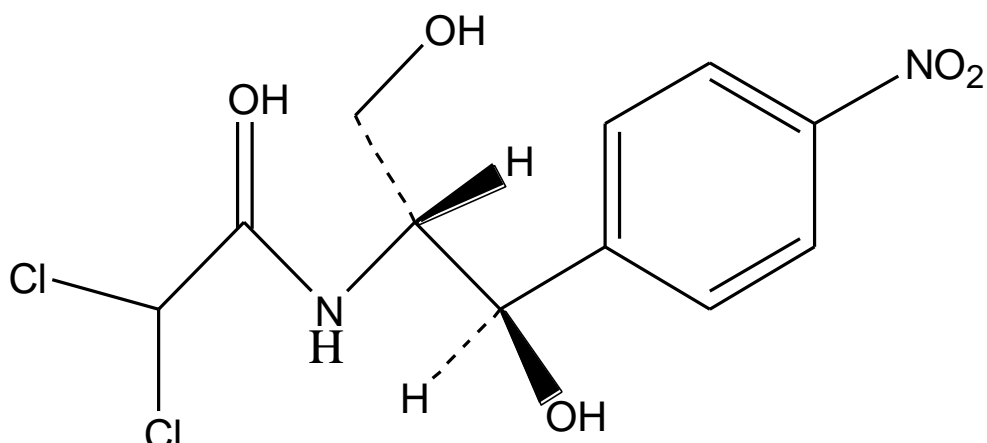
Aplikační způsoby: Perorální i parenterální.

Kontraindikace: Nesmí být použit při nitrooční hypertenzi, virové infekci rohovky, vředové chorobě, artritidě, Cushingově syndromu. O používání přípravků těhotnými a kojícími ženami rozhoduje lékař. <sup>2</sup>

Nežádoucí účinky: Mohou se objevit celkové nežádoucí účinky, jako jsou hyperglykemie, glykosurie a suprese osy hypotalamus – hypofýza – nadledviny, která je reverzibilní a odezní po vysazení léčby přípravkem. Dále se může vyskytnout Cushingův syndrom (kulatý obličej, neobvyklá únava a malátnost, mentální deprese, nepravidelnosti v menstruačním cyklu, pokles libida), retardace růstu, edémy, hypertenze, hypokalemie, deplece bílkovin. <sup>7</sup>

**CHLORAMPHENICOLUM** (2,2-dichlor-N/(1R,2R) -2-hydroxy-1-(hydroxymethyl) -2- (4-nitrofenyl)ethyl)acetamid

Produkovány určitými kmeny mikroorganismu *Streptomyces Venezuela*, vyrábí se převážně synteticky.



Obrázek 2 – Vzorec chloramfenikolu

Sumární vzorec:  $C_{11}H_{12}Cl_2N_2O_5$

Molekulová hmotnost:  $M_r = 323,13$

Fyzikálně-chemické vlastnosti: Bílý, našedle nebo nažloutle bílý jemný krystalický prášek nebo jemné krystalky. Je těžce rozpustný ve vodě a v etheru, snadno rozpustný v lihu 96% a v propylenglykolu. <sup>1</sup>

Charakteristika: Širokospektré antibiotikum, tlumící syntézu bakteriálních proteinů, jehož použití je vyhrazeno pouze pro infekce vyvolané citlivými mikroby. G+ (stafylokoky, streptokoky, pneumokoky, enterokoky), G- (meningokoky, gonokoky, hemofily) a některými anaerobními mikroorganismy, které nelze léčit jinými antibiotiky. <sup>2</sup>

Farmakokinetika: Distribuce je dobrá, proniká i do CNS. Metabolizován je v játrech, vylučován ledvinami. Biologický poločas činí asi 4 hod. <sup>3</sup>

Indikace: Je podáván při břišním tyfu a paratyfu, salmonelóze se septickým průběhem, meningitidě, epiglotitidě, při pertussi a parapertussi, závažné infekci s výskytem aerobní a anaerobní flóry (plicní, abdominální,

gynekologické ap.) a u ostatních infekcí, jejichž původce je citlivý pouze na chloramfenikol. <sup>7</sup>

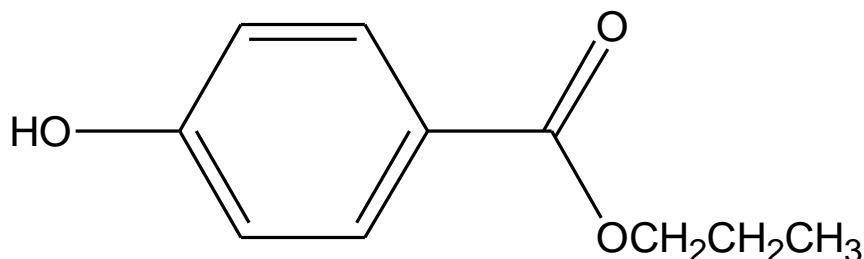
Aplikační způsoby: Perorální i parenterální.

Mechanismus účinku: Inhibuje syntézu proteinů vazbou na 50S ribosomální podjednotku. <sup>4</sup>

Kontraindikace: Nesmí být podán při jaterní nedostatečnosti, při útlumu krvetvorby, po předchozí léčbě ozařováním či cytostatiky. Relativní kontraindikace: současné podávání léků, které mohou poškozovat kostní dřeň (aminofenazon, thiouracil), dále současné podávání tolbutamidu, phenytoinu bez úpravy jejich dávkování. <sup>7</sup>

Nežádoucí účinky: Plastická anemie, útlum kostní dřeně, útlum střevní flóry produkující vitamín K. <sup>2</sup>

### **PROPYLPARABEN** (Propyl-4-hydroxybenzoat)



Obrázek 3 – Vzorec propylparabenu

Sumární vzorec:  $C_{10}H_{12}O_3$

Molekulová hmotnost:  $M_r = 180,20$

Charakteristika: Bílý krystalický prášek. Je velmi těžce rozpustný ve vodě, snadno rozpustný v lihu 96% a v metanolu. Teplota tání je 96 - 99°C. Protože mají antibakteriální a antifungální účinky, přidávají se jako konzervans do potravin, nápojů, kosmetiky a farmaceutických produktů. <sup>1</sup>

## **2.2.METODY STANOVENÍ**

### **BETAMETHASON**

⇒ Lékopisné stanovení obsahu dle ČL 2002

0,100 g se rozpustí v lihu 96% R a zředí se jím na 100,0 ml. 2,0 ml tohoto roztoku se zředí lihem 96% R na 100,0 ml. Měří se absorbance (2.2.25) v maximu při 238,5 nm.

Vypočítá se obsah  $C_{22}H_{29}FO_5$  za použití specifické absorbance, která má hodnotu 395. <sup>1</sup>

⇒ Betamethason může být stanovován pomocí HPLC <sup>19</sup>, TLC. <sup>20</sup>

### **CHLORAMFENIKOLUM**

⇒ Lékopisné stanovení obsahu dle ČL 2002

0,100 g se rozpustí ve vodě R a zředí se jí na 500,0 ml. 10,0 ml tohoto roztoku se zředí vodou R na 100,0 ml. Měří se absorbance (2.2.25) v maximu při 278 nm.

Vypočítá se obsah  $C_{11}H_{12}Cl_2N_2O_5$  za použití specifické absorbance, která má hodnotu 297. <sup>1</sup>

⇒ Chloramfenikol může být stanovován potenciometrickou titrací s použitím iontově selektivní elektrody <sup>12</sup>, kapilární elektroforézou <sup>11</sup>, plynovou chromatografií <sup>21</sup>, chemiluminiscencí <sup>22</sup>, imunologickou metodou jako je test ELISA <sup>23</sup> nebo průtokovou metodou FIA. <sup>24</sup>

### **PROPYLPARABEN**

⇒ Lékopisné stanovení obsahu dle ČL 2002

K 1,000 g se přidá 20,0 ml hydroxidu sodného 1 mol/l VS, zahřívá se 1 h při asi 70°C a pak se rychle ochladí v ledové lázni. Stejným způsobem se připraví kontrolní roztok. Nadbytek hydroxidu sodného se titruje při pokojové teplotě kyselinou sírovou 0,5 mol/l VS do druhého inflexního bodu za potenciometrické indikace bodu ekvivalence (2.2.20).

1 ml hydroxidu sodného 1 mol/l VS odpovídá 180,2 mg  $C_{10}H_{12}O_3$ . <sup>1</sup>

### **2.3. MONOLITICKÉ KOLONY CHROMOLITH (TM)**

Dříve používané HPLC kolony jsou pro svoje limitující prvky (částicovou strukturu, jež mohla způsobit pohyb stacionární fáze a snížit spolehlivost separace a vysoký zpětný tlak, jež limitoval průtok mobilní fáze nebo délku analytické kolony, která mohla být použita) částečně nahrazovány monolitickými kolonami vyvinutými na základě nové sol-gel technologie. Unikátní dvojí porézní struktura = kombinace makropórů a mezopórů umožňuje rychlý postup mobilní fáze a současně poskytuje dostatečně velký povrch pro adsorpci.

MAKROPÓRY : Průměrná velikost makropórů je 2  $\mu\text{m}$ . Jejich hustá síť je dobře prostupná pro mobilní fázi. Tím se zvýší průtok a urychlí separace.



Obrázek 4 – Silikagel - Makropóry

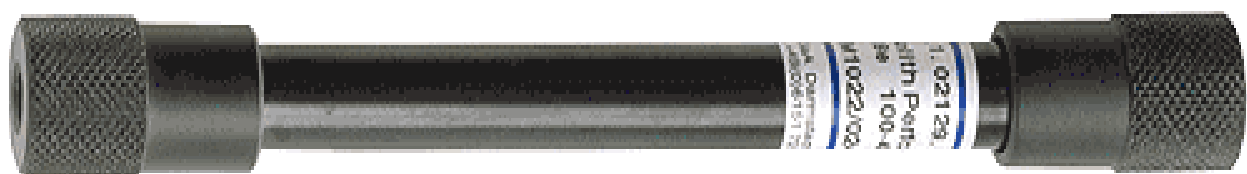
MEZOPÓRY : Jemná porézní struktura, kde na ploše 13 nm dochází k adsorpci molekul analyzované látky.



Obrázek 5 – Silikagel - Mezopóry

Kolony Chromolith<sup>™</sup> umožňují průtok od 1 ml/min do 9 ml/min při zachování separační účinnosti v co nejkratším čase a s velmi nízkým zpětným tlakem. Mohou být zapojovány do série, přičemž zpětný tlak zůstává hluboko pod limitním tlakem částicových kolon. Jsou vhodné pro vysoce účinnou separaci kyselých, basických, nepolárních a chelatujících látek. Jejich univerzálnost, spolehlivost a kvalita je činí ideálními kolonami první volby pro rutinní práci v laboratoři.<sup>5</sup> V tomto místě je však nutné upozornit, že přes veškeré výhody monolitických kolon nedochází v analytické praxi v žádném případě k selekci klasických částicových kolon, ba právě naopak pro velké množství aplikací jsou stále ještě vhodnější klasické částicové kolony. Tento jev je zčásti způsoben také tím že monolitní kolony jsou zatím dostupné jen s klasickou náplní reverzní fáze C - 8 a C - 18, která nebývá pro některé aplikace nejvhodnější.





Obrázek 6 - Monolitní kolona Chromolith<sup>™</sup> Flash (100 mm délka)



Obrázek 7 - Monolitní kolona Chromolith<sup>™</sup> Flash (100 mm délka) + Předkolony



Obrázek 8 - Dvě monolitní kolony spojené spojkou sériově v dvojkolonu



Obrázek 9 – Spojka sériově zapojovaných kolon

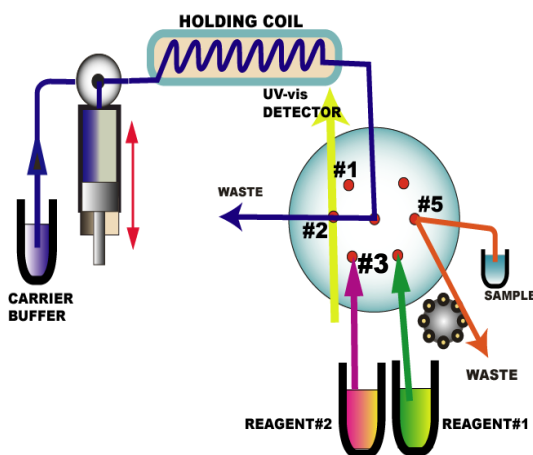
## **2.4. SEKVENČNÍ INJEKČNÍ ANALÝZA**

SIA, která patří do skupiny průtokových analytických metod byla poprvé popsána roku 1990 J.Řůžičkou a Marshalem na Universitě ve Washingtonu. Vznikla při vývoji a zdokonalování průtokové injekční analýzy FIA.

SIA používá přímý a zpětný tok nosiče. Podstatou této metody je počítačem kontrolovaný vícecestný ventil, který je propojen přes mísící cívku se speciální pístovou pumpou.<sup>9</sup> Ventil musí umožňovat libovolné kombinace nasávání roztoků z jednotlivých pozic. V programovacím jazyku FIALab, popř. LabVIEW existuje řídicí a vyhodnocovací program, díky němuž lze provést automaticky dávkování analyzovaného vzorku. Pístová pumpa, která umožňuje pracovat s malými objemy kapalin, je užívána k aspiraci vzorku a činidla do mísící cívky. Poté opačný pohyb pístu pumpy promísí vzorek a činidlo (dojde k chemické reakci) a vzniklý reakční produkt je nasměrován selekčním ventilem a transportován zpětným proudem do průtokového detektoru /v praxi se nejčastěji používají spektrometrické (UV/VIS spektrofotometrické, fluorescenční, chemiluminiscenční) nebo elektrochemické (amperometrické, vodivostní,

ISE) detektory/, kde dojde k vyhodnocení signálu a uchování výsledků analýzy v paměti počítače pro další zpracování. <sup>8</sup>

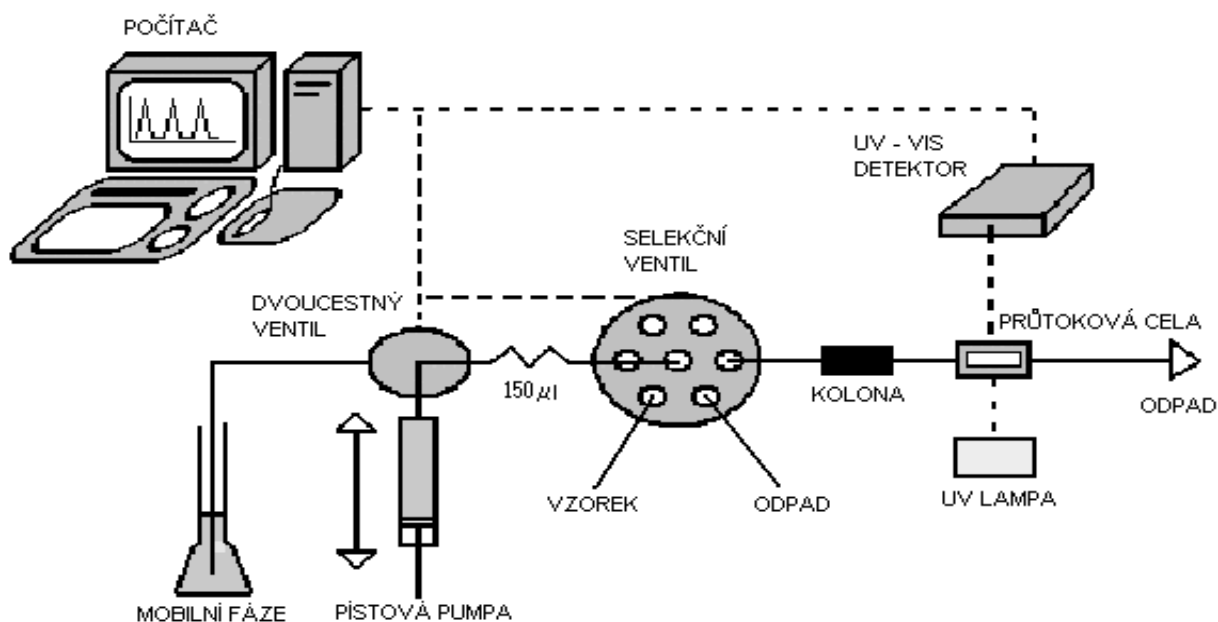
Zaznamenává se výsledný analytický signál ve formě píku. Výhoda této metody spočívá v podstatné redukci spotřeby vzorku, činidel, mobilní fáze a tudíž i odpadu. Díky své automatizaci umožňuje analyzovat velké série vzorků a tím zvýšit produktivitu v laboratořích. Podmínkou realizace analýzy je převedení všech látek do kapalného stavu. <sup>6</sup>



Obrázek 10 – Schéma SIA

## **2.5. SEKVENČNÍ INJEKČNÍ CHROMATOGRRAFIE (SIC)**

U většiny současných analytických metod je nutný, před vlastním stanovením, krok oddělení jednotlivých součástí vzorku. Doposud byla k tomuto účelu kromě metod GC a CE nejčastěji používána metoda HPLC, která je uváděna jako základní separační metoda. Katedra analytické chemie přišla s inovací, a to s propojením separační části (chromatografická monolitická kolona) a analytické části (SIA systém) v jednom přístroji, nyní nazývanou sekvenční injekční chromatografie. Jedná se o začlenění chromatografické monolitické kolony do konvenčního SIA systému mezi vícecestný ventil a průtokovou Z celu.<sup>9</sup> Tato technika je ve světě originální a byla vytvořena kolektivem pracoviště katedry analytické chemie Farmaceutické fakulty v Hradci Králové. Důležitým pozitivem je též programovatelný průtok. Vícecestný ventil umožňuje kombinovat různé mobilní fáze a díky pístové pumpě, naprogramované počítačem, lze měnit průtokovou rychlost a směr.<sup>13</sup> Technika SIC byla již úspěšně použita k analýze několika farmaceutických přípravků.<sup>9,10,13,14,15,16,17,18.</sup>



Obrázek 11 – Schéma SIC

### **3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST**

### **3.1. POUŽITÉ PŘÍSTROJE, CHEMIKÁLIE A PŘÍPRAVA ROZTOKŮ**

#### **Použité přístroje**

1. FIALab<sup>®</sup> 3000 automatický SIA systém (FIALab<sup>®</sup> Instruments, USA),  
Software FIALab for Windows 5.0<sup>®</sup>
  - Pístové čerpadlo s objemem 5 ml
  - Šesticestný selekční ventil (Valco Instruments Co.,USA)
  - Monolitická kolona Chromolith<sup>(TM)</sup> Flash RP - 18e, 25 x 4,6 mm (Merck, Německo) s monolitickou předkolonou 5 – 4,6 mm (Merck, Německo)
  - UV - VIS diode array detektor S2000 (Ocean Optics, Inc.,USA)
  - UV – VIS lampa Analytical Instrument System D1000 CE (Ocean Optics, Inc.,USA)
  - Solarizaci rezistentní optická vlákna (Avantes Inc., USA)
  - Průtoková teflonová Z cela – 1 cm (Avantes Inc., USA)
  - Spojovací materiál - teflonové hadičky s vnitřním průměrem 0,75 mm
  - Program Fialab for Windows 5.0
2. HPLC systém
  - Pumpa LCP 4100 (Ecom, Praha)
  - Autosampler Waters 717 plus
  - Kolona Agilent Zorbax SB - CN 4.6 x 150 mm, velikost částic 5 μm
  - Detektor UV Waters 486 (Waters, Milford, MA)
  - Software CSW v.1.7 for Windows (Data Apex s.r.o., Praha)
3. Jednopaprskový spektrofotometr Hewlett Packard
4. Analytické váhy A&D HR120
5. Ultrazvuková lázeň Tenson 1
6. Digitální pH - metr HANNA pH 212

## **Použité chemikálie**

- methanol Chromasolv, for LC (čistota pro gradientovou eluci)  
(Sigma-Aldrich, Praha)
- acetonitril Chromasolv, for LC (čistota pro gradientovou eluci)  
(Sigma-Aldrich, Praha)
- kyselina fosforečná 85 % (Merck, Praha)
- triethylamin 99,5 % (Fluka)
- betamethason (BE) 98,0 % (Sigma-Aldrich)
- chloramfenikol (CL) 98,0 % (Sigma-Aldrich)
- deionizovaná voda čištěná Milli - Q systém  
(Millipore Corp., Bedford, MA)
- Látky testované jako vnitřní standardy:  
propylparaben (PP) 99,0 % (Galena a.s., Opava), methylparaben,  
ethylparaben, kortizon acetát, hydrokortizon, mefenamová kyselina,  
4 - chlorbenzoová kyselina, triamcinolon acetonid, trimekain chlorid,  
bopindolol hydrogenmalonát, pindolol, propyfenazon, acebutolol

## **Příprava roztoků**

### **Příprava vzorku**

Farmaceutický přípravek - oční kapky BETABIOPTAL<sup>®</sup> obsahuje 200 mg betamethasonu a 500 mg chloramfenikolu ve 100 ml. Nejprve bylo převedeno 500  $\mu\text{l}$  vzorku spolu s 5 ml tetrahydrofuranu, s 5 ml methanolu, s 250  $\mu\text{l}$  koncentrované kyseliny fosforečné a s 5 ml roztoku vnitřního standardu PP ( $c = 400 \mu\text{g ml}^{-1}$ ) v methanolu do kalibrované 25 ml baňky. Směs byla homogenizována a rozpuštěna 15 min ultrazvukovou vibrací, po rysku doplněna mobilní fází a znovu promíchána. Porovnávací roztok standardů byl připraven stejným postupem, jen místo počátečních 500  $\mu\text{l}$  (vzorku) bylo použito již připravených zásobních roztoků standardů BE ( $c = 200 \mu\text{g ml}^{-1}$ ), CL ( $c = 500 \mu\text{g ml}^{-1}$ ) v methanolu a to v objemu 5 ml. Konečná koncentrace analyzovaného vzorku a porovnávacích roztoků standardů byla u BE ( $c = 40 \mu\text{g ml}^{-1}$ ), u CL ( $c = 100 \mu\text{g ml}^{-1}$ ) a u PP ( $c = 80 \mu\text{g ml}^{-1}$ ). SIC systémem byl vždy měřen objem 15  $\mu\text{l}$  vzorku i porovnávacích standardů a byly porovnány výšky jejich píků.

### **Příprava roztoku vnitřního standardu pro analýzu kapek**

Vnitřní standard PP byl připraven rozpuštěním navážky 40 mg látky do 100 ml methanolu. Takto připravený roztok o koncentraci 40 mg/l byl přidán do extrakční směsi kapek.

### **Příprava zásobního roztoku standardů BE+CL a vnitřního standardu propylparabenu**

Zásobní roztoky standardů BE, CL a PP byly připraveny o koncentraci 500 mg/l převedením přesné navážky 25 mg látky do 50 ml odměrné baňky a doplněním po rysku methanolem. Roztoky byly skladovány v temnu a při teplotě 5°C po dobu 1 měsíce. Pracovní roztoky



pro optimalizaci a validaci metody byly připravovány ředěním zásobních roztoků mobilní fáze na požadované koncentrace. Pracovní roztoky byly připravovány každý den nové.

## **3.2. VÝVOJ A OPTIMALIZACE SEPARAČNÍHO PROCESU I (HPLC)**

### **- Prvotní studie na HPLC**

Prvotní studie optimalizace separačního procesu byly prováděny na HPLC instrumentaci z důvodu větší robustnosti této metody a především z důvodu možnosti sledovat hodnoty zpětného tlaku za různých podmínek a navrhnout tak metodu přenositelnou na nízkotlaký SIA systém.

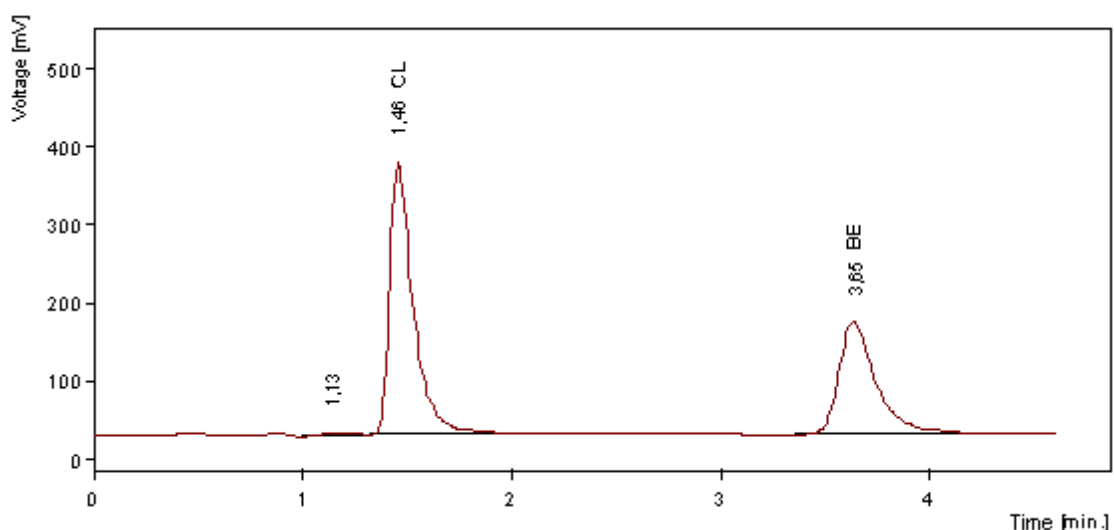
#### **3.2.1. Výběr mobilní fáze**

Při výběru vhodné mobilní fáze pro separaci chloramfenikolu a betamethasonu byl brán v úvahu lipofilní charakter testovaných látek, tzn. jejich schopnost retence na C - 18 uhlíkových řetězcích reverzní fáze monolitické kolony. Mobilní fáze musela být vybrána podle její schopnosti vymýt testované látky z kolony v optimálním čase a při dostatečné separaci obou analyzovaných látek. Byly sledovány retenční časy zkoumaných látek, které charakterizují umístění maxima píku na chromatogramu, schopnost separace píků obou látek až na základní linii za navržených podmínek, symetrie píků a rozlišení píku první látky od píku mrtvého objemu. V přehledu jsou uvedeny jednotlivé testované mobilní fáze a důvod jejich nevhodnosti.

Měření probíhalo při vlnové délce 220 nm s monolitickou kolonou Chromolith<sup>(TM)</sup> Flash RP - 18e, 25 x 4,6 mm s monolitickou předkolonou (10 mm) o průtokové rychlosti 0,6 ml/min, která zůstávala po dobu optimalizace na HPLC konstantní. Tato průtoková rychlost byla zvolena jako kompromis mezi délkou analýzy a přijatelným zpětným tlakem, kterého je možné dosáhnout v SIA systému.

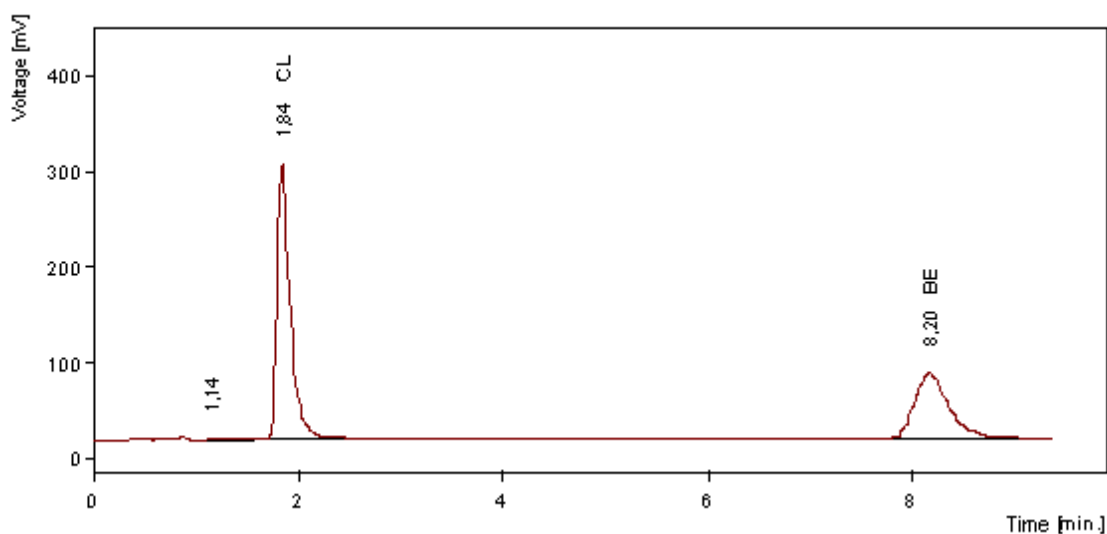
### Výběr vhodné mobilní fáze s odpovídajícími chromatogramy

Nejprve byl vybrán methanol jako organická složka mobilní fáze. První mobilní fází byla testována směs methanol/voda (50:50, v/v) o pH = 5,5. Zpětný tlak na koloně byl 1,2 kPa; průtok 0,6 ml/min a  $\lambda = 220\text{nm}$ . Při měření byla použita předkolona (10 mm) + kolona (25 mm). Píky chloramfenikolu a betamethasonu byly sice při separaci odděleny dostatečně, ale mobilní fáze byla v tomto případě příliš silná. Pík CL se objevil příliš blízko píku mrtvého objemu, protože CL vykazoval slabou retenci na koloně.



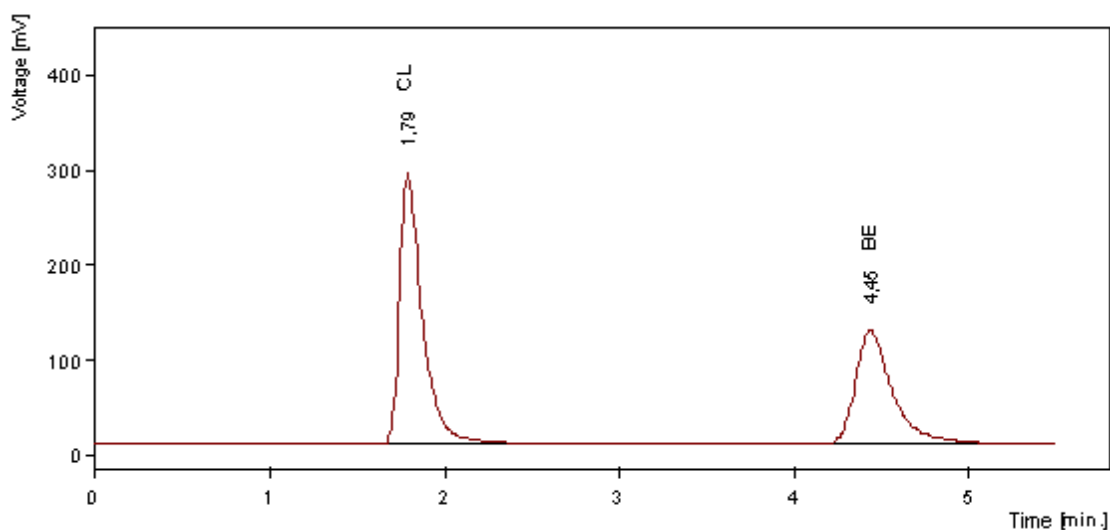
Obrázek 12 - Chromatogram při použití mobilní fáze methanol/voda (50:50, v/v), průtok 0,6 ml/min

Jako druhá mobilní fáze byla použita směs methanol/voda (50:60, v/v). Separace CL a BE proběhla dobře, ale retenční čas BE byl příliš dlouhý a pík mírně rozmytý a naopak retenční čas CL příliš krátký, jak ukazuje jeho pík, který se objevil příliš blízko píku mrtvého objemu.



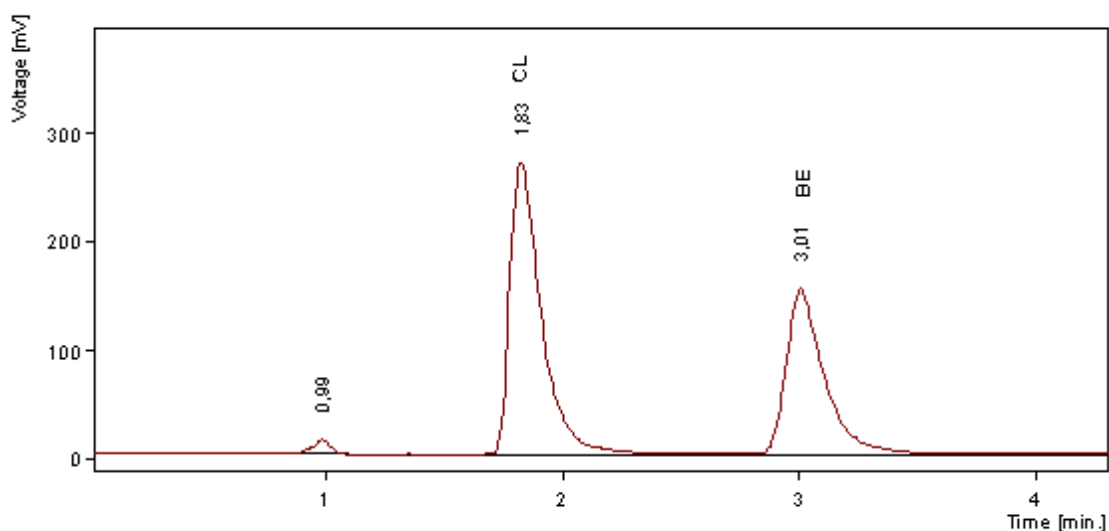
Obrázek 13 - Chromatogram při použití mobilní fáze methanol/voda (50:60, v/v), průtok 0,6 ml/min

Jako další organická složka k výběru vhodné mobilní fáze byl testován kromě methanolu i acetonitril. Byla připravena tříložková mobilní fáze methanol/acetonitril/voda (20:20:60, v/v). Separace látek proběhla dostatečně, ale z důvodu zbytečně vysokého rozlišení píků obou látek byla mobilní fáze shledána jako nevyhovující.



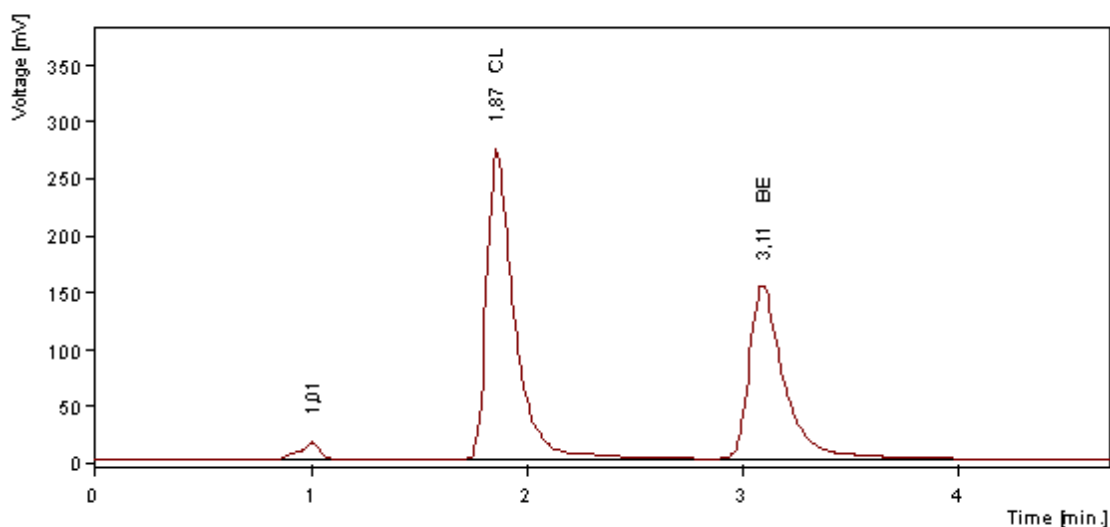
Obrázek 14 - Chromatogram při použití mobilní fáze methanol/acetonitril/voda (20:20:60, v/v), průtok 0,6 ml/min

Nyní se za organickou složkou mobilní fáze zvolil acetonitril. Jako první byla použita směs acetonitril/voda (30:70, v/v), o pH = 5,9. Tlak byl 0,9 - 1 kPa. Píky obou látek se ukázaly mít vyhovující symetrický tvar. Pro slabou retenci CL na koloně, jak ukazuje jeho pík, který se objevil příliš blízko píku mrtvého objemu a pro slabou retenci BE, kdy se jeho pík objevil příliš blízko píku CL, byla mobilní fáze shledána jako málo robustní a nevyhovující. Tyto separační podmínky by byly plně vyhovující pro HPLC metodu avšak ne pro SIC instrumentaci, kde je jiným způsobem řešena konstrukce průtokové cely (tvar Z a větší objem) a tudíž je potřeba dosáhnout efektivnější separace píků od mrtvého objemu i mezi sebou.



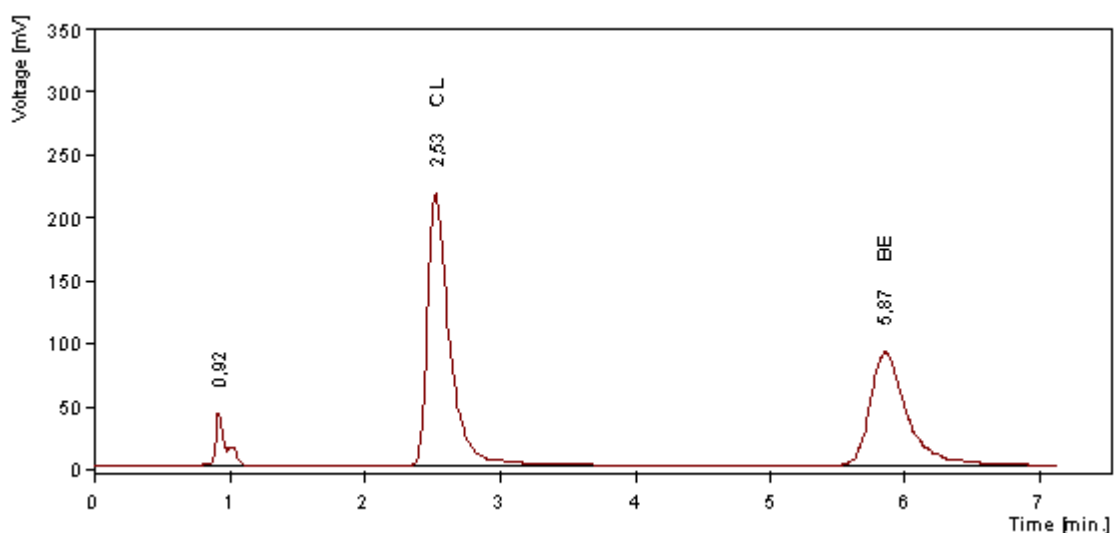
Obrázek 15 - Chromatogram při použití mobilní fáze acetonitril/voda (30:70, v/v), průtok 0,6 ml/min, pH = 5,9

Následně byla použita opět směs acetonitril/voda (30:70, v/v), tentokrát ale okyselena na pH = 2,5. Snížení pH mělo na retenci časů vliv jen velice nepatrný, jak dokládá zobrazení píků na obrázku č. 16.



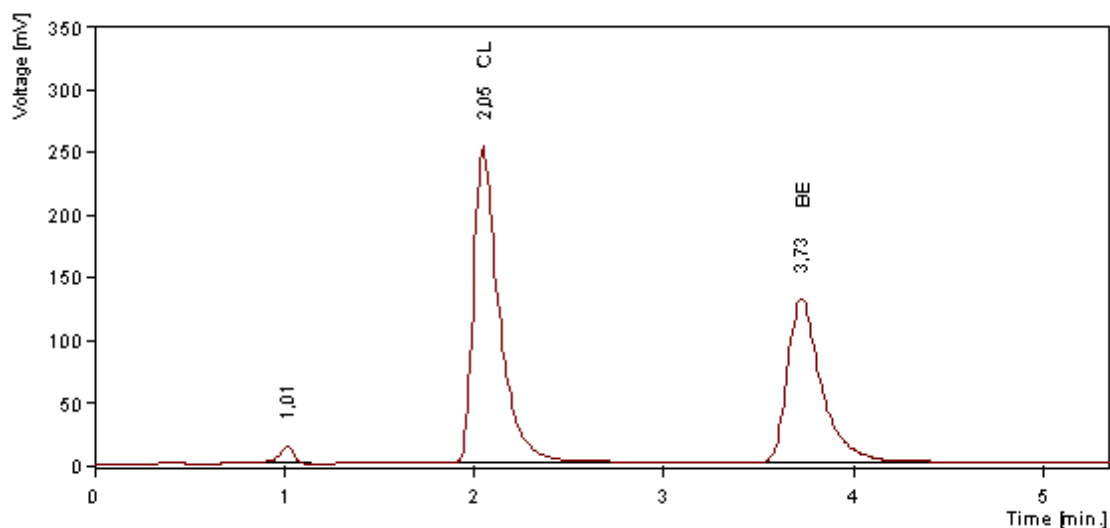
Obrázek 16 - Chromatogram při použití mobilní fáze acetonitril/voda (30:70, v/v),  
průtok 0,6 ml/min, pH = 2,5

Další testovanou mobilní fází se stala směs - acetonitril/voda (25:75, v/v) o pH = 5,3. Tato mobilní fáze nebyla dostatečně silná na včasné vymytí CL a BE, jak dokládají píky na chromatogramu. Důvodem byla silnější retence obou látek na reverzní fázi monolitické kolony a tudíž dlouhý retenční čas.



Obrázek 17 - Chromatogram při použití mobilní fáze acetonitril/voda (25:75, v/v),  
průtok 0,6 ml/min

Poslední testovanou mobilní fází se stala směs acetonitril/voda (30:80, v/v) o pH = 5; s průtokovou rychlostí 0,6 ml/min. Separace obou látek CL a BE proběhla s dostatečným rozlišením, což dokládají symetrické tvary a žádoucí retenční časy píků. Tato mobilní fáze byla tedy zvolena jako optimální.



Obrázek 18 - Chromatogram při použití mobilní fáze acetonitril/voda (30:80, v/v), průtok 0,6 ml/min

### **3.2.2. Výběr vnitřního standardu**

Měření probíhalo při 220 nm s předkolumnou (10 mm) + kolumnou (25 mm), s mobilní fází acetonitril/voda (30:80, v/v) o pH = 5 a s průtokovou rychlostí 0,6 ml/min.

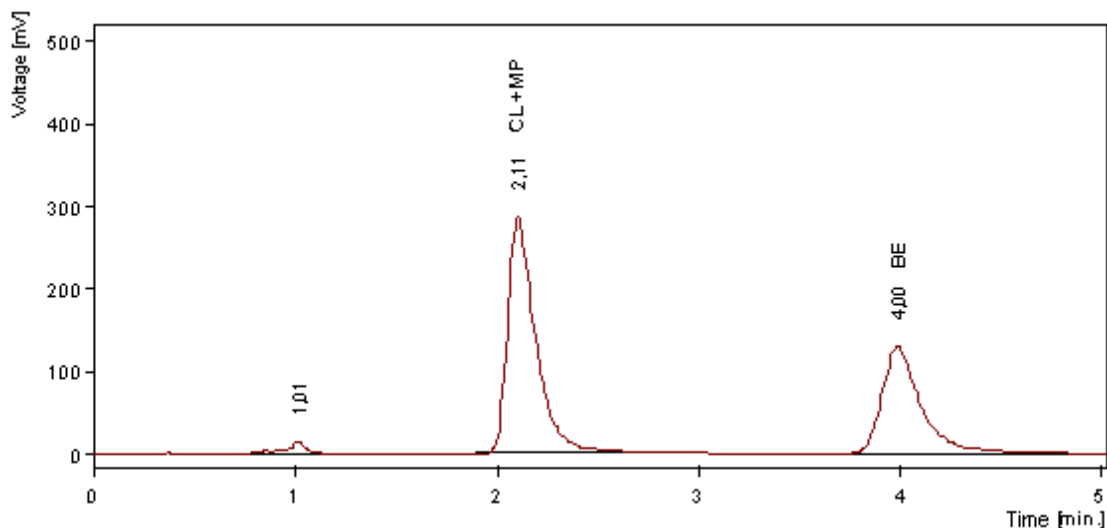
Při hledání optimálního vnitřního standardu bylo testováno třináct látek. Jejich retenční charakteristiky a důvody proč nebyly vhodné jsou uvedeny v následující tabulce č. 1.

<b>Testovaná látka</b>	<b>Retenční čas (min)</b>	<b>komentář</b>
kortizon acetát	9,62	Zbytečně prodloužil čas analýzy.
mefenamová kyselina	-	Pík mefenamové kyseliny se na chromatogramu neobjevil. Pravděpodobně z důvodu velice silné retence
4-chlorbenzoová kyselina	1,11/1,57	Pík 4-chlorbenzoové kyseliny měl dva vrcholy, respektive pík splýval s píkem mrtvého objemu.
hydrokortizon	2,45	Pík hydrokortizonu výrazně překryl pík CL.
triamcinolon acetonid	5,65	Pík triamcinolonu měl symetrický tvar, ale vzdálenost od píku BE nebyla dostatečná.
trimekain chlorid	6,56	Pík trimekainu byl rozmytý v nežádoucí asymetrický tvar.
bopindolol hydrogenmalonát	4,10	Pík bopindololu překryl pík BE.
propyfenazon	4,28	Pík propyfenazonu překryl pík BE.
pindolol	4,11	Pík pindololu zasáhl do píků CL a BE.
acebutolol	4,16	Pík acebutololu zasáhl do píku BE.

Tabulka 1 - Souhrn látek testovaných jako vnitřní standard a jejich retenčních vlastností

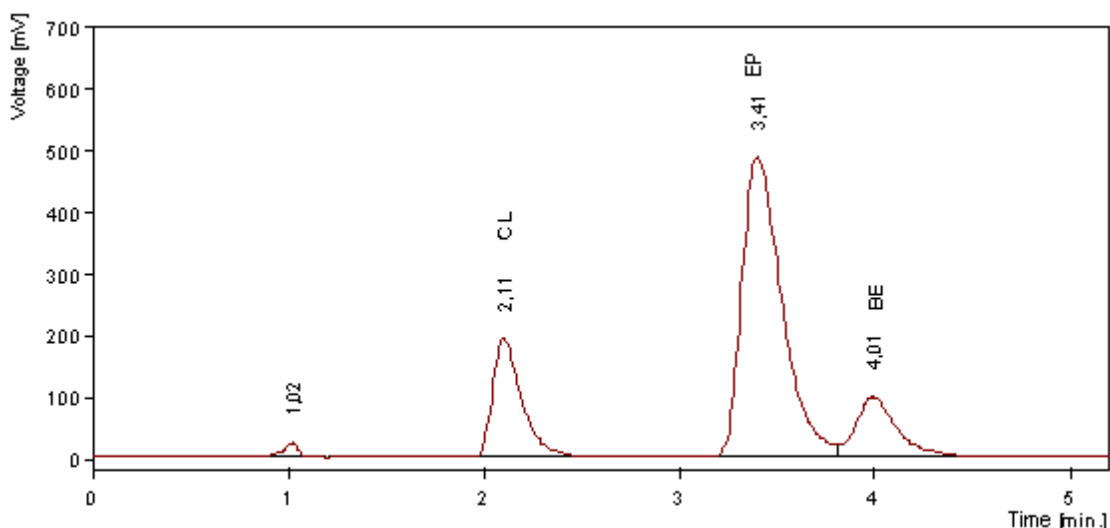


Test dalších třech látek znázorňují chromatogramy níže. Pík methylparabenu a pík chloramfenikolu se navzájem překryly v jediný pík, tudíž methylparaben nevyhověl našim požadavkům.



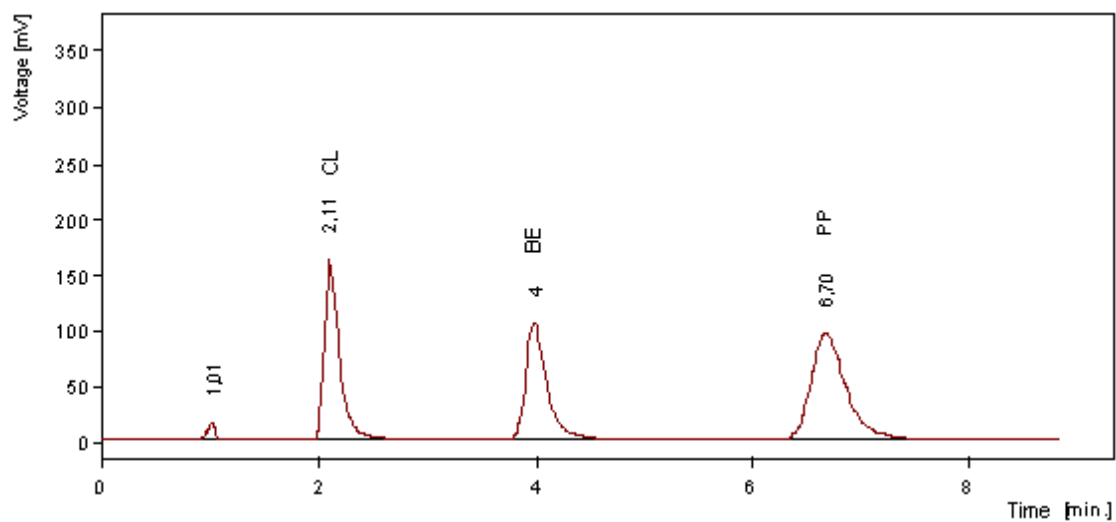
Obrázek 19 - Chromatogram při použití mobilní fáze acetonitril/voda (30:80, v/v), průtok 0,6 ml/min

Ethylparaben též nevyhověl, protože došlo k částečnému překrytí píků ethylparabenu a betamethasonu.



Obrázek 20 - Chromatogram při použití mobilní fáze acetonitril/voda (30:80, v/v), průtok 0,6 ml/min

Propylparaben vykazoval optimální retenční čas a proto byl zvolen jako vhodný vnitřní standard pro další postup. Vyhovoval též tvar a symetrie píků.



Obrázek 21 - Chromatogram při použití mobilní fáze acetonitril/voda (30:80, v/v), průtok 0,6 ml/min

### **3.2.3. Výběr vlnové délky detekce**

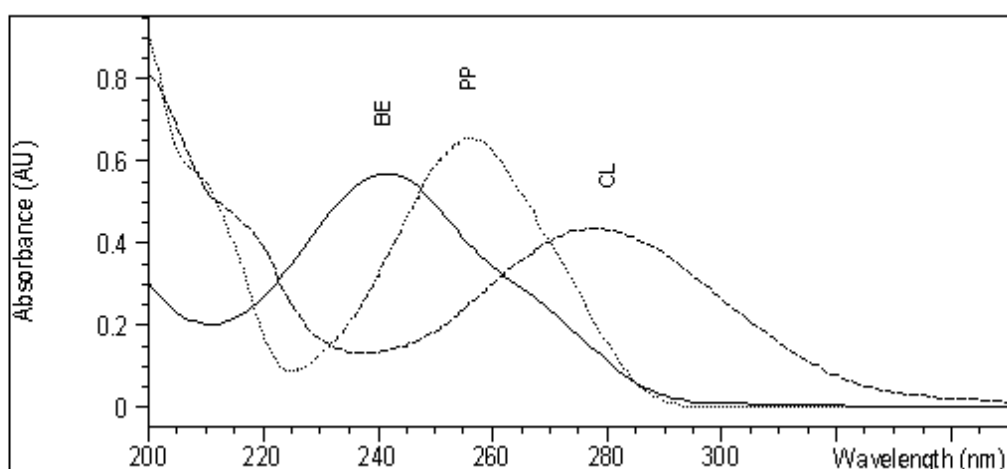
Vhodná vlnová délka detekce, která byla následně zvolena jako měřicí vlnová délka detektoru na SIA přístroji, při které byl stanoven obsah chloramfenikolu a betamethasonu s pomocí vnitřního standardu propylparabenu ve vzorku, byla zjištěna změřením jejich absorpčních spekter v UV oblasti na spektrofotometru. Měření spekter jednotlivých látek se testovalo při použití mobilní fáze acetonitril/voda (30:80, v/v). Byly zjištěny vlnové délky absorpčních maxim jednotlivých látek, tedy vlnové délky, při kterých je měření jejich absorbance nejcitlivější.

Na spektrofotometru bylo zjištěno absorpční maximum pro roztok betamethasonu při 241nm, pro roztok chloramfenikolu při 278nm, a pro roztok propylparabenu při 256nm. Jelikož komerční SIA systém umožňuje provádět detekci i při čtyřech vlnových délkách najednou, tak na základě zjištěných absorpčních maxim stanovovaných látek, byly zvoleny za měřicí vlnové délky detektoru 278 nm pro chloramfenikol a 241 nm pro betamethason a současně i pro propylparaben.

Maximum BE 241 nm

Maximum CL 278 nm

Maximum PP 256 nm

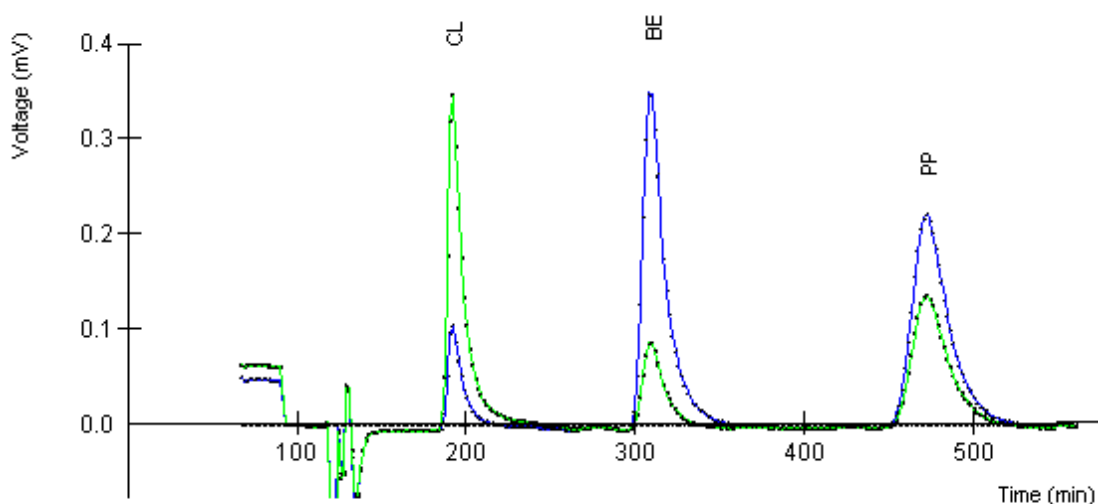


Obrázek 22 – UV - spektra CL, BE, PP s absorpčními maximy v mobilní fázi acetonitril/voda (30:80, v/v)

### **3.3. VÝVOJ A OPTIMALIZACE SEPARAČNÍHO PROCESU II (SIA)**

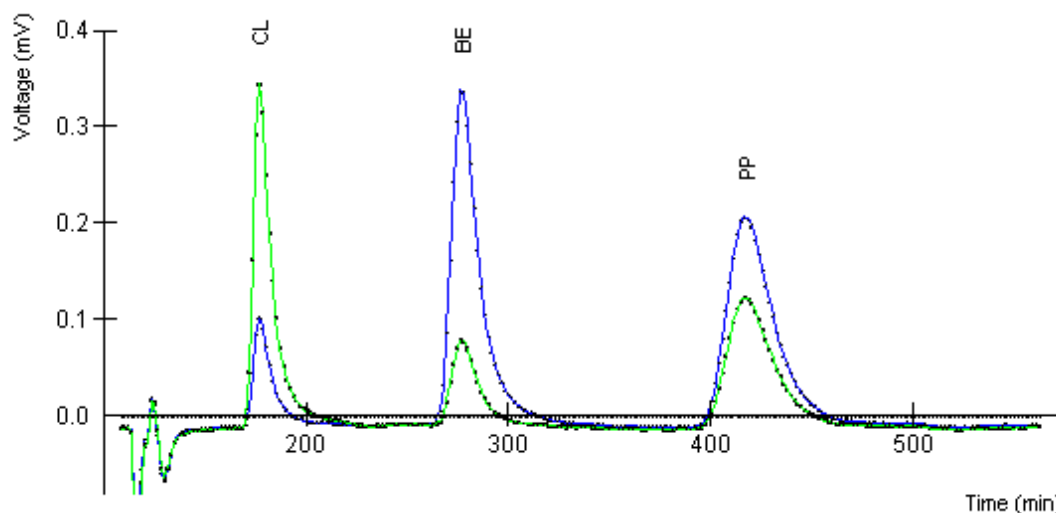
Dosažené optimální podmínky separace BE a CL (mobilní fáze acetonitril/voda (30:80, v/v), průtok 0,6 ml/min) získané na HPLC byly v další fázi práce přeneseny na SIA systém. Monolitická kolona Chromolith<sup>(TM)</sup> Flash RP - 18e, 25 x 4,6 mm s monolitickou předkolonou (10 mm) byla pomocí píkových šroubů zapojena do SIA systému mezi vícecestný selekční ventil a průtokovou Z celu.

Separace provedená za těchto podmínek je znázorněna na SIC chromatogramu na obrázku č. 23. Částečné rozdíly v retenčních časech píků látek jsou způsobeny rozdílnými mrtvými objemy HPLC a SIA systému.



Obrázek 23 – Chromatogram (SIA) při použití mobilní fáze acetonitril/voda (30:80, v/v), monolitická kolona Chromolith<sup>(TM)</sup> Flash RP - 18e, 25 x 4,6 mm + monolitická předkolona (10 mm)

Navržené podmínky separace se i na SIA systému jevily jako optimální, přesto byla testována ještě možnost zkrátit dobu analýzy při zachování dostatečné separace pomocí záměny (10 mm) předkolony za předkolonu o délce (5 mm). Získané zkrácení celkové separační délky kolony o cca 15 % mělo pozitivní vliv na posun retenčních časů látek, zejména vnitřního standardu propylparabenu, při zachování dostatečné separační účinnosti kolony. Chromatogram je znázorněn na obrázku č.24. Z tohoto důvodu byly navržené podmínky separace: mobilní fáze acetonitril/voda (30:80, v/v), průtok 0,6 ml/min, kolona Chromolith<sup>TM</sup> Flash RP - 18e, 25 x 4,6 mm s předkolonou (5 mm), považovány za finální a byly použity pro další validaci metody.



Obrázek 24 – Chromatogram (SIA) při použití finálních podmínek separace: mobilní fáze acetonitril/voda (30:80, v/v), monolitická kolona Chromolith<sup>TM</sup> Flash RP - 18e, 25 x 4,6 mm + monolitická předkolona (5 mm)

### **3.4. VYTVOŘENÍ A OPTIMALIZACE PROGRAMU ANALÝZY NA SIA**

Celý SIA přístroj je ovládán softwarem počítače, tudíž bylo nutno vytvořit jednoduchý program ovládající jednotlivé součásti přístroje a naplánovat přesně jeho jednotlivé kroky. Analýza probíhala za nastavených podmínek, které byly optimalizovány v předcházejících krocích. Kompletní SIA program, podle něhož probíhala separační analýza je uveden v následující tabulce č. 2.

JEDNOTKA	PŘÍKAZ - ČINNOST
DVOUCESTNÝ VENTIL	POLOHA IN
PÍSTOVÁ PUMPA	NASÁVÁNÍ MOBILNÍ FÁZE 4200 $\mu$ l, RYCHLOSTÍ TOKU 100 $\mu$ l sec <sup>-1</sup>
DVOUCESTNÝ VENTIL	POLOHA OUT
VÍCECESTNÝ VENTIL	PORT 2
PÍSTOVÁ PUMPA	NASÁVÁNÍ <b>VZORKU</b> 15 $\mu$ l, RYCHLOSTÍ TOKU 10 $\mu$ l sec <sup>-1</sup>
VÍCECESTNÝ VENTIL	PORT 6 <b>DETEKTOR</b>
	ANALÝZA VZORKU <b>CL</b>
PÍSTOVÁ PUMPA	VYTLAČENÍ CHLORAMFENIKOLU NA KOLONU A DO DETEKTORU 1500 $\mu$ l, RYCHLOSTÍ TOKU 10 $\mu$ l sec <sup>-1</sup>
SPEKTROMETR	MĚŘENÍ ABSORBANCE – PÍK CL NA CHROMATOGRAMU
VÍCECESTNÝ VENTIL	PORT6
	ANALÝZA VZORKU <b>BE</b>
PÍSTOVÁ PUMPA	VYTLAČENÍ BETAMETHASONU 1000 $\mu$ l, RYCHLOSTÍ TOKU 10 $\mu$ l sec <sup>-1</sup>
SPEKTROMETR	MĚŘENÍ ABSORBANCE – PÍK BE NA CHROMATOGRAMU
VÍCECESTNÝ VENTIL	PORT6
	ANALÝZA VZORKU <b>VNITŘNÍ STANDARD PP</b>
PÍSTOVÁ PUMPA	VYTLAČENÍ PROPYLPARABENU 1000 $\mu$ l, RYCHLOSTÍ TOKU 10 $\mu$ l sec <sup>-1</sup>
SPEKTROMETR	MĚŘENÍ ABSORBANCE – PÍK PP NA CHROMATOGRAMU
	UKONČENÍ JEDNOHO CYKLU

Tabulka 2 - Program analýzy SIA

### **3.5. TEST VHODNOSTI CHROMATOGRAFICKÉHO SYSTÉMU**

Účinnost systému byla testována při optimálních podmínkách. Sledované účinné látky byly stanoveny navrženou metodou (SIC) a ze základních chromatografických parametrů byla vypočítána data jako Faktor symetrie  $A_S$ , Rozlišení  $R_S$ , Počet teoretických pater a Retenční časy. Hodnoty dosažených parametrů jsou přehledně znázorněny v tabulce č. 3.

#### **3.5.1. Retenční čas a retenční objem**

$$V_R = t_R \cdot v$$

$V_R$  – retenční objem

$t_R$  – retenční čas

$v$  – průtoková rychlost mobilní fáze

#### **3.5.2. Rozlišení píků**

$$R_S = 1,18 \cdot (t_{R2} - t_{R1}) / W_{h1} + W_{h2}$$

$t_{R1}, t_{R2}$  – retenční časy dvou sousedních píků

$W_{h1}, W_{h2}$  – šířky píků v poloviční výšce

Rozlišení píků větší než 1,5 odpovídá rozdělení píků na základní linii

#### **3.5.3. Faktor symetrie píku**

$$A_S = W_{0,05} / 2d$$

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

$2d$  – vzdálenost mezi kolmicí spuštěnou z vrcholu píku a vztupnou částí píku v jedné dvacetině jeho výšky

#### **3.5.4. Dělicí účinnost monolitické kolony a zdánlivý počet teoretických pater**

$$N = 5,54 \cdot (t_R / W_h)^2$$

$t_R$  – retenční čas

$W_h$  – šířka píku v polovině jeho výšky

$N$  – počet teoretických pater

	<b>CL</b>	<b>BE</b>	<b>PP</b>
Retenční čas (min)	$t_R = 2.85$	$t_R = 4.40$	$t_R = 6.75$
Rozlišení píků	$R_{CL, BE} = 2.16$	$R_{BE, PP} = 2.52$	
Faktor symetrie píku	$A_s = 1.60$	$A_s = 1.58$	$A_s = 1.45$
Účinnost kolony a zdánlivý počet teoretických pater	$N = 1389$	$N = 1862$	$N = 1431$

Tabulka 3 – Chromatografická data získaná výpočtem z údajů podle obrázku č. 26



## **3.6. VALIDACE OPTIMALIZOVANÉ METODY**

### **3.6.1. Stanovení limitu detekce a limitu kvantifikace**

**Limit detekce (LOD)** je nejnižší detekovatelná koncentrace látky, pro kterou je analytický signál statisticky významně odlišný od šumu na základní linii. Zpravidla je definován jako koncentrace látky, jejíž pík je trojnásobně vyšší než šum základní linie (**3 S/N**).

Pro stanovení detekčních limitů chloramfenikolu, betamethasonu a propylparabenu byly experimentálně zjištěny tyto hodnoty koncentrací, které odpovídaly poměru 3 S/N:

LOD chloramfenikolu = 0,5 mg/l

LOD betamethasonu = 1,0 mg/l

LOD propylparabenu = 1,0 mg/l

Odezva byla měřena při vlnové délce  $\lambda = 241$  nm pro betamethason a propylparaben;  $\lambda = 278$  nm pro chloramfenikol za optimalizovaných separačních podmínek.

**Limit kvantifikace (LOQ)** je nejnižší stanovitelná koncentrace látky, která může být určena s vhodnou přesností a správností. Zpravidla je definován jako desetinásobek šumu základní linie (**10 S/N**).

Limit kvantifikace byl matematicky vypočten jako desetinásobek šumu základní linie, přičemž byli použity hodnoty koncentrací měřených pro limit detekce.

Pro jednotlivé látky byly zjištěny tyto limity kvantifikace:

LOQ pro chloramfenikol = 1,66 mg/l

LOQ pro betamethason = 3,33 mg/l

LOQ pro propylparaben = 3,33 mg/l

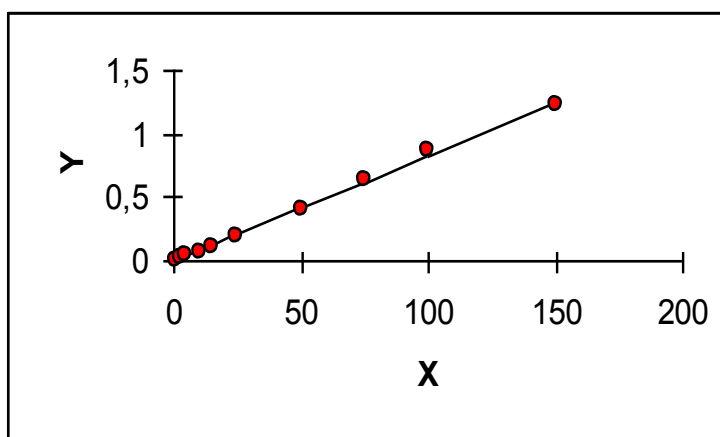
### **3.6.2. Stanovení linearity odezvy**

Linearita je chápána jako přímková závislost mezi dvěma náhodnými proměnnými, tj. odezvou instrumentace (analytickým signálem) a koncentrací analytu. Je to schopnost analytické metody uvnitř stanoveného rozmezí získat testováním výsledky, které jsou přímo úměrné koncentraci sledované látky ve vzorku. Je vyjádřena grafickými parametry lineární regrese (korelační koeficient, směrnice kalibrační přímky – regresní koeficient).

Linearita odezvy byla stanovena pro chloramfenikol, betamethason a propylparaben ve směsi, která byla připravena ředěním zásobních methanolických roztoků do mobilní fáze. Kalibrační roztoky byly připraveny v rozmezí koncentrací 2,5 mg/l - 150 mg/l u všech látek. Každá koncentrace byla změřena dvakrát a do lineární regrese byl zařazen průměr obou výsledků. Pro validaci metody je důležitý korelační koeficient přímky, jež by měl být minimálně 0,99 čemuž výsledky vyhovovaly.

#### **Kalibrační křivka chloramfenikolu**

Pro chloramfenikol byla změřena lineární odezva absorbance v intervalu koncentrací 2,5 mg/l – 150 mg/l.



Obrázek 25 - Kalibrační křivka chloramfenikolu

Koncentrace mg/l	Absorbance
2,5	0,01706
5	0,03432
10	0,06866
15	0,1156
25	0,1839
50	0,4083
75	0,634
100	0,8716
150	1,226

<b>Statistické parametry pro regresi : <math>y = k x + q</math></b>		
Počet bodů	n = 9	Odhad chyby
Směrnice	k = 0,008402 ± 0,000125	
Abs. člen	q = -0,007677 ± 0,008046	
Korelační koef.	r = 0,99912	
Reziduální odch.	s = 0,018831	

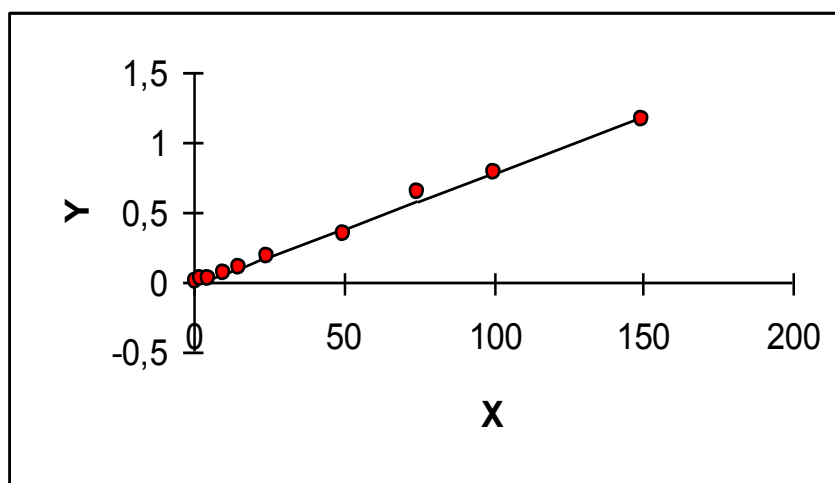
Tabulka 4 – Data pro kalibrační křivku chloramfenikolu

**Rovnice lineární regrese pro křivku CL:**

**$A = (0.0084 \pm 0.00012)c - (0.0076 \pm 0.008)$ , korelační koeficient je 0.99912**

### Kalibrační křivka betamethasonu

Pro betamethason byla změřena lineární odezva absorpance v intervalu koncentrací 2,5 mg/l – 150 mg/l



Obrázek 26 - Kalibrační křivka betamethasonu

Koncentrace mg/l	Absorbance
2,5	0,01569
5	0,02822
10	0,0614
15	0,09699
25	0,17438
50	0,3455
75	0,641
100	0,7776
150	1,1639

<b>Statistické parametry pro regresi : <math>y = kx + q</math></b>			
			Odhad chyby
Počet bodů	n =	9	
Směrnice	k =	0,007924 ±	0,000174
Abs. Člen	q =	-0,012455 ±	0,011246
Korelační koef.	r =	0,99945	
Reziduální odch.	s =	0,026323	

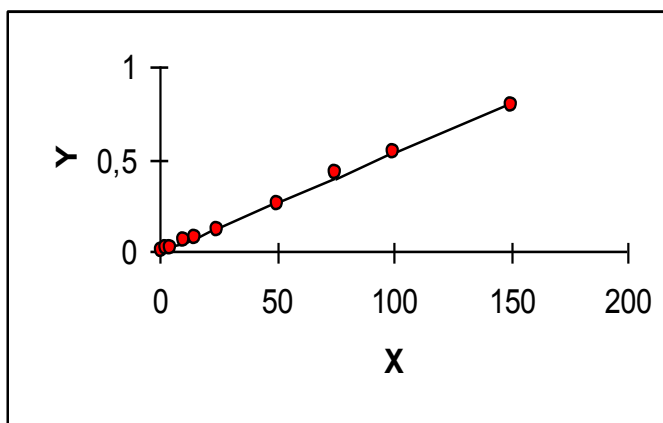
Tabulka 5 - Data pro kalibrační křivku betamethasonu

**Rovnice lineární regrese pro křivku BE:**

**BE:  $A = (0.00792 \pm 0.00017)c - (0.012 \pm 0.011)$ , korelační koeficient je 0.99945**

**Kalibrační křivka propylparabenu**

Pro propylparaben byla změřena lineární odezva absorbance v intervalu koncentrací 2,5 mg/l – 150 mg/l.



Obrázek 27 - Kalibrační křivka propylparabenu

Koncentrace mg/l	Absorbance
2,5	0,012207
5	0,02059
10	0,0501
15	0,0683
25	0,1182
50	0,2569
75	0,4155
100	0,5394
150	0,7892

<b>Statistické parametry pro regresi : <math>y = kx + q</math></b>		
Počet bodů	n = 9	Odhad chyby
Směrnice	k = 0,00536	± 0,00006
Abs. Člen	q = -0,004744	± 0,00416
Korelační koef.	r = 0,999421	
Reziduální odch.s	= 0,009736	

Tabulka 6 – Data pro kalibrační křivku propylparabenu

**Rovnice lineární regrese pro křivku PP:**

**PP:  $A = (0.00536 \pm 0.00006)c - (0.0047 \pm 0.0041)$ , korelační koeficient je 0.99942**

**3.6.3. Opakovatelnost měření absorbance při různých koncentracích standardů**

**OPAKOVATELNOST MĚŘENÍ V RÁMCI JEDNOHO DNE**

Je to přesnost analýz provedených v rámci jedné laboratoře, týmž analytikem, na téže analytické soustavě, se stejnými chemikáliemi a rozpouštědly na jednom vzorku. Neboli se jedná o opakovaný nástřik stejného množství, stejného vzorku, za stejných chromatografických podmínek. V našem případě byla dávkována osmkrát po sobě směs látek v koncentracích 5,00 mg/l, 25,00 mg/l a 50,00 mg/l. Z odezvy signálu píků jednotlivých látek byla vypočítána relativní směrodatná odchylka (RSD) stanovení jednotlivých látek pro jednotlivé koncentrace.

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

RSD - Relativní směrodatná odchylka

$\bar{y}$  - Průměr absorbancí

n - Počet měření

$y_i$  - Hodnoty absorbancí jednotlivých paralelních stanovení

**Koncentrace 5,00 mg/l**

Číslo analýzy	A (CL)	A (BE)	A (PP)
1	0,03	0,03	0,03
2	0,02	0,02	0,02
3	0,03	0,02	0,02
4	0,03	0,03	0,02
5	0,02	0,03	0,03
6	0,02	0,02	0,02
7	0,03	0,03	0,02
8	0,03	0,02	0,03
<b>Průměr absorbancí</b>	<b>0,03</b>	<b>0,03</b>	<b>0,02</b>
RSD (%)	2,88	5,73	7,61

Tabulka 7 - Naměřené hodnoty absorpance a vypočítané hodnoty opakovatelnosti měření pro jednotlivé látky při koncentraci 5,00 mg/l

**Koncentrace 25,0 mg/l (1.den)**

Číslo analýzy	A (CL)	A (BE)	A (PP)
1	0,20	0,19	0,15
2	0,20	0,20	0,15
3	0,20	0,19	0,14
4	0,20	0,19	0,14
5	0,19	0,19	0,15
6	0,19	0,19	0,15
7	0,20	0,19	0,15
8	0,20	0,19	0,15
<b>Průměr absorbancí</b>	<b>0,20</b>	<b>0,19</b>	<b>0,15</b>
RSD (%)	1,13	1,14	1,66

Tabulka 8 - Naměřené hodnoty absorpance a vypočítané hodnoty opakovatelnosti měření pro jednotlivé látky při koncentraci 25,00 mg/l

### **Koncentrace 50,0 mg/l**

Číslo analýzy	A (CL)	A (BE)	A (PP)
1	0,38	0,40	0,28
2	0,38	0,40	0,28
3	0,38	0,41	0,28
4	0,39	0,41	0,28
5	0,38	0,41	0,28
6	0,39	0,41	0,28
7	0,39	0,41	0,29
8	0,38	0,41	0,29
<b>Průměr absorbancí</b>	<b>0,38</b>	<b>0,41</b>	<b>0,28</b>
RSD (%)	1,02	0,79	0,78

Tabulka 9 - Naměřené hodnoty absorbance a vypočítané hodnoty opakovatelnosti měření pro jednotlivé látky při koncentraci 50,00 mg/l

Z výsledků měření byly vyhodnoceny také hodnoty opakovatelnosti (RSD) retenčních časů jednotlivých látek při hodnotě koncentrace (50,00 mg/l).

Retenční časy látek v sec			
Číslo analýzy	CL	BE	PP
1	118,0	39,8	44,3
2	117,8	39,6	43,6
3	117,7	39,5	43,6
4	117,7	39,5	43,5
5	117,8	39,7	43,9
6	117,7	39,5	43,2
7	117,7	39,6	43,6
8	117,9	39,5	42,9
<b>Průměr retenčních časů</b>	<b>117,8</b>	<b>39,6</b>	<b>43,6</b>
RSD (%)	0,1	0,3	0,9

Tabulka 10 – Opakovatelnost retenčních časů při koncentraci 50,00 mg/l



## OPAKOVATELNOST MĚŘENÍ V RÁMCI NĚKOLIKA DNÍ

V případě stanovení opakovatelnosti měření v rámci několika dní bylo do systému dávkováno stejné množství, stejného vzorku, za stejných chromatografických podmínek v průběhu 5 dní. V našem případě se jednalo o stanovení v průběhu celkem 7 dní, kdy dvoudenní pauza byla tvořena víkendem. Do SIA systému byl dávkován stejný vzorek o koncentraci 25 mg/l třikrát po sobě. Z odezvy 3 měření byla vypočítána průměrná hodnota. Z průměrných hodnot z 5 dní měření byla vypočítána (RSD) stanovení pro jednotlivé látky.

Získané hodnoty pro jednotlivé dny jsou uvedeny v tabulkách č. 8,11,12,13,14 a mezidenní opakovatelnost měření je uvedena jako průměrné hodnoty odezvy 3 měření absorbancí v průběhu 5 dní, při koncentraci 25,0 mg/l v tabulce č. 15.

### **Koncentrace 25,0 mg/l (2.den)**

Číslo analýzy	A (CL)	A (BE)	A (PP)
1	0,19	0,19	0,15
2	0,19	0,19	0,15
3	0,20	0,19	0,15
<b>Průměr absorbancí</b>	<b>0,19</b>	<b>0,19</b>	<b>0,15</b>

Tabulka 11 - Absorbance při koncentraci 25,0 mg/l

### **Koncentrace 25,0 mg/l (3.den)**

Číslo analýzy	A (CL)	A (BE)	A (PP)
1	0,20	0,20	0,15
2	0,20	0,20	0,15
3	0,20	0,20	0,15
<b>Průměr absorbancí</b>	<b>0,20</b>	<b>0,20</b>	<b>0,15</b>

Tabulka 12 - Absorbance při koncentraci 25,0 mg/l

**Koncentrace 25,0 mg/l (4.den)**

Číslo analýzy	A (CL)	A (BE)	A (PP)
1	0,20	0,20	0,16
2	0,20	0,20	0,15
3	0,20	0,20	0,15
<b>Průměr absorbancí</b>	<b>0,20</b>	<b>0,20</b>	<b>0,15</b>

Tabulka 13 - Absorbance při koncentraci 25,0 mg/l

**Koncentrace 25,0 mg/l (5.den)**

Číslo analýzy	A (CL)	A (BE)	A (PP)
1	0,20	0,20	0,16
2	0,20	0,21	0,16
3	0,21	0,21	0,16
<b>Průměr absorbancí</b>	<b>0,20</b>	<b>0,21</b>	<b>0,16</b>

Tabulka 14 - Absorbance při koncentraci 25,0 mg/l

Den měření	Průměrná hodnota odezvy ze 3 měření		
	A (CL)	A (BE)	A (PP)
1.den	<b>0,20</b>	<b>0,19</b>	<b>0,15</b>
2.den	<b>0,19</b>	<b>0,19</b>	<b>0,15</b>
3.den	<b>0,20</b>	<b>0,20</b>	<b>0,15</b>
4.den	<b>0,19</b>	<b>0,20</b>	<b>0,16</b>
5.den	<b>0,20</b>	<b>0,21</b>	<b>0,16</b>
<b>Průměr absorbancí</b>	<b>0,20</b>	<b>0,20</b>	<b>0,15</b>
RSD (%)	2,20	3,11	3,78

Tabulka 15 - Průměrné hodnoty absorbancí a mezidenní opakovatelnost měření v průběhu 5 dní, při koncentraci 25,0 mg/l

Dosažené hodnoty opakovatelnosti měření v rámci 5 dní (tzv. inter-day precision) nepřesáhly pro žádnou z výše analyzovaných sloučenin hodnotu RSD 4 %.

#### **3.6.4. Selektivita**

Selektivita analytické metody je definována jako schopnost přesného a správného určení analytu i v přítomnosti interferujících látek. Je to tedy schopnost analytické metody jednoznačně stanovit analyzované látky. Metoda stanovení nesmí být rušena pomocnými látkami a dalšími složkami přípravku. V našem případě nebylo možné změřit vzorek placebo a tím zjistit možné interference z pomocných látek. Na chromatogramech byla ale dosažena dokonalá separace všech tří látek. Absence interferencí, tedy správnost dosažených výsledků byla potvrzena pomocí testu výtěžnosti (správnosti).

### **3.6.5. Přesnost**

Tento krok poskytuje důkaz o přesnosti celé metody od přípravy vzorku k vyhodnocení dat. Dokládá blízkost shody mezi více výsledky získanými opakovaným měřením homogenního vzorku za předepsaných podmínek. Výsledkem je obvykle rozdíl či relativní směrodatná odchylka **RSD** při sérii měření.

V našem případě byla přesnost metody potvrzena měřením farmaceutického přípravku (bylo analyzováno 6 roztoků vzorku BETABIOPTAL® kapky jedné šarže). Výsledky jednotlivých měření jsou vyjádřené jako stanovený procentuální obsah deklarovaného množství. Přesnost metody je vyjádřena jako opakovatelnost stanovení ve formě RSD.

VZOREK	OBSAH CL (%)	OBSAH BE(%)
1	98,8	96,5
2	95,3	97,9
3	102,5	97,3
4	95,9	98,2
5	96,7	98,8
6	95,9	97,6
	<b>PRŮMĚR = 97,5</b>	<b>PRŮMĚR = 97,9</b>
	<b>RSD = 2,55%</b>	<b>RSD = 0,8%</b>

Tabulka 16 - Výsledky přesnosti systému pro stanovení CL a BE,  
stanovení 6 vzorků jedné šarže

### **3.6.6. Výtěžnost (Správnost)**

Správnost vyjadřuje těsnost shody výsledků měření a skutečné hodnoty měřené veličiny. Jedná se tedy o statisticky významnou rozdílnost mezi získanou a skutečnou hodnotou dané veličiny. Hodnocením správnosti metody se určuje přítomnost či nepřítomnost náhodné chyby, nejčastěji otestováním odchylky výsledků od správné hodnoty a to buď porovnáním se standardem, s již zavedenou a ověřenou metodou nebo srovnáním s referenčním materiálem. V našem případě nebylo možné získat placebo přípravku, z tohoto důvodu byly tedy připraveny a změřeny vzorky s přídavkem přesného množství standardu (100%). Při testování 3 různých šarží BETABIOPTAL<sup>®</sup> kapek byla zjištěna průměrná výtěžnost pro CL 97,1 % a pro BE 100,3 %.

## **4. VLASTNÍ STANOVENÍ VE FARMACEUTICKÉM PŘÍPRAVKU**

#### **4.1. STANOVENÍ VE FARMACEUTICKÉM PŘÍPRAVKU – OČNÍ KAPKY**

##### **BETABIOPTAL<sup>®</sup>**

Úkolem bylo změřit obsah účinných látek chloramfenikolu a betamethasonu v léčivém přípravku BETABIOPTAL<sup>®</sup> vyrobeného firmou FARMILA - Thea Farmaceutici Milano S.p.A, ( Milano, Itálie )

<b>Účinná látka + Množství (g)</b>	
betamethason	0,010
chloramfenikol	0,025
<b>Pomocná látka</b>	
polyethylenglykol	
kyselina boritá	
tetraboritan sodný	
macrogolum 300	
macrogolum 1540	
macrogolum 4000	
polysorbatum 80	
hypromellosem 2910	
thiomersalum	
aqua purificata.	

Tabulka 17 - Složení kapek BETABIOPTAL<sup>®</sup> deklarované výrobcem (na 5ml)

Rozdílné rozpouštěcí postupy byly použity pro získání účinných látek z očních kapek v požadovaném rozsahu 95 – 105 %.

Při rozpuštění v mobilní fázi byl uspokojivý jen výsledek CL, kde výtežnost byla 100 %, ale BE měl výtěžnost jen 75 %. Tento problém se opakoval i s použitím dalších organických rozpouštědel (methanol, acetonitril, isopropanol, tetrahydrofuran, dimethylsulfoxid a propylenglykol), kdy opět nedošlo k dostatečnému rozpuštění BE a výsledky též nevyhovovaly.

Jediný dimethylsulfoxid měl dostatečnou výtěžnost pro obě účinné látky, ale jeho pík interferoval na chromatogramu.

Nakonec se úspěšnou ukázala koncentrovaná kyselina fosforečná, jež byla přidána k organickému rozpouštědlu. Směs tetrahydrofuranu a methanolu v kombinaci s kyselinou fosforečnou v poměru 5:5:0,25 (v/v/v) byla shledána jako optimální rozpouštědlo k dostatečné výtěžnosti obou účinných látek a byla tedy použita v následujícím validačním postupu.

#### **4.2. STANOVENÍ BETABIOPTAL<sup>®</sup> METODOU SIC**

Sledované účinné látky byly stanoveny navrženou metodou SIC a ze základních chromatografických parametrů byla vypočítána data jako Faktor symetrie  $A_S$ , Rozlišení píků  $R_S$ , Počet teoretických pater  $N$  a Retenční časy  $t_R$ . Test vhodnosti chromatografického systému pro stanovení v přípravku dokládá tabulka č. 3.

Měření bylo provedeno za optimalizovaných podmínek: mobilní fáze acetonitril/voda (30:80, v/v), monolitická kolona Chromolith<sup>(TM)</sup> Flash RP - 18e, 25 x 4,6 mm + monolitická předkolona (5 mm), rychlost toku 0,6 ml/min, UV detekce probíhala při  $\lambda = 241$  nm pro betamethason a propylparaben;  $\lambda = 278$  nm pro chloramfenikol.

Výsledky procentuálního obsahu účinných látek v přípravku byly vypočítané podle následujícího vzorce:

$$C_I = (A_{VZ} / A_{IS(vz)} \cdot m_S \cdot R \cdot 100) / (A_{ST} / A_{IS(st)} \cdot m_V \cdot Z)$$



Kde jednotlivé proměnné jsou:

$C_1$  - obsah stanovené složky v %

$A_{VZ}$  - plocha píku vzorku

$A_{ST}$  - plocha píku standardu

$A_{IS(vz)}$  - plocha píku vnitřního standardu ve vzorku

$A_{IS(st)}$  - plocha píku vnitřního standardu ve standardu

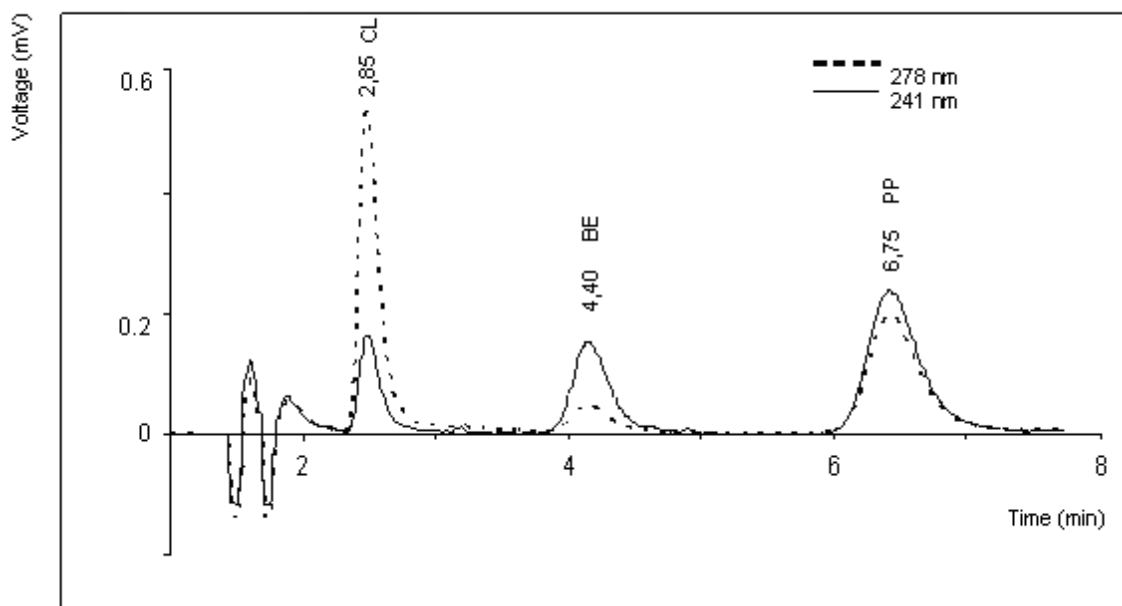
$m_v$  - navážka vzorku

$m_s$  - navážka standardu v g

Z - faktor zředění

R - korekční faktor vztažený na čistotu standardu (pro BE i CL shodně 0,98)

Získané výsledky dokazují, že navržená metoda umožňuje přesně a správně stanovit obsah účinných látek CL a BE v očních kapkách BETABIOPTAL<sup>®</sup> jak dokládá tabulka č. 18.



Obrázek 28 – Sekvenční injekční chromatogram stanovení účinných látek zahrnující též vnitřní standard PP v očních kapkách BETABIOPTAL<sup>®</sup>, mobilní fáze acetonitril/voda (30:80, v/v),

### STANOVENÍ SIC

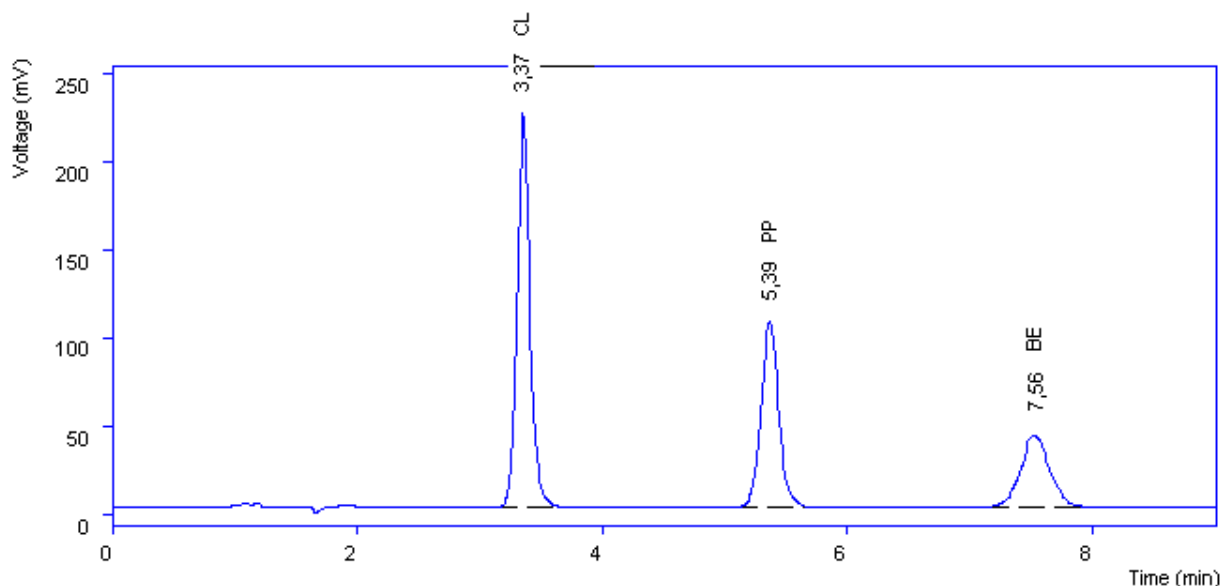
		OBSAH CL (%)	OBSAH BE (%)
VZOREK 1	1.	97,0	94,5
	2.	100,5	98,4
	<b>průměr</b>	<b>98,8</b>	<b>96,5</b>
VZOREK 2	1.	95,4	95,1
	2.	95,2	100,7
	<b>průměr</b>	<b>95,3</b>	<b>97,9</b>
VZOREK 3	1.	100,0	95,7
	2.	104,9	98,8
	<b>průměr</b>	<b>102,5</b>	<b>97,3</b>
VZOREK 4	1.	95,6	98,1
	2.	96,0	98,2
	<b>průměr</b>	<b>95,9</b>	<b>98,2</b>
VZOREK 5	1.	96,3	98,8
	2.	97,1	98,8
	<b>průměr</b>	<b>96,7</b>	<b>98,8</b>
VZOREK 6	1.	95,7	98,7
	2.	96,1	98,4
	<b>průměr</b>	<b>95,9</b>	<b>98,6</b>

Tabulka 18 – Výsledné hodnoty SIC, stanovení 6 vzorků jedné šarže,  
každý vzorek 2 nástřiky

### **4.3. STANOVENÍ BETABIOPTAL<sup>®</sup> METODOU HPLC**

Stanovení účinných látek ve farmaceutickém přípravku BETABIOPTAL<sup>®</sup> oční kapky bylo provedeno za odlišných podmínek na HPLC systému. Stacionární fáze byla zaměněna z monolitické, hydrofóbní reverzní fáze C - 18 za částicovou více polární SB - CN fázi. Analýza byla provedena na koloně Agilent Zorbax SB - CN 4.6 x 150 mm, s velikostí částic 5 µm. Jako optimální mobilní fáze byla zvolena methanol/voda (50:50, v/v), rychlost průtoku 1,0 ml/min a vlnová délka 240 nm. Chromatogram na obrázku č. 27 ukazuje stanovení účinných látek CL, BE v očních kapkách. Retenční časy byly odlišné a eluční pořadí píků BE a PP bylo obráceno oproti SIC metodě.

Výsledky stanovení stejného vzorku očních kapek pomocí HPLC jsou doloženy v tabulce č. 19. Statistický t - test (95 % úrovně) neodhalil podstatné odlišnosti mezi průměrnými hodnotami získanými z obou metod.



Obrázek 29 - HPLC chromatogram, stanovení účinných látek zahrnující též vnitřní standard PP v očních kapkách BETABIOPTAL<sup>®</sup>, mobilní fáze methanol/voda (50:50, v/v)

### SROVNÁVACÍ STANOVENÍ METODOU HPLC

		OBSAH CL (%)	OBSAH BE (%)
VZOREK 1	1.	104,6	104,2
	2.	103,9	103,1
	<b>průměr</b>	<b>104,2</b>	<b>103,6</b>
VZOREK 2	1.	101,9	102,5
	2.	101,9	103,3
	<b>průměr</b>	<b>101,9</b>	<b>102,9</b>
VZOREK 3	1.	101,2	101,6
	2.	98,9	99,6
	<b>průměr</b>	<b>100,0</b>	<b>100,6</b>
VZOREK 4	1.	100,9	101,9
	2.	99,4	100,4
	<b>průměr</b>	<b>100,2</b>	<b>101,1</b>
VZOREK 5	1.	98,7	100,2
	2.	98,6	100,8
	<b>průměr</b>	<b>98,7</b>	<b>100,5</b>
VZOREK 6	1.	98,9	100,2
	2.	100,4	100,9
	<b>průměr</b>	<b>99,6</b>	<b>100,4</b>

Tabulka 19 - Srovnávací měření HPLC, 6 vzorků jedné šarže, každý vzorek 2 nástřiky

## **5. ZÁVĚR**

Byl vypracován postup separace a následného stanovení betamethasonu a chloramfenikolu v očních kapkách BETABIOPTAL®. Analýza probíhala za použití mobilní fáze acetonitril/voda (30:80, v/v) o pH = 5, s nastavenou rychlostí průtoku 0,6 ml min<sup>-1</sup> a vlnovou délkou detekce 241 nm pro betamethason a 278 nm pro chloramfenikol. Vnitřním standardem s podobnými vlastnostmi jako obě účinné látky byl zvolen z třinácti testovaných látek propylparaben. V první fázi vývoj separačního procesu probíhal na HPLC. Získané údaje byly v další fázi práce přeneseny na SIA systém. Monolitická kolona Chromolith<sup>(TM)</sup> Flash RP - 18e, 25 x 4,6 mm s 5 mm předkolonou (Merck, Germany) byla zapojena mezi vícecestný ventil konvenčního (SIA) systému a průtokovou Z celu. Nejprve byl vytvořen postup krok za krokem v programu Fialab for Windows 5.0, podle kterého poté probíhala přesně naprogramovaná separační analýza. Optimalizovaná metoda byla před vlastním měřením validována, což dokládají následující údaje. Limit detekce byl pro betamethason 1,0 mg/l, pro chloramfenikol 0,5 mg/l a pro vnitřní standard propylparaben 1,0 mg/l. Limit kvantifikace byl pro betamethason 3,33 mg/l, pro chloramfenikol 1,66 mg/l a pro propylparaben 3,33 mg/l. Lineární odezvu absorbance u koncentrací 2,5 mg/l – 150 mg/l pro betamethason, chloramfenikol a propylparaben charakterizuje korelační koeficient větší než 0,999. Opakovatelnost měření absorbance byla zkoumána u osmi nástřiků každé látky při koncentracích 5,00 mg/l, 25,00 mg/l a 50,00 mg/l. Z odezvy signálu píků jednotlivých látek byla vypočítána relativní směrodatná odchylka (RSD) stanovení jednotlivých látek pro jednotlivé koncentrace, která nepřesáhla 7,6 %. Opakovatelnost měření pro retenční časy za stejných podmínek vykazovala relativní směrodatnou odchylku (RSD) nižší než 0,9 %. Přesnost systému pro stanovení šesti vzorků vykazovala relativní směrodatnou odchylku 0,8 % u betamethasonu a 2,55 % u chloramfenikolu. Délka jedné analýzy byla kratší než 500 sekund.

Problém s nízkou výtěžností BE při ředění kapek mobilní fází byl vyřešen vhodnou kombinací použitých rozpouštědel se současným

okyselením a sonikací během přípravy vzorku. Původní průměrná 75 % výtěžnost BE byla pak za optimálních podmínek zvýšena na hodnotu blízko 100 % (resp. 100,3 %) .

Většina validačních parametrů splňovala podmínky kladené na analytickou metodu, pouze opakovatelnost měření pro nejnižší koncentraci dvakrát překročila povolenou mez 5 % v případě BE (5,73 %) a PP (7,61 %).

Po porovnání výsledků stanovení SIC metodou byla navržena nová HPLC metoda s odlišnými separačními podmínkami (kolona i mobilní fáze).

Experimentálně zjištěné srovnatelné výsledky metod SIC a HPLC potvrdily předpokládanou možnost separovat a stanovit obsah účinných látek ve farmaceutickém přípravku BETABIOPTAL<sup>®</sup>, místo finančně nákladnější separační metody HPLC, nízkoekonomickým systémem SIC se zapojenou monolitickou kolonou.

Metoda SIC byla shledána jako možnou alternativní metodou pro stanovení účinných látek ve složených farmaceutických přípravcích.

## **6. SEZNAM LITERATURE**



- <sup>1</sup> Lékopisná komise MZ.: Český lékopis (2002), Grada publishing Praha, 2., 1147 - 1346
- <sup>2</sup> Kolektiv autorů.: Pharmindex Kompendium (2001), MediMedia Information, 314
- <sup>3</sup> Kolektiv autorů.: Remedium (1996), Panax, 292 - 478
- <sup>4</sup> Lincová, D., Faughali, H.: Základní a aplikovaná farmakologie (2002), Galén, 373 - 446
- <sup>5</sup> <http://chromolith.com>, listopad 2006
- <sup>6</sup> Paseková, H., Polášek, M., Solich, P.: Sekvenční injekční analýza (1999), Chemické Listy, 93, 354 - 359
- <sup>7</sup> <http://www.sukl.cz/>, listopad 2006
- <sup>8</sup> <http://www.flowinjection.com>, listopad 2006
- <sup>9</sup> Šatínský, D., Huclová, J., L.C. Ferreira, R., Montenegro, B.S.M., Solich, P.: Determination of ambroxol hydrochloride, methyparaben and benzoic acid in pharmaceutical preparations based on sequential injection technique coupled with monolithic column (2006), Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 40, 287-293
- <sup>10</sup> Šatínský, D., Neto, I., Sklenářová, H., Conceição, Montenegro, B.S.M., Solich, P.: Sequential injection chromatographic determination of paracetamol, caffeine and acetylsalicylic acid in pharmaceutical tablets (2004) Journal of Separation Science, 27, 529-536
- <sup>11</sup> Santosa Sérgio, M., Henriquesa, M., C. Duartea, A., Esteves, V.: Development and application of a capillary electrophoresis based method for the simultaneous screening of six antibiotics in spiked milk samples (2007), Talanta, 71, 731-737
- <sup>12</sup> Saad Hassan S. M., Eldesouki M. H.: Determination of chloramphenicol in pharmaceutical preparations by the cadmium ion-selective electrode, spectrophotometry and atomic-absorption spectrometry (1979), Talanta, 26, 531-536

- <sup>13</sup> Šatínský, D., Solich, P., Chocholouš, P., Karlíček, R.: Monolithic columns – a new concept of separation in the sequential injection technique (2003), *Analitica Chimica Acta*, 499, 205 - 214
- <sup>14</sup> Šatínský, D., Huclová J., Solich, P., Karlíček, R.: Reversed - phase Porous silica rods, an alternative approach to high – performance liquid chromatographic separation using the sequential injection chromatography technique (2003), *Journal of Chromatography*, 1015, 239 - 244
- <sup>15</sup> Šatínský, D., Huclová J., Karlíček, R.: Coupling of monolithic columns with sequential injection technique a new separation approach in flow methods (2003), *Analitica Chimica Acta*, 494, 133 - 140
- <sup>16</sup> Klimundová, J., Šatínský, D., Sklenářová, H., Solich, P.: Automation of simultaneous release test of two substances by sequential injection chromatography coupled with Franz cell (2006), *Talanta*, 69, 730 - 735
- <sup>17</sup> Šatínský, D., Santos, L., Sklenářová, H., Solich, P., Montenegro, B.S.M., Araújo A.: Sequential injection chromatographic determination of ambroxol hydrochloride and doxycycline in pharmaceutical preparations (2005), *Talanta*, 68, 214 - 218
- <sup>18</sup> Chocholouš, P., Šatínský, D., Solich, P.: Fast simultaneous spectrophotometric determination of naphazoline nitrate and methylparaben by sequential injection chromatography (2006), *Talanta*, 70, 408 - 413
- <sup>19</sup> Santos-Montes, A., Gasco-López, A. I., Izquierdo - Hornillos, R.: Simultaneous determination of dexamethasone and betamethasone in pharmaceuticals by reversed - phase HPLC (2005), *Chromatographia*, 39, 539 - 542
- <sup>20</sup> Henion, J., Maylin, G.A., Thomson B.A.: Determination of drugs in biological samples by thin - layer chromatography - tandem mass spectrometry (1983), *Journal of Chromatography*, 271, 107-124

- <sup>21</sup> Santos, L., Barbosa, J., Castilho M., Ramos, F., Ribeiro, C.A.F.: Determination of chloramfenikol residues in rainbow trouts by gas chromatography – mass spectrometry and liquid chromatography tandem mass spectrometry (2005), *Analitica Chimica Acta*, 529, 249 - 256
- <sup>22</sup> Catala Icarda, M., Miscewicz, M., Cincu, A., García Mateo, J.V., Calatayud, M.: Photochemical reaction for direct chemiluminescence determination of photodegradable chloramfenikol (2003), *Talanta*, 60, 404 - 414
- <sup>23</sup> Shen, H – Y., Liang, H – L.: Screening, determination and confirmation of chloramfenikol in seafood, meat and honey using ELISA, HPLC – UVD, GC – ECD (2005), *Analitica Chimica Acta*, 535, 33 - 41
- <sup>24</sup> Bautista, J.A.G., Metco, J.V.G., Calatayud, J.M.: Flow injection biamprometric determination of chloramfenikol and related nitro compound by on – line chemical photodegradation (2000), *Analytica Chimica Acta*, 404, 141 – 150