

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
FARMACEUTICKÁ FAKULTA
V HRADCI KRÁLOVÉ

Katedra farmaceutické chemie

a

kontroly léčiv

RIGORÓZNÍ PRÁCE

HPLC HODNOCENÍ FUMAGILLINU
V LÉČIVÉM PŘÍPRAVKU



Hradec Králové 2008

Mgr. Kristýna Strýčková

Tímto bych chtěla poděkovat vedoucímu mé rigorózní práce RNDr. Milanovi Mokrému, CSc. za všestrannou pomoc, trpělivost, neocenitelné rady a odborné vedení při vypracovávání rigorózní práce.

1. ÚVOD	4
2. TEORETICKÁ ČÁST	7
2.1. Definice chromatografických metod a jejich rozdělení	8
2.2. Základní charakteristiky chromatografického procesu	14
2.3. Vysokoúčinná kapalinová chromatografie	18
2.3.1. <i>Přístroje a vybavení v HPLC</i>	19
2.3.1.1. Zásobníky mobilní fáze	19
2.3.1.2. Čerpadla mobilní fáze	20
2.3.1.3. Dávkovací zařízení	20
2.3.1.4. Chromatografické kolony a jejich náplně	21
2.3.1.5. Typy detektorů	22
2.3.1.6. Zařízení pro zpracování dat	25
2.3.2. <i>Kvalitativní a kvantitativní analýza v HPLC chromatogramu</i>	25
2.4. Validace analytických metod	27
2.5. Vlastnosti fumagillinu	30
2.5.1. <i>Fyzikálně-chemické vlastnosti fumagillinu</i>	31
2.5.2. <i>farmakologické vlastnosti fumagillinu</i>	31
2.5.3. <i>Přehled prací zabývajících se analýzou fumagillinu</i>	33
2.5.4. <i>Přehled prací zabývajících se fumagillinem</i>	34
2.6. Stabilita léčiv	36
2.6.1. <i>Faktory ovlivňující stabilitu léčiv a léků</i>	36
2.6.2. <i>Testy stability</i>	37
3. CÍL PRÁCE	38
4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	40
4.1. Použitý chromatografický materiál, přístroje, pomůcky a chemikálie	41
4.2. Vývoj chromatografických podmínek pro stanovení fumagillinu	43
4.2.1. <i>Validace metody</i>	47
4.2.2. <i>Stabilita</i>	48
5. VÝSLEDKY A DISKUZE	49
5.1. Vývoj chromatografických podmínek pro HPLC analýzu fumagillinu	50
6. ZÁVĚR	63
7. LITERATURA	65
SOUHRN	70
ABSTRAKT	71

1.ÚVOD

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

Vysokoučinná kapalinová chromatografie – High Performance Liquid Chromatography (HPLC) je v současné době jedna z nejprogresivnějších, nejmodernějších a nejvíce používaných analytických metod. Jedná se o separační metodu umožňující kvalitativní i kvantitativní hodnocení analyzovaných látek. Hlavní přednosti HPLC spočívají v citlivosti stanovení, rychlosti analýzy, použití minimálního množství vzorku. Jednou z dalších velkých předností je možnost automatizace. Současné nejmodernější HPLC chromatografy jsou vybavené automatickými dávkovači, které mohou po nastavení příslušných parametrů provádět analýzu bez obsluhy operátora. HPLC umožňuje analyzovat širokou škálu sloučenin od anorganických iontů až po polymerní sloučeniny, dále také termolabilní a netěkavé sloučeniny. Z těchto důvodů je využívání HPLC velmi široké. Je srovnatelná s GC, avšak má větší využití, protože řada léčiv je netěkavá.

Fumagillin je antibiotické léčivo používané pro léčbu nosemové nákazy včel, jejímž původcem je *Nosema apis*. Je též účinný u infekcí způsobených prvoky např. infekce vyvolané výtrusovci (Apicomplexa) třídy hromadilek. U člověka není pro systémové použití schválen, avšak je jednou z látek s nejvyšším účinkem na mikrosporidiové infekce HIV-pozitivních pacientů. Z tohoto důvodu jsou připravovány analoga a deriváty s nižší toxicitou pro člověka, ale se zachovanou vysokou antisporicidní aktivitou. Též působí jako inhibitor angiogeneze. V ČR byla ukončena registrace 29.11.1999, avšak uvažuje se o celoevropské registraci za nově stanovených podmínek.

2.TEORETICKÁ ČÁST

2.1. Definice chromatografických metod a jejich rozdělení

Chromatografické metody jsou jednou z nejrozšířenějších analytických metod umožňující účinnou separaci látek nutnou pro spolehlivou identifikaci a kvantifikaci složek sledovaného vzorku. Jejich přednosti vyniknou především při analýzách směsí látek, kdy ostatní analytické metody, jako např. spektrofotometrické, nelze principiálně použít. Jelikož veškeré technické produkty a velká většina přírodních látek jsou složité směsi, mají chromatografické metody analýzy prvořadý význam.⁽¹⁾

K rozdělení látek dochází na základě jejich různé pohyblivosti v systému dvou fází – stacionární (zakotvené) a mobilní (pohyblivé). Různé látky se liší ve svých adsorpčních vlastnostech, v hodnotách rozdělovacích koeficientů, ve svých rozměrech či ve svých nábojích, což lze vše využít v chromatografii k jejich rozdělení na vhodném chromatografickém zařízení. Stacionární fází může být pevná látka (papír, SiO_2 , Al_2O_3), ale i kapalná fáze zakotvená na pevném nosiči, mobilní fází pak bývá kapalina či plyn.⁽¹⁾

V současné době se používá mnoho typů chromatografických metod, které se liší z hlediska povahy

- Separáčního děje
- Použité techniky
- Způsobu vyvíjení
- Skupenství pohyblivé a nepohyblivé fáze⁽²⁾

DĚLENÍ DLE POVAHY SEPARAČNÍHO PROCESU

Název chromatografické metody	Povaha hlavního (určujícího) procesu
adsorpční	adsorpce
rozdělovací	extrakce, rozpouštění
iontově výměnná	elektrolytická interakce a difúze
gelová	difúze
afinitní	specifická interakce s afinantem

- **ADSORPČNÍ**

Je založena na různé schopnosti látek v roztoku adsorbovat se na povrchu pevné fáze - adsorbentu (říkáme, že látky mají různou afinitu k adsorbentu). Je to tedy chromatografie ve fázi pevná látka - kapalina. Chromatografie probíhá ve dvou stupních - v prvním stupni dojde k adsorpci látek na adsorbent podle jejich afinity k adsorbentu (látky s větší afinitou se zachytí dříve), ve druhém stupni je třeba látky z vazby na sorbent uvolnit, desorbovat, což se provádí buď prostou elucí (vymytím) nebo vytěsněním roztokem látky, která má k adsorbentu větší afinitu než navázaná látka. Způsob a síla adsorpce závisí na povaze adsorbentu, na chemickém složení adsorbované látky a také na složení mobilní fáze. Podle fyzikálně chemické povahy můžeme adsorbenty dělit na polární a nepolární. Mezi polární patří: oxidy a soli. Mezi nepolární: aktivní uhlí, silikagel s chemicky vázanou nepolární fází.⁽³⁾

Závislost mezi množstvím neadsorbované látky a její koncentrací v roztoku vyjadřuje adsorpční izoterma. K rozdělení látek ze směsi dojde, jestliže jsou různě silně adsorbovány, tj. jejich adsorpční izotermy mají různé směrnice.⁽²⁾

- **ROZDĚLOVACÍ**

Směs složek, která je rozpuštěná v soustavě dvou nemísitelných nebo omezeně mísitelných kapalných fází, se mezi ně dělí podle rozpustnosti jednotlivých složek v jednotlivých fázích. Distribuce složek je určována pomocí rozdělovací konstanty. Účinnost dělení složek je úměrná velikosti rozdílu v jejich rozdělovacích konstantách. Jedna fáze je stacionární (zakotvená), druhá fáze se po jejím povrchu zvolna pohybuje - jedná se tedy o fázi mobilní neboli pohyblivou. Tyto dvě fáze musí být vzájemně nasyceny, tj. musí být v rovnováze, aby během chromatografického procesu nedocházelo ke koncentračním změnám použitého rozpouštědlového systému.⁽³⁾

Při rozdělovací chromatografii se zpravidla užívá dvoufázový systém, přičemž jedna fáze bývá bohatší na organická rozpouštědla a druhá na vodu. Při normálním uspořádání je stacionární fáze vodná (nebo fáze s vodou mísitelná), fází mobilní pak fáze nepolární. Nosiči stacionární fáze mohou být látky, které jsou schopny adsorbovat značné procento vody, aniž by se změnilo jejich skupenství (zůstávají stále v pevném stavu). Takových látek je celá řada, např. neklížený papír, silikagel, dextransy, křemelina, škrob, prášková celulóza nebo filtrační papír apod. Toto uspořádání umožňuje separovat směsi látek ve vodě rozpustných. V některých případech je však výhodnější nasycit hydrofobně impregnovaný nosič organickou fází a fází vodnou volit jako mobilní. Jedná se o tzv. systém obrácených fází (RP-reversed phase), při němž se stacionární fáze stává fází nepolární. Tento systém se používá v kapalinové chromatografii nejčastěji a je vhodný k dělení méně polárních látek.⁽³⁾

- **IONTOVĚ VÝMĚNNÁ**

Iontově výměnná chromatografie probíhá na iontoměničích. Ion iontoměniče je vyměněn za ion obsažený v mobilní fázi nebo ve vzorku. Separace probíhá na principu soutěžení ionexu o tyto ionty.

Jedná se o separaci iontů, a proto je vždy používána vodná mobilní fáze. Stacionární fáze - (iontoměnič, ionex) je zpravidla makromolekulární matrice, která obsahuje kyselou nebo bazickou funkční skupinu. Katexy jsou iontoměniče s kyselou funkční skupinou (sulfokyselina, karboxylová kyselina), které nesou záporný náboj, anex obsahuje bazickou funkční skupinu (aminoskupinu) a je nositelem kladného náboje. Ion, který je obsažený v ionexu bývá vyměněn za ion obsažený v mobilní fázi nebo ve vzorku a na principu soutěžení ionexu o tyto ionty dochází k separaci.

Podobně probíhá také ligandová výměna, kdy na iontoměniči, obvykle katexu, je zachycen iontovou výměnou vhodný kov, a na takto upravenou kolonu se přivádí mobilní fáze obsahující látku schopnou vytvářet s vázaným kovem komplex (ligand). Iontoměničová technika se využívá jak při přípravě vzorků pro chromatografické analýzy (SPE), tak v HPLC, zřídka v plošném uspořádání kapalinové chromatografie.⁽⁴⁾

- **GELOVÁ**

Gelovou chromatografií se dělí látky podle velikosti molekul. Stacionární fáze je gel a stacionární i mobilní fází je voda, tedy systém voda - voda. Stacionární fáze je však uzavřena v gelu, čímž je zajištěna nemísitelnost s fází mobilní. Díky tomuto speciálnímu uspořádání se zcela mění charakter separace, neboť separaci podle rozdělovacího koeficientu podléhají pouze látky, které proniknou póry gelu k stacionární fázi. Separace tedy probíhá na základě tvaru a velikosti molekul látek ve směsi. Protože látky, které proniknou dovnitř gelu musí opět difundovat ven a ve svém postupu kolonou se zdrží, postupují kolonou nejrychleji látky s velkou molekulou, které nejsou schopny póry gelu projít.⁽³⁾

- **AFINITNÍ**

Afinitní chromatografie využívá biologických schopností látek specificky a vratně vázat jiné látky. Hlavní specificky působící složkou je afinitní ligand kovalentně vázaný na pevný nosič. Při prolití kolony roztokem, který obsahuje biologicky aktivní látku určenou k izolaci, se zachytí pouze tato biologicky aktivní složka. Specificky sorbovaná látka je eluována pomocí rozpustného afinantu nebo změnou složení mobilní fáze. Jako afinanty se nejčastěji používají různé peptidy, aminokyseliny, enzymy, antigeny, protilátky.⁽⁵⁾

DĚLENÍ DLE POUŽITÉ TECHNIKY

- **FRONTÁLNÍ**

Tento způsob chromatografie spočívá ve stálém přivádění roztoku dělené směsi na kolonu až do konce chromatografického procesu. Například u tříslučkové směsi z kolony zprvu vychází jen čistá mobilní fáze. Poté se objeví a trvale vytéká složka A, která má nejmenší afinitu ke stacionární fázi, a je proto nejméně bržděna. Později

začne vytékat směs A+B, jestliže složka B má středně velkou afinitu, a nakonec po nasycení stacionární fáze složkou C, která má největší afinitu, vytéká roztok obsahující složky A+B+C ve stejném složení, v jakém byl přiváděn na kolonu. Tato metoda byla vyvinuta k účelům analytickým.⁽⁶⁾

- **ELUČNÍ**

Na kolonu se vnese jen malá část roztoku směsi (např. A,B,C) a kolona se eluuje mobilní fází (rozpuštědlem) E, která má ke stacionární fázi menší afinitu než kterákoliv ze složek. Každá složka se může vymývat nezávisle na druhých, nemusí jedna druhou vytěšňovat. Složky vytékají také v pořadí podle afinit. Jejich zóny jsou proto při postupu kolonou velmi často odděleny zónou čisté mobilní fáze, nedotýkají se. Složky opouštějí kolonu ve formě zcela oddělených píků.⁽⁶⁾

Eluční chromatografie může být ve 3 variantách

1. **prostá (izokratická)** - k eluci se používá stále stejná mobilní fáze. Tato metoda je vhodná tehdy, když se dělené látky od sebe příliš neliší v afinitě ke stacionární fázi, takže jejich zóny se elují v nepříliš dlouhých intervalech.⁽²⁾
2. **vícetupňová** - při eluci méně polárním rozpouštědlem se elují dobře některé složky, jiné jsou příliš sorbovány a pro jejich eluci se zvolí polárnější rozpouštědlo.
3. **gradientová** - při eluci se postupně plynule mění koncentrace polárnější složky v mobilní fázi nebo pH mobilní fáze. Tento způsob se používá hlavně při dělení komplikovanějších směsí a jeho cílem je zkrácení doby analýzy a získání ostřejšího rozdělení látek.⁽²⁾

- **VYTĚŠŇOVACÍ**

Principem této metody je to, že se na chromatografickou kolonu jednorázově vnese jen část chromatografické směsi (např. obsahující v roztoku složky A,B,C), potom se až do konce chromatografování kontinuálně přivádí roztok látky D, která má ke stacionární fázi větší afinitu. Proto tato látka (vytěšňovadlo) uvolňuje ze stacionární fáze všechny předem zadržené složky. Složka A, která má nejmenší afinitu, opouští kolonu první. Jako poslední vytéká vytěšňovadlo D.⁽⁶⁾

DĚLENÍ DLE ZPŮSOBU VYVÍJENÍ

- Chromatografie sloupcová
- Chromatografie v plošném uspořádání – **tenkovrstvá** – stacionární fáze je kapalina zachycená na tenké vrstvě a mobilní fáze je také kapalina
 - **na papíře** – stacionární fáze je kapalina zachycená v papíře a mobilní fáze je též kapalina⁽⁶⁾

DĚLENÍ DLE SKUPENSTVÍ POHYBLIVÉ FÁZE

- Chromatografie kapalinová – mobilní fází je kapalina a stacionární fází je nemísitelná kapalina nebo pevná látka
- Chromatografie plynová – mobilní fází je plyn a stacionární fází je kapalina nebo pevná látka⁽²⁾

DĚLENÍ DLE ÚČELU

- Chromatografie analytická
- Chromatografie preparativní

2.2. Základní charakteristiky chromatografického procesu

Charakteristickou veličinou pro každou chromatografickou látku v daném chromatografickém systému je retenční čas t_R nebo retenční objem V_R . Retenční čas je doba, která uplyne od nástřiku vzorku po dosažení maxima eluční křivky a retenční objem je proteklý objem mobilní fáze za tuto dobu. Tyto dvě veličiny spolu souvisejí vztahem :

$$V_R = t_R \cdot F_M$$

kde F_m je objem mobilní fáze proteklé kolonou za jednotku času (objemová rychlost toku).

Retenční objem V_R je dán součtem dvou objemových veličin

$$V_R = V'_R + V_M$$

kde V'_R je redukovaný retenční objem (někdy bývá označován jako skutečný retenční objem) a V_m - mrtvý objem představující celkový objem, který zaujímá mobilní fáze od místa nástřiku přes kolonu až po detektor. V_R můžeme také nazývat zdánlivým elučním objemem. Mrtvý objem se zjistí experimentálně jako retenční objem nesorbující se látky.

Analogicky platí tento vztah i pro retenční čas:

$$t_R = t'_R + t_M$$

kde t'_R je skutečný retenční čas a t_M je mrtvý čas kolony, tj. čas látky, která se v koloně nezadržuje.

V literatuře se často uvádějí tzv. eluční (retenční) poměry. Je to v podstatě poměr redukovaného elučního objemu látky 2 k redukovatelnému retenčnímu objemu látky 1.⁽⁷⁾

$$r_{1,2} = \frac{V'_{R2}}{V'_{R1}}$$

K charakterizaci retence se používá bezrozměrná veličina K označovaná jako kapacitní poměr, pro niž platí následující vztahy:

$$K = \frac{V_R - V_M}{V_M} = \frac{V'_R}{V_M} = \frac{t_R - t_M}{t_r} = \frac{t'_R}{t_M}$$

Kapacitní poměr je veličina, která vyjadřuje poměr celkového množství chromatografované látky ve stacionární fázi k celkovému množství látky ve fázi

mobilní a je přímo úměrná konstantě K_D , která je vyjádřením poměru koncentrací chromatografované látky v obou fázích. Pro kapacitní poměr platí :

$$K = K_D \cdot \frac{V_S}{V_M} = K_D \cdot S$$

V_S je objem stacionární fáze, V_M je objem mobilní fáze v koloně a S je označení pro fázový poměr v koloně.⁽⁸⁾

K popisu účinnosti separace látek se používá veličina rozlišení R_S :

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

t_{R1} a t_{R2} – retenční časy nebo vzdálenosti podél základní linie od bodu nástřiku ke kolmicím spuštěným z vrcholů dvou sousedních píků, w_{h1} a w_{h2} – šířka píku v poloviční výšce. Rozlišení větší než 1,5 odpovídá rozdělení píků na základní linii.

K hodnocení účinnosti kolony se používá zdánlivý počet teoretických pater N . Při výpočtu množství teoretických pater se vychází z retenčního času t_R testované látky a ze šířky píku w_h při jeho bázi.

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

Ke srovnání účinnosti různých kolon se užívá parametru výškový ekvivalent teoretického patra H , který se vypočítá z délky kolony L vyjádřené v metrech a z počtu teoretických pater N :

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

Výškový ekvivalent teoretického patra je určován řadou parametrů jako je např. teplota, viskozita mobilní fáze, vlastnosti chromatografované látky, přičemž nejdůležitějším parametrem je průtoková rychlost mobilní fáze kolonou. Průtoková rychlost U je charakterizována známou Van DEEMTEROVOU rovnicí :

$$H = A + \frac{B}{U} + CU$$

kde A je příspěvek turbulentní difúze, B je příspěvek molekulární difúze, C je příspěvek odporu vůči převodu hmoty k výškovému ekvivalentu teoretického patra. Aby separace byla účinná, hodnoty H by měly být v rozmezí 0,01-1,00 mm. Dalšími faktory ovlivňujícími tuto veličinu je mimokolonový mrtvý objem a objem analyzovaného vzorku.

Dosažením výše uvedených rovnic do vztahu pro parametr rozlišení dvou píků je možné odvodit a popsat tři faktory, na kterých je rozlišení závislé. Je to účinnost, selektivita a kapacita:

$$R_s = \left[\frac{\sqrt{N}}{4} \right] \cdot \left[\frac{r-1}{r} \right] \cdot \left[\frac{D_m}{1+D_m} \right]$$

Dalším důležitým faktorem je selektivita kolony, která je vyjádřena relativní retencí r . Je mírou relativní separace 2 složek směsi.

$$r = \frac{t_{R2} - t_M}{t_{R1} - t_M} = \frac{t'_{R2}}{t'_{R1}}$$

t_{R2} retenční čas sledovaného píku, t_{R1} retenční čas referenčního píku (obvykle pík odpovídající zkoušené látce), t_M mrtvý čas nebo vzdálenost podél základní linie od bodu nástřiku ke kolmici spuštěné z vrcholu píku odpovídajícího nezadržované složce.

Faktor symetrie píku A_s se vypočítá ze vzorce:

$$A_s = \frac{w_{0,05}}{2d}$$

$w_{0,05}$ je šířka píku v jedné dvacetině jeho výšky, d je vzdálenost mezi kolmicí spuštěnou z vrcholu píku a vzestupnou částí píku v jedné dvacetině jeho výšky. Hodnota faktoru symetrie 1,0 značí úplnou (ideální) symetrii píku.^(7,8,9,10)

Poměr signálu k šumu (S/N), který ovlivňuje přesnost stanovení obsahu složek, se vypočítá ze vzorce:

$$\frac{S}{N} = \frac{2H}{h}$$

H je výška píku odpovídajícího dané látce na chromatogramu předepsaného porovnávacího roztoku měřenou od vrcholu píku k extrapolované základní linii signálu, který se sleduje na vzdálenosti rovné dvacetinásobku šířky píku v polovině jeho výšky, h je rozpětí šumu pozadí na chromatogramu získaného při slepé zkoušce a zaznamenávaného na vzdálenosti rovné dvacetinásobku šířky píku v polovině jeho výšky na chromatogramu předepsaného porovnávacího roztoku, a to pokud možno rovnoměrně na obě strany od místa, kde by se měl nacházet sledovaný pík.⁽¹¹⁾

Opakovatelnost odezvy se vyjadřuje jako odhad relativní směrodatné odchylky ($RSD\%$) v procentech pro řadu následných měření porovnávacího roztoku a vypočítá se ze vzorce:

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

y_i jsou jednotlivé hodnoty vyjádřené jako plocha píku, výška píku nebo poměr ploch u metody vnitřního standardu; \bar{y} - průměr jednotlivých hodnot; n - počet jednotlivých hodnot.

Test způsobilosti systému představuje nedílnou součást metody a slouží k zajištění přiměřené účinnosti chromatografického systému. Pro hodnocení účinnosti kolony se používají následující parametry: zdánlivá účinnost, kapacitní faktor, rozlišení, relativní retence a faktor symetrie. Faktory, které mohou ovlivnit chromatografické chování, zahrnují složení mobilní fáze, její iontovou sílu, teplotu a zdánlivé pH, průtokovou rychlost, délku kolony, teplotu a tlak, charakteristiku stacionární fáze, včetně porozity, velikosti a typu částic, specifického povrchu a u nosičů používaných v chromatografii s obrácenými fázemi rozsah chemické modifikace (odstranění povrchových silanolových skupin, obsah vázaného uhlíku atd.).^(10,11)

2.3. Vysokoučinná kapalinová chromatografie

Vysokoučinná kapalinová chromatografie - High Performance Liquid Chromatography (HPLC) se řadí mezi nejčastěji používané separační metody. Vyniká vysokou účinností, dobrou opakovatelností a robustností. HPLC je široce využívána ve všech moderních lékopisných monografiích. Tato metoda je vhodná pro dělení netěkavých a polárních látek, jejichž analýza příbuznou plynovou chromatografií bývá obtížná.⁽¹²⁾

Chromatografie využívá dělení analyzovaných látek mezi dvěma fázemi, z nichž jedna je stacionární - nepohyblivá a druhá je mobilní - pohyblivá. V průběhu chromatografického procesu dochází k postupnému, mnohokrát opakovanému vytváření rovnovážných stavů dělených látek mezi stacionární fází, která je v koloně nebo plošné vrstvě, a mobilní fází, která unáší separované látky. Při styku stacionární i mobilní fáze s dělenými látkami dochází k vzájemným interakcím, které jsou základním předpokladem separace. Uplatňují se interakce analytů s mobilní fází, interakce mobilní fáze se stacionární a sorpce analytů na stacionární fázi.⁽¹²⁾

Vývoj

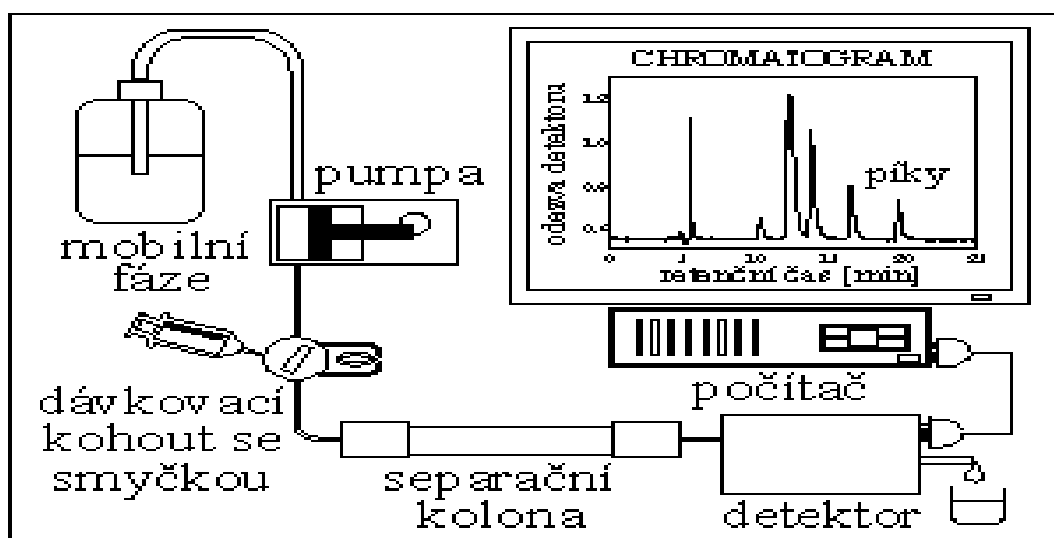
Základy chromatografie položil ruský botanik, fyziolog a biochemik M.S. Cvet v roce 1906, který jako první rozdělil na sloupci sorbentu chlorofyl na jeho složky: chlorofyl a, chlorofyl b a karotenoidy. Na jeho pracích jsou založeny všechny pozdější chromatografické techniky.

Teprve začátkem čtyřicátých let, po objevení rozdělovací chromatografie, se kolonová kapalinová chromatografie rozvinula ve své klasické podobě. V roce 1952 dokonce Martin a Synge dostali za své práce v oboru chromatografie Nobelovu cenu za chemii. Používaly se kolony s náplní tvořenou hrubými částicemi (o průměru 100 až 200 μm i více), mobilní fáze kolonou protékala jen působením gravitační síly a eluát se musel odebírat po frakcích. Začátkem padesátých let byly prvními kapalinovými chromatografy analyzovány aminokyseliny. V polovině šedesátých let se objevily první gelové chromatografy. Koncem šedesátých let, začátkem sedmdesátých let došlo k prudkému rozvoji teorie a instrumentace kapalinové chromatografie a na trh byly uvedeny komerční přístroje, které umožnily práci při zvýšených tlacích. Rozvoj mikroelektroniky umožnil detekci na podkladě kontinuálního měření absorpce záření v UV, či VIS oblasti. Mohutné zvýšení

separační účinnosti analytických kolon bylo uskutečněno v první polovině sedmdesátých let za použití techniky plnění kolon tříděnými mikroparticulárními sorbenty o velikosti částic 5-10 μm .^(6,7,9)

2.3.1. Přístroje a vybavení v HPLC

Kapalinový chromatograf se skládá z těchto částí: 1- část zabezpečující transport mobilní fáze (zásobníky mobilní fáze, vysokotlaké čerpadlo s čidlem pro měření tlaku), 2- část zajišťující dávkování vzorku (manuální či automatické), 3- část zajišťující separaci látek (chromatografická kolona), detekci, registraci signálu a vyhodnocování chromatografického záznamu (průtokový detektor, integrátor, případně počítač a tiskárnu).⁽¹³⁾



2.3.1.1. Zásobníky mobilní fáze

Při izokratické eluci je mobilní fáze vedena z jednoho ze zásobníků do vysokotlakého čerpadla. Při gradientové eluci se přiváděná mobilní fáze z obou (nebo i většího počtu) zásobníků mísí podle programu ve směšovači zařazeném buď před a nebo za vysokotlakým čerpadlem.⁽⁷⁾

Mobilní fáze (zpravidla směsi organických rozpouštědel nebo vodné roztoky pufrů) se před použitím filtrují (odstranění nečistot) a odplyňují (např. s použitím ultrazvukové lázně). Do systému HPLC jsou čerpány nejčastěji ze skleněných lahví, ale také z plastu (polyethylen, polypropylen) nebo nerezové oceli. Do lahve zasahuje čerpací hadička opatřená často skleněnou fritou, zároveň mobilní fáze z důvodu dokonalého a soustavného odplyňování trvale probublává hélium (jinou alternativou

odplyňování je použití membránového degasseru). Zásobník mobilních fází má maximálně čtyři pozice pro současné čerpání a směšování mobilních fází.⁽¹⁴⁾

2.3.1.2. Čerpadla mobilní fáze

Obecným požadavkem na funkci čerpadel je, aby dávkování bylo plynulé, tj. bez pulsů, které by mohly způsobit výkyvy v detektoru. Dále musí čerpadlo zajistit konstantní průtok, který umožňuje kvalitativní i kvantitativní analýzu. Zároveň je potřeba, aby konstrukční materiál byl chemicky odolný proti korozivním účinkům.
(7,10,15)

Moderní instrumentace umožňuje pracovat s tlaky až 60 MPa. Důležitá je vysoká přesnost a reprodukovatelnost průtoků v celé škále pracovních tlaků. Čerpadla bývají dělena na pulzní a bezpulzní, používají se pístová, membránová nebo pístově membránová. Konstrukční řešení v kombinaci s automatickým ovládním zpravidla uspokojivě řeší minimalizaci pulzů, materiálem pro výrobu čerpadel v HPLC je nejčastěji nerezová ocel, safír, titan, keramika.⁽¹⁴⁾

V kapalinové chromatografii se využívá dvou modů čerpání mobilních fází:

a) isokratický, kdy je za stálého průtoku čerpána jedna mobilní fáze (jednosložková nebo vícesložková předem smíchaná). Alternativně lze čerpat zároveň ze dvou až čtyř rezervoárů při konstantním poměru složek a konstantním průtoku.

b) gradientový, kdy v průběhu jedné analýzy lze programovaně měnit složení i průtok mobilní fáze. Kvalitní chromatografické zařízení synchronizuje činnost ventilů a čerpadel tak, aby gradientový profil byl reprodukovatelný.⁽¹⁴⁾

2.3.1.3. Dávkovací zařízení

Kvalita separace látek na chromatografické koloně závisí od kvality dávkování vzorku. Krátké a rychlé dávkování zvyšuje předpoklad dosažení úzkých, ostrých elučních vln. Nástřiková zařízení se musí vyrovnat s vysokými tlaky na koloně. Používají se především dávkovací vysokotlaké ventily se smyčkou, která je součástí dvoupolohového ventilu umožňujícího změnu toku mobilní fáze do kolony. Dobře vybavená chromatografická zařízení mají k dispozici autosamplery se zásobníkem vzorků (nejlépe s temperací) a s programovatelnou derivatizací vzorku před analýzou.

Automatické dávkovací zařízení výrazně zvyšuje produktivitu práce. Jeho součástí je zásobník, který bývá často na několik desítek vzorků, a dávkování je řízeno programem.⁽¹⁴⁾

2.3.1.4. Chromatografické kolony a jejich náplně

Kolony pro HPLC jsou z materiálu, který musí odolávat relativně vysokým pracovním tlakům a zároveň chemickému působení mobilních fází a separovaných složek. Materiálem chromatografických kolon je většinou antikorozi ocel nebo speciálně tvrzené borosilikátové sklo, lze použít i kombinaci obou materiálů. Pro analytické aplikace se převážně používají kolony plněné pórovitými náplněmi o průměru 3-10 μm o délce 5-30 cm a vnitřním průměrem 3-4 mm. Účinnost separace, doba analýzy a pracovní tlak se zvyšují s rostoucí délkou kolony a naopak klesají s rostoucím průměrem částic náplně. Při práci s kolonami o průměru menším než 2 mm se jedná o tzv. mikrokolonovou kapalinovou chromatografii, jejíž výhodou je hlavně snížení spotřeby mobilní fáze i vzorku a zvýšení citlivosti detekce. Materiály pro plnění kolon jsou většinou založeny na anorganické matici (silikagel, oxid hlinitý, pórovité sklo), na níž mohou být chemicky vázány nebo zakotveny různé stacionární fáze, méně často se používá organických gelů různé struktury, které mohou být rovněž chemicky modifikovány. Charakter stacionární fáze závisí na chromatografickém systému. V HPLC se vyskytuje "normální fáze" a "obrácená fáze". U normálních fází je stacionární fáze polární, mobilní fází bývá nepolární rozpouštědlo (pentan, hexan). U obrácených fází je stacionární fáze nepolární a mobilní fáze polárnější. Jedná se o RP-reversed-phase (systém s obrácenými fázemi). V HPLC je využíván asi v 80 %.^(7,16,17,18)

Kolony obsahující **chemicky vázané stacionární fáze**. Na hydroxylové skupiny na povrchu silikagelových částic jsou vhodnou chemickou reakcí navázány různé radikály. Zpravidla se jedná o uhlovodíkové řetězce obsahující 18, popřípadě 8 uhlíkových atomů - nepolární chemicky vázané fáze, nebo radikál obsahuje tříuhlíkatý řetězec zakončený skupinami $-\text{NH}_2$, $-\text{CN}$ aj. - středně polární fáze. Tyto kolony jsou stabilní jen v rozmezí pH 3-7,5, u moderních kolon po dalších úpravách nosiče v rozmezí pH 2-10. Při nízkém pH dochází k hydrolyze chemicky vázaného organického ligandu, při vyšším pH dochází k rozpouštění silikagelové matrice, což vede ke ztrátě separačních vlastností kolony. Také tepelná stabilita silikagelových částic je omezená, teplotní hranice je do 60 °C. Tyto nedostatky odstraňují **zirkoniové kolony**. Jedná se o kolony s nosičem ZrO_2 . Částice sorbentu jsou mechanicky velmi stabilní, nezávislé na iontové síle mobilní fáze, nebobtnají ani nedochází k jejich kompresi. Na rozdíl od silikagelových nosičů jsou stabilní v celém rozsahu hodnot pH (0-14). Kolony jsou tepelně stabilní až do 100 °C a při speciální úpravě dokonce až do 150 °C popř. 200 °C.⁽¹⁸⁾

Monolitické kolony tvoří jediný kus pórovitého materiálu, který vzniká zesílením polymerní směsi. Monolit vzniká jednokrokovou radikálovou polymerací směsi monomerů v přítomnosti porogeního roztoku. Největší výhodou monolitických kolon jsou jejich hydrodynamické vlastnosti. Podle chemické podstaty a způsobu přípravy se mohou monolitické stacionární fáze rozdělit na fáze s modifikovaným silikagelem a na fáze na bázi organických polymerů (polyakrylamidu, akrylamidu nebo polystyrenu). Výhodou je, že se mohou používat vyšší průtoky mobilní fáze.

Chirální stacionární fáze se používají při hodnocení opticky aktivních léčiv.⁽¹⁹⁾

2.3.1.5. Typy detektorů

Detektory slouží k indikaci látek vycházejících z chromatografické kolony. Sledují pomocí vhodného snímače některou z vlastností eluátu a signál se po zesílení přivádí do zapisovače, který poskytuje záznam závislosti intenzity daného signálu na čase. K detekci separovaných látek se zpravidla využívá určitých jejich vlastností, jimiž se tyto látky liší od složek mobilní fáze.

Na detektor se kladou zejména tyto požadavky:

- linearita odezvy v co nejširším rozmezí koncentrací
- dostatečně velký poměr mezi šumem a měřenou hodnotou
- vysoká citlivost
- reprodukovatelnost odezvy na změně složení mobilní fáze při gradientové eluci
- malá citlivost ke změnám průtoku a tlaku
- univerzálnost - detekce všech oddělených složek vzorku^(2,7)

Detektory můžeme rozdělit do dvou základních skupin :

a) *selektivní detektory*, jejichž signál je úměrný koncentraci samotné detegované látky v eluátu

b) *univerzální (nespecifické) detektory*, jejichž odezva je úměrná určité celkové vlastnosti fluátu, tj. jak solutu, tak i složek mobilní fáze.

Nejpoužívanější jsou spektrofotometrické detektory pracující v ultrafialové (a popř. viditelné) oblasti, následují detektory fluorimetrické a elektrochemické (všechny selektivní) a refraktometrické (univerzální). V dnešní době je relativně časté spojení HPLC/MS. Toto spojení je však finančně nákladné.

Spektrofotometrické detektory

Proměřují absorpci elektromagnetického záření určité vlnové délky složkami fluátu protékající celou detektorem. K detekci léčiv se využívá především UV oblast spektra, mnohem méně oblast viditelná a minimálně infračervená oblast spektra – v praxi se uplatňují především UV detektory, even. UV-VIS detektory.

Lze je dělit do čtyř základních typů:

1. UV detektor s fixní vlnovou délkou (nejčastěji 254 nm a nebo 280 nm, při nichž absorbuje většina léčiv). Uspořádání je zpravidla dvoupaprskové a měří rozdíl absorbance mezi měrnou a srovnávací celou, v níž může být buď vzduch, nebo mobilní fáze. Tyto detektory jsou nejlevnější a dosahují poměrně vysoké citlivosti.

2. UV detektor s proměnou vlnovou délkou - libovolně měnitelná dle potřeb

3. Scanning UV detektor - snímají během několika sekund absorpční spektrum v maximu píku hodnoceného léčiva. Umožňují volit libovolnou vlnovou délku záření pro detekci, většinou v rozmezí 190 nm do 400 nm až 600 nm.

4. Photodiode-array detektor - umožňují rychlý záznam spektra bez přerušení chromatografické separace. Jsou založeny na současném měření signálu velkého počtu miniaturních plošných fotodiod. Hodnotí léčivo současně při několika vlnových délkách.

Spektrofotometrické detektory jsou v analýze léčiv používány nejčastěji, vyznačují se značnou citlivostí (10^{-9} až 10^{-10} g/ml) a lze je použít při gradientové eluci.^(13,20)

Fluorimetrické detektory

Fluorimetrické detektory jsou založeny na principu fluorescence a měření sekundárního záření (emisního), které látka vydá po absorpci primárního elektromagnetického záření (excitačního). Látky, které nefluoreskují, lze mnohdy derivatizací s vhodnými činidly převést na fluoreskující deriváty. Tyto detektory jsou méně univerzální než UV detektory, ale citlivější (min. detek. množ. až 10^{-10} g/ml), selektivnější a jsou rovněž použitelné při gradientové eluci.^(20,21)

Elektrochemické detektory

Jsou třetím nejčastěji používaným typem selektivních detektorů a slouží k detekci látek schopných elektrochemické reakce tj. oxidačně - redukčních změn, jež probíhají na fázovém rozhraní roztok – elektroda.

Ampérometrické detektory měří proud vyvolaný průchodem redukovatelné nebo oxidovatelné látky průtokovou celou, v níž jsou umístěny elektrody s vloženým pracovním napětím. Používá se dvouelektrodových nebo častěji tříelektrodových systémů (skládajících se z měrné, srovnávací a pomocné elektrody). Proměřují elektrochemickou veličinu, jejichž hodnota je závislá na koncentraci analyzovaného léčiva. Jsou značně citlivé (10^{-9} až 10^{-12} g/ml), ale většina z nich nelze použít při gradientové eluci. Ampérometrické detektory používají tuhých, měrných elektrod, zhotovených nejčastěji ze skelného uhlíku, grafitových vláken, grafitové pasty, platiny, zlata. Jejich nevýhodou je zanášení, postupná dezaktivace jejich povrchu produkty oxidace a redukce a nečistotami z mobilní fáze, což vyžaduje častou recalibraci detektoru.

Polarografické detektory pracují s rtuťovou kapkovou elektrodou, u níž se na rozdíl od tuhých elektrod pravidelně obnovuje povrch.

Elektrochemické detektory umožňují dosáhnout velmi vysoké citlivosti při nízké ceně. Kladou však vysoké nároky na čistotu a dokonalé odplynění mobilní fáze. Mobilní fáze musí být vodivá, proto je nelze použít v systémech s normálními fázemi.

Coulometrické detektory měří náboj potřebný k oxidaci či redukci celkového množství látky při jejím průtoku měrnou celou, což umožňuje dosáhnout vyšší citlivosti detekce než u ampérometrických detektorů.^(13,20)

Refraktometrické detektory

Tyto detektory jsou stále nejčastěji užívanými nespecifickými (univerzálními) detektory. Poskytují odezvu úměrnou rozdílu indexů lomu eluátu v měrné cele a srovnávací kapaliny (mobilní fáze) v referenční cele. Při analytickém hodnocení léčiv se používají ojediněle pro poměrně velké nevýhody – především výrazně menší citlivost (10^{-6} g/ml), nutnost termostatování a nelze je použít při gradientové eluci.^(13,20)

Spojení HPLC a MS představuje atraktivní a velmi účinnou analytickou techniku, která uspokojuje požadavky kladené na analýzu složitých organických látek. Výhody hmotnostního spektrometru oproti ostatním detektorům jsou dány jednak jeho citlivostí, selektivitou a univerzálností, a jednak množstvím informací o struktuře analyzované látky. Umožňuje analyzovat látky s relativní molekulovou hmotností nad 20 tisíc.⁽¹³⁾

2.3.1.6. Zařízení pro zpracování dat

Vyhodnocovací zařízení slouží k vyhodnocování výsledků získaných z odezvy detektoru. Jsou vybavené mikroprocesorem, stále běžnější je používání počítačů s obrazovkou, tiskárnou. Hlavní výhodou počítačů je, že automaticky kontrolují, zda přístroj dodržuje nastavené parametry a jsou schopné zasahovat do jeho režimu a vést analýzu v optimálních, předem určených podmínkách.^(7,13)

2.3.2. Kvalitativní a kvantitativní analýza v HPLC chromatogramu

Ke kvalitativní a kvantitativní analýze slouží chromatografická křivka. Stanovení léčiv metodou HPLC je v řadě lékopisných článků spojeno se zkouškami na čistotu.

Kvalitativní hodnocení = identifikace složek ve vzorku - stejné látky mají za stejných podmínek dělení shodné retenční časy t_R (čas od nástřiku vzorku na kolonu k maximu chromatografického píku). Porovnáním s retenčními časy standardních roztoků lze určit kvalitativní složení vzorku - podmínkou je dokonalé oddělení eluční vlny látky (píku) od ostatních píků nalezených v chromatogramu. Pro dosažení vhodného oddělení stanovované látky (složky vzorku) lze upravit podmínky analýzy: výběrem vhodné kolony (velikost, náplň), výběrem vhodné mobilní fáze nebo nastavením optimální rychlosti toku mobilní fáze kolonou. Některé UV detektory umožňují v maximu chromatografického píku sejmut UV spektrum, shoda UV spekter vzorku a standardu je další identifikační charakteristikou.

Kvantitativní hodnocení = množství složky ve vzorku - sestavení kalibrační křivky ze známých koncentrací standardů téže látky jako závislost **výšky** nebo **plochy** píku na koncentraci. Na základě zjištěných ploch píků se obsah látky ve vzorku určuje pomocí standardu se známou koncentrací. Nejčastěji se používá buď metoda vnějšího nebo vnitřního standardu.^(2,20)

Metoda vnějšího standardu

Při této metodě se porovnává plocha píku stanovované složky s plochou píku standardu chromatografovaného za stejných podmínek. Jako vnější standard se používá u substancí tzv. chemická referenční látka, nebo u složených lékových přípravků jedna z analyzovaných složek směsi. Koncentrace stanovovaných složek směsi se pak vypočítá z poměru ploch (výšek) píků jednotlivých stanovovaných látek a plochy píku vnějšího standardu.^(20,22)

Metoda vnitřního standardu

Při této metodě se přidává přesně známé množství standardní látky (jiná látka s podobnou chemickou strukturou a podobnými fyz.-chem. vlastnostmi) do analyzované směsi před vlastní analýzou. Po důkladném promíchání se vzorek nastříkuje na kolonu. Koncentrace stanovovaných složek se vypočítá z poměru ploch (výšek) píků jednotlivých separovaných složek a plochy píku vnitřního standardu. Protože standard a vzorek jsou při současném chromatografování vystaveny stejným vlivům, dochází tím k jejich eliminaci. Metoda vnitřního standardu je méně časově náročná a hlavně přesnější, protože není zatížena chybou dvojího nástřiku. Vnitřní standard však musí být eluován v blízkosti píků, které budou vyhodnocovány, musí mít podobnou koncentraci jako hodnocené látky a musí být chemicky inertní. Po vyhodnocení ploch píků vypočítáme poměr ploch a sestojíme kalibrační křivku jako závislost poměru ploch na koncentraci.^(2,20,22)

2.4. Validace analytických metod

Analytické metody používané pro monitorování kvality léčiv musí být vhodné, přesné a spolehlivé. Vhodnost, přesnost a spolehlivost musí být experimentálně ověřena, doložena a tento proces se nazývá validace analytické metody. Jedná se o sérii experimentů, kterými se zjistí nejdůležitější charakteristiky metody, potvrdí se, že dává reprodukovatelné a spolehlivé výsledky. Cílem validace je dát praktické hranice, ve kterých je zkušební postup použitelný, a zajistit, aby při opakovaném postupu dával stejné výsledky. Validace je oddělený akt. Obecně se nejprve definují požadavky na zkušební metodu. Vyvine se metoda, najdou se optimální podmínky a třetím bodem je validace, tj. pomocí experimentálních dat se prokáže, že je metoda vhodná pro daný účel, že splňuje na začátku definované požadavky.

Obecné analytické parametry, ověřované při validaci metod, jsou:

- přesnost (opakovatelnost, reprodukovatelnost)
- linearita, rozsah
- správnost
- detekční a kvantitativní limit
- selektivita
- robustnost

PŘESNOST

Je to míra shody mezi jednotlivými výsledky metody opakovaně prováděné s homogenním vzorkem. Podle podmínek opakování metody se rozlišuje opakovatelnost a reprodukovatelnost. Při stanovení opakovatelnosti se metoda provádí jedním analytikem na tomtéž přístroji, se stejnými činidly, na jednom homogenizovaném vzorku. Reprodukovatelnost se provádí v různých laboratořích na jednom homogenizovaném vzorku. Přesnost se vyjádří jako relativní směrodatná odchylka z minimálně 6 nezávislých analýz.

LINEARITA

Linearita je chápána jako přímková závislost mezi dvěma náhodnými proměnnými, tj. odezvou instrumentace (analytickým signálem) a koncentrací analytu. Těsnost vzájemné závislosti dvou náhodných proměnných charakterizuje korelační koeficient (r). Při lineární závislosti nabývá hodnoty +1 a čím více se blíží

jedné, tím je závislost obou proměnných těsnější. ROZSAH je interval mezi dvěma hladinami koncentrace stanovované látky.

SPRÁVNOST

Je odchylka výsledku metody od správné hodnoty. Správná hodnota se zjistí

1. buď jinou, nezávislou metodou, jejíž správnost je ověřena
2. analýzou modelového vzorku tj. placebo
3. analýzou vzorku s přidavkem standardní látky.

Vyjadřuje se jako rozdíl hodnot nebo jako výtěžnost (recovery):

$$= \text{nalezená hodnota} * 100 / \text{skutečná hodnota}$$

DETEKČNÍ A KVANTITATIVNÍ LIMIT

Jedná se o citlivost metody. Jsou to parametry, které je nutné doložit u metod pro hodnocení nečistot. Detekční limit je pouze pro limitní testy, tj. test zjišťující jen je-li látka nad nebo pod určitou hranicí. Je to nejnižší detekovatelná koncentrace látky, nestanovovaná kvantitativně. Kvantitativní limit je pro stanovení obsahu nečistot. Je to nejnižší koncentrace látky, stanovitelná s přijatelnou přesností a správností.

SELEKTIVITA

Selektivita analytické metody je definována jako schopnost přesného a správného určení analytu i v přítomnosti interferujících látek (matrice). Selektivní metoda je tedy taková metoda, která za určitých podmínek umožňuje přesné a správné stanovení obsahu složky ve vymezené směsi jiných složek. Selektivita analytické metody je testována porovnáním výsledků vzorků standardů s výsledky vzorků s matricí. Interference matrice se projevuje tím, že analytický signál neodpovídá stanovovanému analytu, ale tento signál je superponován signálem rušivé složky (čistota signálu). Prokazování selektivity metody je do jisté míry závislé na použité instrumentální technice, a proto je nutné pro každý použitý systém vypracovat individuální program prokazování selektivity metody.

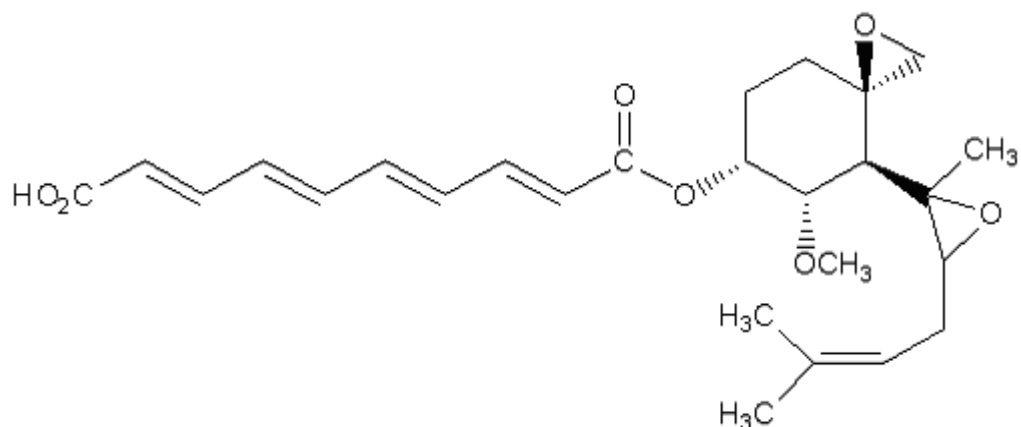
ROBUSTNOST

Míra reprodukovatelnosti výsledků získaných analýzou jednoho homogenního vzorku v různých laboratořích, různými analytiky, na různých přístrojích a s různými

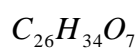
činidly. Jedná se o míru schopnosti metody dávat správné a přesné výsledky i při menších změnách pracovních podmínek, ke kterým dochází při provádění metody v jiné laboratoři, i když popsany postup zůstává zachován.^(23,24)

2.5 Vlastnosti fumagillinu

Strukturní vzorec



Sumární vzorec



Chemický název

5-Methoxy-4-(1,5-dimethyl-1,2-epoxy-4-hexenyl)-1-oxaspiro[2.5]oct-6-yl
hydrogen(all-E)-2,4,6,8-dekatetraendioat

M_r 458,53

Nejčastěji se používá ve formě bicyklohexylamoniové soli, která má:

-**chemický název:** Fumagillin(1,1'-Bicyclohexyl)-4-amoniová sůl

-**sumární vzorec:** $C_{38}H_{57}NO_7$

- M_r 639,87

2.5.1. Fyzikálně-chemické vlastnosti fumagillinu

Vzhled: bleděžlutý prášek

Rozpustnost: prakticky nerozpustný ve vodě (naopak sůl je ve vodě rozpustná), zředěných kyselinách, nasycených uhlovodících, rozpustný ve většině jiných rozpouštědel, ve vodném roztoku Na_2CO_3 a alkalického hydroxidu

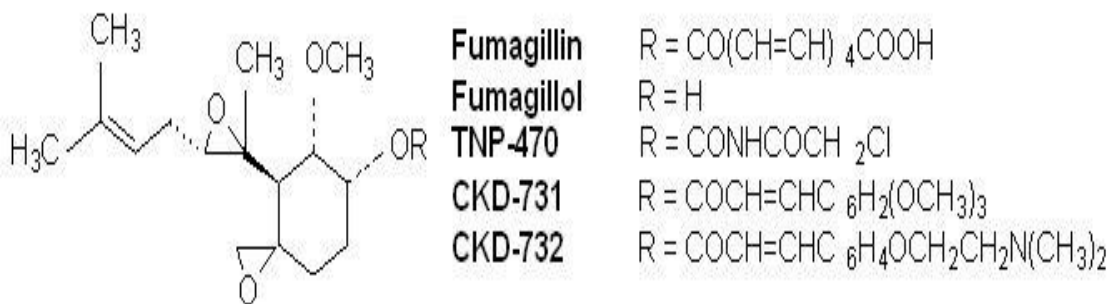
Uskladnění: při teplotě 15-25 °C, chránit před světlem

UVmax: 335 nm, 351 nm^(25,26)

2.5.2. Farmakologické vlastnosti fumagillinu

Fumagillin byl izolován a charakterizován v roce 1951 jako sekundární produkt plísně *Aspergillus fumigatus*. Tento mykotoxin našel uplatnění jako antibiotikum, především při tlumení prvoka *Nosema apis*, který způsobuje závažnou včelí chorobu zvanou nosematóza. Nosemou je v Evropě nakažena asi polovina včelstev. Nákaza bývá často přítomna v latentní formě, která může propuknout v epidemii. Ta pak včelstva velmi oslabí nebo zcela zničí. Jediným účinným léčivem nosematózy je fumagillin, který je však registrován jen v několika evropských zemích. Uvažuje se proto o jeho celoevropské registraci, zejména když bylo prokázáno, že je účinný i u jiných infekcí způsobených prvoky, např. infekcí vyvolaných výtrusovci (Apicomplexa) třídy hromadinek (*Gregarina*).

Ačkoliv fumagillin není schválen pro systémové užití u člověka, je jednou z látek s nejvyšším účinkem u mikrosporidiových infekcí HIV-pozitivních pacientů. To je další důvod, proč je fumagillin znovu intenzivně studován a v laboratořích jsou připravovány jeho analoga a deriváty se zachovanou vysokou antisporeicidní aktivitou, ale nižší toxicitou pro člověka. Takovou látkou je i derivát s kódovým označením TNP-470, který je účinnější než fumagillin, ale jeho toxicita je nižší. Dalšími nadějnými deriváty jsou látky označené jako CKD-731 a CKD-732. Jsou to všechno deriváty fumagillolu, který je základním farmakoforem této skupiny látek. Charakteristická pro tento farmakofor je přítomnost dvou oxiranových kruhů, z nichž jeden tvoří spiranovou strukturu s cyklohexanem.



Další významnou aktivitou fumagillinu a některých jeho derivátů je jejich vliv na angiogenezi. Angiogeneze, čili novotvorba cév, je proces, v němž se primitivní vaskulatura rozrůstá a remodeluje, přičemž se vytváří síť velkých a malých cév, které se mohou vzájemně propojovat a větvit. Tento proces je regulován souborem různých působků (cytokinů, integrinů, adhezních molekul, proteáz apod.). Za fyziologických podmínek jsou faktory podporující angiogenezi v dynamické rovnováze s faktory, které ji potlačují. Snížení účinnosti angiogenní aktivity má za následek poruchu hojení ran nebo pomalé hojení zlomenin. Naopak zvýšená podpora novotvorby cév se může podílet na patogenezi revmatoidní artritidy, retinopatie nebo chronického zánětu. Angiogeneze hraje i významnou úlohu v růstu nádorového ložiska a tvorbě metastáz. Inhibice angiogeneze v nádoru se proto zdá být slibnou léčebnou možností některých forem rakoviny.

Fumagillin a některé jeho deriváty jsou účinnými inhibitory angiogeneze. Jejich vysoká účinnost a nízká toxicita z nich činí vážné kandidáty na nová protirakovinná léčiva, i když genotoxický potenciál fumagillinu byl prokázán v experimentech in vivo. Mechanismus účinku fumagillinu zřejmě spočívá v inhibici methioninaminopetidáz, proteáz, které odstraňují N-terminální methionin z nově syntetizovaných proteinů. Opakovaně bylo prokázáno, že tento proces je spojen s tvorbou nádorů, s idiopatickou plicní fibrózou a dalšími patologickými procesy.⁽²⁷⁾

Příbalové informace

Charakteristika: Fumagillin je antibiotické léčivo, produkované houbou *Aspergillus fumigatus*, které je specifickým lékem nosekové nákazy včel, jejímž původcem je prvok *Nosema apis*. Podává se na jaře včelstvům, u nichž neprobíhá normální vývoj. Preventivně se přidává do potravy na jaře, příp. na konci léta.

Indikace: nosemová nákaza včel, účinkuje také na rod Entamoeba u šimpanzů a psů

Kontraindikace: Přípravek se nesmí používat v době snůšky medu, jmenovitě od 15.dubna do 30.srpna.

Dávkování: K přípravě léčivého pokrmu se nejprve rozpustí obsah jedné lahvičky v malém množství vody a poté se přilije za stálého míchání k 25 l ochlazeného cukrového roztoku. Takto připravený sirup se zkrmuje po důkladném protřepání a promísení, během 2-3 týdnů, vždy večer. V případech, kdy včely zesláblé nosematózou nepřijímají léčivý sirup, nanáší se na včelami pokrytý plát. Celkové množství 5 l léčivého sirupu, potřebné k léčbě jednoho včelího roje, se podává v denních dávkách 0,25-0,5 l. V případě silného napadení je třeba celý postup zopakovat po 48 hodinách. Jedno balení postačí k léčbě pěti včelstev.

Ochranná lhůta: Med bez ochranné lhůty (přípravek je kontraindikován v období snůšky medu).

Způsob skladování: Při teplotě 15-25 °C, chránit před světlem ^(26,28)

2.5.3. Přehled prací zabývajících se analýzou fumagillinu

Pro analýzu fumagillinu byly vypracovány studie využívající nejrůznější metodiky. Analytické hodnocení bylo nejčastěji prováděno pomocí HPLC, event. spektrofotometrie nebo tenkovrstvé chromatografie.

- Laboratory studies on the photostability of fumagillin, the active ingredient of Fumidil B¹ ⁽²⁹⁾
stacionární fáze : C₁₈ , mobilní fáze: acetonitril : voda : kyselina octová (500:500:1,5), $\lambda=350$ nm
- Trace analysis of fumagillin in honey by liquid chromatography-diode array-electrospray ionization mass spectrometry ⁽³⁰⁾
stacionární fáze: C₁₈ , mobilní fáze: vodný roztok octanu amonného (20 mM): acetonitril v poměru 61:39, v/v
- Elisa and HPLC methods analysis of fumagillin its decomposition products in honey ⁽³¹⁾
stacionární fáze: C₁₈ , mobilní fáze: acetonitril : voda : ledová kyselina octová (500:500:1,5)

- Monitoring of selected metabolites and biotransformation products from fermentation broths by high-performance liquid chromatography ⁽³²⁾
stacionární fáze: C₁₈ , mobilní fáze: acetonitril : vodný roztok kyseliny fosforečné nebo acetonitril : kyselý fosfátový pufr
- Determination of fumagillin by high performance liquid chromatography³⁰⁾
stacionární fáze: C₁₈ , mobilní fáze: acetonitril : voda: ledová kyselina octová (500:500:1,5), v/v/v, λ=351 nm ⁽³³⁾
- Multiclass determination and confirmation of antibiotic residues in honey using LC-MS/MS ⁽³⁴⁾
- Enantioselective synthesis of a potential key intermediate for the total synthesis of fumagillin ⁽³⁵⁾

2.5.4. Přehled prací zabývající se fumagillinem

- FGFR1/PI3K/AKT signaling pathway is a novel target for antiangiogenic effects of the cancer drug fumagillin (TNP-470) ⁽³⁶⁾
- Design, synthesis, and antiangiogenic effects of a series of potent novel fumagillin analogues ⁽³⁷⁾
- Fumagillin: an anti-infective as a parent molecule for novel angiogenesis inhibitors ⁽³⁸⁾
- Evaluation of genotoxic effects of fumagillin by cytogenetic tests in vivo ⁽³⁹⁾
- Fumagillin suppresses HIV-1 infection of macrophages through the inhibition of Vpr activity ⁽⁴⁰⁾
- Antimicrosporidial activities of fumagillin, TNP-470, ovalicin, and ovalicin derivatives in vitro and in vivo ⁽⁴¹⁾
- A stereoselective asymmetric synthesis of antibiotic (-)-fumagillol using claisen rearrangement and intramolecular ester enolate alkylation as key steps ⁽⁴²⁾
- MetAP-2 inhibitors based on the fumagillin structure. Side-chain modification and ring-substituted analogues ⁽⁴³⁾
- Early genetic mechanisms underlying the inhibitory effects of endostatin and fumagillin on human endothelial cells ⁽⁴⁴⁾

- Effects of carboxymethylcellulose and carboxypolymethylene on morphology of *Aspergillus fumigatus* NRRL 2346 and fumagillin production ⁽⁴⁵⁾
- Carbon and nitrogen source nutrition of fumagillin biosynthesis by *Aspergillus fumigatus* ⁽⁴⁶⁾
- Fumagillin Treatment of Intestinal Microsporidiosis ⁽⁴⁷⁾
- Investigation of novel fumagillin analogues as angiogenesis inhibitors ⁽⁴⁸⁾

2.6. Stabilita léčiv

Definice:

Stabilita je vlastnost léčiva zachovávat si, v přípustných mezích v určitém období a za určitých podmínek uchování, stejné jakostní znaky, jaké má léčivo v čase výroby.

2.6.1. Faktory ovlivňující stabilitu léčiv a léků

Faktory ovlivňující stabilitu léčiv můžeme rozdělit na vnitřní a vnější.

Vnitřní faktory souvisejí s vlastnosti jednotlivých složek lékové formy. Stabilitu léku může ovlivňovat každá její složka buď terapeutický účinná, nebo neúčinná. Důležitou úlohu mají chemické vlastnosti a kvalita léčiva, pomocných látek a obalový materiál. Nezanedbatelný vliv mají i jiné faktory jako je velikost částic, pH, vlastnosti použitých rozpouštědel a v nemalé míře i přítomnost chemických reziduí a nebo kontaminant z výroby.

Vnější faktory, kterými jsou nejčastěji teplota, světlo, radiace, vzduch a vlhkost, dokáží výrazně ovlivnit stabilitu léku. Můžou způsobit přeměny týkající se jednak vlastnosti lékové formy, jednak změn v účinných a pomocných látkách obsažených v léku. Dále k těmto faktorům patří i způsoby zpracování – technologické postupy všech složek léku do konečné lékové formy, jako je způsob balení a uchování léku. Všechny tyto vlivy můžou mít odraz nejenom na stabilitu, ale i na biologickou dostupnost léčiva, a teda i na účinnost a bezpečnost připraveného léku.

Účinná látka – léčivo – má určitou strukturu, která je typickou charakteristikou působení na receptory v organismu a nebo podpora jeho metabolických dějů. Ve složitých směsích, kterými léky jsou, může docházet k rozkladu léčiv různými vlivy. Nejčastěji se jedná o hydrolýzu, oxidaci, izomerizaci, polymerizaci a fotolýzu.

Pomocné látky – jsou základní složky léků. Svými vlastnostmi umožňují zpracování a standardní výrobu léku a umožňují správné využívání léčiva. V dnešní době je škála používaných pomocných látek velmi široká od látek z hlediska chemické struktury jednoduchých, dále komplexní polymerní sloučeniny, až po různorodé přírodní látky a jejich směsi. Pomocné látky vesměs tvoří podstatnou část hotového léku, můžou vyvolat a nebo se podílet na chemickém nebo fyzikálním ovlivnění léčiva. Nežádoucí interakce můžou vést k ohrožení kvality a nebo znemožňují podání léčiv. Chemické interakce můžou způsobit rozklad účinné látky, a tím snížit obsah potřebný na

terapeutický účinek. Fyzikální interakce můžou snížit rozpustnost, obsahovou rovnoměrnost účinné dávky a nebo ohrozit podání léku.

2.6.2. Testy stability

Můžeme je rozdělit do několika skupin:

- 1- testy zátěžové:** používají se v předformulačních studiích na ověření stability léčiva
- 2- testy zrychlené:** využívají se na kinetické studie rozkladu léčiva a lékové formy, porovnávací zrychlené testy pro výběr vhodného složení, obalu apod.
- 3- testy dlouhodobé:** zakládají se co nejdříve podle postupu vývojových prací, hlavně v postexperimentálních studiích stability, tj. při vývoji lékové formy a na účely registrace, při které se můžou doplnit i zrychlenými testy
- 4- testy stability léku při jeho používání** ⁴⁹⁾

3.CÍL PRÁCE

Cílem práce je analytické hodnocení fumagillinu s využitím HPLC a stanovení jeho obsahu v léčivém přípravku. Práce navazuje na diplomovou práci, ve které jsem se zabývala fumagillinem z hlediska použití u včel.

4.EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1. Použitý chromatografický materiál, přístroje, pomůcky a chemikálie

Chromatografický materiál

Chromatografická kolona 4x150 mm I.D. s náplní Separon SGX C18, 7 µm, Tessek, Praha, Česká Republika

Chromatografická kolona 4x150 mm I.D. s náplní Separon SGX C8, 7 µm, Tessek, Praha, Česká Republika

Chromatografická kolona 3x150 mm I.D. s náplní Separon SGX NH₂, 7 µm, Tessek, Praha, Česká Republika

Chromatografická kolona 4x150 mm I.D. s náplní Separon SGX CN, 7 µm, Tessek, Praha, Česká Republika

Chromatografická kolona 250×4 mm I.D. s náplní Lichrosorb RP-18C, 5 µm, Merck, Německo

Chromatografická kolona 250 × 4 mm I.D. s náplní Lichrosorb DIOL, 10 µm, Merck, Německo

Separační kolonka 9x20 mm s náplní Separon SGX C18, 60 µm, Tessek, Praha, Česká Republika

Přístroje

Kapalinový chromatograf HP1000 (Hewlett-Packard)

Analytické váhy, Helago, Česká Republika

Acidimetr 333, Druopta, Praha, Česká Republika

Spektrofotometr Shimadzu, UV-2401 PC, Shimadzu, Japonsko

Ultrazvuková lázeň K10, Kraitex, Slovensko

Nylonový filtr 0,45 µm

Pomůcky

Laboratorní sklo

Chemikálie

Fumagillin, Chinoin Budapešť, Maďarsko

Octan amonný p.a., Balex - Pardubice, Česká republika

Fosforečnan draselný kyselý p.a., Lachema-Brno, Česká republika

Methylalkohol p.a., Penta, Praha, Česká republika
Acetonitril PhEur, Merck, Německo
Tetrabutyl-ammonium bromid p.a., Lachema-Brno, Česká republika
Síran sodný krystalický p.a., Lachema-Brno, Česká republika
Kyselina fosforečná 85% p.a., Lachema-Brno, Česká republika
Hydroxid sodný p.a., Lachema-Brno, Česká republika
Ledová kyselina octová p.a., Lachema-Brno, Česká republika
Dichlormethan p.a., Balex-Pardubice, Česká republika
Octan ethylnatý p.a., Lachema-Brno, Česká republika
Chloramphenicolum, galenická laboratoř – Ostrava, Česká republika
Sulpirid, Sigma-Aldrich, Německo
4-Chloroacetanilid 97%, Sigma-Aldrich , Německo
Nimesulid , Sigma-Aldrich, Německo
Voda čištěná reverzní osmózou
Kyselina askorbová p.a., Sigma-Aldrich, Německo
Dihydrogenfosforečnan sodný p.a., Lachema-Brno, Česká republika
Hydrogenfosforečnan sodný p.a., Lachema-Brno, Česká republika
Glucosum p.a., Lachema-Brno

4.2. Vývoj chromatografických podmínek pro stanovení fumagillinu

Pro stanovení fumagillinu bylo nutné najít vhodné základní chromatografické podmínky, které zahrnují volbu optimální stacionární fáze, mobilní fáze, průtokové rychlosti a vhodné vlnové délky pro UV detekci.

Výběr stacionární a mobilní fáze

Jako stacionární fáze byla nejprve použita chromatografická kolona s náplní Separon SGX C18 (7 μm), 4x150 mm (číslo 1). Dále chromatografická kolona s náplní Separon SGX C8, (7 μm), 4x150 mm (číslo 2). Poté chromatografická kolona s náplní Lichrosorb DIOL, 10 μm , (číslo 3). Další chromatografická kolona s náplní Lichrosorb RP-18C (5 μm), 250x4 mm (číslo 4). Pátá chromatografická kolona byla s náplní nitrilovou (7 μm) 4x150 mm. Šestá chromatografická kolona byla aminová kolona (7 μm), 3x150 mm. K přípravě vzorku byla použita separační kolonka s náplní Separon SGX C18 (60 μm), 9x20 mm.

Na jednotlivých kolonách byly zkoušeny tyto mobilní fáze:

na koloně č.1:

- methanol : voda 60:40 (v/v)
- methanol : okyselená voda na pH 3,20 upraveno 10% H_3PO_4 ; 60:40 (v/v)
- methanol : fosforečnanový pufr (KH_2PO_4 0,05 mol/l; pH 4,8) 60:40 (v/v)
- methanol : fosforečnanový pufr (KH_2PO_4 0,05 mol/l; pH 3,08 - upraveno 10% H_3PO_4) 60:40 (v/v)
- acetonitril : fosforečnan amonný (0,05 mol/l) 70:30 (v/v)
- methanol : octan amonný (0,05 mol/l) 60:40 (v/v)
- methanol : octan amonný (0,005 mol/l) 60:40 (v/v)

na koloně č.2:

- methanol : voda (pH 3,1- upraveno 10% H_3PO_4) 60:40 (v/v)
- methanol : fosforečnan draselný (0,005 mol/l) 60:40 (v/v)
- acetonitril : voda : ledová kyselina octová 50:50:0,15 (v/v/v)
- methanol : fosforečnanový pufr (KH_2PO_4 0,05 mol/l; pH 4,8) 60:40 (v/v)
- acetonitril : fosforečnanový pufr (KH_2PO_4 0,05 mol/l; pH 4,8) 60:40 (v/v)

-methanol : síran sodný (0,02 mol) 60:40 (v/v)

-methanol : octan amonný (0,005 mol) 60:40 (v/v)

na koloně č.3:

-methanol : fosforečnanový pufr (KH_2PO_4 0,05 mol/l) 60:40 (v/v)

-acetonitril : voda : ledová kyselina octová 50:50:1,5 (v/v/v)

-acetonitril : fosforečnanový pufr (KH_2PO_4 0,05 mol/l; pH 3,04 - upraveno 10% H_3PO_4) 60:40 (v/v)

na koloně č.4:

-methanol : fosforečnanový pufr (KH_2PO_4 0,05 mol/l) 60:40 (v/v)

na koloně č. 5:

-methanol : fosforečnanový pufr (KH_2PO_4 0,05 mol/l) 60:40 (v/v)

-acetonitril : fosforečnanový pufr (KH_2PO_4 0,05 mol/l; pH 3,08 - upraveno 10% H_3PO_4) 60:40 (v/v)

-methanol : fosforečnanový pufr (KH_2PO_4 0,05 mol/l; pH 3,08 - upraveno 10% H_3PO_4) 60:40 (v/v)

-methanol : fosforečnanový pufr (KH_2PO_4 0,05 mol/l; pH 6,02 - upraveno 10% NaOH + 10 mg tetrabutylammonium bromid) 60:40 (v/v)

-acetonitril : fosforečnanový pufr (KH_2PO_4 0,05 mol/l; pH 3,06 - upraveno 10% H_3PO_4) 40:60 (v/v)

-acetonitril : fosforečnanový pufr (KH_2PO_4 0,05 mol/l; pH 3,60 - upraveno 10% H_3PO_4) 50:50 (v/v)

-acetonitril : fosforečnanový pufr (KH_2PO_4 0,05 mol/l; pH 3,60 - upraveno 10% H_3PO_4) 55:45 (v/v)

-acetonitril : fosforečnanový pufr (KH_2PO_4 0,05 mol/l; pH 3,08 - upraveno 10% H_3PO_4) 50:50 (v/v)

-acetonitril : fosforečnanový pufr (KH_2PO_4 0,05 mol/l; pH 3,08 - upraveno 10% H_3PO_4) 55:45 (v/v)

-aceton : fosforečnanový pufr (KH_2PO_4 0,05 mol/l; pH 3,64 - upraveno 10% H_3PO_4) 60:40 (v/v)

-methanol : octan amonný (0,005 mol) 60:40 (v/v)

-methanol : síran sodný (0,02 mol) 60:40 (v/v)

na koloně č.6:

-methanol : octan amonný (0,005 mol/l) 60:40 (v/v)

Vlnová délka byla vybrána na základě změření spektra fumagillinu. Ten vykazoval 4 maxima vlnových délek (202 nm, 241 nm, 335 nm a 349 nm). Pro analýzu byla zvolena vlnová délka s nejvýraznější absorbancí, což bylo 335 nm.

Analýza probíhala při **průtokových rychlostech** od 0,4 – 1,0 ml/min.

Výběr vnitřního standardu

Pro kvantitativní analýzu byla zvolena metoda vnitřního standardu. Při výběru vhodného standardu byly zkoumány tyto látky.

- chloramfenikol
- sulpirid
- 4–chloracetanilid
- nimesulid
- tetracyklin

Z vytipovaných léčiv - chloramfenikol, sulpirid a 4-chloracetanilid neabsorbovaly při vlnové délce 335 nm. Tetracyklin nevyhovoval z důvodu krátkého retenčního času.

Nimesulid byl při výběru vnitřního standardu nejvhodnější, jeho pík byl symetrický a oba píky se dělily až na základní linii.

Příprava mobilní fáze

Ke stanovení fumagillinu byla použita mobilní fáze methanol : octan amonný (0,005 mol/l) v poměru 60:40. Nejdříve byl připraven vodný roztok octanu amonného, který byl přefiltrován přes nylonový filtr- 0,45 µm. Takto připravený roztok se smíchá s methanolem v uvedeném poměru.

Příprava zásobního roztoku fumagillinu

0,01 g gumagillinu bylo naváženo do 10 ml odměrné baňky a doplněno methanolem po rysku (1 mg/ml).

Příprava zásobního roztoku vnitřního standardu

0,01 g nimesulidu bylo rozpuštěno v 10,0 ml methanolu. Z tohoto roztoku byl odebrán 1,0 ml, který byl dán do 10 ml odměrné baňky a doplněn methanolem po rysku. Poté z toho roztoku byl odebrán 1,0 ml a smíchán s 1,0 ml methanolu (50 μ g/ml).

Příprava vzorku pro validační parametry

Bylo smícháno 1,0 ml zásobního roztoku fumagillinu s 1,0 ml zásobního roztoku nimesulidu ($c_{\text{fum}}=5*10^{-4}$ g/ml , $c_{\text{nim}}=2,5*10^{-5}$ g/ml).

Příprava placebo

Placebo bylo připraveno z těchto složek:

Dihydrogenfosforečnan sodný čistý	0,136 g
Hydrogenfosforečnan sodný- krystalický	0,136 g
Kyselina askorbová	0,136 g
Glukóza	18,232 g

Jednotlivé složky byly naváženy a dány do 100 ml odměrné baňky a doplněny vodou po rysku.

Příprava vzorku pro analýzu

Nejprve jsem připravila roztok placebo s fumagillinem – 0,01 g fumagillinu se rozpustilo v 10,0 ml placebo. Z takto připraveného roztoku se vezme 1,0 ml a smíchá se s 1,0 ml zásobního roztoku vnitřního standardu. Takto připravený vzorek byl nastříkovan na kolonu ($c_{\text{fum}}=5*10^{-4}$ g/ml , $c_{\text{nim}}=2,5*10^{-5}$ g/ml).

Příprava vzorku pro stabilitu při pokojové teplotě a v lednici

Viz. vzorek pro validační parametry

4.2.1. Validace metody

Z validačních parametrů byla ověřena přesnost, správnost, linearita, selektivita a detekční limit.

Přesnost

Přesnost byla vyjádřena jako relativní směrodatná odchylka z 6 nezávislých analýz, kdy měření bylo prováděno pětkrát u každého vzorku.

Správnost

Správnost byla vyjádřena v procentech jako odchylka metody od správné hodnoty. Byly připraveny 3 vzorky o známé koncentraci fumagillinu, které byly nastříkovány třikrát na kolonu a poté byla vypočítána výtěžnost.

Linearita

Linearita metody byla ověřena na základě kalibrační křivky. Kalibrační křivka byla sestavena jako závislost poměru ploch fumagillinu /nimesulidu na příslušných koncentracích. Pro její sestavení byly použity roztoky o 4 různých koncentracích fumagillinu (25 mg/ml; 37,5 mg/ml; 50 mg/ml; 62,5 mg/ml), kdy každý vzorek obsahuje 1,0 ml zásobního roztoku nimesulidu . Kalibrační roztoky byly připraveny naředěním příslušného množství zásobního roztoku fumagillinu methanolem na objem 10,0 ml a nastříkovány na kolonu. Měření bylo provedeno třikrát u každé koncentrace vzorku. Získané údaje byly vyhodnoceny, zpracovány do tabulky a na jejich základě sestavena kalibrační křivka, která byla následně použita i pro stanovení fumagillinu.

Selektivita

Selektivita byla vyjádřena jako rozdíl mezi výsledky analýzy vzorku se složkami placebo a placebem samotným.

Detekční limit

Jedná se o nejnižší koncentraci látky, stanovitelnou s přijatelnou přesností a správností.

Robustnost

Byly zkoušeny změny poměrů jednotlivých složek mobilní fáze a změny pH mobilní fáze $\pm 5\%$.

4.2.2. Stabilita

Stabilita fumagillinu byla zjišťována při

- pokojové teplotě tj. 24 °C
- v lednici při teplotě 6-8 °C

5. VÝSLEDKY A DISKUZE

5.1. Vývoj chromatografických podmínek pro HPLC analýzu fumagillinu

STACIONÁRNÍ FÁZE

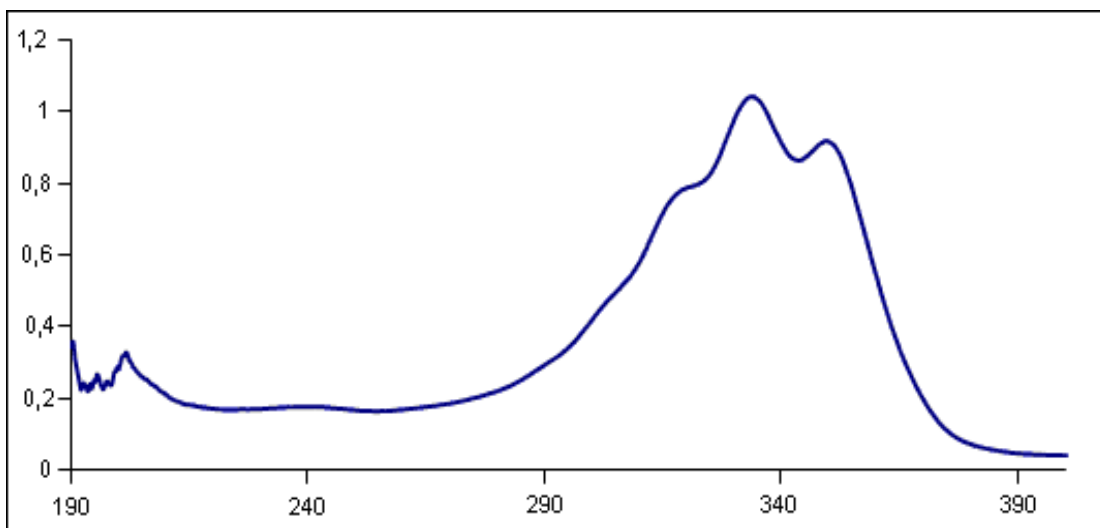
Při vývoji optimálních chromatografických podmínek pro hodnocení fumagillinu byly vyzkoušeny různé stacionární fáze. Jako nejvhodnější stacionární fáze byla vybrána chromatografická kolona 3x150 mm I.D. s náplní Separon SGX NH₂, 7 µm, od firmy Tessek.

MOBILNÍ FÁZE

Byly vyzkoušeny různé mobilní fáze v různých poměrech. Nejvhodnější mobilní fáze byla směs methanol : octan amonný (vodný roztok 0,005 mol/l) v poměru 60:40. Tato fáze poskytovala nejlepší záznamy. Při použití ostatních mobilních fází nedocházelo k úplnému rozdělení píků, nebo retenční časy zkoumaných látek byly velmi blízké a tudíž se píky navzájem překrývaly a nebyly rozděleny na základní linii. **Průtoková rychlost** byla zvolena 1,0 ml/min, **tlak** se pohyboval od 2,5 do 2,7 MPa.

DETEKCE

Detekce byla prováděna v oblasti UV spektra, fumagillin měl čtyři maxima, při 202 nm, 241 nm, 335 nm a 349 nm. Nejvhodnější vlnová délka byla při 335 nm, protože vykazovala nejvýraznější absorbanci.



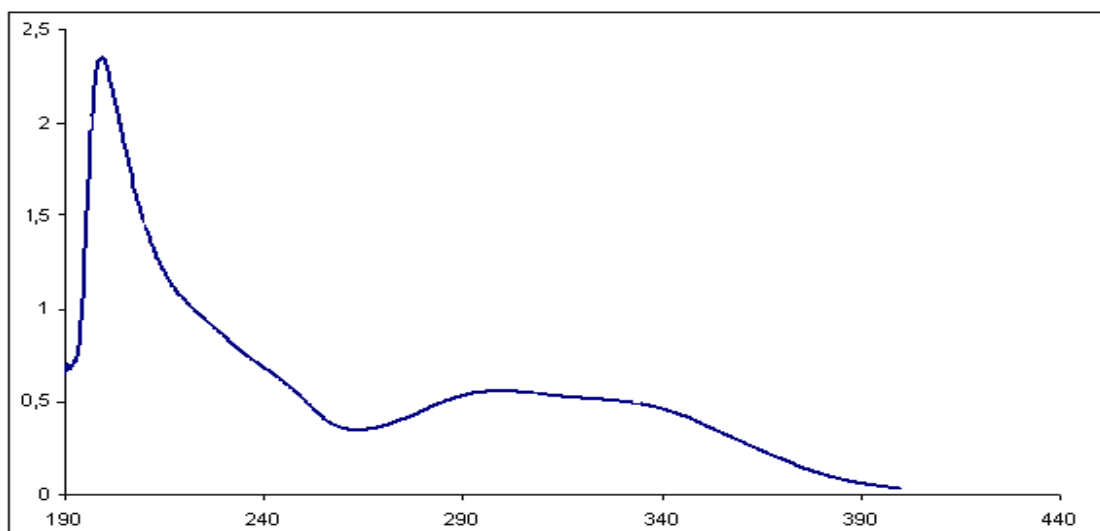
Obr. č.1 : Absorpční spektrum fumagillinu

Absorpční maxima:

$\lambda = 349,20 \text{ nm}$	$A = 0,9165$
$\lambda = 334,00 \text{ nm}$	$A = 1,0408$
$\lambda = 241,40 \text{ nm}$	$A = 0,1738$
$\lambda = 201,80 \text{ nm}$	$A = 0,3259$

VNITŘNÍ STANDARD

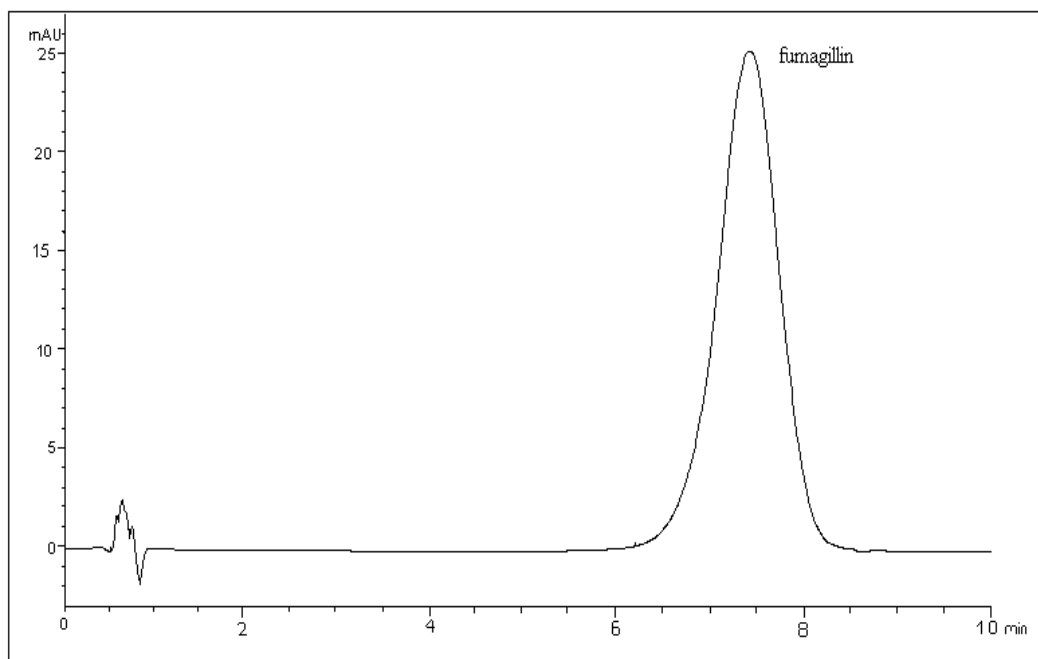
Nimesulid byl při výběru vnitřního standardu nejvhodnější, jeho pík byl symetrický a oba píky se dělily až na základní linii.



Obr. č.2 : Absorpční spektrum nimesulidu

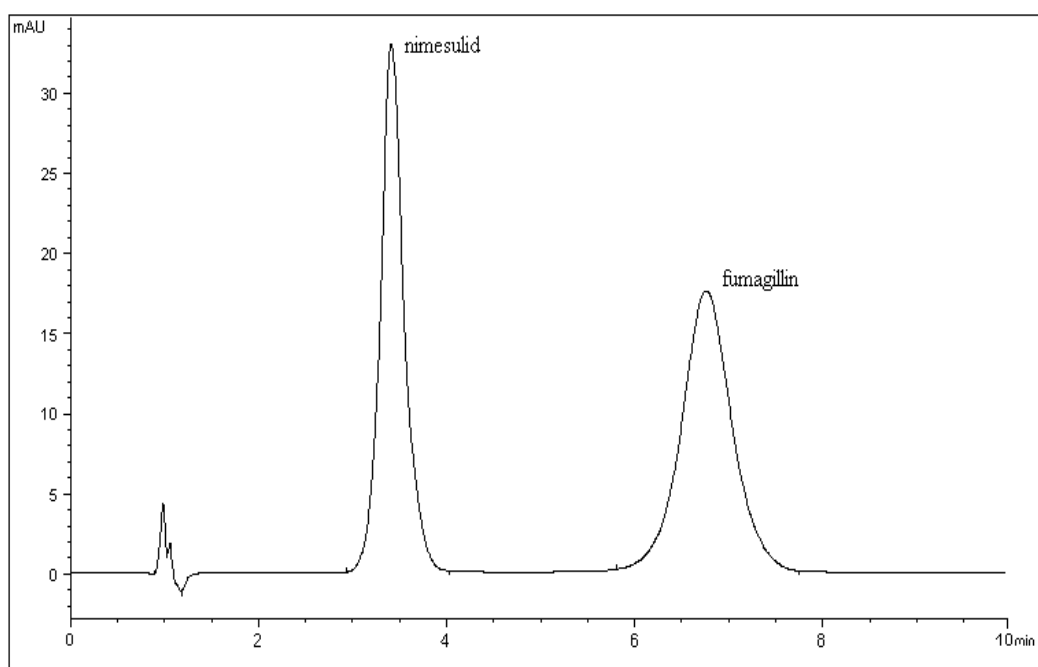
Absorpční maxima:

$\lambda = 194,60 \text{ nm}$	$A = 0,3166$
$\lambda = 201,60 \text{ nm}$	$A = 0,9557$
$\lambda = 298,20 \text{ nm}$	$A = 0,2548$
$\lambda = 323,40 \text{ nm}$	$A = 0,2426$



Obr.č. 3: Chromatografický záznam fumagillinu (methanolický roztok 1mg/ml)

Chromatografické podmínky: **kolona**: 3x150 nm I.D. s náplní Separon SGX NH₂, 7 μm; **mobilitní fáze** : methanol : octan amonný (vodný roztok 0,005 mol/l, v/v) v poměru 60 : 40, **průtoková rychlost** : 1 ml/min, λ= 335 nm, **nástřik** : 20 μl



Obr.č.4: Chromatografický záznam fumagillinu a vnitřního standardu nimesulidu

($c_{\text{fum}}=5 \cdot 10^{-4}$ g/ml, $c_{\text{nim}}=2,5 \cdot 10^{-5}$ g/ml),

Chromatografické podmínky viz. obr.č.3

Z validačních parametrů byly ověřeny

- **přesnost**

Tabulka č.1: Hodnoty ploch pro výpočet směrodatné odchylky

Vzorek č.1						
Plocha	fumagillin	682,6	682,9	677,7	687,4	679,2
	nimesulid	560,6	574,7	582,1	587,1	588,4
Směrodatná odchylka: 2,4254						
Vzorek č.2						
Plocha	fumagillin	521,8	521	518,8	519,2	518,2
	nimesulid	528,1	527,5	527,2	526,9	520,5
Směrodatná odchylka: 1,5297						
Vzorek č.3						
Plocha	fumagillin	639,1	639	640,3	640	641
	nimesulid	474,1	473,6	473,2	472,9	475,3
Směrodatná odchylka: 0,8408						
Vzorek č.4						
Plocha	fumagillin	634,1	630,3	629,9	630,3	631,5
	nimesulid	518,4	516,4	516,2	515,7	516,2
Směrodatná odchylka: 1,7181						
Vzorek č.5						
Plocha	fumagillin	712,9	712,3	708,2	712,7	712,4
	nimesulid	550,7	555,6	545,5	550,8	556,3
Směrodatná odchylka: 2,5006						
Vzorek č.6						
Plocha	fumagillin	645,1	645	645,4	640,9	641,6
	nimesulid	578,5	578,6	576,1	574,7	573,7
Směrodatná odchylka: 2,3040						

- **správnost**

Tabulka č.2: Hodnoty pro zjištění koncentrace

vzorek	Plocha		Poměr ploch Fum/nim	průměr	koncentrace
	Fumagillin	nimesulid			
1	527,51	673,1	0,7837	0,7836	$3,72 \cdot 10^{-4}$ g/ml
	526,90	672,5	0,7835		
	526,20	671,6	0,7835		
2	721,17	737,4	0,978	0,981	$4,95 \cdot 10^{-4}$ g/ml
	731,85	743	0,985		
	724,51	739,3	0,980		
3	773,41	657,1	1,177	1,180	$6,19 \cdot 10^{-4}$ g/ml
	773,80	654,1	1,183		
	769,18	651,85	1,180		

Výtěžnost:

Vzorek č.1: 99,20 %

Vzorek č.2: 99,00 %

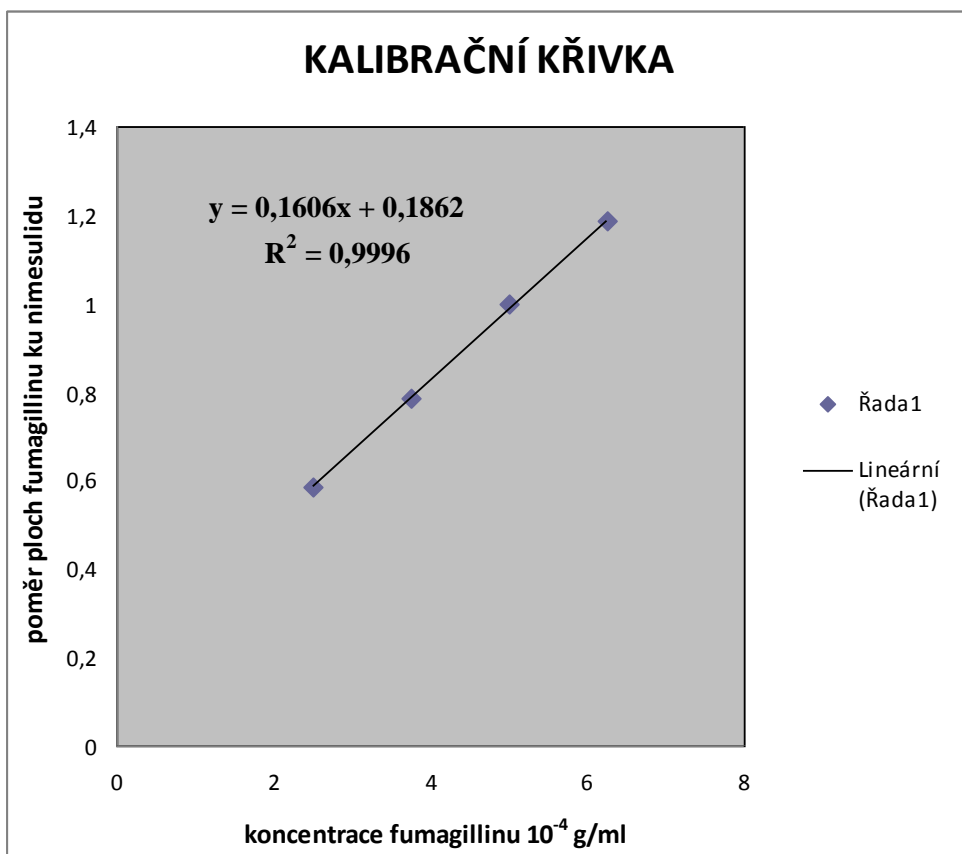
Vzorek č.3: 99,04 %

- **linearita**

Byla použita metoda kalibrační křivky. K jejímu sestavení byly použity čtyři koncentrace fumagillinu (viz. Kapitola 4.2.1)

Tabulka č.3: Hodnoty pro koncentraci kalibrační křivky

vzorek	Plocha Fumagillin nimesulid		Poměr ploch fum/nim	průměr
1	295,7	505,6	0,585	0,587
	299,2	509,2	0,586	
	298,5	504,8	0,591	
2	398,78	508	0,785	0,786
	397,78	504,8	0,788	
	397,24	505,4	0,786	
3	494,61	497,6	0,994	0,997
	496,10	496,6	0,999	
	494,91	496,4	0,997	
4	556,3	467,6	1,190	1,186
	554,1	467,1	1,186	
	553	467,3	1,183	



Obr. č. 5: Kalibrační křivka

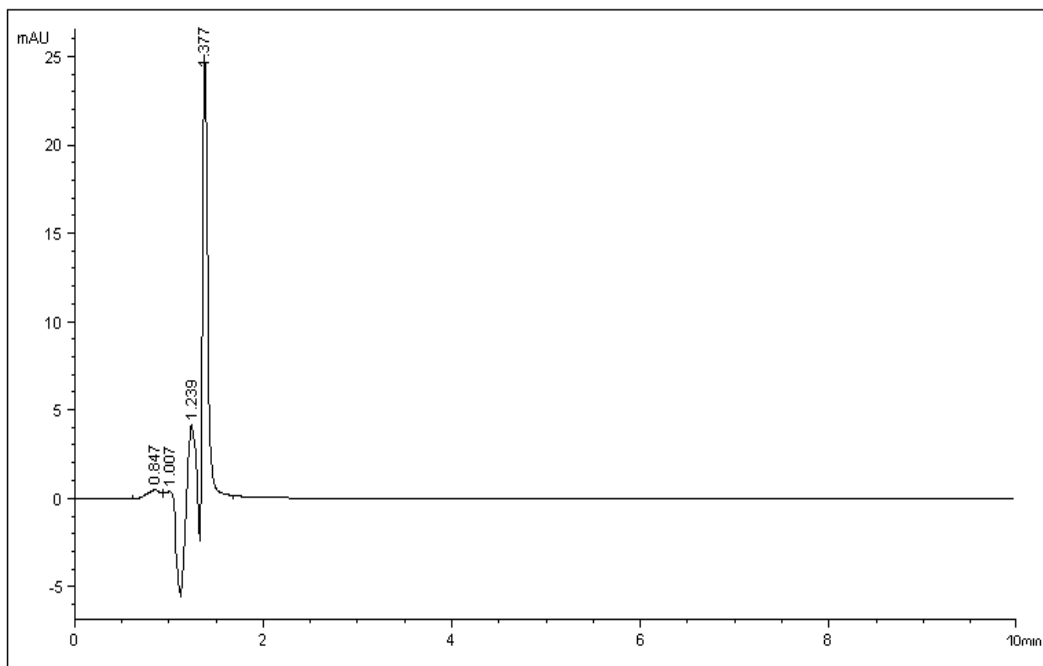
Pro vyhodnocení chromatografických záznamů byla sestrojena kalibrační křivka (závislost koncentrace fumagillinu na poměru ploch fumagillinu ku nimesulidu), která vykazuje lineární průběh v rozmezí daných koncentrací. Její parametry jsou:

Rovnice regresivní přímky: $y = 0,1606x + 0,1862$

Korelační koeficient: $R^2 = 0,9996$

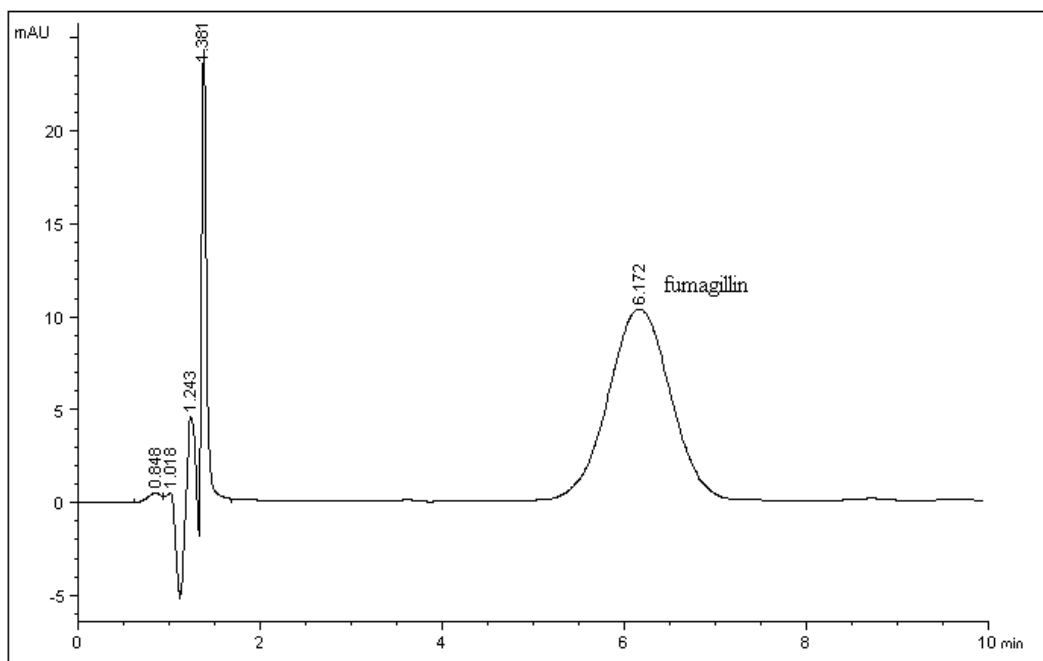
- **selektivita**

Selektivita je doložena chromatografickým záznamem placebo a fumagillinu s placebem



Obr. č. 6: Chromatografický záznam placebo

Chromatografické podmínky viz obr.č3

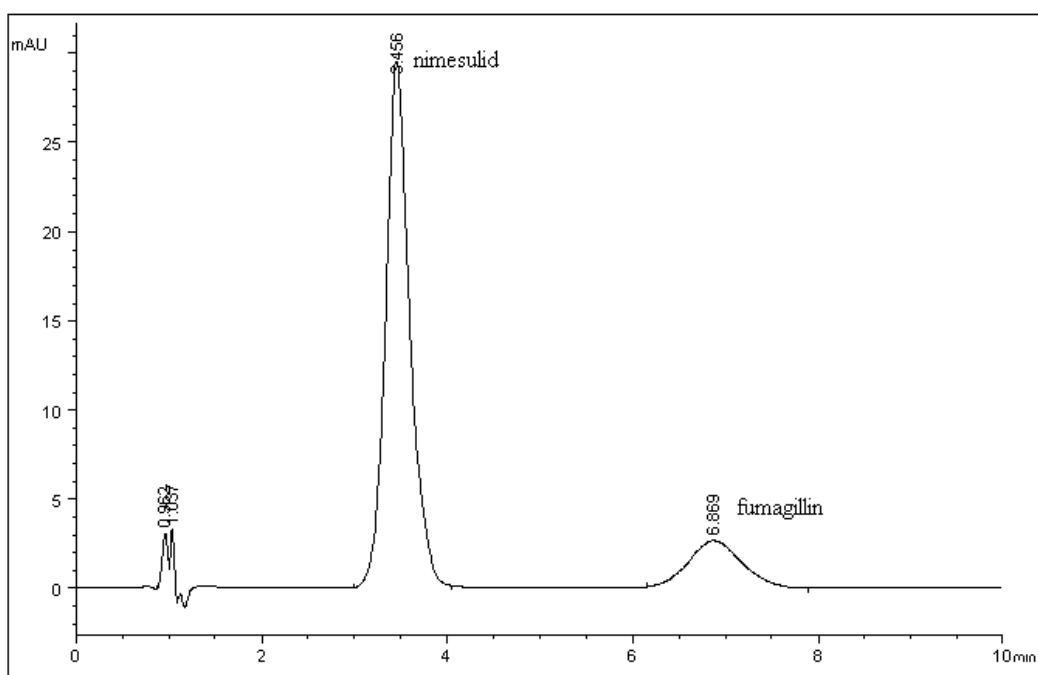


Obr.č.7: Chromatografický záznam placebo s fumagillinem (1mg/ml placebo)

Chromatografické podmínky viz. obr.č.3

- **detekční limit**

Nejnižší detekovatelná koncentrace fumagillinu byla 3,4 $\mu\text{g/ml}$.

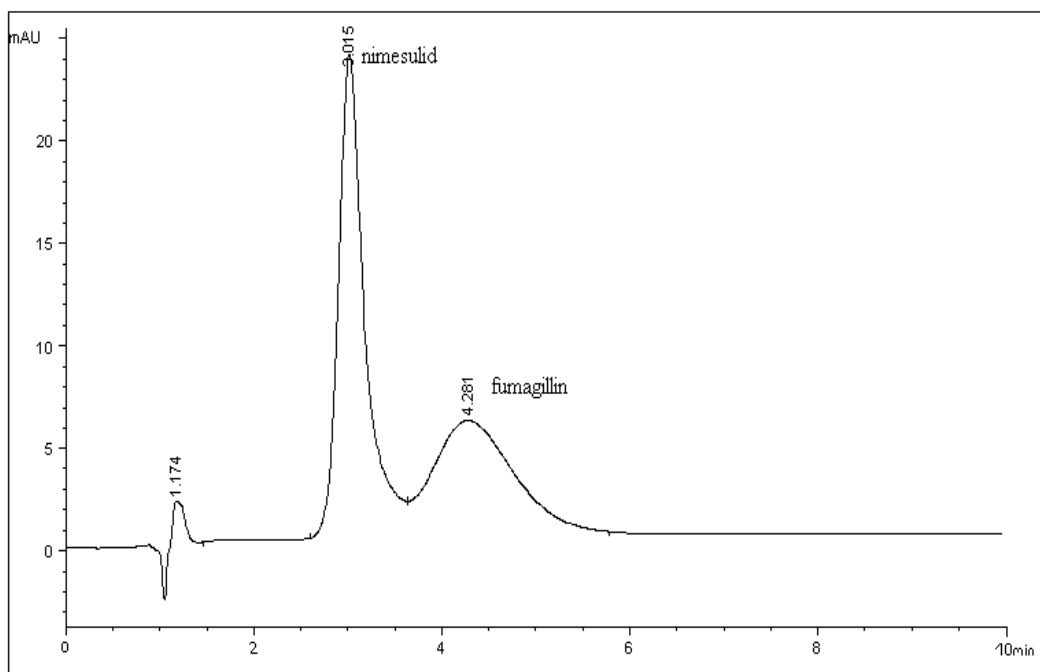


Obr.č. 8: Chromatografický záznam nejnižší detekovatelné koncentrace (3,4 $\mu\text{g/ml}$)

Chromatografické podmínky viz. obr.č.3

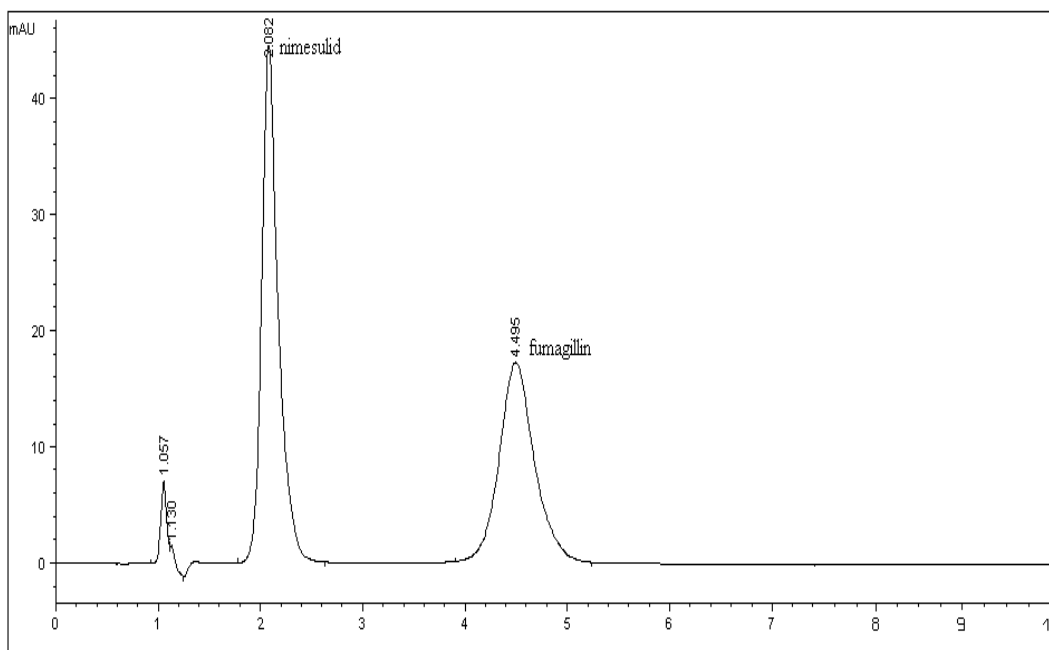
- **robustnost**

Při změně poměru mobilní fáze dochází ke zkracování retenčních časů jak fumagillinu, tak nimesulidu naopak změna pH mobilní fáze má vliv na retenční čas, ale symetrie píků zůstává zachována.



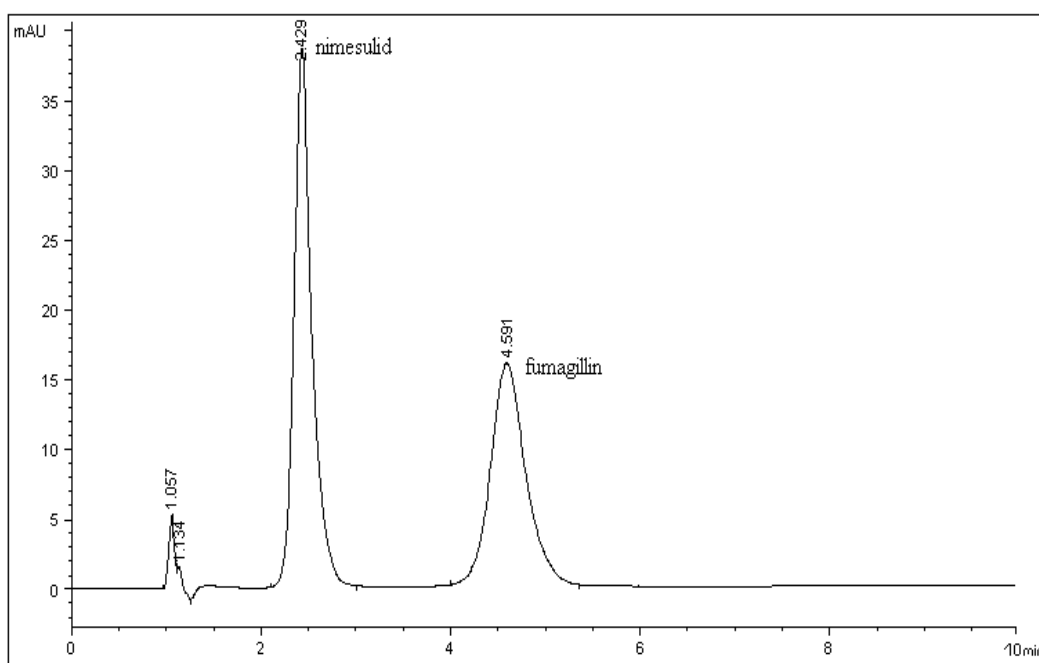
Obr.č.9: Chromatografický záznam při změně mobilní fáze

Chromatografické podmínky: **kolona**: 3x150 nm I.D. s náplní Separon SGX NH₂, 7 μm; **mobilní fáze** : methanol : octan amonný (vodný roztok 0,005 mol/l, v/v) v poměru 55 : 45, **průtoková rychlost** : 1 ml/min, $\lambda = 335$ nm, **nástřik** : 20 μl



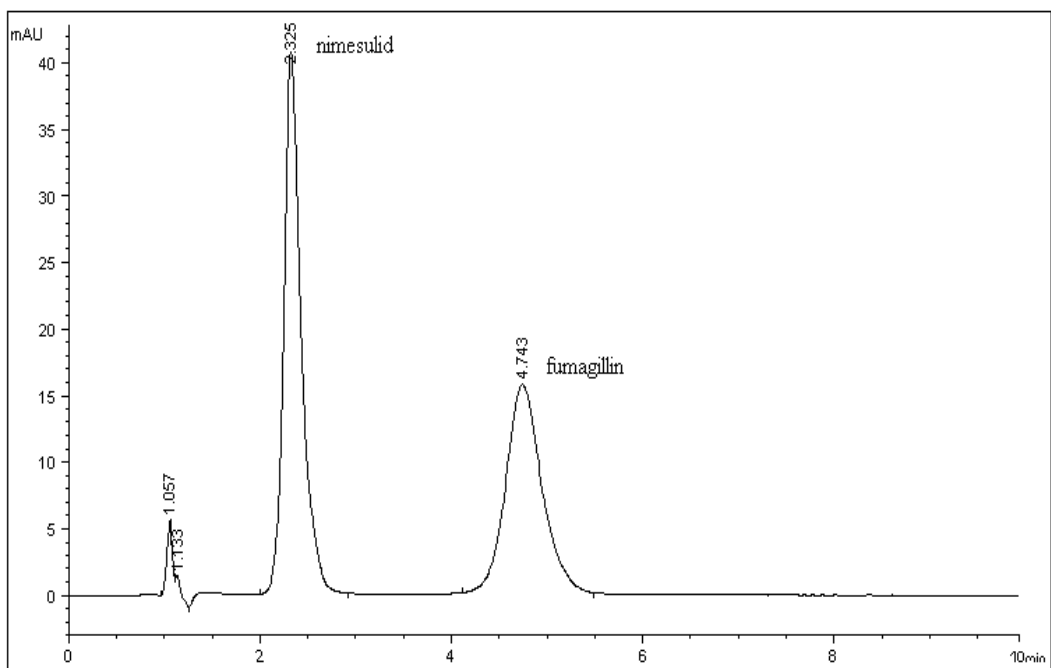
Obr.č.10: Chromatografický záznam při změně mobilní fáze

Chromatografické podmínky: **kolona**: 3x150 nm I.D. s náplní Separon SGX NH₂, 7 μm; **mobilní fáze** : methanol : octan amonný (vodný roztok 0,005 mol/l, v/v) v poměru 65 : 35, **průtoková rychlost** 1 ml/min, λ= 335 nm, **nástrik** : 20 μl



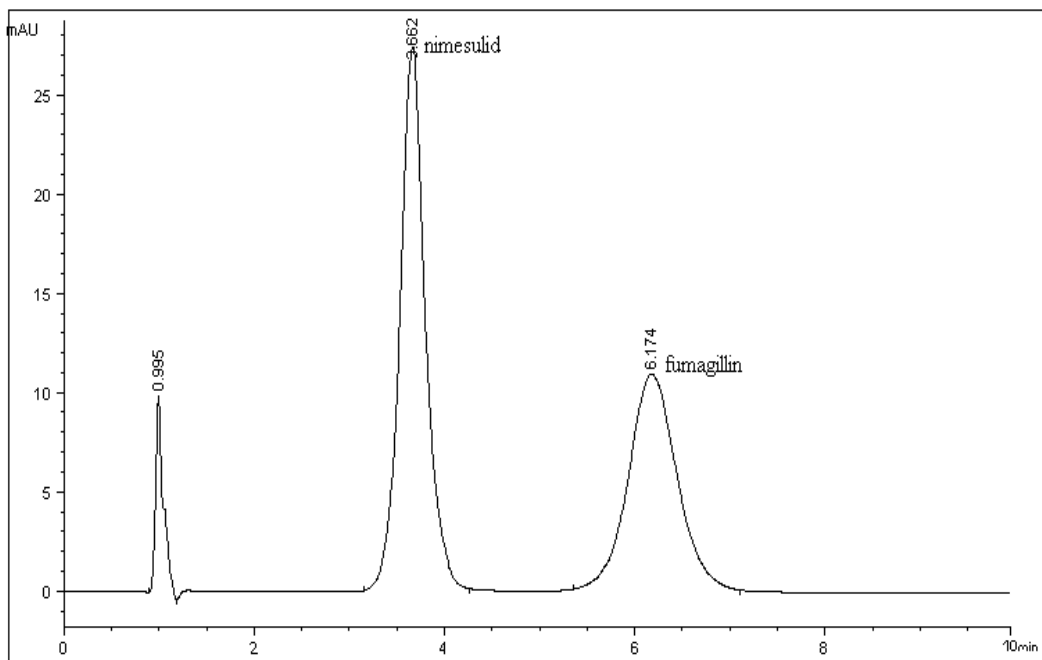
Obr.č.11: Chromatografický záznam při změně pH mobilní fáze = 3,01

Chromatografické podmínky viz obr.č.3

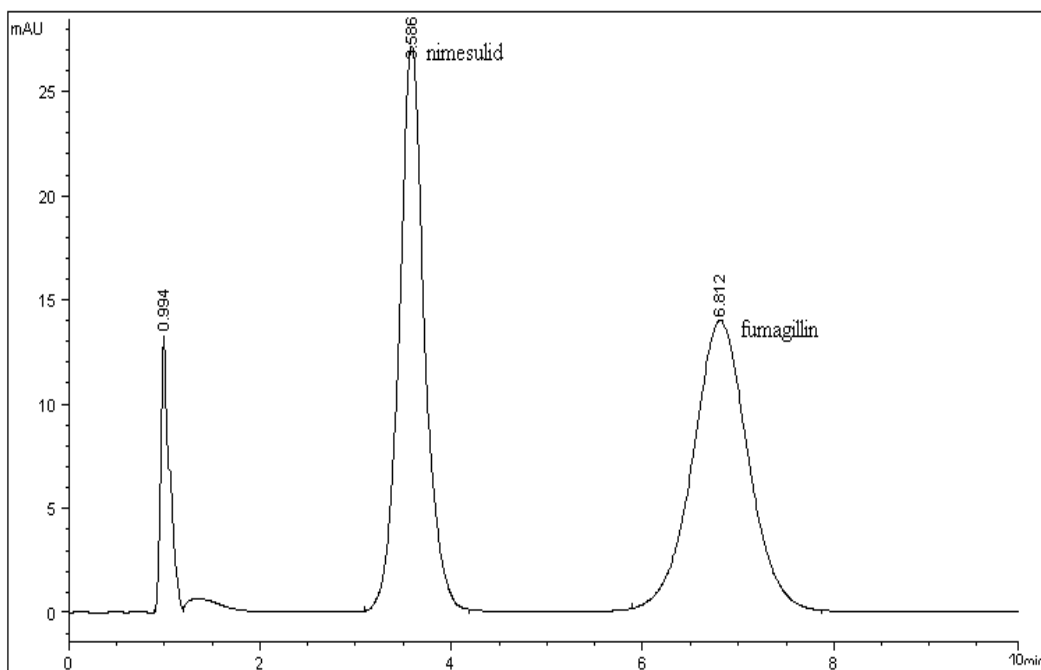


Obr.č.12: Chromatografický záznam při změně pH mobilní fáze = 7,05
Chromatografické podmínky viz obr.č. 3

- stabilita roztoků



Obr.č.13: Chromatografický záznam stability při pokojové teplotě po 72 hod.
Chromatografické podmínky viz obr.č.3



Obr.č.14: Chromatografický záznam stability při teplotě 2 až 8 °C
Chromatografické podmínky viz obr.č.3

Ponechání vzorků při pokojové teplotě a v lednici nemělo žádný vliv na retenční čas a nedošlo ani ke vzniku rozkladných produktů.

6. ZÁVĚR

V rigorózní práci bylo vypracováno analytické hodnocení fumagillinu s využitím HPLC a stanoven obsah fumagillinu v léčivém přípravku. Měření bylo prováděno na chromatografické koloně o rozměrech 3x150 mm I.D. s náplní Separon SGX NH₂, 7μm. Byla použita mobilní fáze ve složení methanol : octan amonný (vodný roztok 0,005 mol/l, v/v) v poměru 60:40, průtoková rychlost 1 ml/min při tlaku 2,5 až 2,6 MPa. Vzorky byly nastříkovány v objemu 20 μl.

Pro stanovení fumagillinu z léčivého přípravku byla vypracovaná metoda vnitřního standardu. Při zvolených podmínkách nejvíce vyhovoval nimesulid. Z validačních parametrů byla ověřena linearita na základě kalibrační křivky, kde rovnice regresní přímky je $y = 0,1606x + 0,1862$ a korelační koeficient je $R^2 = 0,9996$. Dále přesnost, správnost, robustnost, selektivita a detekční limit. Poté byla zkoušena stabilita při pokojové teplotě a při teplotě 2 až 8°C.

Bylo stanoveno 0,0238 g fumagillinu na 1 g léčivého přípravku. V léčivém přípravku je deklarovaná hodnota 0,025 g fumagillinu na 1g léčivého přípravku, což odpovídá 95,2 %.

7. LITERATURA

1. http://fch.upol.cz/skripta/zfcm/chrom/chrom_teorie.htm (21.9.2008)
2. Karlíček, R. a kol.: Analytická chemie pro farmaceuty, Karolinum, Praha 1998
3. <http://sweb.cz/biochemie/x/metody/chromatografie.htm#adsorpci> (21.9.2008)
4. www.mzcr.cz/data/c764/lib/ajald.htm (9.12.07)
5. www.mzcr.cz/data/c764/lib/ajayh.htm (9.12.07)
6. Mikeš, O.: Základní typy chromatografie. In: Mikeš, O a kol.: Laboratorní chromatografické metody, SNTL, Praha 1980
7. Churáček, J.; Jandera, P.: Úvod do vysokoúčinné kapalinové kolonové chromatografie, SNTL, Praha 1985
8. Klíma, J.; Grafnetterová, J.: Využití kapalinové a plynové chromatografie v klinické farmakologii. In: Pokroky ve farmacii 7, Avicenum, Praha 1987
9. Churáček, J.; Jandera, P.: Separace látek, Kapalinová vysokoúčinná kolonová chromatografie, SNTL, Praha 1986
10. Chromatografické metody, veličiny a výpočty, podklady pro seminář, katedra farmaceutické chemie a kontroly léčiv, Hradce Králové 2006
11. Český lékopis (ČL 2002), Grada, Praha 2002
12. web.natur.cuni.cz/~tesarove/hplc.pdf (21.9.2008)
13. Churáček, J.: Advanced Instrumental Methods of Chemical Analysis, Academia, Praha 1993
14. <http://ciselniky.dasta.mzcr.cz/hypertext/200620/hypertext/BOAJALB.htm> (21.9.2008)
15. Meloun, B.: Automatizace a mechanizace kolonových operací v kolonové chromatografii. In: Mikeš, O. a kol.: Laboratorní chromatografické metody, SNTL, Praha 1980
16. Szepezi, G.: How to use reverse phase HPLC, VCH Publishers Inc., USA 1992
17. <http://ciselniky.dasta.mzcr.cz/hypertext/200620/hypertext/BOAJALB.htm> (5.2.08)
18. Chemagazin 2003, č. 3, ročník XIII, 34-35
19. www.hplc.cz/Fag/monolithic_columns.htm (5.2.08)
20. Klimeš, J. a kol.: Kontrola léčiv I., Karolinum, Praha 2002
21. www.hplc.cz/Teorie/FL_detector.html (5.2.08)
22. Holzbecher, Z.; Churáček, J. a kol.: Analytická chemie, SNTL ALFA, Praha 1987
23. Validace analytických metod v kontrole léčiv, Věstník SÚKL 1/94, SÚKL Praha 1994

24. http://www.hplc.cz/Validace/index.htm#_3._Valida%C4%8Dn%C3%AD_parametr_y (25.9.2008)
25. Pharmazeutische Stoffliste, 8. Auflage, ABDA, Frankfurt am Main, 1992
26. Vodrážka a kol.: Veterinárská medicína a farmakol\u00f3gia, Osveta, Martin 1986
27. <http://toxicology.emtrading.cz/modules.php?name=News&file=article&sid=147> (25.9.2008)
28. Kocman, J.; \u010c\u00falper, Z. a kol.: Vademekum registrovan\u00fdch veterin\u00e1rn\u00edch p\u0159\u00edpravk\u00fa 1997, Strategie Praha
29. Kochansky, J. and Nasr, M.: Laboratory studies on the photostability of fumagillin, the aktive ingredient of Fumidil B¹, *Apidologie*, 2004, 35, 301-310
30. Nozala, Ma.J.; Bernala J.L.; Mart\u00edna, Ma.T.; Bernala, J.; \u00c1lvaro, A.; Mart\u00ednt, R. and Higesb, M.: Trace analysis of fumagillin in honey by liquid chromatography-diode array- electrospray ionization mass spectrometry, *J. Chromatogr. A*, 2008, 1190, 224-231
31. Assil Hanna I. and Sporns, P.: Elisa and HPLC methods analysis of fumagillin its decomposition products in honey, *J. Agric. Food Chem.*, 1991, 39, 2206-2213
32. Morovj\u00e1n, G.; Szak\u00e1cs, G. and Fekete, J.: Monitoring of selected metabolites and biotransformation products from fermentation broths by high-performance liquid chromatography, *J. Chromatogr. A*, 1997, 763, 165-172
33. Brackett, J.M.; Arguello, M.D.; Schaar, J.C.: Determination of fumagillin by high performance liquid chromatography, *J. Agric. Food Chem.*, 1988, 36, 762-764
34. Polez, M.I.; Pettis, J.S.; Smith, I.B.; Chu, P.S.: Multiclass determination and confirmation of antibiotic residues in honey using LC-MS/MS, *J. Agric. Food Chem.* 2008, 56, 1553-9
35. Ciampini, M.; Perlmutterand, P.; Watson, K.: Enantioselective synthesis of a potential key intermediate for the total synthesis of fumagillin, *Tetrahedron. Asymmetr.*, 2007, 18, 243-250
36. Chen, G.J.; Weylie, B.; Hu, C.; Zhu, J.; Forough, R.: FGFR1/PI3K/AKT signaling pathway is a novel target for antiangiogenic effects of the cancer drug fumagillin (TNP-470), *J. Cell. Biochem.*, 2007, 101, 1492-504
37. Lee, H.W.; Cho, C.S.; Kang, S.K.; Yoo, Y.S.; Shin, J.S.; Ahn, S.K.: Design, synthesis, and antiangiogenic effects of a series of potent novel fumagillin analogues, *Chem. Pharm. Bull.*, 2007, 55, 1024-9

38. Lefkove, B.; Govindarajan, B.; Arbiser, J.L.: Fumagillin: an anti-infective as a parent molecule for novel angiogenesis inhibitors, *Expert.Rev.Anti.Infect.Ther.* 2007, 5, 573-9
39. Stanimirovic, Z.; Stevanovic, J.; Bajic, V.; Radovic, I.: Evaluation of genotoxic effects of fumagillin by cytogenetic tests in vivo, *Mutat-Res.* 2007, 628, 1-10
40. Watanabe, N.; Nishihara, Y.; Yamaguchi, T.; Koito, A.; Miyoshi, H.; Kakeya, H.; Osada, H.: Fumagillin suppresses HIV-1 infection of macrophages through the inhibition of Vpr activity, *FEBS. Lett.*, 2006, 580, 2598-602
41. Didier, P.J.; Phillips, J.N.; Kuebler, D.J.; Nasr, M.; Brindley, P.J.; Stovall, M.E.; Bowers, L.C.; Didier, E.S.: Antimicrosporidial activities of fumagillin, TNP-470, ovalicin, and ovalicin derivatives in vitro and in vivo, *Antimicrob. Agents. Chemother.*, 2006, 50, 2146-55
42. Kim, D.; Ahn, S.K.; Bae, H.; Kim, H.S.: A stereoselective asymmetric synthesis of antibiotic (-)-fumagillol using claisen rearrangement and intramolecular ester enolate alkylation as key steps, *Arch. Pharm. Res.*, 2005, 28, 129-41
43. Rodeschini, V.; Boiteau, J.G.; Van-de-Weghe, P.; Tarnus, C.; Eustache, J.: MetAP-2 inhibitors based on the fumagillin structure. Side-chain modification and ring-substituted analogues. *J.Org.Chem.*, 2004 Jan 23; 69, 357-73
44. Mazzanti, C.M.; Tandle, A.; Lorang, D.; Costouros, N.; Roberts, D.; Bevilacqua, G.; Libutti, S.K. : Early genetic mechanisms underlying the inhibitory effects of endostatin and fumagillin on human endothelial cells, *Genome. Res.*, 2004, 14, 1585-93
45. Yang, W.; Hartweg, E.A.; Fang, A.; Demain, A.L.: Effects of carboxymethylcellulose and carboxypolymethylene on morphology of *Aspergillus fumigatus* NRRL 2346 and fumagillin production, *Curr. Microbiol.*, 2003, 46, 24-7
46. Yang, W.; Kim, W.S.; Fang, A.; Demain, A.L.: Carbon and nitrogen source nutrition of fumagillin biosynthesis by *Aspergillus fumigatus*, *Curr. Microbiol.*, 2003, 46, 275-9
47. Molina, J.M.; Tourneur, M.; Sarfati, C.; Chevret, S.; de Gouvello, A.; Gobert, J. G.; Balkan, S.; Derouin, F.: Fumagillin Treatment of Intestinal Microsporidiosis, *New Engl. J. Med.*, 2002, 25, 1936-1969
48. Pyun Hyung-Jung; Fardis, M.; Tario, J.; Yang Cheng, Y.; Ruckman, J.; Henninger, D.; Jin, H. and Choung, U. Kim: Investigation of novel fumagillin analogues as angiogenesis inhibitors, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2004, 14, 91-94

49. Beňo, P. ; Truplová, E. ; Ostrovská, V. ; Stankovičová, M.: Stabilita liečiv a liekov,
Veda, Bratislava 2003

SOUHRN

HPLC HODNOCENÍ FUMAGILLINU V LÉČIVÉM PŘÍPRAVKU

Rigorózní práce

Mgr. Kristýna Strýčková

Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmaceutické chemie a kontroly léčiv

V této rigorózní práci bylo vypracováno analytické hodnocení fumagillinu s využitím HPLC a stanoven obsah fumagillinu v léčivém přípravku. Měření bylo prováděno na chromatografické koloně o rozměrech 3x150 mm I.D. s náplní Separon SGX NH₂, 7μm. Byla použita mobilní fáze ve složení methanol : octan amonný (vodný roztok 0,005 mol/l, v/v) v poměru 60:40, průtoková rychlost 1 ml/min při tlaku 2,5 až 2,6 MPa. Detekce byla prováděna při 335 nm pomocí UV detektoru. Vzorky byly nastříkovány v objemu 20 μl.

Pro stanovení fumagillinu v léčivém přípravku byla vypracována metoda vnitřního standardu. Při zvolených podmínkách nejvíce vyhovoval nimesulid. Z validačních parametrů byla ověřena linearita, přesnost, správnost, robustnost, selektivita a detekční limit. Dále byla zkoušena stabilita při pokojové teplotě a při teplotě 2 až 8 °C.

Bylo stanoveno 0,0238 g fumagillinu na 1 g léčivého přípravku, což odpovídá 95,2 % deklarovaného množství

ABSTRACT

HPLC EVALUATION OF FUMAGILLIN IN THE MEDICINE

Rigorous thesis

Mgr. Kristýna Strýčková

**Charles University in Prague, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové,
Department of Pharmaceutical Chemistry and Drug Control**

In this rigorous thesis is described analytic evaluation of fumagillin by using HPLC and stated the amount of fumagillin in the medicine. The measurement was implemented on chromatographic column in size 3 x 150 mm I.D. with the Seladon SGX NH₂ filling, 7µm. There was used the mobile phase composed of methanol: ammonium acetate (aqueous solution 0,005 mol/l, v/v) in the ratio of 60:40, at the flow rate of 1ml/min and pressure of 2,5-2,6 MPa. The detection was performed at 335 nm using the UV detector. The samples were sprayed in cubage 20 µl.

The international standard method was drawn up for determination of fumagillin in medicine. The most suitable sample from the selected conditions was nimesulid. Concerning validation parameters were verified linearity, accuracy, robustness, selection and detector limit. Further there was examined the stability in conditions of room temperature and the temperature of 2-8°C.

It was determined 0,0238 g of fumagillin in 1 g of medicine that is stated as 95,2% of necessary amount.