

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE  
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ  
KATEDRA FARMACEUTICKÉ CHEMIE A KONTROLY LÉČIV

# **Hodnocení biologicky aktivních látek kapalinovou chromatografií XII.**

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: Mgr. Pavla Pilařová

Hradec Králové, 2011

Nela Kendziorová

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

V Hradci Králové 9. května 2011

Nela Kendziorová

Na tomto místě bych ráda poděkovala vedoucí diplomové práce Mgr. Pavle Pilařové za odborné vedení a poskytnutí cenných rad při vypracování diplomové práce. Dále bych poděkovala PharmDr. Petru Kastnerovi PhD. a všem pracovníkům katedry farmaceutické chemie a kontroly léčiv za vstřícné jednání a pomoc.

# OBSAH:

<b>1. ÚVOD.....</b>	<b>6</b>
<b>2. CÍL PRÁCE.....</b>	<b>8</b>
<b>3. TEORETICKÁ ČÁST.....</b>	<b>10</b>
3.1 <i>METFORMIN-HYDROCHLORID A JEHO VLASTNOSTI.....</i>	<i>11</i>
3.1.1 Vzorec a chemické vlastnosti .....	11
3.1.2 Indikace .....	11
3.1.3 Mechanismus účinku .....	12
3.1.4 Farmakokinetické vlastnosti .....	12
3.1.5 Kontraindikace .....	12
3.1.6 Nežádoucí účinky .....	13
3.1.7 Interakce .....	13
3.1.8 Přípravky s obsahem metformin-hydrochloridu.....	13
3.2 <i>VYSOKOÚČINNÁ KAPALINOVÁ CHROMATOGRAFIE (HPLC).....</i>	<i>15</i>
3.2.1 Mobilní fáze HPLC .....	16
3.2.2 Stacionární fáze HPLC.....	16
3.2.3 Princip separace látek v HPLC.....	17
3.2.4 Instrumentace .....	21
3.2.5 Kvalitativní a kvantitativní analýza.....	25
3.2.6 Praktické aplikace kapalinové chromatografie.....	27
3.2.7 Chromatografické podmínky pro stanovení metformin-hydrochloridu kapalinovou chromatografií uvedené v literatuře.....	28
<b>4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....</b>	<b>30</b>
4.1 <i>CHEMIKÁLIE A POMŮCKY.....</i>	<i>31</i>
4.1.1 Léčivé přípravky.....	31
4.1.2 Chemikálie.....	32
4.1.3 Sestava pro HPLC .....	32
4.1.4 Přístroje .....	33
4.1.5 Pomůcky.....	33
4.2 <i>PŘÍPRAVA ROZTOKŮ.....</i>	<i>33</i>
4.2.1 Příprava standardů.....	33
4.2.2 Příprava pufrů.....	34

4.2.3 Příprava mobilní fáze .....	34
4.2.4 Příprava zkoušených roztoků .....	35
4.3 CHROMATOGRAFICKÉ PODMÍNKY .....	35
<b>5. VÝSLEDKY A DISKUSE.....</b>	<b>37</b>
5.1 CHROMATOGRAFICKÉ PODMÍNKY .....	38
5.2 ANALÝZA LÉČIVÝCH PŘÍPRAVKŮ S METFORMIN-HYDROCHLORIDEM.....	51
<b>6. ZÁVĚR .....</b>	<b>53</b>
<b>7. LITERATURA.....</b>	<b>55</b>
<b>SOUHRN .....</b>	<b>58</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>59</b>

# **1. ÚVOD**

Metformin-hydrochlorid je perorální antidiabetikum. Jedná se o derivát biguanidu. Používá se v terapii diabetu mellitu II. typu u pacientů s nadváhou. Metformin-hydrochlorid nestimuluje vylučování inzulínu, nýbrž za přítomnosti inzulínu dokáže snížit nadměrně vysokou hladinu cukru v krvi. Nezvyšuje riziko hyperglykémie. [1]

Vysokoučinná kapalinová chromatografie (HPLC) je jednou z nejpoužívanějších analytických metod pro hodnocení léčiv. Jde o separační metodu, která umožňuje současně jak kvalitativní, tak i kvantitativní hodnocení separovaných složek směsi, a to s vysokou selektivitou, citlivostí a v relativně krátkém čase. Pro analýzu postačuje velmi malé množství vzorku. Z HPLC záznamu lze získat detailní informace o identitě, obsahu i čistotě analyzovaného léčiva. [2]

## **2. CÍL PRÁCE**

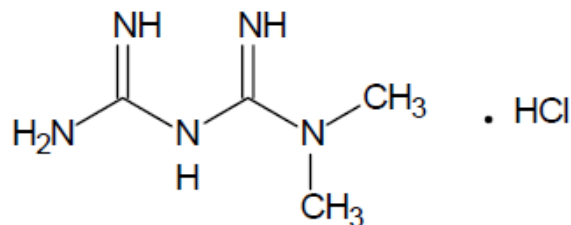


Cílem této diplomové práce je nalezení vhodné metody stanovení metformin-hydrochloridu pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC). Metoda stanovení metformin-hydrochloridu a jeho příbuzné látky 1-kyanguanidinu bude aplikována u léčivých přípravků Diaphage 850, Metfirex 850 mg, Metfogamma 850 mg a Siofor 850.

## **3. TEORETICKÁ ČÁST**

## 3.1 METFORMIN-HYDROCHLORID A JEHO VLASTNOSTI

### 3.1.1 Vzorec a chemické vlastnosti



Metformin-hydrochlorid ( $C_4H_{12}ClN_5$ ) je lékopisná látka.  $M_r = 165,63$ .

Je to 1,1-dimethylbiguanid-hydrochlorid. Obsahuje 98,5 % až 101,0 % sloučeniny  $C_4H_{12}ClN_5$ , počítáno na vysušenou látku. [3]

#### *Vlastnosti*

Bílé nebo téměř bílé krystaly. Snadno rozpustný ve vodě, těžce rozpustný v ethanolu 96 %, prakticky nerozpustný v acetonu a v dichlormethanu. Teplota tání je 222 °C až 226 °C. [3]

#### *Nečistoty*

- 1-kynguanidin
- 1-(4,6-diamino-1,3,5-triazin-2-yl)guanidin
- *N,N*-dimethyl-1,3,5-triazin-2,4,6-triamin
- 1,3,5-triazin-2,4,6-triamin (melamin)
- 1-methylbiguanid
- dimethylamin

[3]

### 3.1.2 Indikace

Metformin-hydrochlorid je perorální antidiabetikum. Používá se k léčbě diabetu mellitu II. typu u dospělých pacientů, zvláště u pacientů s nadváhou, v případě, že předepsaná dieta a cvičení nevedou k dostatečné regulaci glykémie. Používá se buď v monoterapii nebo v kombinaci s ostatními perorálními antidiabetiky, nebo s inzulínem. [4]

### 3.1.3 Mechanismus účinku

Jedná se o biguanid s antihyperglykemickým účinkem, který snižuje bazální i postprandiální hladinu glukózy v plazmě. Nestimuluje sekreci inzulínu, a proto nezpůsobuje hypoglykémii. Metformin-hydrochlorid může působit prostřednictvím tří mechanismů:

- Snižením tvorby glukózy v játrech inhibicí glukoneogeneze a glykogenolýzy.
- Ve svalech zvýšením citlivosti na inzulín, zlepšením absorpce a využití glukózy na periférii.
- Prodloužením absorpce glukózy ve střevech.

Dále zvyšuje transportní kapacitu všech druhů membránových přenašečů glukózy.

Také příznivě ovlivňuje metabolismus tuků, a to nezávisle na ovlivnění glykémie.

Metformin-hydrochlorid snižuje hladinu celkového cholesterolu, LDL cholesterolu a triglyceridů. [4]

### 3.1.4 Farmakokinetické vlastnosti

Biologická dostupnost biguanidů je 50-60 %. Metformin-hydrochlorid dosahuje maximální plazmatické koncentrace asi za 3 h po perorálním podání, eliminační poločas je 4,5 h, účinek se udrží 8-12 h. Vazba na plazmatické albuminy je nízká. Biguanidy nejsou v organismu metabolizovány, vylučují se ledvinami v aktivní nezměněné formě.

[5]

### 3.1.5 Kontraindikace

Přecitlivělost na metformin-hydrochlorid nebo kteroukoli pomocnou látku, diabetická ketoacidóza, diabetické prekóma, selhání nebo dysfunkce ledvin. Akutní stavy, které mohou ovlivnit funkce ledvin, např. dehydratace, závažná infekce, šok. Intravaskulární podání jodovaných kontrastních látek. Akutní nebo chronická onemocnění, která mohou ve tkáních vyvolat hypoxii, např. srdeční nebo respirační nedostatečnost, infarkt myokardu v nedávné době, šok. Dále jaterní nedostatečnost, akutní intoxikace alkoholem, alkoholismus a kojení. [4]

### 3.1.6 Nežádoucí účinky

Při zahájení léčby jsou velmi časté gastrointestinální poruchy jako nevolnost, zvracení, průjem, bolesti břicha a ztráta chuti k jídlu. Ve většině případů spontánně odezní.

Velmi vzácně se mohou vyskytnout kožní reakce jako erytém, svědění a kopřivka nebo snížení absorpce vitamínu B<sub>12</sub>. [4]

### 3.1.7 Interakce

Nedoporučuje se současné užívání metformin-hydrochloridu s:

- **alkoholem** (zvýšené riziko výskytu laktátové acidózy při akutní intoxikaci alkoholem)
- **jodovanými kontrastními látkami** (jejich podání může vést k selhání ledvin působící akumulaci metforminu a riziko vzniku laktátové acidózy).

Zvláštní opatrnost vyžaduje současné užívání metformin-hydrochloridu s:

- **glukokortikoidy** (systémové i lokální podání), **beta-2-sympatomimetiky a diuretika** (mají vnitřní hyperglykemické účinky)
- **ACE-inhibitory** (mohou snižovat hladinu glukózy v krvi)

[4]

### 3.1.8 Přípravky s obsahem metformin-hydrochloridu

- **Adimet, Adimet 1000**, Ratiopharm GmbH, Ulm, SRN
- **APO-metformin 500 mg, APO-metformin 850 mg, APO-metformin 1000 mg**, Apotex Europe B.V., Leiden, Nizozemí
- **Glucophage 500 mg, Glucophage 500 mg pro přípravu perorálního roztoku v sáčkích, Glucophage 850, Glucophage 850 mg pro přípravu perorálního roztoku v sáčkích, Glucophage 1000 mg, Glucophage 1000 mg pro přípravu perorálního roztoku v sáčkích, Glucophage XR**, Merck KgaA, Darmstadt, SRN, Merck Santé S.A.S., Lyon, Francie
- **Langerin 1000**, Zentiva a.s., Hlohovec, SR
- **Metfirex 500 mg, Metfirex 850 mg, Metfirex 1 g**, Sanofi – Aventis s.r.o, Praha, ČR
- **Metfogamma 500 mg, Metfogamma 850 mg, Metfogamma 1000 mg**, Wörwag Pharma GmbH und Co. KG, Böblingen, SRN

- **Metfogen 500 mg, Metfogen 850 mg, Metfogen 1000 mg**, Generics (UK) Ltd., Potters Bar, Herts, Velká Británie
- **Metformin 1000 mg Zentiva**, Zentiva a.s., Hlohovec, SR
- **Metformin AL 1000**, Aliud Pharma GmbH und Co. KG, Laichingen, SRN
- **Metformin Aurobindo 500 mg, Metformin Aurobindo 850 mg, Metformin Aurobindo 1000 mg**, Aurobindo Pharma Ltd., South Ruislip, Velká Británie
- **Metformin Bluefish 500 mg, Metformin Bluefish 850 mg, Metformin Bluefish 1000 mg**, Bluefish Pharmaceuticals AB, Stockholm, Švédsko
- **Metformin Mylan 500 mg, Metformin Mylan 850 mg, Metformin Mylan 1000 mg**, Generics (UK) Ltd., Potters Bar, Herts, Velká Británie
- **Metformin Pfizer 500 mg, Metformin Pfizer 850 mg, Metformin Pfizer 1000 mg**, Pfizer s.r.o., Praha, ČR
- **Metformin Pharmacin 500 mg, Metformin Pharmacin 850 mg, Metformin Pharmacin 1000 mg**, Generics (UK) Ltd., Potters Bar, Herts, Velká Británie
- **Metformin Teva 500 mg, Metformin Teva 850 mg, Metformin Teva 1000 mg, Metformin Teva XR 500 mg**, Teva Pharmaceuticals ČR s.r.o., Praha, ČR
- **Metformin USV Europe 500 mg, Metformin USV Europe 850 mg, Metformin USV Europe 1000 mg**, USV Europe Ltd., Cambridge, Velká Británie
- **Metformin Vale 500 mg, Metformin Vale 850 mg, Metformin Vale 1000 mg**, Generics (UK) Ltd., Potters Bar, Herts, Velká Británie
- **Normaglyc 500 mg, Normaglyc 850 mg, Normaglyc 1000 mg**, Jelfa S.A., Jelenia Góra, Polsko
- **Siofor 500, Siofor 850, Siofor 1000**, Berlin-Chemie AG, Berlin, SRN
- **Stadamet 500, Stadamet 850, Stadamet 1000**, Stada Arzneimittel AG, Bad Vilbel, SRN

[6]

## 3.2 VYSOKOÚČINNÁ KAPALINOVÁ CHROMATOGRRAFIE (HPLC)

Vysokoúčinná kapalinová chromatografie – High Performance Liquid Chromatography (HPLC) je progresivní analytická metoda, která nachází uplatnění ve všech oblastech analýzy léčiv.

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, a mobilní fází, která unáší separované látky. Při styku stacionární i mobilní fáze s dělenými látkami dochází k vzájemným interakcím, které jsou základním předpokladem pro jejich separaci. K separaci dochází na základě různé afinity dělených látek ke stacionární a mobilní fázi.

Stacionární fáze se nazývá sorbent. Mobilní fázi se říká eluční činidlo či eluent a její schopnosti vymývat látky eluční síla. Mobilní fáze o vyšší eluční síle vymývá látky z kolony rychleji než fáze o nižší eluční síle. Podle rostoucí eluční účinnosti jsou rozpouštědla seřazena do eluotropní řady: heptan < cyklohexan < tetrachlormethan < toluen < éther < chloroform < aceton < acetonitril < ethanol < methanol < octová kyselina.

HPLC analýzu lze realizovat za konstantního složení mobilní fáze v průběhu celé eluce, tzv. isokratická eluce. Je-li v průběhu analýzy programově měněno složení mobilní fáze, jedná se o tzv. gradientovou eluci. [7], [8], [9]

Mezi hlavní výhody HPLC patří:

- a) Jedná se o separační metodu, která umožňuje kvalitativní i kvantitativní hodnocení separovaných složek směsi.
- b) Rychlost analýzy, citlivost stanovení (v závislosti na použitém detektoru).
- c) Pro analýzu postačuje minimální množství vzorku.
- d) Možnost automatizace.

[7]

Separaci látek můžeme ovlivnit volbou stacionární fáze, změnami složek mobilní fáze (protože kapalná mobilní fáze není pouze inertním nosičem vzorků, ale podílí se přímo

na interakcích rozpuštěných látek se stacionární fází), ale i změnami dalších parametrů, především výměnou kolony, změnou průtokové rychlosti (tlaku) mobilní fáze a změnami pracovní teploty. [9]

### **3.2.1 Mobilní fáze HPLC**

Mobilní fáze se významně podílí na separačním procesu. Možnosti změny mobilní fáze jsou v podstatě neomezené. Pokud chceme zlepšit rozlišení látek při separaci, je vždy snadnější měnit složení mobilní fáze, než použít jiné stacionární fáze. Separaci lze ovlivnit nejen změnou zastoupení různých rozpouštědel v mobilní fázi, ale i změnou pH, iontové síly, přidáním iontově párových činidel.

[9]

### **3.2.2 Stacionární fáze HPLC**

Pro účinné dělení látek hraje rozhodující roli náplň kolony, tj. kvalita sorbentu, jeho velikost a stejnoměrnost částic, ale i tvar, porozita, struktura.

Chromatografické kolony pro analytické účely jsou nejčastěji 10-25 cm dlouhé o vnitřním průměru 3-5 mm. Kolony jsou naplněny vhodnými sorbenty. Náplně se připravují z pórovitých anorganických či polymerních materiálů. Nejčastěji se používají nemodifikované anebo chemicky modifikované mikročástice silikagelu. Podle vázané skupiny mají chemicky modifikované fáze různou polaritu od nepolárních až po polární. Pro dělení látek iontového charakteru se používají stacionární fáze s vlastnostmi iontoměníčů.

Sorbenty dělíme na polární a nepolární. Mezi polární patří silikagel, oxid hlinitý a chemicky vázané polární stacionární fáze (např. pentafluorfenylpropyl, kyanopropyl). Mezi nepolární řadíme chemicky vázané nepolární stacionární fáze (oktadecyl, oktyl nebo fenyl).

Malá stabilita silikagelu při pH menším než 2 a větším než 8 vedla k vývoji nových nosičů stacionární fáze, které by rozšířily pracovní rozsah hodnot pH a teploty. Zkoumaly se vlastnosti některých kovů (Zr, Ti, Al) a jejich oxidů. Jako perspektivní se jevil oxid zirkoničitý. Oxid zirkoničitý je teplotně i chemicky stabilní. Používá se buď nemodifikovaný nebo modifikovaný oxid zirkoničitý. Modifikací povrchu organickými polymery (polybutadienem a polystyrenem) byly vyvinuty nové stacionární fáze stabilní v celém rozsahu pH (1-14) a při teplotách do 200 °C. Separace je založena jednak na



hydrofóbních interakcích molekul analytů se stacionární fází, a dále na iontově-výměnných interakcích s adsorbovanou Lewisovou bází.

Vedle stacionárních fází, které se skládají z jednotlivých částic sorbentu, existují i monolitické stacionární fáze (monolity). Monolitické kolony tvoří jediný kus porézního materiálu, který zcela zaplňuje vnitřek separační kolony. Proti typickým kolonám plněným drobnými částicemi, monolitické kolony neobsahují mezičásticové prostory, kterými v klasických kolonách protéká mobilní fáze. Mobilní fáze protéká póry monolitické kolony. Tok póry umožňuje značné zrychlení separací zejména velkých molekul (např. bílkovin, nukleových kyselin atd.). Podle chemické podstaty můžeme monolitické stacionární fáze rozdělit na anorganické, makroporézní polymerní a stlačitelné monolity (komprimované gely).

Anorganické monolity jsou na bázi silikagelu. Skládají se z dobře uspořádaných přibližně stejně velikých skeletů prostoupených téměř monodisperzními 1  $\mu\text{m}$  velkými póry. Používají se na separaci malých molekul.

Makroporézní polymerní monolity jsou připravovány přímo v koloně, která se naplní polymerační směsí, uzavře a za tepla je provedena polymerace. Příkladem jsou monolity na bázi glycidylmethakrylátu nebo polystyrenu.

Stlačitelné monolity (komprimované gely) jsou tvořeny gelem, který je připraven polymerací vodného roztoku *N,N'*-metylenbis-akrylamidu a kyseliny akrylové v přítomnosti anorganické soli (nejčastěji síranu amonného). Používají se k separaci bílkovin. [7], [8], [9], [10], [11]

### 3.2.3 Princip separace látek v HPLC

Hlavními principy chromatografického dělení na základě nichž dochází k separaci jsou: adsorpce, rozdělování mezi dvě kapalně fáze, iontová výměna a síťový efekt. Podle podstaty separačního procesu lze chromatografické metody rozčlenit na adsorpční, rozdělovací, iontově výměnnou, gelovou a afinitní chromatografii.

[9], [12]

#### *Adsorpční chromatografie*

Podstatou separace je rozdílná adsorbovatelnost dělených látek na aktivní povrch adsorbentu (stacionární fáze). Povrch adsorbentu je obsazen molekulami mobilní fáze. Adsorpce solutu je výsledkem soutěžení mezi molekulami solutu a mobilní fází

o aktivní centrum.

Polární molekuly se obecně silněji adsorbují na polárních adsorbentech. Jejich adsorpce je dále podporována nepolární mobilní fází. Zvýšením polaritý mobilní fáze se adsorpce snižuje v důsledku rostoucí adsorpce molekul mobilní fáze na povrchu adsorbentu.

Pro separaci látek na základě adsorpce se využívá nemoifikovaný silikagel na jehož volně přístupné skupiny Si – OH na povrchu se polární látky adsorbují prostřednictvím vodíkových vazeb. Sušením při zvýšené teplotě se silikagel dehydratuje a lze tak získat adsorbent s požadovanou aktivitou. Nevýhodou u silikagelu je jeho malá stabilita při pH menším než 2 a větším než 8.

V adsorpční chromatografii s polárními adsorbenty se používají nepolární rozpouštědla (např. hexan) jako mobilní fáze, k nimž se přidávají malá množství (v obsahu menším než 1%) polárních modifikátorů (např. voda, acetonitril, alkoholy, tetrahydrofuran). Tyto modifikátory mají velký vliv na separaci, protože se přednostně adsorbují z mobilní fáze na aktivních místech adsorbentu, tím se stává tento povrch homogennějším a zlepšuje se účinnost separace.

Adsorpční chromatografie je vhodná pro separaci směsi nízkomolekulárních látek, sloučenin lipofilního charakteru a geometrických izomerů. [7], [8], [9]

### *Rozdělovací chromatografie*

V kapalinové rozdělovací chromatografii je podstatou separace rozdílná rozpustnost dělených látek ve dvou vzájemně nemísitelných kapalinách (LLC), přičemž kapalina použitá jako stacionární fáze je zakotvena na vhodném nosiči.

V rozdělovací chromatografii se používají chemicky modifikované stacionární fáze, u nichž se na bázi silikagelu silylací připravují fáze s různými skupinami. Podle vázané skupiny mají chemicky modifikované fáze různou polaritu od nepolárních, vysoce hydrofobních, používaných pro obrácený systém fází až po polární.

Chemicky modifikované stacionární fáze mají řadu výhod:

1. velkou všestrannost použití
2. při změně mobilní fáze se rychle ustavuje rovnováha
3. malé změny v obsahu vody v mobilní fázi neovlivňují separaci
4. není nutné předběžné nasycení mobilní fáze fází stacionární
5. je usnadněna předběžná úprava a separace vzorků biologického původu, neboť

jako mobilní fáze se nejčastěji používají vodné roztoky a sorpce biologických vzorků je právě největší z vody.

Chemicky modifikované stacionární fáze lze kombinovat s velmi rozmanitými mobilními fázemi, od jednoduchých vodných pufrů, přes směsi vody s organickými rozpouštědly, až po organická rozpouštědla. Kromě změn složení lze dále vlastnosti mobilní fáze měnit úpravou pH a přidáním komplexotvorných činidel. Z toho plyne široká aplikovatelnost těchto systémů pro separace látek o různé polaritě a molekulové hmotnosti. [7], [8], [9]

### *Iontově výměnná chromatografie*

Podstatou separace je rozdílná afinita dělených látek, které jsou zpravidla v iontové formě, k iontovým skupinám iontoměniče. Rozdílnost afinity separovaných látek je dána rozdílnými hodnotami disociačních konstant ionogenních skupin, různou velikostí iontů a různým mocenstvím iontů.

Stacionární fází jsou iontoměniče (anexy nebo katexy). Jako stacionární fáze se používají materiály na bázi silikagelu nebo organického polymeru, které jsou modifikovány iontově výměnnými skupinami. Využívají se tyto funkční skupiny: sulfonová (silný měnič kationtů), karboxylová (slabý měnič kationtů), aminoskupina (slabý měnič aniontů), tetraalkylamoniový ion (silný měnič aniontů). Jako mobilní fáze se nejčastěji používají vodné roztoky pufrů.

Iontově výměnná chromatografie se používá pro látky iontové povahy. Řadí se sem silné elektrolyty (anorganické silné kyseliny, báze nebo soli), slabé elektrolyty, které lze převést na iontovou formu disociací či protonizací. Iontově výměnná chromatografie se využívá k analýze aminokyselin, nukleotidů apod. [7], [9], [13]

### *Gelová chromatografie*

Analyzované látky jsou separovány na základě velikosti molekul. Princip tohoto rozdělování je nerovnovážný a nazývá se síťový efekt. Molekuly látky jsou nesený protékající mobilní fází kolonou naplněnou porézním materiálem (gelem), přičemž pronikají (permeací) do rozpouštědlem naplněných pórů gelu. Malé molekuly pronikají do pórů všech velikostí, větší molekuly jen do větších pórů a velké molekuly, které přesahují průměr pórů, vycházejí z kolony bez jakéhokoliv zdržení. Separace závisí na velikosti a tvaru částic solutu a na velikosti a tvaru pórů stacionární fáze.

Jako stacionární fáze se používají anorganické nebo organické gely. Anorganické gely jsou makroporézní, většinou na bázi oxidu křemičitého. Organické gely jsou homogenní nebo heterogenní síťované organické polymery. [7], [9], [13]

#### *Afinitní (biospecifická) chromatografie*

Afinitní chromatografie je založena na schopnosti biologicky aktivních látek vázat specificky a reversibilně komplementární látky (ligandy). Příkladem jsou komplexy enzymů s inhibitory, substráty, kofaktory či efektory, komplexy protilátek s antigeny, komplexy lektinů s glykoproteiny nebo polysacharidy, apod.

Při přípravě stacionární fáze je nutné použít nosič. Nosič obsahuje funkční skupinu pro vazbu ligandu (nejčastěji bílkovina). Jako nosič se používá agarosa a její deriváty, organické polymery a nosiče na bázi silikagelu.

Afinitní chromatografie se používá k izolaci enzymů, jejich inhibitorů a kofaktorů, protilátek a antigenů, lektinů, polysacharidů a glykoproteinů, nukleových kyselin a nukleotidů, atd. [9]

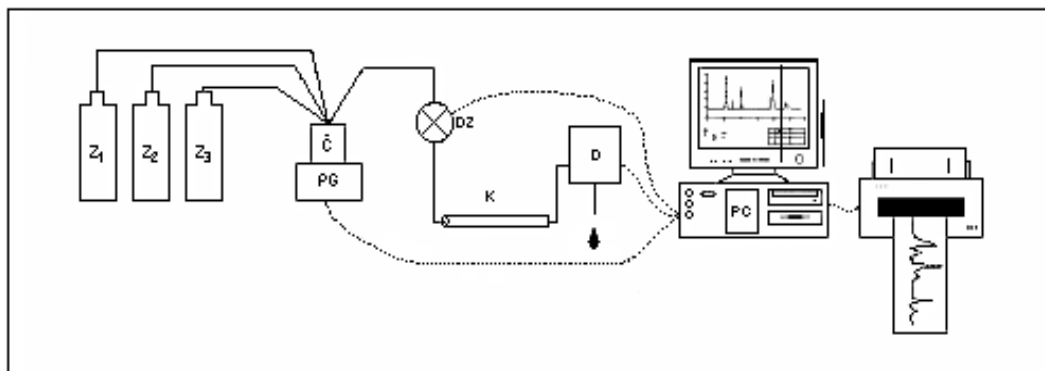
#### *Ultra Performance Liquid Chromatography (UPLC)*

Ultra Performance Liquid Chromatography je poměrně nová technika v oblasti kapalinové chromatografie. Separace na UPLC probíhá za velmi vysokých tlaků (100 MPa). Pro analýzu postačují velmi malá množství vzorků. Použití UPLC zkracuje dobu analýzy, snižuje spotřebu rozpouštědel a zvyšuje citlivost analýzy.

Jako stacionární fáze se používají materiály na bázi silikagelu, které jsou připraveny speciální technologií BEH (bridged ethylsiloxane hybrid technology). BEH technologie zajišťuje stabilitu sorbentu za vysokých tlaků. Velikost částic sorbentu bývá např. 1,7  $\mu\text{m}$ . [14]

### 3.2.4 Instrumentace

Kapalinový chromatograf se skládá z částí, které zabezpečují transport mobilní fáze, separaci látek a jejich detekci. Schéma kapalinového chromatografu je na Obrázku 1.



**Obrázek 1 Schéma kapalinového chromatografu**

$Z_1$ ,  $Z_2$ ,  $Z_3$  – zásobníky mobilní fáze, Č – vysokotlaké čerpadlo, PG - programovací jednotka, DZ – dávkovací zařízení, K – chromatografická kolona, D – diferenciální detektor, PC – počítač. (Plnou čarou je znázorněn tok mobilní fáze, přerušovanou čarou elektrický signál.)

[7]

#### *Zásobník mobilní fáze*

Jako zásobník mobilní fáze ( $Z_1$ ,  $Z_2$ ,  $Z_3$ ) lze použít libovolnou uzavřenou nádobu chemicky odolnou vůči používaným rozpouštědlům. Odplyněná mobilní fáze se přivádí ze zásobníku přes filtr, který brání průniku částic pevných nečistot, do čerpadla (Č). Odplynění je nezbytné, aby se předešlo tvorbě bublinek, což by rušilo jak detekci, tak funkci čerpadla. Odplynit mobilní fázi lze pomocí ultrazvuku, podtlaku nebo probubláváním inertním plynem (dusíkem nebo heliem). Odplynění provádí degasér. [9]

#### *Čerpadlo*

Čerpadlo (Č) je jednou z nejdůležitějších částí kapalinového chromatografu, protože musí zajistit konstantní průtok mobilní fáze. Mobilní fáze je čerpána čerpadlem, které musí umožňovat konstantní bezpulzní tok mobilní fáze a malé rychlosti (0,1 – 10 ml/min) za vysokého tlaku až 40 MPa.

Pomocí programovací jednotky se nastaví požadované složení mobilní fáze a rychlost průtoku mobilní fáze. [8], [9]

### *Dávkovací zařízení*

Čerpadlem je mobilní fáze přiváděna do dávkovacího zařízení (DZ). Automatické dávkovací zařízení je vybaveno zásobníkem vzorků, který obsahuje uzavřené nádoby se vzorky (vialky).

Nejčastěji se používají dávkovací ventily se smyčkou. Smyčkové dávkovače umožňují dávkovat libovolný objem vzorku jehlou. Dávkované vzorky jsou vedeny do kolony (K). [9]

### *Kolona*

Chromatografické kolony jsou obvykle vyráběny z nerezové oceli. Jedná se o několik cm dlouhé trubice naplněné stacionární fází.

Náplň kolony musí být naprosto homogenní a rovnoměrná, proto se stále častěji používají kolony plněné a testované přímo výrobcem. Spoje mezi kolonou, dávkovacím zařízením a detektorem jsou kapilární (vnitřní průměr 0,5 mm), nejčastěji z nerezové oceli. [8]

### *Detektor*

Z kolony je eluát veden do detektoru (D). Detektor slouží k indikaci látek vycházejících z chromatografické kolony. Detektor sleduje pomocí vhodného snímače některou z vlastností eluátu (většinou koncentraci separovaných složek) a signál se po zesílení přivádí do počítače (PC). [12]

Na detektory pro HPLC jsou kladeny mimořádné požadavky:

- vysoká citlivost – detekce látek v roztoku v koncentracích ng až  $\mu\text{g/ml}$
- reprodukovatelnost a linearita odezvy
- nezávislost odezvy na změně složení mobilní fáze při gradientové eluci
- univerzálnost – detekce všech oddělených složek vzorku

[8]

K detekci separovaných látek se zpravidla využívá určitých jejich vlastností, jimiž se tyto látky liší od složek mobilní fáze. Rozlišujeme dva typy detektorů – univerzální a selektivní.

- Univerzální detektor – měří vlastnost systému jako celku, která se mění se změnou složení systému (např. index lomu, tepelná vodivost, relativní permitivita apod.). Detegovaná látka musí mít vlastnosti podstatně odlišné od vlastností ostatních složek mobilní fáze, aby při změnách její koncentrace docházelo k výrazné změně signálu. Proto je tento detektor méně citlivý než detektor selektivní.
- Selektivní detektor – měří vlastnost, která selektivně závisí na koncentraci (množství) sledované složky (např. absorbance při určité vlnové délce záření, elektrický proud při určitém potenciálu atd.). Měření je citlivější. Selektivita je výhodná při analýzách složitých směsí látek.

Mezi běžné detektory používané v HPLC patří spektrofotometrické, fluorimetrické, elektrochemické a refraktometrické. [9], [12]

#### *Spektrofotometrické detektory*

Spektrofotometrické detektory jsou nejčastěji používány při HPLC analýze léčiv. Vyznačují se značnou citlivostí ( $10^{-9}$  až  $10^{-10}$  g/ml) a lze je používat při gradientové eluci. Proměřují absorbanci elektromagnetického záření určité vlnové délky složkami eluátu protékajícího 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, eventuálně UV-VIS detektory. Nejužívanější UV detektory jsou:

- UV-VIS detektor s proměnnou vlnovou délkou (libovolně měnitelná).
- Scanning UV detektor, snímající během několika sekund absorpční spektrum v maximu píku hodnoceného léčiva.
- Diode array detektor (řízený počítačem, umožňuje trojrozměrnou projekci, snímá absorpční spektrum, hodnotí léčivo současně při několika vlnových délkách, porovnává poměry absorbancí).
- UV detektor s fixní vlnovou délkou (nejčastěji 254 nm nebo 280 nm, při nichž absorbuje většina léčiv). Jsou poměrně jednoduché konstrukce a cenově nejdostupnější.

[7]

### *Fluorimetrické detektory*

Fluorimetrické detektory jsou vysoce citlivé pro přirozeně fluoreskující látky, případně pro látky, které lze převést pomocí vhodných činidel na fluoreskující deriváty. Fluorimetrické detektory jsou tedy méně univerzální než UV detektory, ale citlivější ( $10^{-9}$  až  $10^{-12}$  g/ml), selektivnější a jsou rovněž použitelné při gradientové eluci.

Při fluorimetrické detekci prochází eluovaná látka průtokovou celou detektorem, absorbuje UV záření u intenzivního zdroje a přitom vydává fluoreskující záření o větší vlnové délce než záření excitační. Excitační záření je přeměněno na elektrický signál, jehož velikost je úměrná intenzitě fluorescenčního záření.

[7], [9], [12]

### *Elektrochemické detektory*

Elektrochemické detektory nacházejí uplatnění u látek, u nichž lze využít dějů souvisejících s elektrochemickou reakcí probíhající na rozhraní elektroda – eluent. Jsou založeny na měření vodivosti nebo elektrického proudu odpovídajícího oxidaci nebo redukci analytů. Schopnost elektrochemické redukovatelnosti a oxidovatelnosti využívá voltametrický, amperometrický a polarografický detektor. Elektrochemické detektory jsou univerzální, značně citlivé ( $10^{-9}$  až  $10^{-12}$  g/ml), ale většinu z nich nelze použít při gradientové eluci. [7], [9]

### *Refraktometrické detektory*

Měří rozdílný index lomu mezi čistou mobilní fází a eluátem vytékajícím z kolony, obsahujícím analyzovanou látku. Jsou méně citlivé ( $10^{-6}$  g/ml). V dnešní době se používají jen ojediněle, protože mají řadu nevýhod. [7]

### *Hmotnostní detektory*

Pro detekci léčiv je v poslední době využíváno též spojení HPLC s hmotnostní spektrometrií (MS). Hmotnostní spektrometrie je metoda založená na přímém měření hodnoty poměru hmotnosti a počtu kladných nebo záporných elementárních nábojů iontů v plynné fázi, získaných po ionizaci analyzované látky. Hmotnostní spektrometr pracuje za vakua ( $10^{-3}$  až  $10^{-6}$  Pa).

Po výstupu z HPLC kolony je nutno z eluentu odstranit mobilní fázi a molekuly léčiva v plynném stavu jsou v hmotnostním spektrometru ionizovány nárazy elektronů,



termoionizací či elektroionizací. Nabité částice (molekuly i fragmentární ionty) jsou v magnetickém nebo vysokofrekvenčním poli separovány podle hmotnosti a náboje a je zaznamenáno hmotnostní spektrum (tj. četnost iontů ve vztahu k poměru - hmotnost/počet nábojů).

Kombinace HPLC-MS je vhodná pro analýzu polárních, málo těkavých sloučenin a látek tepelně nestálých, které není možno analyzovat kombinací GC-MS (plynová chromatografie spojená s hmotnostní spektrometrií).

Spojení HPLC-MS je vysoce selektivní, vysoce citlivé a poskytuje řadu údajů potřebných pro identifikaci léčiv. Hmotnostní detektory jsou finančně velmi náročné.

[3], [7]

#### *Počítač*

Počítač zpracovává vhodně upravený signál z detektoru, umožní jeho vstup na tiskárnu. Počítač řídí chod celého chromatografu. [7]

### **3.2.5 Kvalitativní a kvantitativní analýza**

#### *Kvalitativní analýza*

Hlavním úkolem kvalitativní analýzy je zjištění či potvrzení identity analyzované látky. Nejběžnějším prostředkem identifikace je retenční (eluční) čas. Retenční čas je základní kvalitativní charakteristikou v HPLC. Je to čas od nástřiku vzorku na kolonu k maximu chromatografického píku. Nejčastějším důkazem totožnosti je shoda retenčních časů chromatografického píku léčiva v analyzovaném vzorku s retenčním časem píku standardu. [7]

#### *Kvantitativní analýza*

Kvantitativní charakteristikou v HPLC je plocha (event. výška) chromatografického píku.

Pro stanovení jednotlivých složek ve směsi se nejčastěji používají dvě metody:

##### *1. Metoda vnějšího standardu*

Tato metoda spočívá ve dvou krocích (dvojím dávkování). V prvním kroku se na kolonu nastříkne roztok analyzovaného vzorku a po registraci chromatografického záznamu se ve druhém kroku nastříkne roztok vnějšího standardu a opět se registruje jeho chromatogram.

Jako vnější standard se zpravidla používá u substancí standard stanovované látky, označovaný CRL (chemická referenční látka), nebo u složených lékových přípravků jedna z analyzovaných složek směsi.

Koncentrace stanovovaných složek směsi se pak vypočítá z poměrů ploch (výšek) píků jednotlivých stanovovaných látek a plochy píku vnějšího standardu.

## 2. *Metoda vnitřního standardu*

Ke známému objemu roztoku vzorku se přidá definovaný objem roztoku vhodného vnitřního standardu a po promíchání se nastříkuje na kolonu.

Metoda vnitřního standardu je méně časově náročná a hlavně přesnější, protože není zatížena chybou dvojího nástřiku. Vnitřní standard musí být eluován v blízkosti píků, které budou vyhodnocovány, musí mít podobnou koncentraci jako látky, jejichž obsah je zjišťován a musí být chemicky inertní. Stanovení obsahu se provede opakovanými nástřiky porovnávacích a zkoušených roztoků. Ze získaných chromatografických záznamů se vypočítá obsah hodnocených léčiv. Koncentrace stanovovaných látek se vypočítá z poměrů ploch (výšek) píků jednotlivých separovaných složek a plochy píku vnitřního standardu.

[2]

Nejlepších kvantitativních výsledků se dosáhne minimalizací možných zdrojů chyb v následujících krocích:

- *odběr reprezentativního vzorku a jeho skladování*

Homogenní kapalně vzorky jsou reprezentativní. U nehomogenních vzorků (např. moč) je nutné odebrat velké množství materiálu a promísit ho. Vzorky je nutné uchovávat za vhodných podmínek, aby nedošlo k jejich degradaci.

- *příprava vzorků pro dávkování do kapalinového chromatografu*

Vzorky je potřeba přefiltrovat, aby se neucpaly kapilární spoje.

- *dávkování vzorku*

Dávkování v HPLC se provádí dávkovači se smyčkou. Dávkování je reprodukovatelné. Reprodukovatelnost měření výšky a plochy píků se pohybuje kolem 1-2 %.

- *chromatografická separace*

Důležité je dodržovat stejné experimentální podmínky.

▪ *Detekce, zpracování a interpretace signálu detektoru*

Zdrojem chyb může být šum, únik základní linie i citlivost detekce, které jsou ovlivněny změnami v průtokové rychlosti. Pokud průtok mobilní fáze kolísá, je přesnější měřit výšku píků. Při kolísání složení mobilní fáze je přesnější měření plochy píků.

[7], [9]

### **3.2.6 Praktické aplikace kapalinové chromatografie**

Využití kapalinové chromatografie v praxi je velmi rozsáhlé. Kapalinová chromatografie umožňuje analyzovat látky v rozmezí molekulových hmotností od sto do několika stovek tisíc.

Používá se k řešení těchto hlavních úkolů:

1. K dělení a identifikaci látek ve směsích
2. Ke kontrole čistoty látek
3. K čistění a mikropreparaci látek
4. Ke kvantitativní analýze látek ve směsi
5. Ke kontrole výroby a to jak předvýrobních stupňů (kontrola surovin), tak i meziproductů a finálních výrobků
6. Ke kontrole životního prostředí (např. pesticidy ve vodách)
7. V klinické praxi k analýzám nejrůznějších komponent v tělních tekutinách (krvi, moči) – hormony, steroidy, léčiva a jejich metabolity
8. V potravinářství, ke sledování čistoty výrobků
9. V biologii a biochemii při analýzách bílkovin, nukleových kyselin a v dalších oblastech biochemické analýzy
10. V řadě dalších odvětví průmyslu, v zemědělství a všude tam, kde je třeba sledovat buď čistotu surovin anebo sledovat migraci určitých preparátů v prostředí (např. herbicidy v půdě) anebo provádět hygienickou (zdravotní) kontrolu finálních výrobků či sledovat účinné složky v nich.

[12]

### 3.2.7 Chromatografické podmínky pro stanovení metformin-hydrochloridu kapalinovou chromatografií uvedené v literatuře

Separaci metformin-hydrochloridu kapalinovou chromatografií lze provést několika způsoby (viz. Tabulka 1.).

Tabulka 1. Možné chromatografické podmínky pro stanovení metformin-hydrochloridu kapalinovou chromatografií

<b>Metoda 1</b>	
<b>Stacionární fáze</b>	μbondapak C <sub>18</sub>
<b>Mobilní fáze</b>	Acetonitril, dodecylsulfát sodný, dihydrogensulfát sodný, destilovaná voda
<b>Detekce</b>	UV při 235 nm
<b>pH a průtok</b>	pH 5.1, průtok 1.5 ml/min
<b>Zdroj literatury</b>	[16]
<b>Metoda 2</b>	
<b>Stacionární fáze</b>	Reverzní fenyllová fáze při 40°C
<b>Mobilní fáze</b>	Fosfátový pufr a acetonitril
<b>Detekce</b>	UV při 236 nm
<b>pH a průtok</b>	pH 7.0, průtok 1.0 ml/min
<b>Zdroj literatury</b>	[17]
<b>Metoda 3</b>	
<b>Stacionární fáze</b>	Nova-Pak silikagelová kolona
<b>Mobilní fáze</b>	Dihydrogenfosfát amonný, methanol
<b>Detekce</b>	UV při 232 nm
<b>pH a průtok</b>	pH 5.0, průtok 1.0 ml/min
<b>Zdroj literatury</b>	[18]
<b>Metoda 4</b>	
<b>Stacionární fáze</b>	Silikagelová kolona
<b>Mobilní fáze</b>	Acetonitril, dihydrogenfosfát sodný
<b>Detekce</b>	UV při 324 nm
<b>pH a průtok</b>	pH 6.0, průtok 1.3 ml/min
<b>Zdroj literatury</b>	[19]

<b>Metoda 5</b>	
<b>Stacionární fáze</b>	HSF5 kolona
<b>Mobilní fáze</b>	Acetonitril, acetát amonný
<b>Detekce</b>	UV při 233 nm
<b>pH a průtok</b>	pH 6.8, průtok 1.0 ml/min
<b>Zdroj literatury</b>	[20]

## **4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST**

## 4.1 CHEMIKÁLIE A POMŮCKY

### 4.1.1 Léčivé přípravky

V této práci byly použity přípravky:

- DIAPHAGE 850, por tbl flm 100x850 mg, SVUS Pharma a.s., Hradec Králové, ČR, šarže 84003
- METFIREF 850 mg, por tbl flm 30x850 mg, Sanofi – aventis s.r.o., Praha, ČR, šarže 9V005
- METFOGAMMA 850 mg, por tbl flm 30x850 mg, Wörwag Pharma GmbH und Co. KG, Böblingen, SRN, šarže 0905042
- SIOFOR 850, por tbl flm 30x850 mg, Berlin-Chemie AG, Berlín, SRN, šarže 93775

Složení a vzhled:

- DIAPHAGE 850  
Metformini hydrochloridum 850 mg v jedné tabletě. Jako pomocné látky jsou obsaženy Cellulosum microcristallinum, Povidonum 30, Croscarmellosum natricum, Stearinum, Album opadry OY-L-28900. Tablety jsou potahové, bílé, bikonvexní, kulaté.
- METFIREX 850 mg  
Metformini hydrochloridum 850 mg v jedné tabletě (což odpovídá 663 mg metforminu). Jako pomocné látky jsou obsaženy hypromelosa, povidon, magnesium-stearát, makrogol 6000, oxid titaničitý. Tablety jsou potahované, bílé, obdélníkové se zkosenými hranami a půlící rýhou na obou stranách.
- METFOGAMMA 850 mg  
Metformini hydrochloridum 850 mg v jedné tabletě (což odpovídá 663 mg metforminu). Jako pomocné látky jsou obsaženy magnesium-stearát, hydroxypropylmethylcelulosa, povidon 25, oxid titaničitý, makrogol 6000. Tablety jsou potahované, bílé, oválné, bikonvexní.
- SIOFOR 850  
Metformini hydrochloridum 850 mg v jedné tabletě (což odpovídá 662,9 mg metforminu). Jako pomocné látky jsou obsaženy hypromelosa, povidon, magnesium-stearát, makrogol 6000, oxid titaničitý. Tablety jsou potahované, bílé, oválné s půlící rýhou na obou stranách. [6]

#### 4.1.2 Chemikálie

- 1,1-dimethylbiguanid hydrochlorid (metformin hydrochlorid), Sigma Aldrich, Německo
- 1-cyanoguanidine (dicyanodiamide), Wanbury, Indie
- Methanol gradient grade pro kapalinovou chromatografii, Merck, Německo
- Acetonitril gradient grade pro kapalinovou chromatografii, Merck, Německo
- Dihydrogenfosforečnan sodný, Penta, ČR
- Dihydrogenfosforečnan draselný, Penta, ČR
- 1-octanesulfonic acid sodium salt monohydrate, Sigma, Německo
- Sodium pentanesulfonate, Sigma, Německo
- Hydroxid sodný, Penta, ČR
- Hydroxid draselný, Penta, ČR
- Kyselina fosforečná, Penta, ČR
- Voda čištěná

#### 4.1.3 Sestava pro HPLC

- Kontrolní jednotka: CTO-20AC VP Shimadzu
- Čerpadlo: LC-20AD VP Shimadzu
- Termostat kolony: CTO-20AS VP Shimadzu
- PC program: Shimadzu-CLASS-VP 5
- UV-VIS detektor: SPD-20A VP Shimadzu
- Autosampler: SIL-20AC VP Shimadzu
- Řídící jednotka: CBM-20A VP Shimadzu
- Chromatografické kolony:
  - C<sub>18</sub> (5 μm) 125 x 4,0 mm, Meck
  - HSF5 (5 μm) 150 x 4,6 mm, Discovery
  - Fenylová (5 μm) 250 x 4,6 mm, Waters
  - DiamondBond – C<sub>18</sub> (5 μm) 150 x 4,6 mm, ZirChrom



#### 4.1.4 Přístroje

- Digitální váhy Sartorius AG typ A200S, Německo
- Ultrazvuková lázeň K10, Kraitek, Slovensko
- pH-metr, SCHOTT CG 843, Schott Instruments GmbH

#### 4.1.5 Pomůcky

kádinky, odměrné baňky, odměrné válce, dělené pipety, balónek k pipetě, zkumavky, stojan na zkumavky, vialky, laboratorní lžičky, lodičky, třenka s těrkou, stříčka, frita, injekční stříkačky, membránový filtr 0,45 µm.

## 4.2 PŘÍPRAVA ROZTOKŮ

### 4.2.1 Příprava standardů

Standardní roztok metformin-hydrochloridu v methanolu:

Do 50 ml odměrné baňky bylo naváženo 50 mg metformin-hydrochloridu. Tato navážka byla rozpuštěna v methanolu. Objem baňky byl doplněn po rysku a důkladně promíchán. 10 ml tohoto roztoku se zředilo do 100 ml odměrné baňky. Výsledný roztok byl přefiltrován přes mikrofiltr 0,45 µm do vialky a nastříknut na kolonu.

Z důvodů srážení tohoto standardu s mobilní fází obsahující acetonitril, byl připraven standardní roztok metformin-hydrochloridu ve vodě.

Standardní roztok metformin-hydrochloridu ve vodě:

Do 100 ml odměrné baňky bylo naváženo 170 mg metformin-hydrochloridu. Tato navážka byla rozpuštěna ve vodě. Objem baňky byl doplněn po rysku a důkladně promíchán. 5 ml tohoto roztoku se zředilo do 50 ml odměrné baňky. Výsledný roztok byl přefiltrován přes mikrofiltr 0,45 µm do vialky a nastříknut na kolonu.

Standardní roztok 1-kyanguanidinu v methanolu

Do 50 ml odměrné baňky byl navážen 1 mg 1-kyanguanidinu. Tato navážka byla rozpuštěna v methanolu. Objem baňky byl doplněn po rysku a důkladně promíchán. Výsledný roztok byl přefiltrován přes mikrofiltr 0,45 µm do vialky a nastříknut na kolonu.

Z důvodů srážení tohoto standardu s mobilní fází obsahující acetonitril, byl připraven standardní roztok 1-kyanguanidinu ve vodě.

Standardní roztok 1-kyanguanidinu ve vodě:

Do 200 ml odměrné baňky bylo naváženo 20 mg 1-kyanguanidinu. Tato navážka byla rozpuštěna ve vodě. Objem baňky byl doplněn po rysku a důkladně promíchán. 4 ml tohoto roztoku se zředily do 200 ml odměrné baňky. Výsledný roztok byl přefiltrován přes mikrofiltr 0,45  $\mu\text{m}$  do vialky a nastříknut na kolonu.

#### **4.2.2 Příprava pufrů**

Příprava fosforečnanového pufru o pH 6,0 (dle Českého lékopisu 2009):

3,4 g dihydrogenfosforečnanu sodného bylo naváženo do 500 ml odměrné baňky. Tato navážka byla rozpuštěna ve vodě. Objem baňky byl doplněn po rysku a důkladně promíchán. pH bylo upraveno hydroxidem sodným koncentrovaným RS. Výsledný roztok byl přefiltrován přes mikrofiltr 0,45  $\mu\text{m}$ .

Příprava fosforečnanového pufru o pH 3,5 (dle Českého lékopisu 2009):

34 g dihydrogenfosforečnanu draselného bylo naváženo do 500 ml odměrné baňky. Tato navážka byla rozpuštěna ve vodě. Objem baňky byl doplněn po rysku a důkladně promíchán. pH bylo upraveno kyselinou fosforečnou R. Výsledný roztok byl přefiltrován přes mikrofiltr 0,45  $\mu\text{m}$ .

Příprava fosforečnanového pufru o pH 7,5 (dle Českého lékopisu 2009):

6,8 g dihydrogenfosforečnanu draselného bylo naváženo do 250 ml odměrné baňky. Tato navážka byla rozpuštěna ve 232,5 ml vody. pH bylo upraveno hydroxidem draselným R. Roztok byl zředěn vodou na 250 ml. Výsledný roztok byl přefiltrován přes mikrofiltr 0,45  $\mu\text{m}$ .

#### **4.2.3 Příprava mobilní fáze**

Pufr o potřebném pH byl smíchán s methanolem nebo acetonitrilem. Výsledný roztok byl přefiltrován přes mikrofiltr 0,45  $\mu\text{m}$ .

#### 4.2.4 Příprava zkoušených roztoků

Zkoušený roztok Diaphage 850:

Tablety Diaphage 850 byly důkladně rozdrceny v třence. 1120,0 mg této tabletoviny (odpovídá 1 tabletě s obsahem 850 mg) bylo naváženo do 250 ml odměrné baňky. Tabletovina byla rozpuštěna ve vodě 15 min pomocí ultrazvuku. Po rozpuštění byl objem baňky doplněn po rysku a důkladně promíchán. 5 ml tohoto roztoku bylo zředěno do 100 ml odměrné baňky. Připravený roztok byl přefiltrován přes mikrofiltr 0,45  $\mu\text{m}$  do vialky a nastříknut na kolonu.

Zkoušené roztoky Metfirex 850 mg, Metfogamma 850 mg a Siofor 850 byly připraveny stejným způsobem jako zkoušený roztok Diaphage 850 (viz. postup výše)

### 4.3 CHROMATOGRAFICKÉ PODMÍNKY

Byly zkoumány různé druhy stacionárních fází ( $\text{C}_{18}$ , HSF5, DiamondBond- $\text{C}_{18}$ , fenylová fáze) a různá složení, poměry a rychlosti průtoku mobilní fáze (methanol, acetonitril s fosforečnanovými pufrů o různém pH, i s přísávkou iontopárových činidel o koncentraci 0,01 mol/l). Chromatografické podmínky byly vždy testovány vzhledem k metformin-hydrochloridu a zároveň vzhledem k jeho příbuzné látce 1-kyanguanidinu. Nejdříve byla zkoušena  $\text{C}_{18}$  stacionární fáze. Jako mobilní fáze byla použita směs fosforečnanového pufru o pH 6,0 a methanolu (70:30, pak 80:20, v/v) při průtoku 1,0 ml/min a teplotě 25,0 °C. Poté bylo změněno složení mobilní fáze na směs fosforečnanového pufru o pH 6,0 a acetonitrilu (80:20, v/v), průtok zůstal zachován, ale postupně byla zvyšována teplota (z 25 °C na 30 °C, 40 °C a 50 °C). Při těchto podmínkách bylo zkoušeno také pH 3,5 fosforečnanového pufru. Poté bylo pH fosforečnanového pufru upraveno na 7,5 a byla testována směs fosforečnanového pufru a acetonitrilu (80:20, pak 95:5, v/v) při teplotě 25 °C a průtoku 1,0 ml/min. Také byl vyzkoušen přísávek iontopárových činidel (1-oktansulfonová kyselina a sodná sůl pentansulfonové kyseliny) ke směsi fosforečnanového pufru o pH 6,0 a acetonitrilu (80:20, v/v) při průtoku 1,0 ml/min a teplotě 25,0 °C. Přísávek sodné soli pentansulfonové kyseliny byl testován také u směsi fosforečnanového pufru a acetonitrilu (95:5 a 100:0, v/v) při stejném průtoku a teplotě.

Jako druhá byla testována fenyllová stacionární fáze. Jako mobilní fáze byla použita směs fosforečnanového pufru o pH 6,0 a methanolu (80:20, pak 90:10, v/v) při průtoku 1,0 ml/min a teplotě 25 °C. Při poměru 80:20 složek mobilní fáze byl zkoušen vliv iontopárových činidel (1-oktansulfonová kyselina, sodná sůl pentansulfonové kyseliny). Přídavek 1-oktansulfonové kyseliny byl také zkoušen u různých poměrů složek (80:20, 95:5 a 90:10, v/v) směsi fosforečnanového pufru o pH 6,0 a acetonitrilu při stejném průtoku a teplotě.

Dále byla použita zirkoniová DiamondBond - C<sub>18</sub> stacionární fáze. Byla testována mobilní fáze – směs čištěné vody a methanolu (80:20, v/v) při průtoku 1,0 ml/min a teplotě 50 °C. Poté byla jako mobilní fáze zkoušena směs fosforečnanového pufru o pH 6,0 a methanolu (80:20, v/v) při průtoku 1,0 ml/min a teplotách 50 °C, 60 °C a 70 °C. Za stejných podmínek byla také zkoušena směs fosforečnanového pufru o pH 6,0 a acetonitrilu. (80:20, v/v).

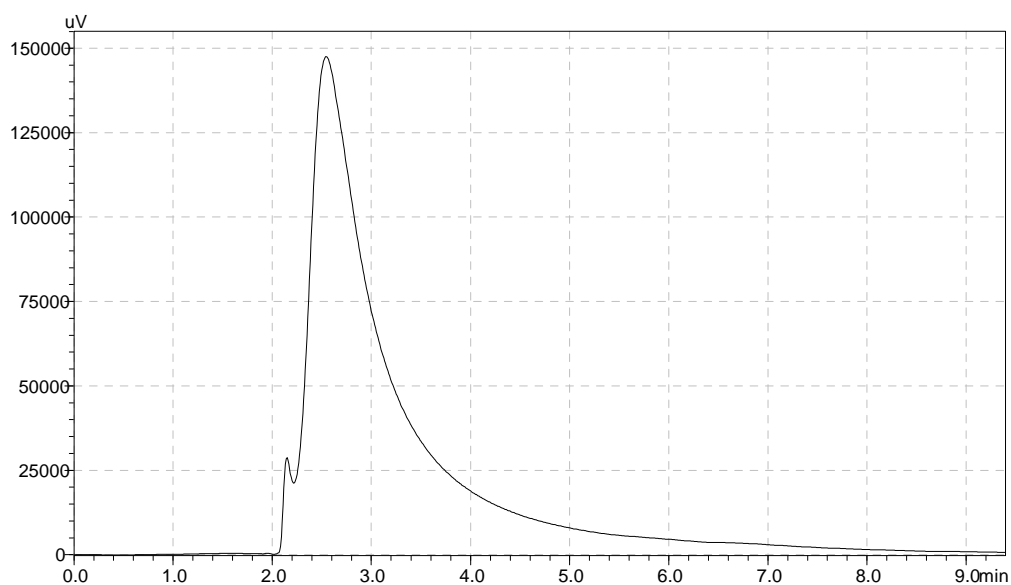
Jako poslední byla použita HSF5 stacionární fáze. Jako mobilní fáze byla zkoušena směs fosforečnanového pufru o pH 6,0 a methanolu v různých poměrech složek (70:30; 80:20; 99:1; 95:5; 97,5:2,5) při průtoku 1,0 ml/min a teplotě 25,0 °C. Při poměru 97,5:2,5 složek mobilní fáze byla postupně zvyšována teplota (z 25 °C na 30 °C, 40 °C, 50 °C a 60 °C) při průtoku 1,0 ml/min a 0,8 ml/min. Při teplotě 60 °C byl také testován průtok 0,7 ml/min.

## **5. VÝSLEDKY A DISKUSE**

## 5.1 CHROMATOGRAFICKÉ PODMÍNKY

Chromatografické podmínky byly hledány tak, aby bylo rozlišení mezi metformin-hydrochloridem a 1-kynguanidinem a aby symetrie píků byla do 1,5.

Použití C<sub>18</sub> stacionární fáze nebylo vhodné, pík metformin-hydrochloridu byl nesymetrický a eluoval se blízko mrtvého retenčního času (viz. Obrázek 2).



**Obrázek 2 Nástřik roztoku standardu metformin-hydrochloridu**

Kolona: C<sub>18</sub> (5 μm) 125 x 4,0 mm, Meck

Mobilní fáze: fosforečnanový pufr pH 6,0 a methanol (70:30, v/v)

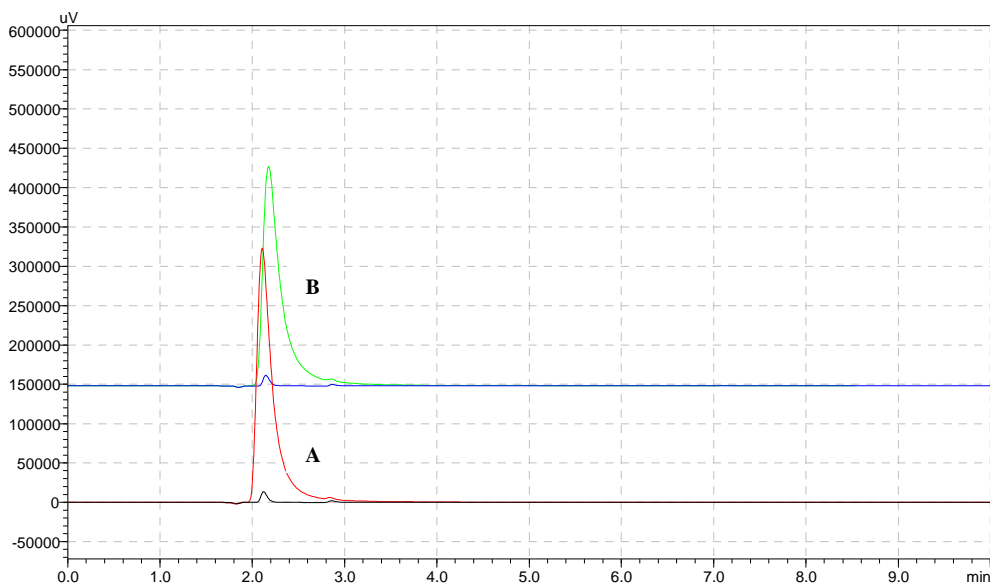
Průtoková rychlost: 1,0 ml/min

UV detekce při: 230 nm

Teplota: 25 °C

Nástřik: 20 μl

Úprava poměru složek a složení mobilní fáze vedla k zlepšení symetrie píku (viz. Obrázek 3).



**Obrázek 3 Nástřik roztoku standardu metformin-hydrochloridu a standardu 1-kyanguanidinu**

**A:** Mobilní fáze: fosforečnanový pufr pH 7,5 a acetonitril (80:20, v/v)

**B:** Mobilní fáze: fosforečnanový pufr pH 7,5 a acetonitril (95:5, v/v)

Kolona: C<sub>18</sub> (5 μm) 125 x 4,0 mm, Meck

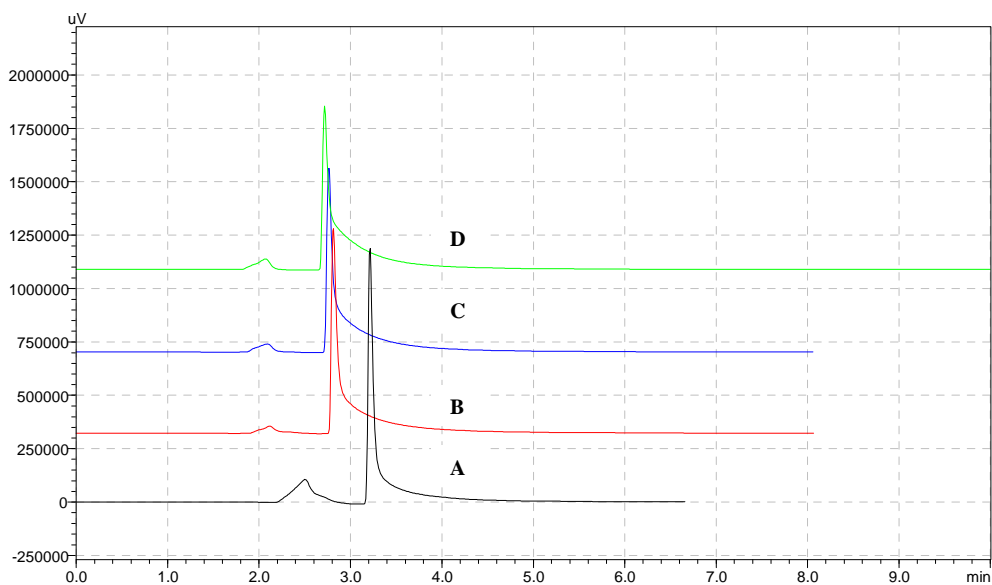
Průtoková rychlost: 1,0 ml/min

UV detekce při: 230 nm

Teplota: 25 °C

Nástřik: 20 μl

Změna pH na 3,5 a 7,5 vedla k mírnému zlepšení symetrie píku. Zvýšení teploty vedlo ke zkrácení retenčního času (viz. Obrázek 4) nebo na retenční čas nemělo vliv (viz. Obrázek 5).



**Obrázek 4 Nástřik roztoku standardu metformin-hydrochloridu**

**A:** Teplota: 25 °C

**B:** Teplota: 30 °C

**C:** Teplota: 40 °C

**D:** Teplota: 50 °C

Kolona: C<sub>18</sub> (5 μm) 125 x 4,0 mm, Meck

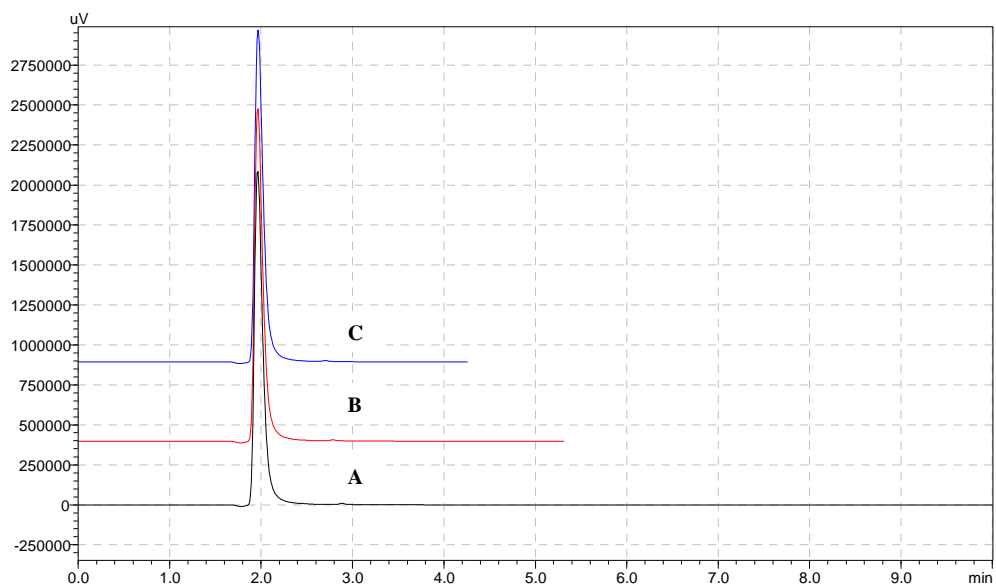
Mobilní fáze: fosforečnanový pufr pH 6,0 a acetonitril (80:20, v/v)

Průtoková rychlost: 1,0 ml/min

UV detekce při: 230 nm

Nástřik: 20 μl





**Obrázek 5 Nástřik roztoku standardu metformin-hydrochloridu**

**A:** Teplota: 30 °C

**B:** Teplota: 40 °C

**C:** Teplota: 50 °C

Kolona: C<sub>18</sub> (5 μm) 125 x 4,0 mm, Meck

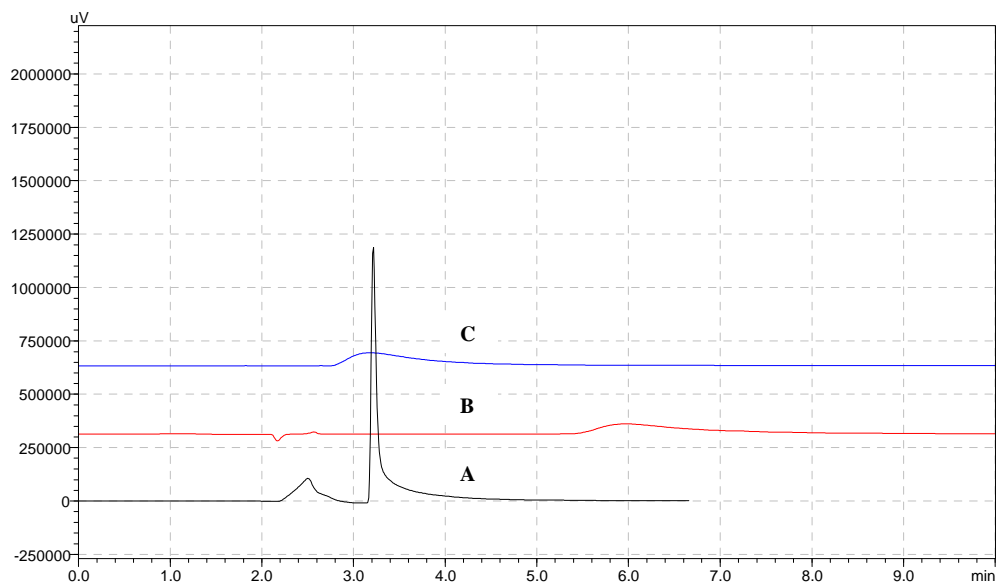
Mobilní fáze: fosforečnanový pufr pH 3,5 a acetonitril (80:20, v/v)

Průtoková rychlost: 1,0 ml/min

UV detekce při: 230 nm

Nástřik: 20 μl

Přídavek iontopárových činidel vedl k rozmytí píku metformin-hydrochloridu (viz. Obrázek 6 a Obrázek 7)



**Obrázek 6 Nástřik roztoku standardu metformin-hydrochloridu**

**A:** bez iontopárového činidla

**B:** s 1-oktansulfonovou kyselinou

**C:** se sodnou solí pentansulfonové kyseliny

Kolona: C<sub>18</sub> (5 μm) 125 x 4,0 mm, Meck

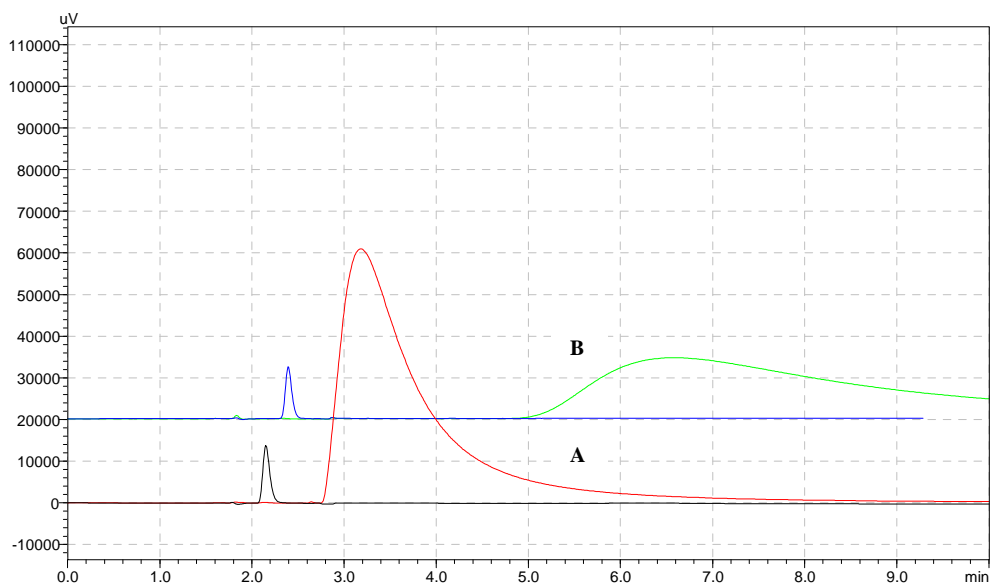
Mobilní fáze: fosforečnanový pufr pH 6,0 a acetonitril (80:20, v/v)

Průtoková rychlost: 1,0 ml/min

UV detekce při: 230 nm

Teplota: 25 °C

Nástřik: 20 μl



**Obrázek 7 Nástřik roztoku standardu metformin-hydrochloridu a standardu 1-kyanguanidinu**

**A:** Mobilní fáze: fosforečnanový pufr pH 6,0 a acetonitril (80:20, v/v) a sodná sůl pentansulfonové kyseliny

**B:** Mobilní fáze: fosforečnanový pufr pH 6,0 a acetonitril (95:5, v/v) a sodná sůl pentansulfonové kyseliny

Kolona: C<sub>18</sub> (5 μm) 125 x 4,0 mm, Meck

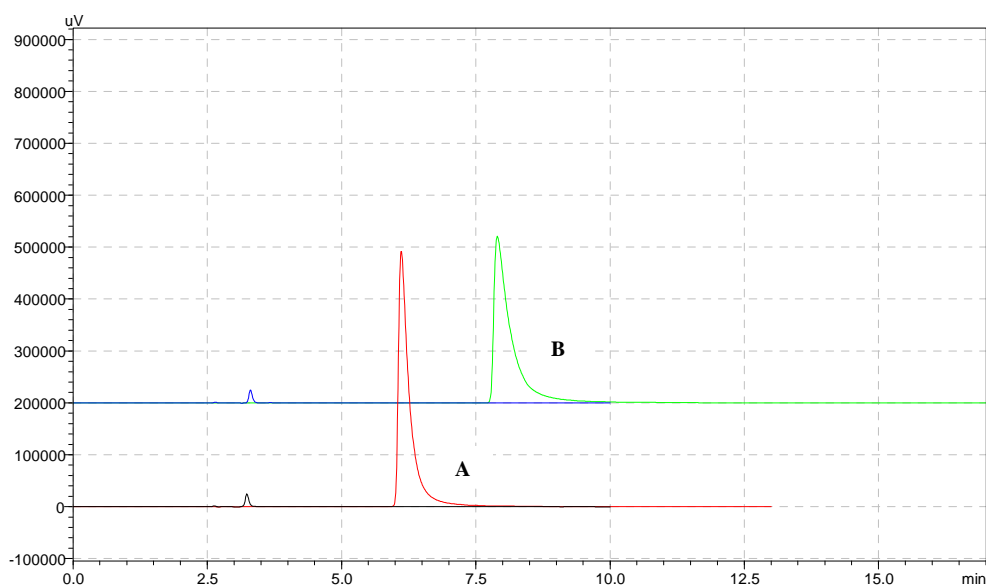
Průtoková rychlost: 1,0 ml/min

UV detekce při: 230 nm

Teplota: 25 °C

Nástřik: 20 μl

Výměna fenylové stacionární fáze vedla sice k prodloužení retenčního času píku metformin-hydrochloridu, ale zhoršila se jeho symetrie. Změna složení a poměru složek mobilní fáze společně s přidavkem 1-oktansulfonové kyseliny prodloužila retenční čas, ale nezlepšila symetrii píku (viz. Obrázek 8 a Obrázek 9).



**Obrázek 8 Nástřik roztoku standardu metformin-hydrochloridu a standardu 1-kynguanidinu**

**A:** Mobilní fáze: fosforečnanový pufr pH 6,0 a methanol (80:20, v/v)

**B:** Mobilní fáze: fosforečnanový pufr pH 6,0 a methanol (90:10, v/v)

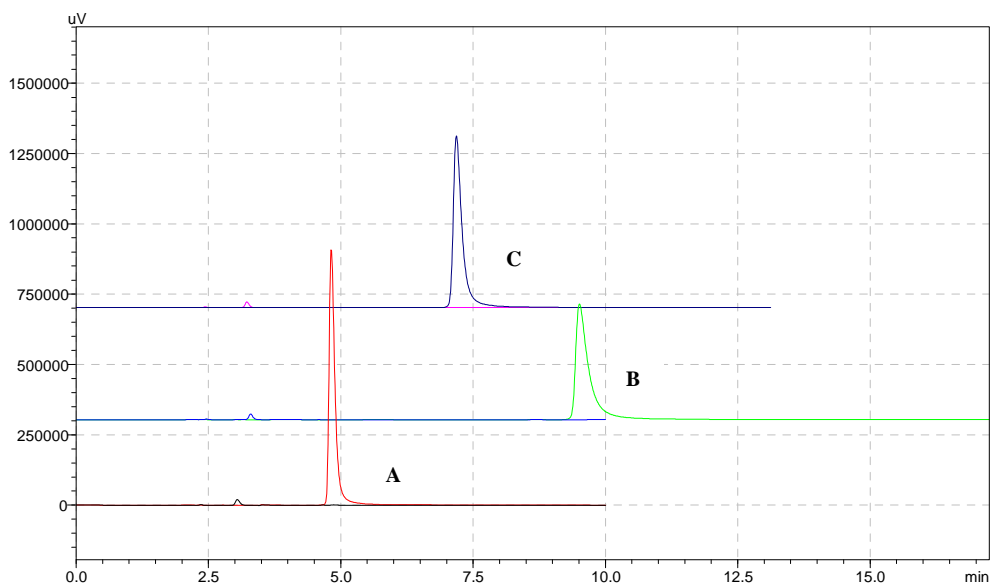
Kolona: Fenylová (5  $\mu$ m) 250 x 4,6 mm, Waters

Průtoková rychlost: 1,0 ml/min

UV detekce při: 230 nm

Teplota: 25 °C

Nástřik: 20  $\mu$ l



**Obrázek 9 Nástřík roztoku standardu metformin-hydrochloridu a standardu 1-kyanguanidinu**

**A:** Mobilní fáze: fosforečnanový pufr pH 6,0 a acetonitril (80:20, v/v)

a 1-oktansulfonová kyselina

**B:** Mobilní fáze: fosforečnanový pufr pH 6,0 a acetonitril (95:5, v/v)

a 1-oktansulfonová kyselina

**C:** Mobilní fáze: fosforečnanový pufr pH 6,0 a acetonitril (90:10, v/v)

a 1-oktansulfonová kyselina

Kolona: Fenylová (5  $\mu$ m) 250 x 4,6 mm, Waters

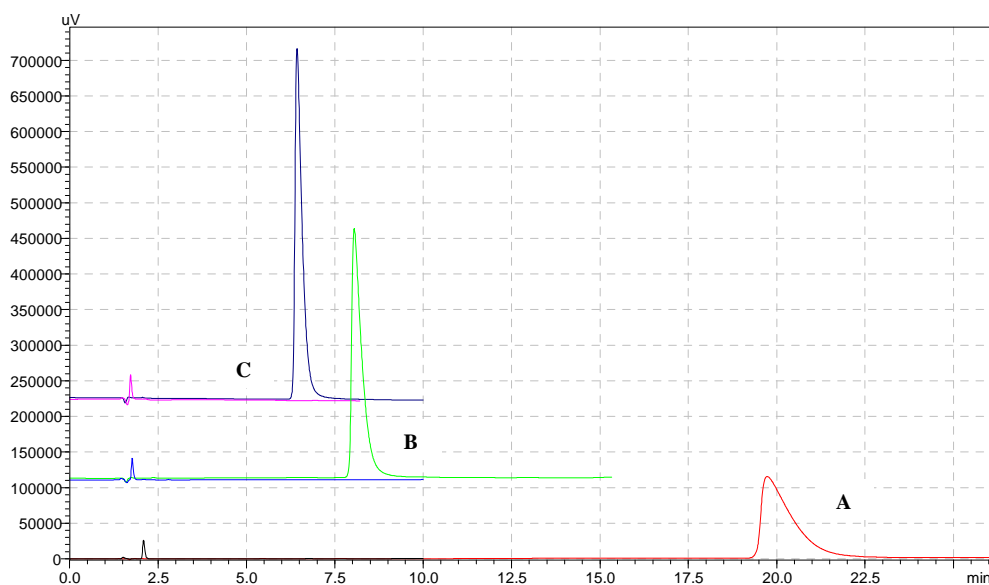
Průtoková rychlost: 1,0 ml/min

UV detekce při: 230 nm

Teplota: 25 °C

Nástřík: 20  $\mu$ l

Použití zirkoniové DiamondBond - C<sub>18</sub> vedlo k výraznému prodloužení retenčního času, ale pík metformin-hydrochloridu nebyl symetrický. Zvýšení teploty vedlo ke zkrácení retenčního času a ke zlepšení symetrie píku (viz. Obrázek 11). Použití mobilní fáze o složení fosforečnanový pufr a acetonitril vedlo ke zhoršení symetrie píku a zkrácení retenčního času.



**Obrázek 11 Nástřik roztoku standardu metformin-hydrochloridu a standardu 1-kyanguanidinu**

**A:** Teplota: 50 °C

**B:** Teplota: 60 °C

**C:** Teplota: 70 °C

Kolona: DiamondBond – C<sub>18</sub> (5 μm) 150 x 4,6 mm, ZirChrom

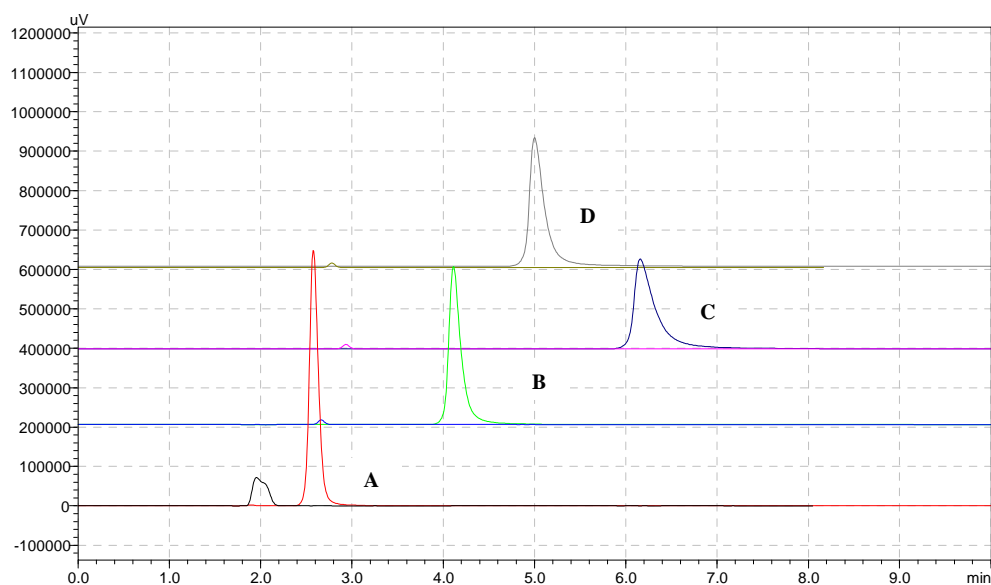
Mobilní fáze: fosforečnanový pufr pH 6,0 a methanol (80:20, v/v)

Průtoková rychlost: 1,0 ml/min

UV detekce při: 230 nm

Nástřik: 20 μl

Použití HFS5 stacionární fáze vedlo ke zlepšení symetrie píku metformin-hydrochloridu, ale pořád se eluoval blízko mrtvého retenčního času. Změna poměru složek mobilní fáze (viz. Obrázek 12), zvýšení teploty (viz. Obrázek 13) a snížení průtoku mobilní fáze (viz. Obrázek 14) vedlo k prodloužení retenčního času píku a zlepšení symetrie.



**Obrázek 12 Nástřik roztoku standardu metformin-hydrochloridu a standardu 1-kyanguanidinu**

**A:** Mobilní fáze: fosforečnanový pufr pH 6,0 a methanol (70:30, v/v)

**B:** Mobilní fáze: fosforečnanový pufr pH 6,0 a methanol (95:5, v/v)

**C:** Mobilní fáze: fosforečnanový pufr pH 6,0 a methanol (99:1, v/v)

**D:** Mobilní fáze: fosforečnanový pufr pH 6,0 a methanol (97,5:2,5; v/v)

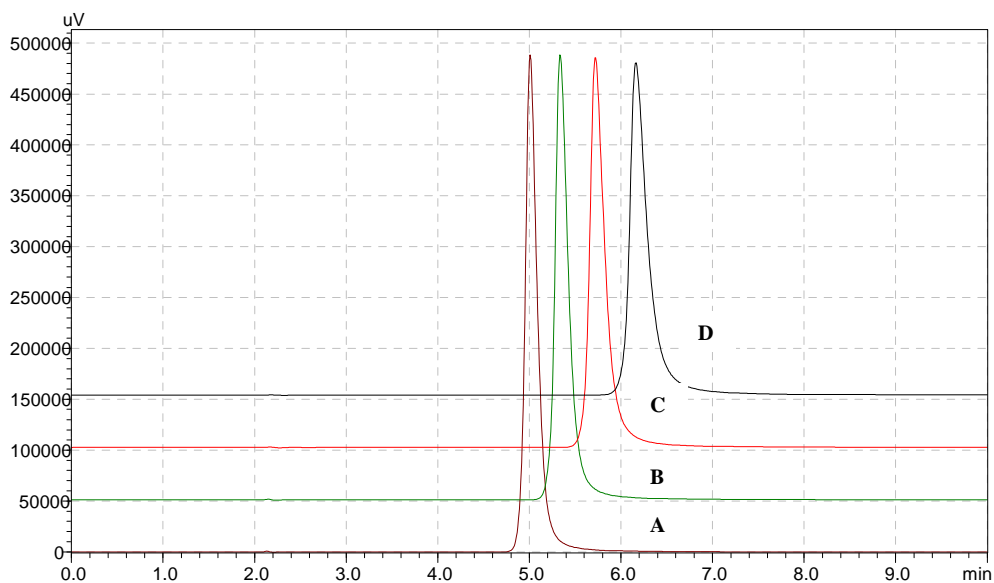
Kolona: HSF5 (5  $\mu$ m) 150 x 4,6 mm, Discovery

Průtoková rychlost: 1,0 ml/min

UV detekce při: 230 nm

Teplota: 25 °C

Nástřik: 20  $\mu$ l



**Obrázek 13 Nástřik roztoku standardu metformin-hydrochloridu**

**A:** Teplota: 60 °C

**B:** Teplota: 50 °C

**C:** Teplota: 40 °C

**D:** Teplota: 30 °C

Kolona: HSF5 (5 µm) 150 x 4,6 mm, Discovery

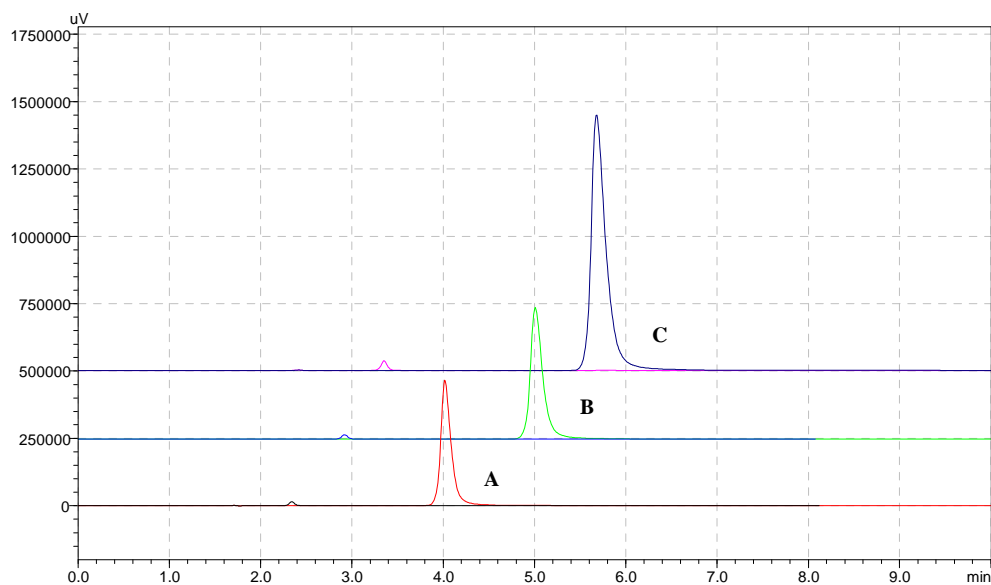
Mobilní fáze: fosforečnanový pufr pH 6,0 a methanol (97,5:2,5; v/v)

Průtoková rychlost: 0,8 ml/min

UV detekce při: 230 nm

Nástřik: 20 µl





**Obrázek 14 Nástřik roztoku standardu metformin-hydrochloridu a standardu 1-kyanguanidinu**

**A:** Průtoková rychlost: 1,0 ml/min

**B:** Průtoková rychlost: 0,8 ml/min

**C:** Průtoková rychlost: 0,7 ml/min

Kolona: HSF5 (5  $\mu$ m) 150 x 4,6 mm, Discovery

Mobilní fáze: fosforečnanový pufr pH 6,0 a methanol (97,5:2,5; v/v)

UV detekce při: 230 nm

Teplota: 60 °C

Nástřik: 20  $\mu$ l

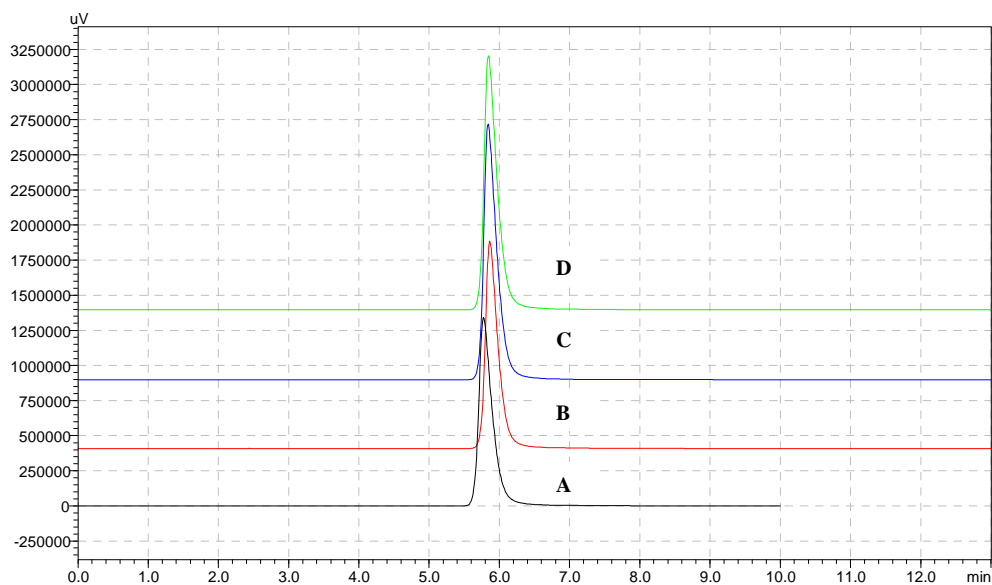
Jako nejlepší se jevílo použití HSF5 stacionární fáze. Chromatografické podmínky pro hodnocení metformin-hydrochloridu v léčivých přípravcích kapalinovou chromatografií jsou uvedeny v Tabulce 2 (str. 50).

Tabulka 2. **Použité chromatografické podmínky pro stanovení metformin-  
hydrochloridu kapalinovou chromatografií**

<b>Kolona</b>	HSF5 (5 µm) 150 x 4,6 mm, Discovery
<b>Složení mobilní fáze</b>	Fosforečnanový pufr a methanol (97,5:2,5; v/v)
<b>pH mobilní fáze</b>	Nastaveno na 6,0 pomocí koncentrovaného hydroxidu sodného RS
<b>Průtok</b>	0,7 ml/min
<b>Detekce</b>	UV při 230 nm
<b>Teplota na koloně</b>	60,0°C
<b>Nástřik vzorku</b>	20 µl

## 5.2 ANALÝZA LÉČIVÝCH PŘÍPRAVKŮ S METFORMIN-HYDROCHLORIDEM

Metformin-hydrochlorid byl hodnocen v léčivých přípravcích Diaphage 850, Metfirex 850 mg, Metfogamma 850 mg a Siofor 850 za chromatografických podmínek uvedených v Tabulce 2 (str. 50).



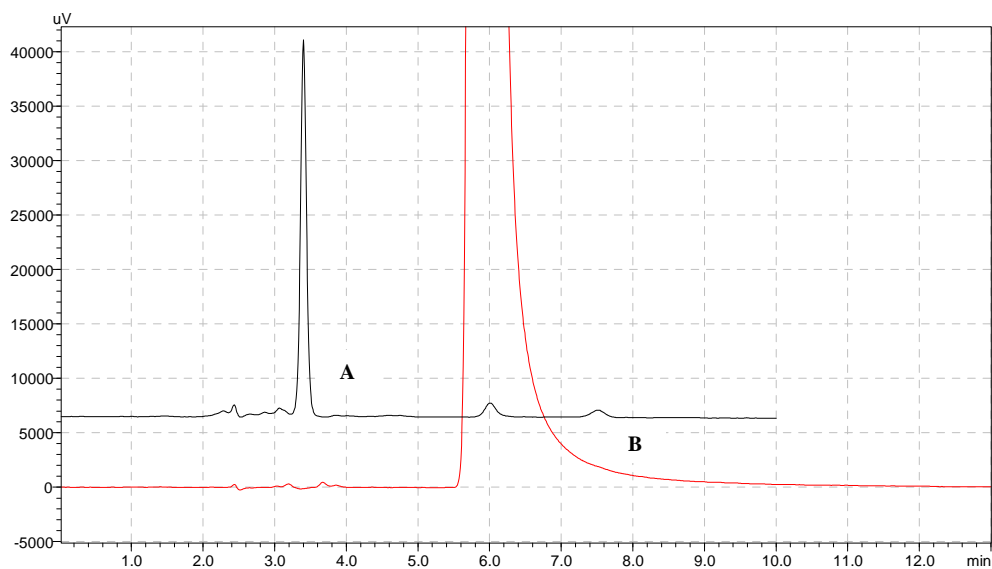
**Obrázek 15** Nástřik zkoušených roztoků Diaphage 850, Metfirex 850 mg, Metfogamma 850 mg a Siofor 850

**A:** Zkoušený roztok Diaphage 850

**B:** Zkoušený roztok Metfirex 850 mg

**C:** Zkoušený roztok Metfogamma 850 mg

**D:** Zkoušený roztok Siofor 850



**Obrázek 16** Nástřik roztoku standardu 1-kyanguanidinu (A) a nástřik zkoušeného roztoku Metfogamma 850 mg (B)

1-kyanguanidin v léčivých přípravcích Diaphage 850, Metfirex 850 mg, Metfogamma 850 mg a Siofor 850 nebyl detekován.

## **6. ZÁVĚR**

1. Byly zpracovány literární zdroje týkající se metformin-hydrochloridu a vysokoúčinné kapalinové chromatografie.
2. Byla optimalizována vhodná metoda hodnocení metformin-hydrochloridu.
3. Pro hodnocení metformin-hydrochloridu byla použita kolona HSF5 (5  $\mu$ m) 150 x 4,6 mm, Discovery. Jako mobilní fáze byl použit roztok fosforečnanového pufru o pH 6,0 a methanolu (97,5:2,5; v/v). Průtok mobilní fáze byl 0,7 ml/min, teplota na koloně 60 °C. Vlnová délka UV detektoru byla nastavena na 230 nm.
4. Tato metoda byla aplikována na léčivé přípravky Diaphage 850, Metfirex 850 mg, Metfogamma 850 mg a Siofor 850.
5. Metoda byla vyvinuta s ohledem na příbuznou látku 1-kyanguanidin.
6. 1-kyanguanidin v léčivých přípravcích Diaphage 850, Metfirex 850 mg, Metfogamma 850 mg a Siofor 850 nebyl detekován.
7. Validace nalezené metodiky bude předmětem další práce.
8. Tato práce byla prezentována na 39. konferenci Syntéza a analýza léčiv, 2.9. – 4.9.2010 v Bratislavě

## **7. LITERATURA**

1. LÜLLMANN H., MOHR K., WEHLING M., *Farmakologie a toxikologie*, překlad 15., zcela přepracovaného vydání, Grada Publishing, a.s., Praha 2004, ISBN 80-247-0836-1
2. KLIMEŠ J. a kolektiv, *Kontrola léčiv II.*, nakladatelství Karolinum, 2007, ISBN 978-80-246-1460-1
3. Český lékopis 2009, Grada Publishing, a.s. 2009, ISBN 978-80-247-2494-7
4. Výpis z databáze SPC přípravku Siofor 850, aktualizováno 12.1.2011
5. LINCOVÁ D., FARGHALI H. et al., *Základní a aplikovaná farmakologie*, Galén, 2007, ISBN 978-80-7262-373-0
6. AISLP, stav k 1.1.2011
7. KLIMEŠ J. a kolektiv, *Kontrola léčiv I.*, nakladatelství Karolinum, 2008, ISBN 978-80-246-1613-1
8. KARLÍČEK R. a kolektiv, *Analytická chemie pro farmaceuty*, nakladatelství Karolinum, 2005, ISBN 80-246-0348-9
9. PACÁKOVÁ V., STULÍK K., *Vysokoúčinná kapalinová chromatografie*, Státní pedagogické nakladatelství, Praha 1986
10. ŠVEC F., Monolitické stacionární fáze pro HPLC, *Chemické listy*, květen 2004, vol. 98, no. 5, s. 232-238
11. JANEČKOVÁ L., SOBOTNÍKOVÁ J., TESAŘOVÁ E., BOSÁKOVÁ Z., Využití moderních reverzních stacionárních fází na bázi oxidu zirkoničitého pro analýzu bioaktivních peptidů, *Chemické listy*, květen 2010, vol. 104, no. 5, s. 334-342
12. CHURÁČEK J., JANDERA P., *Separace látek: Kapalinová vysokoúčinná kolonová chromatografie*, Státní nakladatelství technické literatury, Praha 1981
13. HRABÁLEK A. a kolektiv, *Chemická laboratorní technika pro farmaceuty*, nakladatelství Karolinum, Praha 2004, ISBN 80-7184-698-8
14. NOVÁKOVÁ L., MATYSOVÁ L., SOLICH P., Advantages of application of UPLC in pharmaceutical analysis, *Talanta*, January 2006, vol. 68, no. 3, s. 908-918
15. KISELEV A.V., JAŠIN J.I., *Adsorpční plynová a kapalinová chromatografie*, Státní nakladatelství technické literatury, Praha 1988
16. ZARGHI A., FOROUTAN S. M., SHAFATI A., KHODDAM A., Rapid determination of metformin in human plasma using ion-pair HPLC, *Journal of Pharm. Biomed. Anal.*, February 2003, vol. 31, no. 1, s. 197-200
17. PORTA V., SCHRAMM S. G., KANO E. K., KOONO E. E., ARMANDO Y. P.,



- FUKUDA K., SERRA C. H. d. R., HPLC-UV determination of metformin in human plasma for application in pharmacokinetics and bioequivalence studies, *Journal of Pharm. Biomed. Anal.*, January 2008, vol. 46, no. 1, s 143-147
18. AL-RIMAVI F., Development and validation of an analytical method for metformin hydrochloride and its related compound (1-cyanoguanidine) in tablet formulations by HPLC-UV, *Talanta*, October 2009, vol. 79, no. 5, s. 1368-1371
19. AMINI H., AHMADIANI A., GAZERANI P., Determination of metformin in human plasma by high-performance liquid chromatography, *Journal of Chromatography B*, September 2005, vol. 824, no. 1-2, s. 319-322
20. TAHARA K., YONEMOTO A., YOSHIYAMA Y., NAKAMURA T., AIZAWA M., FUJITA Y., NISHIKAWA T., Determination of antihyperglycemic biguanides in serum and urine using an ion-pair solid-phase extraction technique followed by HPLC-UV on a pentafluorophenylpropyl column and on an octadecyl column, *Biomed. Chromatogr.*, November 2006, vol. 20, no. 1, s. 1200-1205

# SOUHRN

Hodnocení biologicky aktivních látek kapalinovou chromatografií XII.

Diplomová práce

Kendziorová Nela

Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové,  
Katedra farmaceutické chemie a kontroly léčiv

Byla optimalizována metoda stanovení metformin-hydrochloridu vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií v přípravcích Diaphage 850, Metfirex 850 mg, Metfogamma 850 mg a Siofor 850. Při práci bylo použita HSF5 kolona. Jako mobilní fáze byl použit roztok fosforečnanového pufru a methanolu (97,5:2,5; v/v). pH bylo nastaveno na 6,0 pomocí koncentrovaného hydroxidu sodného RS. Průtok mobilní fáze byl 0,7 ml/min. Teplota na koloně byla 60,0 °C. Vlnová délka UV detektoru byla nastavena na 230 nm.

# ABSTRACT

Determination of the Biologically Active Substances using Liquid Chromatography XII.

Thesis

Kendziorová Nela

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

The method for determination of the metformin-hydrochloride by high-performance liquid chromatography in pharmaceutical preparations Diaphage 850, Metfirex 850 mg, Metfogamma 850 mg and Siofor 850 was optimised. HSF5 column was used. A mobile phase composed of phosphate buffer and methanol (97,5:2,5; v/v) at a flow rate 0,7 ml/min was used for the separation. pH was adjusted to 6,0 using concentrated sodium hydroxide. The temperature was set at 60,0 °C. Detection was carried out at 230 nm.