

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

**Hodnocení biologicky aktivních látek kapalinovou
chromatografií XIV**

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: Mgr. Pavla Pilařová

Hradec Králové, 2012

Veronika Fišerová

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

V Hradci Králové 15. května 2012

Veronika Fišerová

Ráda bych poděkovala vedoucí mé diplomové práce Mgr. Pavle Pilařové za odborné vedení, trpělivost, pomoc a cenné rady, které mi poskytla během zpracování této práce. Také bych chtěla poděkovat PharmDr. Petrovi Kastnerovi Ph.D. i ostatním pracovníkům na katedře farmaceutické chemie a kontroly léčiv za jejich ochotu a pomoc.

SOUHRN

Hodnocení biologicky aktivních látek kapalinovou chromatografií XIV

Diplomová práce

Veronika Fišerová

Univerzita Karlova v Praze

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmaceutické chemie a kontroly léčiv

Byla vyvinuta metoda stanovení acikloviru pomocí UHPLC v léčivém přípravku obsahujícím 5 % acikloviru s ohledem na separaci příbuzné látky acikloviru, guanin. Použitím metody UHPLC bylo docíleno zkrácení doby analýzy. Při práci byla používána kolona Thermo Scientific 1,7 μm C18 100A, 100 \times 3 mm. Jako mobilní fáze byla zvolena směs 90% acetonitrilu s octanovým tlumivým roztokem o pH 5,5 a analýza byla provedena gradientovou elucí. Průtok mobilní fáze byl nastaven na 0,5 ml/min při teplotě kolony 40 °C. Vlnová délka na UV detektoru byla 254 nm.

Klíčová slova: UHPLC, aciklovir

ABSTRACT

The Determination of the Biologically Active Substances using Liquid Chromatography XIV

Thesis

Veronika Fišerová

Charles University Prague

Faculty of Pharmacy Hradec Králové

Department of Pharmaceutical Chemistry and Drug Control

A method has been developed for the determination of the aciclovir by UHPLC in a pharmaceutical preparation containing 5 % of aciclovir with regard to the separation of a related substance, guanine. By using the UHPLC method the time of analysis was shortened. A Thermo Scientific 1,7 μm C18 100A, 100 \times 3 mm column was used. A mixture of 90% acetonitrile and a buffer with a pH of 5,5 was chosen as the mobile phase and the analysis was performed by gradient elution. The flow rate of the mobile phase was set at 0,5 ml/min and the column temperature was 40 °C. Detection was carried out at a wavelength of 245 nm.

Keywords: UHPLC, acyclovir

OBSAH:

1. ÚVOD	1
2. CÍL PRÁCE	2
3. TEORETICKÁ ČÁST	3
3.1 ACIKLOVIR A JEHO VLASTNOSTI	4
3.1.1 VZOREC A CHEMICKÉ VLASTNOSTI	4
3.1.2 INDIKACE	4
3.1.3 MECHANISMUS ÚČINKU	5
3.1.4 FARMAKOKINETICKÉ VLASTNOSTI	5
3.1.5 NEŽÁDOUCÍ ÚČINKY	6
3.1.6 KONTRAINDIKACE	6
3.1.7 INTERAKCE	6
3.1.8 PŘÍPRAVKY OBSAHUJÍCÍ ACIKLOVIR	7
3.2 KAPALINOVÁ CHROMATOGRAFIE (LC)	8
3.2.1 HISTORIE CHROMATOGRAFIE	8
3.2.2 MOBILNÍ FÁZE V LC	9
3.2.3 STACIONÁRNÍ FÁZE V LC	10
3.2.4 INSTRUMENTACE	11
3.2.5 PRINCIP CHROMATOGRAFICKÉ SEPARACE	13
3.2.6 HODNOCENÍ ANALÝZY	13
3.2.6.1 Kvalitativní analýza	14
3.2.6.2 Kvantitativní analýza	14
3.2.7 PRAKTICKÉ VYUŽITÍ LC	15
3.2.8 ULTRA FAST LIQUID CHROMATOGRAPHY (UFLC)	16
3.2.9 ULTRA HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY (UHPLC)	16
4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	18
4.1 CHEMIKÁLIE A POMŮCKY	19
4.1.1 CHEMIKÁLIE	19
4.1.2 CHROMATOGRAFICKÁ SESTAVA PROMINENCE UFLC-XR	20
4.1.3 PŘÍSTROJE	21

4.1.4 POMŮCKY	21
4.2 PŘÍPRAVA ROZTOKŮ	22
4.2.1 PŘÍPRAVA PUFRŮ	22
4.2.2 PŘÍPRAVA MOBILNÍ FÁZE	23
4.2.3 PŘÍPRAVA STANDARDŮ	23
4.2.4 PŘÍPRAVA ZKOUŠENÉHO ROZTOKU A PLACEBA	25
4.3 PODMÍNKY SEPARACE	27
5. VÝSLEDKY A DISKUSE	33
5.1 CHROMATOGRAFICKÉ PODMÍNKY	33
5.2 ANALÝZA KRÉMU S ACIKLOVIREM	39
6. ZÁVĚR	43
7. POUŽITÉ ZKRATKY	44
8. LITERATURA	46

1. ÚVOD

Aciklovir je antivirotikum, které se používá k terapii onemocnění vyvolaných virem *Herpes simplex a Herpes zoster*. Po aktivaci ve formě trifosfátu účinkuje na principu blokování enzymu DNA-polymerasy a tím způsobuje inhibici syntézy virové nukleové kyseliny. Výhodou acikloviru je jeho nízká toxicita oproti dříve klinicky používaným protivirovým látkám. Tato vlastnost ho umožnila používat nejen lokálně, ale i k systémové léčbě (parenterálně, perorálně). Strukturou se jedná o acyklický analog guanosinu (proto i název látky), kde místo původně vázaného cukerného kruhu je řetězec alifatického vícesytného alkoholu^{1,2}.

UHPLC je analytická separační metoda, která umožňuje práci za mnohem vyšších tlaků než běžná HPLC, aniž by došlo k poškození kolony nebo jiné součásti chromatografu. Analýza trvá kratší dobu a k získání výsledků postačí minimální množství testovaných vzorků. Díky rychlejšímu rozdělování látek nedochází k velké spotřebě rozpouštědel, takže použití UHPLC je výhodné i z ekonomického hlediska. K rychlejší separaci využívá metoda UHPLC kolony s velikostí částic 1-2 μm . Výsledkem měření jsou chromatogramy, které poskytují jak kvalitativní, tak kvantitativní informace o jednotlivých složkách vzorku^{11,12,13}.

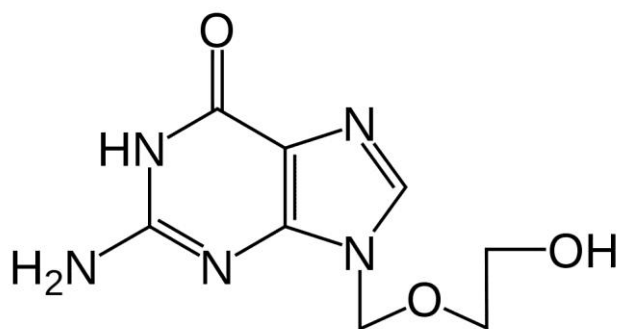
2. CÍL PRÁCE

Cílem diplomové práce bylo vyvinout metodu stanovení acikloviru pomocí UHPLC s ohledem na zlepšení separace acikloviru a jeho příbuzné látky guaninu. Použitím metody UHPLC by mělo dojít ke zkrácení doby analýzy u léčivého přípravku obsahujícího aciklovir.

3. TEORETICKÁ ČÁST

3.1 ACIKLOVIR A JEHO VLASTNOSTI

3.1.1 Vzorec a chemické vlastnosti



Aciklovir je lékopisnou látkou se sumárním vzorcem $C_8H_{11}N_5O_3$ a relativní molekulovou hmotností $M_R = 225,20464$ g/mol. V Českém lékopise 2009 je definován jako: 2-amino-9-[(2-hydroxyethoxy)methyl]-1,9-dihydro-6H-purin-6-on. Obsahuje 98,5 % až 101,0 % sloučeniny $C_8H_{11}N_5O_3$, počítáno na bezvodou látku^{3,4}.

Vlastnosti

Bílý nebo téměř bílý krystalický prášek, který je těžce rozpustný ve vodě, velmi těžce rozpustný v ethanolu 96% a snadno rozpustný v dimethylsulfoxidu. Rozpouští se ve zředěných roztocích minerálních kyselin a alkalických hydroxidů³. Aciklovir je velmi polární a lehce ionizovatelná látka⁵.

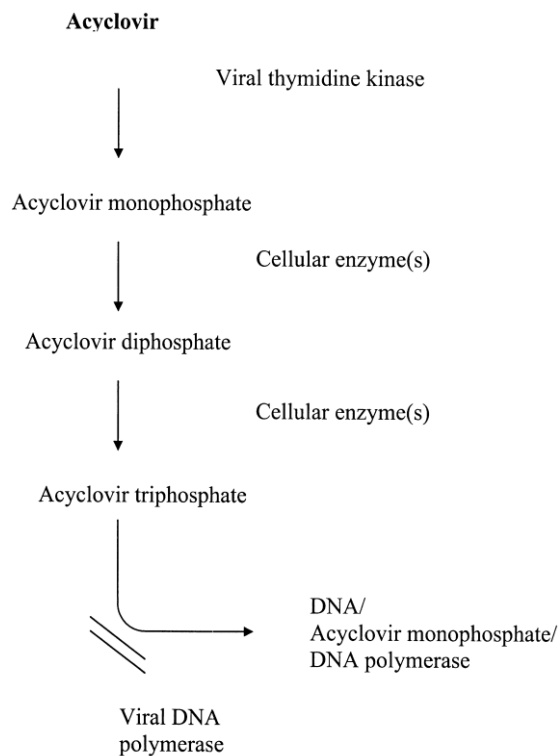
Bod tání acikloviru je v rozmezí teplot 256,5 – 257 °C⁴.

3.1.2 Indikace

Aciklovir je často používané, synteticky připravené, virostatikum specifické proti herpetickým virům. Používá se parenterálně, perorálně a lokálně; zejména k léčbě a prevenci kožních a slizničních forem infekčních onemocnění: herpes facialis, respektive labialis, herpes genitalis, planých neštovic a pásového oparu^{2,6,7}.

3.1.3 Mechanismus účinku

Aby byl aciklovir účinný, musí se nejprve aktivovat pomocí specifických kináz. K aktivaci dochází trifosforylací po vycytání acikloviru infikovanou buňkou hostitele. V této aktivní trifosfátové formě pak blokuje specifickou virovou DNA-polymerázu a tím zabraňuje dalšímu množení virů (viz obr. 1). Protože je aciklovir vysoce selektivní právě k virové DNA-polymeráze, nedochází tak k významnému ovlivnění normálních buněčných pochodů^{2,6,7,8}.



Obrázek 1: Schéma mechanismu účinku ACI²¹

3.1.4 Farmakokinetické vlastnosti

Po perorálním podání se z gastrointestinálního traktu vstřebává asi 15 – 30 % podané dávky a maximální plazmatické koncentrace je dosaženo za 90 – 150 minut. Aciklovir prochází placentou a přechází i do mateřského mléka. Významně se distribuuje do gastrointestinálního traktu, ledvin, jater, plic a jeho hladiny byly

prokázány i v mozku, srdci, svalech, slezině a v pohlavních orgánech. Hromadí se také v tělních tekutinách (sliny, sperma, vaginální sekret, mozkomíšní mok)^{4,9}.

Na bílkoviny krevní plazmy se váže v rozmezí 9 – 33 %, což není klinicky významné.

Vylučuje se ledvinami (glomerulární filtrací i tubulární sekrecí) z cca 90% v nezměněné formě a přibližně z 10% ve formě jediného významného metabolitu 9-karboxymethoxymethylguaninu^{2,7,8,9}.

Biologický poločas acikloviru je 2 – 3 hodiny při normální renální funkci^{2,6,7}.

3.1.5 Nežádoucí účinky

Přípravky použité lokálně a perorálně jsou prakticky bez nežádoucích účinků. Po injekčním podání se může výjimečně vyskytnout tromboflebitida, zhoršení funkce ledvin, poruchy CNS (např.: halucinace, třes, dezorientace), alergické reakce^{2,6,7}.

3.1.6 Kontraindikace

Přípravky s obsahem acikloviru se nesmí používat u pacientů se známou přecitlivělostí na účinnou látku⁷.

3.1.7 Interakce

Při systémové aplikaci společně s probenecidem nebo amphotericinem B může dojít k prodloužení biologického poločasu acikloviru. (Je zvýšená jeho koncentrace v plazmě i v mozkomíšním moku.)^{4,7}

Aciklovir ovlivňuje eliminaci současně užívaného methotrexátu nebo jiných léčiv, které se vylučují aktivní renální sekrecí, a to snížením jejich renální clearance^{4,7}.

Chlorhexidin v kombinaci s aciklovirem vykazuje synergické působení na inhibici syntézy virové DNA⁴.

3.1.8 Přípravky obsahující aciklovir

Přípravky s obsahem acikloviru (ACI) můžeme rozdělit do následujících skupin⁷:

- a) perorální formy: tablety s obsahem ACI 200 mg/ 400 mg/ 800mg; suspenze,
- b) parenterální formy: lyofilizát pro infúze nebo suché injekce s obsahem ACI 250 mg,
- c) lokální formy: 5% krémy, 3% oční masti.

Jsou zařazeny ve třech ATC skupinách¹⁰:

- 1) Dermatologika - Antibiotika a chemoterapeutika pro použití v dermatologii - Virostatika
- 2) Antiinfektiva pro systémovou aplikaci - Antivirotika pro systémovou aplikaci - Nukleosidy a nukleotidy, kromě inhibitorů reverzní transkriptázy
- 3) Smyslové orgány - Oftalmologika - Virostatika.

Přípravky registrované v České republice k 21. 1. 2012¹⁰:

Aciclovir AL krém, ALIUD PHARMA GmbH Laichingen, Německo

Acyclostad Galmed, STADA Arzneimittel AG Bad Vilbel, Německo

Herpesin 200, Herpesin 400, Herpesin KRÉM, Teva Pharmaceuticals CR, s. r. o., Praha, Česká republika

Provirsan, PRO. MED. CS Praha a. s., Praha, Česká republika

Zovirax (oční mast), **Zovirax 200 mg, Zovirax 400 mg, Zovirax 800 mg**, The Wellcome Foundation Ltd., Greenford, Middlesex, Velká Británie

Zovirax (krém), GlaxoSmithKline Consumer Healthcare, GSK Export Ltd., Brentford, Velká Británie

Zovirax DUO 50 mg/g + 10 mg/g Krém, Beecham Group plc Trading as GlaxoSmithKline Consumer Healthcare, Brentford, Velká Británie

3.2 KAPALINOVÁ CHROMATOGRRAFIE (LC)

Kapalinová chromatografie je analytická separační metoda, která je založena na různé distribuci jednotlivých složek vzorku mezi dvě fáze, které jsou nemísitelné. První fáze se vyznačuje schopností zadržovat v různém rozsahu jednotlivé složky směsi, nazývá se stacionární fáze a je, na rozdíl od fáze druhé, nepohyblivá. Druhá fáze je tedy pohyblivá a slouží k vymývání zadržovaných složek ze stacionární fáze, nazývá se proto fáze mobilní. Jak už napovídá název metody, mobilní fází bude kapalina. Vlivem různé afinity jednotlivých částí vzorku ke stacionární fázi dochází k jejich separaci, složky s malou afinitou se oddělují ze stacionární fáze do fáze mobilní dříve než složky, které se k nepohyblivé fázi vážou pevněji^{3,14}.

Výhodou chromatografických metod je poskytování jak kvalitativních, tak kvantitativních výsledků měření.

3.2.1 Historie chromatografie

Počátky chromatografie sahají na začátek 20. století, konkrétněji do let 1901 - 1903, kdy ruský botanik Michail Semjonovič Cvět oddělil jednotlivé složky chlorofylu, který byl extrahovaný do petroletheru, pomocí skleněné kolony naplněné křemelinou. Chlorofyl se postupně rozdělil na viditelné barevné zóny, a proto Cvět tuto metodu pojmenoval „chromatografie“ (z řeckého *chromos* = barva, *graphein* = psaní)^{15,16}.

Rozvoj metody však nastal teprve po druhé světové válce a největšího rozkvětu se LC dočkala až v 70. letech minulého století, kdy byla vyvinuta metoda HPLC umožňující práci za vysokých tlaků (30-40 MPa), protože byly použity kolony z odolnějšího materiálu (porózní oxid křemičitý). Velikost částic v kolonách se tehdy pohybovala mezi 5-10 μm . O dvacet let později byla velikost částic 3,5 μm ¹⁷. Zmenšování částic bylo zavedeno z důvodu vyšší účinnosti separace. Jak je vidět, trendem se stávají kolony s co nejmenšími částicemi (1-2 μm), to však vede ke značnému nárůstu tlaku do tak vysokých hodnot, za kterých už běžný HPLC systém nemůže pracovat. Tento fakt vyžadoval vznik nových přístrojů, jako jsou UFLC

nebo UHPLC systémy, které využívají kolony s náplní částic o velikosti do 2 μm a jsou schopny pracovat i za vyšších tlaků¹¹.

Přehled vývoje velikosti částic uvádí tabulka 1:

Rok	Velikost částic
1950	100 μm
1967	50 μm
1972	10 μm
1985	5 μm
1992	3-3,5 μm
2000	2,5 μm
2004	1,7 μm

Tabulka 1: Vývoj velikosti částic kolonové náplně²⁶

3.2.2 Mobilní fáze v LC

Mobilní fází je kapalina, která je tlačena vysokotlakým čerpadlem na kolonu. Po nástřiku vzorku na kolonu dochází k distribuci jednotlivých analyzovaných složek mezi dvě fáze. Mobilní fáze vymývá složky vzorku zadržené ve stacionární fázi a unáší je kolonou ve směru svého toku. Z tohoto důvodu se tato fáze někdy nazývá eluční činidlo¹⁴.

Její složení může být po celou dobu analýzy konstantní, pak mluvíme o isokratické eluci. Pokud v průběhu analýzy dochází ke změně složení mobilní fáze, pak hovoříme o eluci gradientové. Nejčastěji se mění její koncentrace nebo pH. Gradientová eluce se využívá, když je potřeba separovat složitější směsi látek^{14,28}.

Mobilní fáze musí tvořit kvalitní rozpouštědla a před analýzou je potřeba, aby byly pomocí filtrace zbavené mechanických nečistot a odplyněním zbavené rozpuštěných plynů^{14,23,27}.

3.2.3 Stacionární fáze v LC

Schopností stacionárních fází je zadržovat jednotlivé složky nastříkovaného vzorku, které jsou následně vymývány protékající mobilní fází. Kolony, které se dnes používají v LC, mají nejčastěji chemicky vázané stacionární fáze obsahující modifikovaný oxid křemičitý. V závislosti na tom, jaká skupina se naváže na povrch nosiče (v tomto případě silanolové skupiny oxidu křemičitého), vznikají fáze polární i nepolární (příklady viz tab. 2)^{3,14,28}.

Jako další sorbenty se používají oxid hlinitý, porézní grafit, nemodifikovaný oxid křemičitý, oxid zirkoničitý, polymery^{3,29}.

V LC se používá mnoho typů stacionárních fází, jsou to fáze nepohyblivé a tvoří náplň kolon (tzv. sorbent). Kvalita sorbentu (velikost částic, jejich tvar a porozita) hraje během separace důležitou roli^{3,14}. Velikost a uspořádání částic ovlivňuje zejména rychlost a účinnost analýzy. Jak už bylo zmiňováno výše, čím jsou částice sorbentu menší, tím je účinnost separace vyšší^{11,25}.

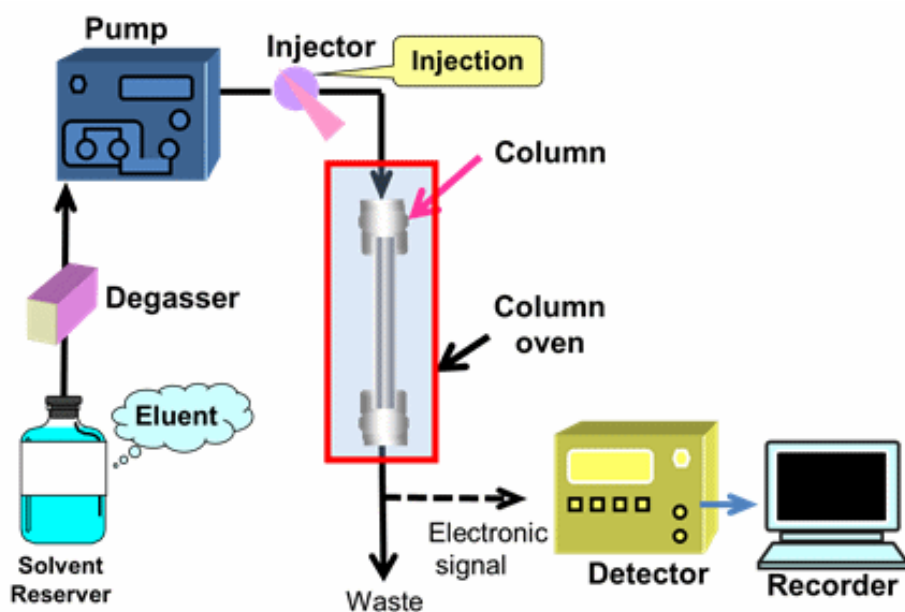
Vázaná skupina (název)	Označení, charakteristika
- C ₁₈ H ₃₇ (oktadecyl)	C ₁₈ , nepolární fáze
- C ₈ H ₁₇ (oktyl)	C ₈ , nepolární fáze
- (CH ₂) ₃ NH ₂ (aminopropyl)	NH ₂ , středně polární fáze
- (CH ₂) ₃ CN (kyanopropyl)	CN, středně polární fáze

Tabulka 2: Chemicky modifikované stacionární fáze^{3,14,28}

3.2.4 Instrumentace

Kapalinový chromatograf (viz obr. 3) se skládá ze^{28,31}:

- * zásobníků mobilní fáze (solvent reserver)
- * odplyňovače (degasser)
- * vysokotlakého čerpadla (pump)
- * automatického dávkovacího zařízení (injector)
- * kolony, která je uložena do topné komory (column in column oven)
- * detektoru (detector)
- * počítače (recorder)



Obrázek 3: Schéma přístroje pro LC³¹

Zásobníky mobilní fáze jsou nejčastěji skleněné nádoby, do kterých se zavádějí teflonové hadičky zakončené filtry. Těmito hadičkami je mobilní fáze odváděna do systému a pomocí vysokotlakého čerpadla je tlačena přes kolonu do detektoru. Ještě než se eluční činidlo dostane k čerpadlu, prochází odplyňovačem^{28,32}.

Za čerpadlem je nainstalován automatický dávkovač vzorků, který přes smyčkový ventil nastříkne z určené vialky roztok vzorku na kolonu. Vialky jsou umístěny v chlazeném prostoru³².

Chromatografické kolony jsou různě dlouhé trubice (v řádech centimetrů), které jsou nejčastěji vyráběny z nerezové oceli nebo skla. Jsou naplněné stacionární fází, která musí být homogenní. Dochází zde k vlastnímu rozdělování vzorku na jednotlivé složky, které mobilní fáze následně eluuje do detektoru. Kolona je uložena v topné komoře, která zajišťuje konstantní teplotní podmínky v průběhu analýzy. Veškeré spoje mezi kolonou, dávkovačem a detektorem musí být kapilární^{14,28,31,32}.

Detektor zaznamenává změny ve složení mobilní fáze. Poté, co zaregistruje průtok separovaných složek skrz detekční celou, přenesení upravený signál (nejčastěji zesílený) do počítače. Ideální detektor je:

- 1) univerzální, tj. měl by umožňovat detekci všech analytů
- 2) vysoce citlivý, měl by umožňovat detekci ve velmi nízkých koncentracích látek v roztoku (ng/ml až µg/ml)
- 3) schopen poskytnout okamžitou odezvu na změnu složení mobilní fáze
- 4) odolný vůči změnám průtoku mobilní fáze, tlaku a teploty
- 5) vhodný i pro gradientovou eluci

Detektory můžeme rozdělit na selektivní a neselektivní. Selektivní detektory mohou zachytit jen určité skupiny látek, zatímco neselektivní detektory jsou univerzální. Ze selektivních detektorů se v LC používají: spektrofotometrické detektory (UV-VIS, DAD), fluorimetrické detektory, elektrochemické detektory (konduktometrický, potenciometrický, amperometrický, coulochemický), hmotnostně spektrometrické detektory. Z neselektivních pak detektory refraktometrické a nebulizační (ELSD, CAD, NQAD). Spektrofotometrické detektory zaznamenávají změny v absorpci záření, fluorimetrické detektory zaznamenávají fluorescenci stanovených látek nebo jejich derivátů, elektrochemické detektory hodnotí změny elektrochemických veličin (vodivost,

potenciál, elektrický proud, elektrický náboj) v závislosti na koncentraci analytu, refraktometrický detektor měří rozdílný index lomu, hmotnostně spektrometrické detektory zaznamenávají změny v ionizaci a detektory nebulizační hodnotí intenzitu laserem rozptýleného světla (ELSD) nebo náboj (CAD), NQAD je založen na kondenzaci částic na kapky, které jsou počítány optickým laserem. Typ detektoru je volen na základě charakteristik analyzované látky^{14,28,29,33,37}.

Počítač (PC) zpracovává přenesený signál z detektoru, který přichází do PC ve formě elektronického signálu. Dále umožňuje výstup hodnocení na tiskárnu a hlavně pomocí vhodného softwaru řídí provoz celého přístroje^{28,31}.

3.2.5 Princip chromatografické separace

Během analýzy vzorku dochází v koloně k neustálému ustalování rovnováhy jeho jednotlivých složek mezi stacionární a mobilní fází. Děje se tak v závislosti různých afinit složek buď k polární, nebo k nepolární fázi.

Separace látek je závislá na retenci, protože každá látka je brzděna odlišně velkou silou. Rychlost, jakou bude látka unášena chromatografickým systémem, závisí na sorpční rovnováze. To znamená, čím rychleji látka postupuje, tím méně je zachycována stacionární fází, a dochází tedy k její rychlejší desorpci do fáze mobilní¹⁴.

3.2.6 Hodnocení analýzy

Výstupem každé analýzy je počítačem zpracovaný grafický záznam, tzv. chromatogram. Chromatogramy přinašejí podklady pro kvalitativní i kvantitativní hodnocení výsledků. Idealizovaný chromatogram je řada gausovských píků na základní linii.

K zajištění přiměřené účinnosti celého chromatografického systému, se provádí test způsobilosti systému, kterým se vyhodnocují hlavně tyto parametry: zdánlivá účinnost kolony, hmotnostní distribuční poměr, rozlišení mezi píky, relativní retence, faktor symetrie píku^{3,14}.

3.2.6.1 Kvalitativní analýza

K identifikaci jednotlivých složek analyzovaných vzorků slouží retenční data: retenční čas a retenční objem. Retenční čas (t_R) charakterizuje zadržování látky na koloně, je to doba od nástřiku vzorku až po maximum chromatografického píku. Z retenčního času je možné vypočítat retenční objem (V_R). Jedná se o objem mobilní fáze, který musí protéct kolonou, aby se daná složka vzorku vymyla. Vzorec pro výpočet retenčního objemu je $V_R = t_R \times v$, kde t_R značí retenční čas a v je rychlost průtoku mobilní fáze.

Důkaz totožnosti se nejčastěji provádí porovnáním retenčních časů píku analyzované složky a retenčních časů píku standardu.

V lékopisných monografiích se často využívá také hodnocení pomocí nekorigované relativní retence (r_G), která je mírou relativní separace dvou látek ve směsi. Vypočítá se podle vzorce: $r_G = t_{R2} / t_{R1}$, kde t_{R2} je retenční čas sledovaného píku a t_{R1} značí retenční čas referenčního píku (obvykle pík odpovídající zkoušené látce)^{3,14,28}.

3.2.6.2 Kvantitativní analýza

Množství dané složky ve vzorku určuje plocha pod píkem analyzované složky, případně výška píku. Stanovení obsahu látky je relativní, protože se zjišťuje s použitím standardů. Nejčastěji se setkáváme s metodou vnějšího standardu, nebo s metodou vnitřního standardu.

Metoda vnějšího standardu se skládá ze dvou kroků. Nejdříve je na kolonu nastříkovan roztok zkoušeného vzorku a po získání jeho chromatogramu je v druhém kroku nastříknut roztok vnějšího standardu. Po získání obou chromatogramů, které byly získávány za stejných separačních podmínek, se porovnávají plochy (nebo výšky) píků standardu a analytu a vyhodnocuje se jejich koncentrace.

U metody vnitřního standardu se postupuje tak, že se do známého množství roztoku zkoušené směsi přidá přesně známý obsah vnitřního standardu. Roztok se důkladně promíchá a pak je nastříkovan na kolonu. Vnitřní standard musí být inertní a stálá látka. Nesmí obsahovat nečistoty, které by měly podobný retenční čas jako

zkoušené látky. Stanovení koncentrace jednotlivých složek zkoušeného vzorku se opět vypočítává porovnáváním ploch (nebo výšek) píků analytu s píkem standardu. Tato metoda je méně časově náročná, a protože není zatížena případnou chybou dvojího nástřiku (jako je tomu u metody vnějšího standardu), je metodou přesnější.

K ověření přesnosti kvantitativní analýzy se vyhodnocují dva parametry: poměr signálu k šumu (který má vliv na přesnost stanovení obsahu testovaných složek směsi) a opakovatelnost odezvy (ta se vyjadřuje v procentech jako odhad relativní směrodatné odchylky ploch, resp. výšek, pro řadu následujících měření)^{3,14,34}.

3.2.7 Praktické využití LC

Kapalinová chromatografie umožňuje v jednom kroku provést identifikaci, kontrolu čistoty a stanovení obsahu látek. Díky tomu nachází v praxi široké využití v různých analytických laboratořích, výzkumu a v technické praxi.

Je to metoda, která se hojně využívá ve farmacii při kontrolní analýze léčiv. (De facto každá lékopisná monografie ji používá ve zkouškách na čistotu.) LC umožňuje také analýzu složených léčivých přípravků nebo přírodních léčivých látek obsažených v rostlinném materiálu, pomáhá řešit problematiku stability léčiv a v neposlední řadě je využívána při monitorování lékových hladin v tělních tekutinách²⁸.

Dalším odvětvím, které pracuje s LC, je nepochybně zemědělství, které tuto metodu využívá například ke sledování migrace herbicidů v půdě.

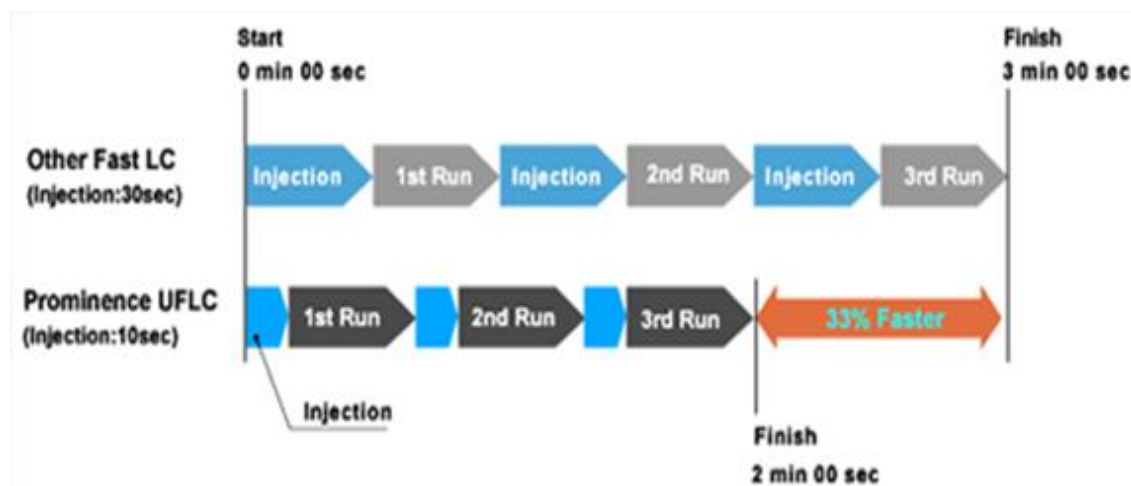
V rámci ochrany životního prostředí se pomocí LC dají stanovit pesticidy v ekosystémech nebo v potravinách a krmivech.

Potravinářský průmysl ji využívá ke kontrole svých produktů. (Zaměřuje se zejména na čistotu výrobků, přítomnost alergenů.) Například v pivovarnictví se využívá ke stanovení karbonylů v pivu.

Dále se s používáním LC můžeme setkat při biochemických analýzách, hlavně bílkovin a nukleových kyselin^{35,36}.

3.2.8 Ultra fast liquid chromatography (UFLC)

Metoda UFLC umožňuje za použití minimálního množství testovaného vzorku rychlejší rozdělení látek, a tak dochází ke zkrácení doby analýzy. K rychlejší a vyšší schopnosti separace využívá UFLC zejména kratší kolony s velikostí částic menších než $2,2 \mu\text{m}$ ^{11,12}. Vysoká rychlost analýzy je dána rovněž krátkými vstřikovacími cykly vzorku. (Cyklus netrvá déle než 10s; automatický dávkovač redukuje celkový čas zkrácením doby mezi jednotlivými nástřiky¹²; viz obr. 2.) Doba analýzy je až desetkrát kratší než při použití běžné HPLC. Díky rychlosti analýzy dochází také ke snížení spotřeby rozpouštědel. Přístroj Prominence UFLC-XR je schopen pracovat až do tlaku 66 MPa^{18,19}.



Obrázek 2: Rozdíl injekčního cyklu-schéma²⁰.

3.2.9 Ultra high performance liquid chromatography (UHPLC)

UHPLC se stala novým směrem vývoje kapalinové chromatografie. Metoda je známa od roku 2004 a znamenala velký pokrok v oblasti analytické separace. Jak již bylo zmíněno výše, UHPLC systém je navržen, aby mohl pracovat za vysokých tlaků (až 103,5 MPa). Musí být sestaven tak, aby čerpadla, hadičky, těsnění, ventily, kolony a veškeré spoje v systému byly schopny odolávat požadovaným tlakům. Vysoký tlak

v systému vzniká z důvodu používání kolon, které jsou naplněny porózními částicemi o velikosti $< 2 \mu\text{m}$. Čím jsou částice menší, tím vyšší je účinnost separace. Nejčastěji se setkáváme s kolonami, které jsou naplněny $1,7\mu\text{m}$ částicemi^{11,22,24,25,38}.

Pokrokem v oblasti UHPLC kolon byla nová technologie pevného jádra částic s homogenním porézním povrchem, který omezuje difúzi složek zkoumaného vzorku do pórů a z pórů částic. Navíc jsou částice v koloně rovnoměrně rozložené a to zajišťuje vyšší účinnost separace a také lepší opakovatelnost měření³⁰.

Výhodou používání UHPLC je lepší kvantitativní odpověď; zkrácená doba analýzy, která vede ke snížení spotřeby používaných rozpouštědel a tím dochází i k menší zátěži pro životní prostředí. Důsledkem snížení spotřeby rozpouštědel jsou i nižší finanční náklady. Jelikož čas potřebný pro jednu analýzu je kratší, nabízí UHPLC větší produktivitu než HPLC^{13,23}.

Rychlejší separace látek pomocí UHPLC je dána velikostí částic kolony ($< 2 \mu\text{m}$), výkonným čerpadlem, které pracuje za vysokých tlaků a při možnosti použití vyšší rychlosti průtoku mobilní fáze. Dále k urychlení analýzy přispívá fakt, že nástřik jednotlivých vzorků je charakteristický relativně rychlými cykly (25s) a k analýze stačí jen malý objem nástřiku^{13,24,25,26,38}.

4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 CHEMIKÁLIE A POMŮCKY

4.1.1 Chemikálie

- * Pracovní standard: Aciclovir, Pliva Lachema, Česká republika
- * Pracovní standard: Guanin hydrochlorid, Pliva Lachema, Česká republika
- * Pracovní standard: Methyl-4-hydroxybenzoát (methylparaben), FlukaChemika Steinheim, Švýcarsko
- * Pracovní standard: Propyl-4-hydroxybenzoát (propylparaben), FlukaChemika Steinheim, Švýcarsko
- * Testovaný léčivý přípravek – bílý, hladký krém obsahující 5 % acikloviru a následující pomocné látky: karbomer 934, hydroxid sodný, dimetikon, cetylalkohol, natrium-lauryl-sulfát, methylparaben, propylparaben, čištěnou vodu.
- * Placebo krému (mast'ový základ a konzervační látky)
- * Aqua purificata
- * Acetonitril, Merck, Německo
- * Acetonitril 99,9 %, Fluka Analytical Sigma Aldrich, St. Louis
- * Dihydrogenfosforečnan draselný, Dr. Kulich Hradec Králové, Česká republika
- * Dimethylsulfoxid 99,8 %, Merck, Německo
- * Hydroxid sodný, Dr. Kulich Hradec Králové, Česká republika
- * Kyselina octová zředěná RS
- * Kyselina octová bezvodá R
- * Kyselina octová ledová 99 %, Dr. Kulich Hradec Králové, Česká republika

- * Methanol 99,9 %, Merck, Německo
- * Octan amonný, Balex Pardubice, Česká republika
- * Octan sodný trihydrát, Petr Švec Penta, Česká republika
- * Tetrahydrofuran, Fluka Analytical Sigma Aldrich, St. Louis
- * Tetrahydrofuran, Balex Pardubice, Česká republika

4.1.2 Chromatografická sestava Prominence UFLC-XR

- * Odplyňovač: DGU-20A₃ Shimadzu
- * Čerpadla: LC 20AD, LC20AD XR Shimadzu
- * Automatický dávkovač: SIL-20AC HT Shimadzu
- * Řídící jednotka: CBM-20A Shimadzu
- * Detektor: UV/VIS SPD-20A Shimadzu
- * Topná komora: CTO-20AC Shimadzu
- * PC software: LabSolutions verze 1.24 SP1 (Shimadzu Corporation pro UFLC-XR)
- * Chromatografické kolony:
 - * Kinetex 1,7 μm C18 100A, 150 × 2,1 mm (Phenomenex)
 - * Thermo Scientific 1,7 μm C18 100A, 100 × 3 mm

4.1.3 Přístroje

* Digitální váhy Sartorius AG A200S, Německo

* pH-metr SCHOTT CG 843, Německo

* Ultrazvuková lázeň K10 Kraittek, Slovensko

4.1.4 Pomůcky

Kádinky, odměrné baňky, odměrné válce, pipety, pipetovací balónek, stříčky, laboratorní lžičky, navažovací lodičky, zkumavky, stojan na zkumavky, zábrusové láhve k uchování kapalin, odsávací baňka, fritra (S4 5-15 μm), magnetické míchadlo, vialky, injekční stříkačky, membránové filtry (NY Simplepure 0,45 μm a MS Nylon 0,22 μm), alobal.

4.2 PŘÍPRAVA ROZTOKŮ

4.2.1 Příprava pufrů

* Příprava acetátového tlumivého roztoku o pH 4,5 dle Českého lékopisu 2009:

Do 500ml odměrné baňky bylo naváženo 3,86 g octanu amonného. Navážka byla rozpuštěna ve vodě. K rozpuštěnému octanu amonnému bylo přidáno 3,5 ml kyseliny octové ledové a roztok byl zředěn vodou jejím doplněním po rysku. Připravený pufr byl upraven na požadované pH 4,5 přidáním potřebného množství kyseliny octové zř. RS a na závěr přefiltrován pomocí vakua přes 0,22 μ m filtr. Výsledná molární koncentrace pufru byla 0,1 mol/l.

* Příprava octanového tlumivého roztoku o pH 5,5 dle Českého lékopisu 2009:

Do 100ml odměrné baňky bylo naváženo 5,44 g octanu sodného trihydrátu. Tato navážka byla rozpuštěna ve vodě a byl k ní přidán 1 ml kyseliny octové bezvodé R. Roztok byl zředěn vodou jejím doplněním po rysku. Připravený pufr byl upraven na požadované pH 5,5 přidáním potřebného množství kyseliny octové zř. RS a na závěr přefiltrován pomocí vakua přes 0,22 μ m filtr. Výsledná molární koncentrace pufru byla 0,4 mol/l.

* Příprava fosforečnanového tlumivého roztoku o pH 6,7:

Do 500ml odměrné baňky bylo naváženo 3,41 g dihydrogenfosforečnanu draselného. Navážka byla rozpuštěna ve vodě a roztok byl zředěn doplněním vody po rysku. Připravený pufr byl upraven na požadované pH 6,7 roztokem hydroxidu sodného o koncentraci 1 mol/l a na závěr přefiltrován pomocí vakua přes 0,22 μ m filtr. Výsledná molární koncentrace pufru byla 0,05 mol/l.

4.2.2 Příprava mobilní fáze

Byl připraven 90% roztok acetonitrilu s vodou. Druhou složku mobilní fáze tvořil vždy jeden z výše uvedených pufrů.

V průběhu experimentu byly vyzkoušeny i dvě předem smíchané mobilní fáze. První z nich byla 10% mobilní fáze acetonitrilu a byla připravena smísením 5 ml acetonitrilu s 45 ml daného pufru. Druhá měla koncentraci acetonitrilu poloviční, tj. 5%, a k její přípravě tedy bylo použito 2,5 ml acetonitrilu a 47,5 ml určitého pufru.

Na proplach po ukončení denní práce byl připraven 50% acetonitril.

4.2.3 Příprava standardů

* Příprava standardního roztoku acikloviru v THF:

Bylo naváženo 25 mg standardu acikloviru do 50ml odměrné baňky. Tato navážka byla rozpuštěna v 5 ml tetrahydrofuranu a 10 ml vody. Roztok byl doplněn po rysku vodou a důkladně promíchán.

* Příprava standardního roztoku zředěného acikloviru:

Roztok byl připraven zředěním standardního roztoku acikloviru (viz výše). Do 10ml baňky bylo odpipetováno 5 ml zásobního roztoku a po rysku byla doplněna voda.

* Příprava standardního roztoku guaninu v THF:

Do 100ml odměrné baňky bylo naváženo 5mg guaninu. K této navážce bylo přidáno 10 ml THF a 0,1 ml hydroxidu sodného ($c = 1 \text{ mol/l}$). Baňka byla umístěna na 10 minut do ultrazvukové lázně a pak byl obsah doplněn vodou po rysku a důkladně promíchán.

Tento základní roztok guaninu byl ještě zředěn: Do 10ml odměrné baňky byl odměřen 1 ml základního roztoku a baňka se po rysku doplnila 10% THF.

* Příprava standardního roztoku acikloviru s guaninem v THF:

Do 25ml odměrné baňky bylo odměřeno 10 ml zásobního roztoku acikloviru a 5 ml základního roztoku guaninu. Po rysku byla doplněna voda a roztok byl důkladně promíchán.

* Příprava standardního roztoku methylparabenu v THF:

Do 100ml odměrné baňky bylo naváženo 10 mg methylparabenu. K této navážce byl po rysku přidán 10% THF.

* Příprava standardního roztoku propylparabenu v THF:

Do 100ml odměrné baňky bylo naváženo 5 mg propylparabenu. K této navážce byl po rysku přidán 10% THF.

* Příprava standardního roztoku směsi parabenů v THF:

Do 10ml odměrné baňky bylo odměřeno po 1 ml základního roztoku methylparabenu a propylparabenu. K roztoku parabenů byl po rysku přidán 10% THF.

* Příprava standardního roztoku rozpouštědla THF:

Byl připraven 10% roztok THF. Přímou do vialky bylo odměřeno 0,1 ml koncentrovaného THF a 0,9 ml vody.

* Příprava standardní směsi všech složek v THF:

Přímou do vialky bylo odměřeno 0,7 ml zásobního roztoku parabenů v THF a 0,7 ml zásobního roztoku acikloviru s guaninem v THF.

* Příprava standardního roztoku acikloviru s guaninem v DMSO:

Do 25ml odměrné baňky s 2,5 ml DMSO a 5 ml vody bylo naváženo 6,20 mg standardu acikloviru. Dále bylo do této baňky přiváženo 3,20 mg guaninu a k této navážce bylo přidáno 2,5 ml DMSO a 0,1 ml hydroxidu sodného ($c = 1 \text{ mol/l}$). Roztok byl doplněn vodou po rysku a důkladně protřepán.

* Příprava standardního roztoku methylparabenu v DMSO:

Do 10ml odměrné baňky bylo naváženo 1,4 mg methylparabenu, který byl rozpuštěn v malém množství methanolu a poté byl do baňky doplněn 10% DMSO po rysku.

* Příprava standardního roztoku propylparabenu v DMSO:

Roztok propylparabenu byl připraven stejným způsobem jako u methylparabenu.

* Příprava standardního roztoku směsi parabenů v DMSO:

Do 10ml odměrné baňky bylo odměřeno po 0,1 ml od každého zásobního roztoku parabenu (viz výše) a k nim bylo přidáno 0,8 ml DMSO.

* Příprava standardního roztoku rozpouštědla DMSO:

Byl připraven 10% roztok DMSO. Do 25ml odměrné baňky bylo odměřeno 2,5 ml koncentrovaného DMSO a po rysku byla doplněna voda.

* Příprava standardní směsi všech složek v DMSO:

Do 25ml odměrné baňky bylo naváženo 5,65 mg acikloviru, 2,75mg guaninu, 1,16 g methylparabenu a 0,85 g propylparabenu. K těmto navážkám bylo postupně přidáno 2,5 ml 10% roztoku DMSO, 0,1 ml hydroxidu sodného ($c = 1 \text{ mol/l}$) a po rysku bylo doplněno vodou a důkladně promícháno.

4.2.4 Příprava zkoušeného roztoku a placebo

* Příprava roztoku testovaného léčivého přípravku v DMSO:

Do 50ml odměrné baňky bylo naváženo 501,06 mg přípravku. K této navážce bylo přidáno 20 ml koncentrovaného DMSO a 10 ml vody. Odměrná baňka byla uzavřena skleněnou zátkou a na 10 minut byla umístěna do ultrazvukové lázně. Po vychladnutí byla baňka doplněna vodou po rysku a obsah se důkladně promíchal. Poté byl roztok přípravku v DMSO přefiltrován pomocí injekční stříkačky přes 0,45 μm filtr do zkumavky. Zkumavka byla dána na 10 minut do mrazáku. Po zchlazení byl roztok

přefiltrován přes dvojici filtrů (opět 0,45 μm) rovnou do vialky. Aciklovir byl z přípravku izolován metodou několikastupňové filtrace.

* Příprava roztoku testovaného léčivého přípravku v THF:

Do 50ml odměrné baňky bylo naváženo 506,5 mg přípravku. K této navážce bylo přidáno 20 ml koncentrovaného THF a 10 ml vody. Další postup byl shodný s přípravou zkoušeného roztoku s DMSO.

* Příprava roztoku placebo v DMSO:

Bylo naváženo 505,3 mg placebo do 50ml odměrné baňky. Dále se postupovalo stejně jako u roztoku léčivého přípravku s DMSO.

* Příprava roztoku placebo v THF:

Bylo naváženo 507,4 mg placebo do 50ml odměrné baňky. Dále se postupovalo stejně jako u roztoku léčivého přípravku s THF.

4.3 PODMÍNKY SEPARACE

Měření bylo prováděno na přístroji Prominence UFLC-XR Shimadzu s kolonou Kinetex a kolonou Thermo Scientific Synchronis. UHPLC analýza byla zkoušena zejména gradientovou, ale i isokratickou elucí. Nepolární stacionární fáze obou zkoušených kolon byla C18. Bylo zkoumáno různé složení mobilní fáze (90% acetonitril v kombinaci s různými pufrů: acetátový pufr o pH 4,5; octanový pufr o pH 5,5; fosforečnanový pufr o pH 6,7) a různé rychlosti průtoku mobilní fáze při různých teplotách na koloně.

Metody isokratické eluce:

1) Bylo zkoušeno konstantní složení mobilní fáze tvořené směsí 90% acetonitrilu a acetátového pufru o pH 4,5. Byly vyzkoušeny čtyři koncentrace mobilní fáze (30%, 20%, 10% a 5%) s rychlostí průtoku 0,15 ml/min.

2) Na zkoušku byly namíchány dvě samostatné směsi mobilní fáze (5% a 10% ACN s acetátovým pufrům, viz kapitola 4.2.2) a byly zkoušeny různé rychlosti průtoku (0,15; 0,17; 0,20; 0,22; 0,25; 0,27; 0,30; 0,33; 0,40; 0,50 a 0,60 ml/min).

Metody gradientové eluce:

1) Mobilní fáze byla tvořena směsí 90% acetonitrilu (B) s acetátovým pufrům o pH 4,5 (A). Byly zkoušeny rychlosti průtoku mobilní fáze 0,20 ml/min a 0,15 ml/min při teplotě na koloně 25 °C. Doba analýzy byla nastavena na 15 minut s následujícím gradientem:

Čas (min)	Mobilní fáze A % (v/v)	Mobilní fáze B % (v/v)
0-3	80	20
3-4	80→20	20→80
4-8	20	80
8-13	20→80	80→20
13-15	80	20

2) Mobilní fáze byla tvořena směsí 90% acetonitrilu s acetátovým pufrem o pH 4,5. Rychlost průtoku mobilní fáze byla nastavena na 0,5 ml/min při teplotě na koloně 25 °C. Doba analýzy byla 20 minut s následujícím gradientem:

Čas (min)	Mobilní fáze A % (v/v)	Mobilní fáze B % (v/v)
0-7	90	10
7-8	90→10	10→90
8-14	10	90
14-16	10→90	90→10
16-20	90	10

3) Mobilní fáze byla tvořena směsí 90% acetonitrilu s acetátovým pufrem o pH 4,5. Rychlost průtoku mobilní fáze byla nastavena na 0,45 ml/min při teplotě na koloně 25 °C. Doba analýzy byla 20 minut s následujícím gradientem:

Čas (min)	Mobilní fáze A % (v/v)	Mobilní fáze B % (v/v)
0-7	90	10
7-8	90→5	10→95
8-16	5	95
16-18	5→90	95→10
18-20	90	10

4) Mobilní fáze byla tvořena směsí 90% acetonitrilu s acetátovým pufrům o pH 4,5. Rychlost průtoku mobilní fáze byla nastavena na 0,45 ml/min při teplotě na koloně 25 °C. Doba analýzy byla 20 minut s následujícím gradientem:

Čas (min)	Mobilní fáze A % (v/v)	Mobilní fáze B % (v/v)
0-4	90	10
4-6	90→3	10→97
6-13	3	97
13-15	3→90	97→10
15-20	90	10

5) Mobilní fáze byla tvořena směsí 90% acetonitrilu s acetátovým pufrům o pH 4,5. Rychlost průtoku mobilní fáze byla nastavena na 0,45 ml/min při teplotě na koloně 25 °C. Doba analýzy byla 20 minut s následujícím gradientem:

Čas (min)	Mobilní fáze A % (v/v)	Mobilní fáze B % (v/v)
0-3	90	10
3-6	90→20	10→80
6-8	20	80
8-10	20→3	80→97
10-13	3	97
13-15	3→90	97→10
15-20	90	10

6) Mobilní fáze byla tvořena směsí 90% acetonitrilu s acetátovým pufrům o pH 4,5. Doba analýzy byla nastavena na 20 minut s gradientem jako v metodě 5, ale s následující změnou: v čase mezi 3. a 6. minutou se koncentrace mobilní fáze B zvyšovala z 10 na 90 % a byla rovněž následující dvě minuty konstantní. Rychlost průtoku mobilní fáze byla nastavena na 0,45 ml/min, při teplotách na koloně 25 °C, 40 °C a 50 °C.

7) Mobilní fáze byla tvořena směsí 90% acetonitrilu (B) s octanovým tlumivým roztokem o pH 5,5 (A). Doba analýzy byla nastavena na 20 minut se stejným gradientem jako v metodě 6. Rychlost průtoku mobilní fáze byla 0,5 ml/min, při teplotě kolony 25 °C, 40 °C a 50 °C.

8) Mobilní fáze byla tvořena směsí 90% acetonitrilu s octanovým tlumivým roztokem o pH 5,5. Rychlost průtoku mobilní fáze byla nastavena na 0,5 ml/min, při teplotě kolony 40 °C. Doba analýzy byla 13 minut s následujícím gradientem:

Čas (min)	Mobilní fáze A % (v/v)	Mobilní fáze B % (v/v)
0-2,5	90	10
2,5-5	90→10	10→90
5-8	10	90
8-11	10→90	90→10
11-13	90	10

9) Mobilní fáze byla tvořena směsí 90% acetonitrilu s octanovým tlumivým roztokem o pH 5,5. Rychlost průtoku mobilní fáze byla 0,5 ml/min, při teplotě kolony 30 °C a 40 °C. Doba analýzy byla nastavena na 12 minut s následujícím gradientem:

Čas (min)	Mobilní fáze A % (v/v)	Mobilní fáze B % (v/v)
0-2,5	90	10
2,5-4	90→3	10→97
4-7	3	97
7-10	3→90	97→10
10-12	90	10

10) Mobilní fáze byla tvořena směsí 90% acetonitrilu s octanovým tlumivým roztokem o pH 5,5. Rychlost průtoku mobilní fáze byla nastavena na 0,5 ml/min, při teplotě kolony 30 °C. Doba analýzy byla 10 minut s následujícím gradientem:

Čas (min)	Mobilní fáze A % (v/v)	Mobilní fáze B % (v/v)
0-2	90	10
2-4	90→10	10→90
4-6	10→3	90→97
6-9	3→90	97→10
9-10	90	10

11) Mobilní fáze byla tvořena směsí 90% acetonitrilu s octanovým tlumivým roztokem o pH 5,5. Rychlost průtoku mobilní fáze byla nastavena na 0,5 ml/min, při teplotě kolony 30 °C. Doba analýzy byla 10 minut se stejným gradientem jako v metodě 10, ale jen s následující změnou: v počátečním čase (mezi 0. a 2. minutou) je složení mobilní fáze (A:B) místo 90:10→93:7.

12) Mobilní fáze byla tvořena směsí 90% acetonitrilu s octanovým tlumivým roztokem o pH 5,5. Rychlost průtoku mobilní fáze byla nastavena na 0,5 ml/min, při teplotě kolony 30 °C a 40 °C. Doba analýzy byla 11 minut s následujícím gradientem:

Čas (min)	Mobilní fáze A % (v/v)	Mobilní fáze B % (v/v)
0-2	90	10
2-4	90→10	10→90
4-5	10	90
5-6	10→3	90→97
6-8	3	97
8-10	3→90	97→10
10-11	90	10

13) Mobilní fáze byla tvořena směsí 90% acetonitrilu s octanovým tlumivým roztokem o pH 5,5. Rychlost průtoku mobilní fáze byla 0,5 ml/min, při teplotě kolony 40 °C. Doba analýzy byla nastavena na 9 minut a byla provedena s podobným gradientem jako v metodě 12. Ten byl až do 6. minuty shodný, pak se lišil v časech, kdy docházelo ke změnám ve složení mobilní fáze:

Čas (min)	Mobilní fáze A % (v/v)	Mobilní fáze B % (v/v)
0-6	viz metoda 12)	viz metoda 12)
6-7	3	97
7-8	3→90	97→10
8-9	90	10

14) Mobilní fáze byla tvořena směsí 90% acetonitrilu (B) s foforečnanovým pufrem o pH 6,7 (A). Rychlost průtoku mobilní fáze byla nastavena na 0,5 ml/min, při teplotě kolony 30 °C a 40 °C. Doba analýzy byla 10 minut a byla provedena se stejným gradientem, který byl použit v metodě 13.

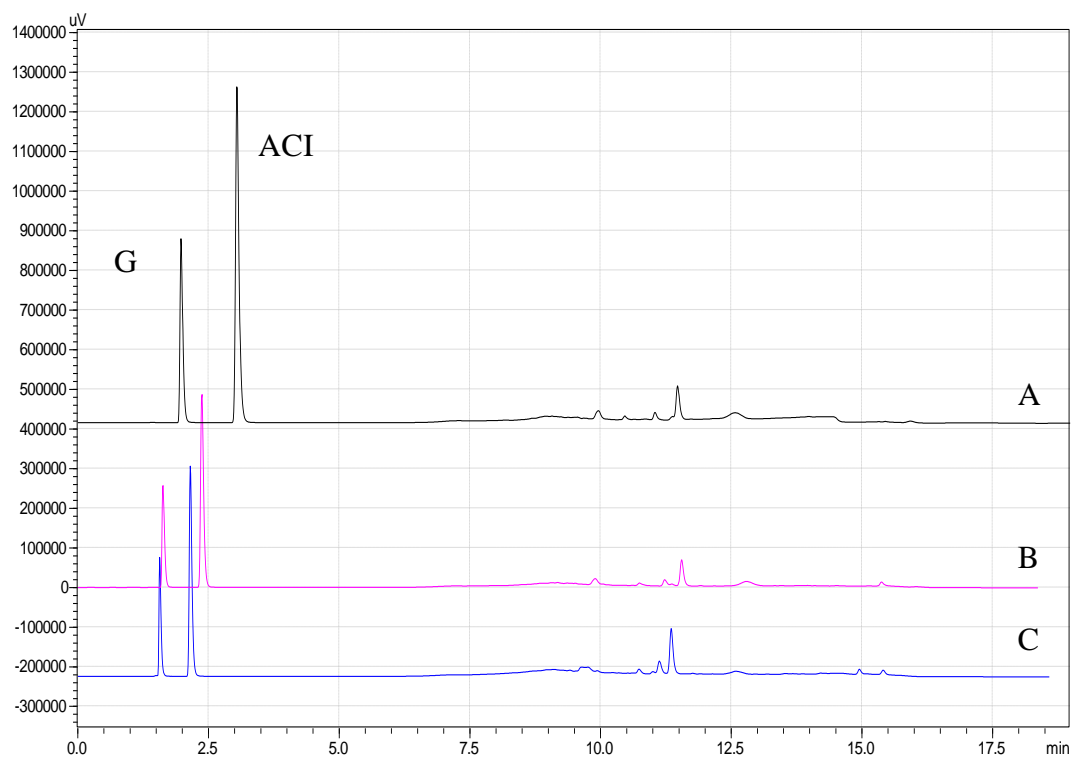
5. VÝSLEDKY A DISKUSE

5.1 Chromatografické podmínky

Podmínky separace byly hledány tak, aby byla zkrácena doba analýzy léčivého přípravku obsahujícího aciklovir. A to s ohledem na zlepšení separace acikloviru a jeho příbuzné látky guaninu tak, aby rozlišení mezi píky (R_s) bylo větší než 1,5.

Byl hledán optimální průtok mobilní fáze v rozmezí 0,17 – 0,6 ml/min s ohledem na maximální tlak chromatografického systému, který se pohyboval v rozmezí 40 – 45 MPa. Mobilní fáze byla tvořena směsí ACN s acetátovým pufrům o pH 4,5 v poměru 5:95, v/v.

Vliv teploty



Obrázek 4: Záznam standardních roztoků ACI s G v DMSO

A: teplota na koloně 25 °C, nástřik 4 μ l

B: teplota na koloně 40 °C, nástřik 2 μ l

C: teplota na koloně 50 °C, nástřik 2 μ l

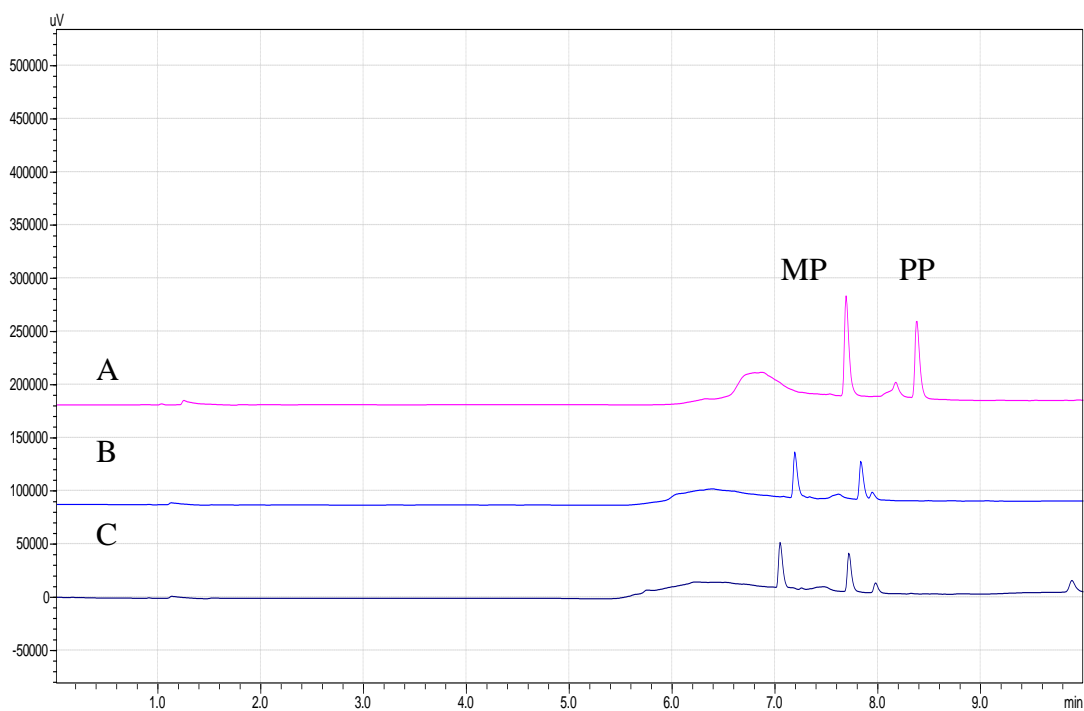
Kolona: Thermo Scientific Synchronis C18 (1,7 μ m)

Metoda: 6.

Mobilní fáze: 90% ACN a acetátový pufr o pH 4,5

Průtoková rychlost: 0,45 ml/min

UV detekce: při 254 nm



Obrázek 5: Záznam standardních roztoků parabenů v DMSO

A: teplota na koloně 25 °C, nástřik 4 μ l

B: teplota na koloně 40 °C, nástřik 2 μ l

C: teplota na koloně 50 °C, nástřik 2 μ l

Kolona: Thermo Scientific Synchronis C18 (1,7 μ m)

Metoda: 7.

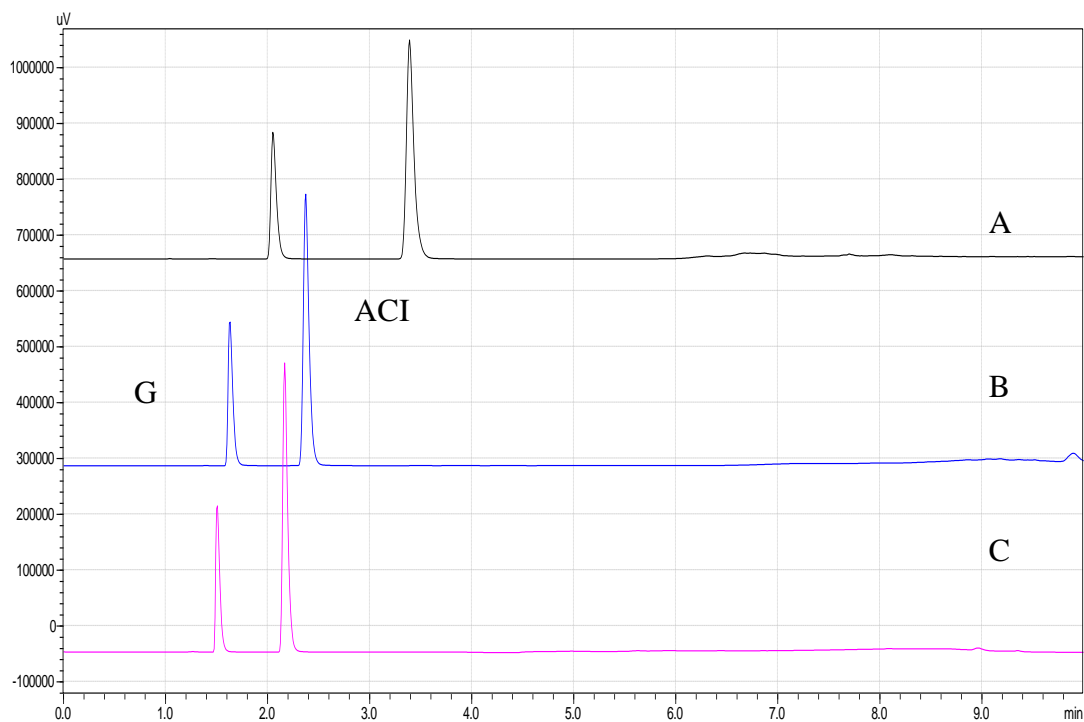
Mobilní fáze: 90% ACN a octanový pufr o pH 5,5

Průtoková rychlost: 0,5 ml/min

UV detekce: při 254 nm

S rostoucí teplotou dochází ke snižování viskozity mobilní fáze, a tedy k jejímu rychlejšímu průtoku kolonou. Jako optimální byla zvolena teplota na koloně 40 °C.

Vliv složení mobilní fáze (pH pufru)



Obrázek 6: Záznam standardních roztoků ACI s G v DMSO

A: acetátový pufr o pH 4,5

B: octanový pufr o pH 5,5

C: fosforečnanový pufr o pH 6,7

Kolona: Thermo Scientific Synchronis C18 (1,7 μm)

Teplota na koloně: 40 °C

Metoda: 6.

Mobilní fáze: A: 90% ACN a acetátový pufr o pH 4,5

B: 90% ACN a octanový pufr o pH 5,5

C: 90% ACN a fosforečnanový pufr o pH 6,7

Průtoková rychlost: 0,45 ml/min

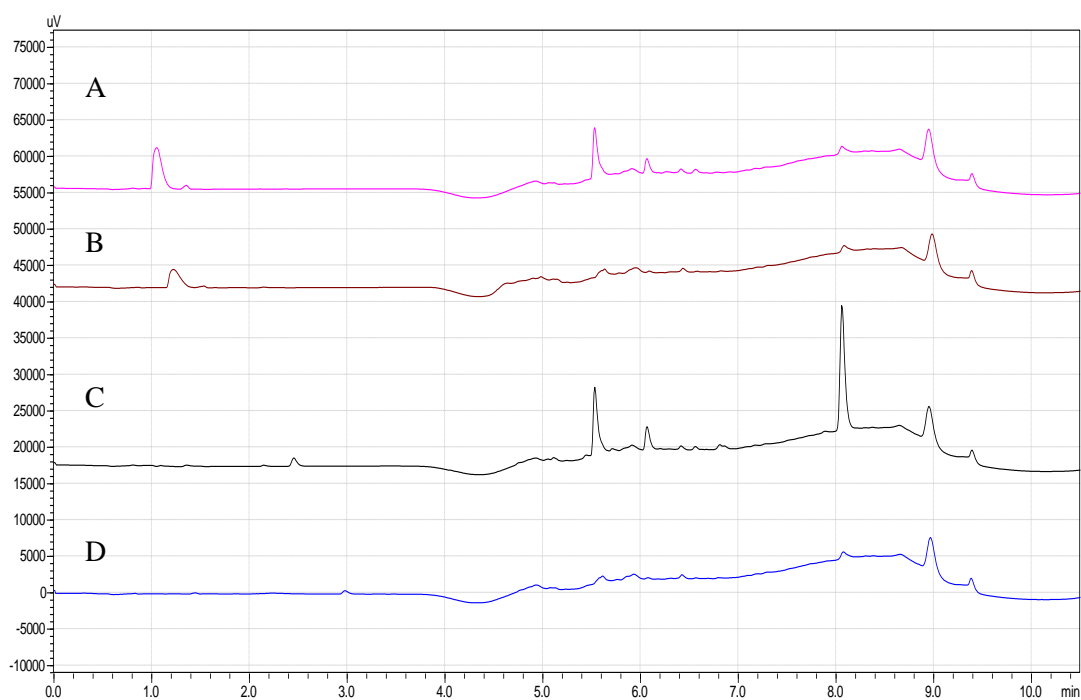
UV detekce: při 254 nm

Nástřik: 2 μ l

Jako optimální byl vybrán octanový pufr o pH 5,5.

Při použití fosforečnanového pufru o vyšším pH 6,7 je příbuzná látka guanin eluována blízko mrtvého retenčního času rozlišení píků ACI a G se zmenšuje, i když je stále vyhovující.

Výběr rozpouštědla



Obrázek 7: Záznam standardních roztoků placeba a samotných rozpouštědel

A: standardní roztok placeba v DMSO

B: standardní roztok DMSO

C: standardní roztok placeba v THF

D: standardní roztok THF

Kolona: Thermo Scientific Synchronis C18 (1,7 μm)

Metoda: 13.

Mobilní fáze: 90% ACN a octanový pufr o pH 5,5

Průtoková rychlost: 0,5 ml/min

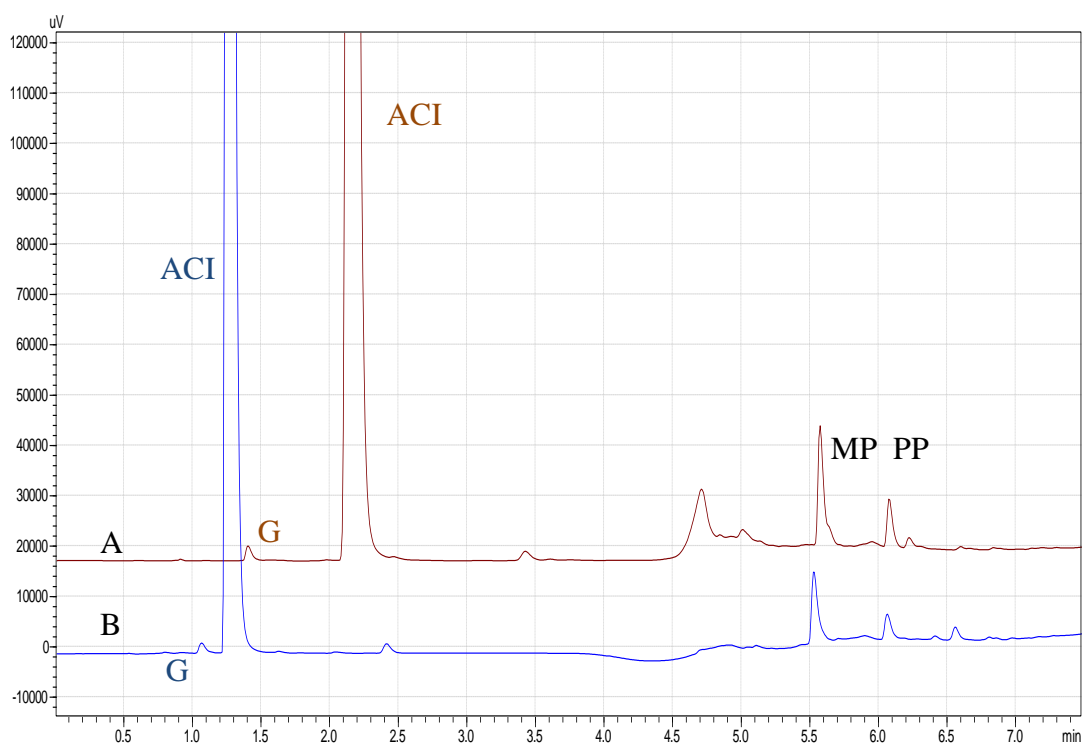
UV detekce: při 254 nm

Nástřík: 2 μl

Byla zkoušena dvě různá rozpouštědla: THF a DMSO. Jako výhodnější byl vybrán THF, protože v DMSO se objevuje pík v čase 1,2.

5.2 Analýza krému s aciklovirem

Vliv složení mobilní fáze (pH pufru) na léčivý přípravek



Obrázek 8: Záznam roztoku zkoušeného krému s aciklovirem v THF

A: octanový pufr o pH 5,5

B: fosforečnanový pufr o pH 6,7

Kolona: Thermo Scientific Synchronis C18 (1,7 μm)

Teplota na koloně: 40 °C

Metoda: 13.

Mobilní fáze: A: 90% ACN a octanový pufr o pH 5,5

B: 90% ACN a fosforečnanový pufr o pH 6,7

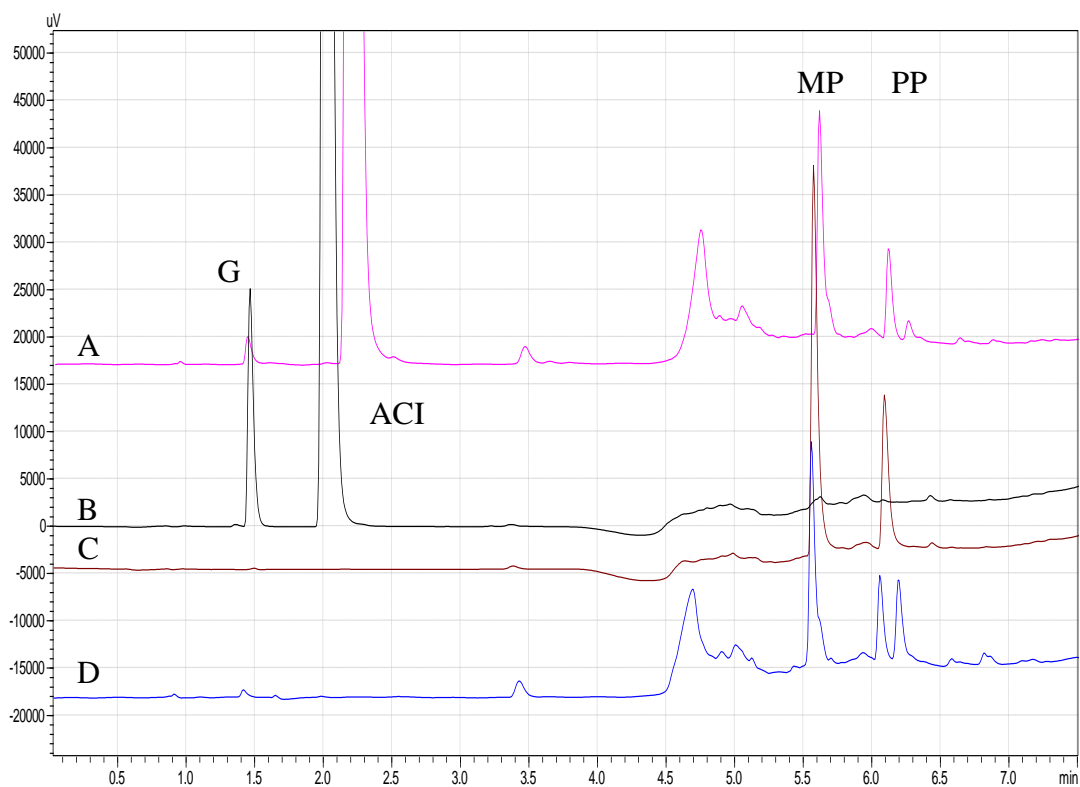
Průtoková rychlost: 0,5 ml/min

UV detekce: při 254 nm

Nástřik: 2 μ l

Jako nejlepší byla zvolena metoda 13. (viz strana 33) s použitím octanového pufru o pH 5,5, kdy rozlišení píků bylo 7,2.

Fosforečnanový pufr by bylo možné pro analýzu přípravku použít také. Rozlišení píků bylo ještě vyhovující 2,0, ale nedošlo ke zkrácení analýzy léčivého přípravku, protože změna pufru neměla vliv na eluci parabenů.



Obrázek 9: Výsledný záznam

A: roztok léčivého přípravku s aciklovirem v THF

B: standardní roztok ACI a G v THF

C: standardní roztok parabenů v THF

D: standardní roztok placebo v THF

Kolona: Thermo Scientific Synchronis C18 (1,7 μm)

Teplota na koloně: 40 $^{\circ}\text{C}$

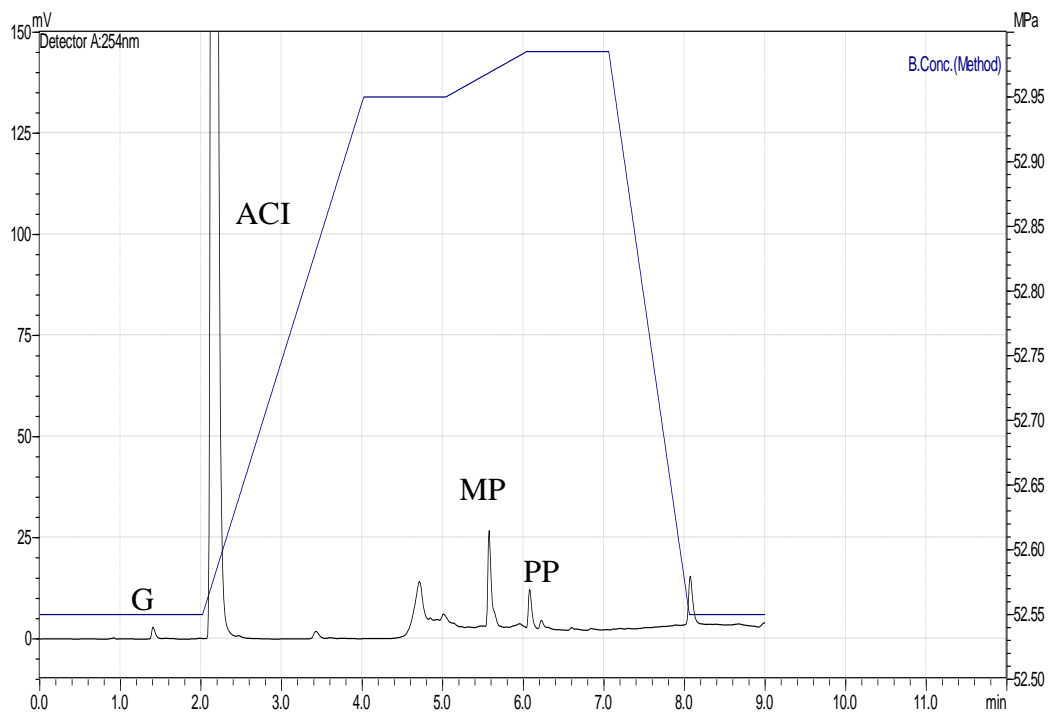
Metoda: 13.

Mobilní fáze: A: 90% ACN a octanový pufr o pH 5,5

Průtoková rychlost: 0,5 ml/min

UV detekce: při 254 nm

Nástřik: 2 μl



Obrázek 10: Chromatogram roztoku léčivého přípravku s aciklovirem a průběh gradientu vybrané 13. metody

6. ZÁVĚR

1. Pro hodnocení acikloviru byla použita kolona typ Thermo Scientific Synchronis s velikostí částic 1,7 μm , stacionární fází C18, velikostí pórů 100Å a rozměry 100 \times 3 mm. Analýzy probíhala gradientovou elucí s mobilní fází tvořenou 90% acetonitrilem a octanovým pufrům o pH 5,5. Průtok mobilní fáze byl 0,5 ml/min při teplotě kolony 40 °C. Vlnová délka UV detektoru byla nastavena na 254 nm.

Čas (min)	Mobilní fáze A % (v/v)	Mobilní fáze B % (v/v)
0-2	90	10
2-4	90→10	10→90
4-5	10	90
5-6	10→3	90→97
6-7	3	97
7-8	3→90	97→10
8-9	90	10

2. Tato metoda byla aplikována na krém obsahující 5 % acikloviru.

3. Metoda byla vyvinuta s ohledem na optimální separaci acikloviru a příbuzné látky guaninu s rozlišením větším než 1,5. Rozlišení píků ACI a G v léčivém přípravku s aciklovirem bylo 7,2.

4. Doba analýzy přípravku byla zkrácena z 22 minut na 9 minut³⁹. Všechny stanovované látky jsou eluovány do 7 minut a 2 minuty jsou nutné k ekvilibraci kolony před dalším nástřikem.

5. Validace metody bude předmětem další práce.

7. POUŽITÉ ZKRATKY

ACI = aciklovir

ACN = acetonitril

CAD = aerosolový detektor nabitých částic (Charged Aerosol Detector)

CNS = centrální nervová soustava

ČL = Český lékopis

DAD = detektor diodového pole (Diode Array Detector)

DNA = deoxyribonukleová kyselina

DMSO = dimethylsulfoxid

ELSD = odpařovací detektor rozptylu světla (Evaporative Light Scattering Detector)

HPLC = vysokoúčinná kapalinová chromatografie (High-Performance LC)

G = guanin

LC = kapalinová chromatografie (Liquid Chromatography)

MP = methylparaben

NQAD = detektor založený na analyzátoru aerosolů (Nano Quantity Analyte Detector)

PC = počítač

PP = propylparaben

THF = tetrahydrofuran

UFLC = Ultra Fast LC

UHPLC = Ultra High Performance LC

8. LITERATURA

1. HARTL J. a kolektiv, *Farmaceutická chemie IV.*, Praha: Nakladatelství Karolinum, 2008, ISBN 978-80-246-1169-3
2. LÜLLMANN H., MOHR K., WEHLING M., *Farmakologie a toxikologie*, překlad 15., zcela přepracovaného vydání, Praha: Grada Publishing, a.s., 2004, ISBN 80-247-0836-1
3. *Český lékopis 2009*, Praha: Grada Publishing, a.s., 2009, ISBN 978-80-247-2494-7
- 4.[online]
http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/summary/summary.cgi?cid=2022&loc=ec_rcs
[vid. 21. ledna 2012]
5. HUIDOBRO A. L., RUPÉREZ F. J., BARBAS C., LC methods for acyclovir and related impurities determination, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, April 2005, vol. 37, no. 4, s. 687–694
6. LINCOVÁ D., FARGHALI H. a kolektiv., *Základní a aplikovaná farmakologie*, druhé, doplněné a přepracované vydání, Praha: Galén, 2007, ISBN 978-80-7262-373-0
7. Mikro-verze AISLP 2003.1 pro MS Windows, SPC přípravků Herpesin krém, Herpesin 400, Supraviran 400
8. BANGARU R. A., BANSAL Y. K., Rao A. R. M., GANDHI T. P., Rapid, simple and sensitive high-performance liquid chromatographic method for detection and determination of acyclovir in human plasma and its use in bioavailability studies, *Journal of Chromatography B*, March 2000, vol. 739, no. 2, s. 231-237

9. [online]

<http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/search/r?dbs+hsdb:@term+@rn+@rel+59277-89-3>

[vid. 21. ledna 2012]

10.[online]

[http://www.sukl.cz/modules/medication/search.php?data\[search_for\]=&data\[code\]=&data\[atc_group\]=&data\[material\]=aciklovir&data\[path\]=&data\[reg\]=&data\[radio\]=none&data\[rc\]=&data\[with_adv\]=0&search=Vyhledat&data\[listing\]=20](http://www.sukl.cz/modules/medication/search.php?data[search_for]=&data[code]=&data[atc_group]=&data[material]=aciklovir&data[path]=&data[reg]=&data[radio]=none&data[rc]=&data[with_adv]=0&search=Vyhledat&data[listing]=20)

[vid. 21. ledna 2012]

11. BARCELÓ-BARRACHINA E., MOYANO E., GALCERAN M. T., LLIBERIA J. L., BAGÓ B., CORTES M. A., Ultra-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry for the analysis of heterocyclic amines in food, *Journal of Chromatography A*, September 2006, vol. 1125, no. 2, s. 195-203

12.[online] <http://www.ssi.shimadzu.com/products/product.cfm?product=UFLC-page01>

[vid. 31. ledna 2012]

13. NOVÁKOVÁ L., MATYSOVÁ L., SOLICH P., Advantages of application of UPLC in pharmaceutical analysis, *Talanta*, January 2006, vol. 68, no. 3, s. 908-918

14. KARLÍČEK R. a kolektiv, Analytická chemie pro farmaceuty, Praha: Nakladatelství Karolinum, 2005, ISBN 80-246-0348-9

15. [online] <http://biochemie.upol.cz/doc/skripta/bam/07.ppt>

[vid. 4. března 2012]

16. [online] http://old.lf3.cuni.cz/chemie/cesky/materialy_B/chromatografie.doc

[vid. 4. března 2012]

17. [online] http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2009_04_266-270.pdf

[vid. 7. ledna 2012]

18. [online] <http://www.laboratorytalk.com/news/sad/sad194.html> [vid. 31. ledna 2012]

19. [online] <http://www.laboratorytalk.com/news/sad/sad206.html> [vid. 31. ledna 2012]
20. [online] <http://www.ssi.shimadzu.com/products/product.cfm?product=uflc-page02>
[vid. 31. ledna 2012]
21. LOREGIAN A., GATTI R., PALU` G., DE PALO E. F., Separation methods for acyclovir and related antiviral compounds, *Journal of Chromatography B*, November 2001, vol. 764, no. 1-2, s. 289-311
22. [online] http://www.waters.com/webassets/cms/library/docs/development_of_a_new_uplc-ms_method_for_systematic_toxicological_analysis.pdf
[vid. 5. března 2012]
23. [online] <http://mtweb.mtsu.edu/nchong/HPLC&UPLC-Kevin-6200.ppt>
[vid. 5. března 2012]
24. [online]
<http://www.chromatographyonline.com/lcgc/Research/UHPLC/ArticleStandard/Article/detail/686086>
[vid. 4. března 2012]
25. [online] <http://www.chromatographyonline.com/lcgc/data/articlestandard/lcgc/242005/164646/article.pdf>
[vid. 22. ledna 2012]
26. NGUYEN D. T.-T., GUILLARME D., RUDAZ S., VEUTHEY J.-L., Fast analysis in liquid chromatography using small particle size and high pressure, *Journal of separation science*, August 2006, vol. 29, no. 12, s. 1836-1848
27. [online] <http://web.natur.cuni.cz/analchem/bosakova/hplc4.pdf> [vid. 8. května 2011]
28. KLIMEŠ J. a kolektiv, *Kontrola léčiv I.*, Praha: Nakladatelství Karolinum, 2006, ISBN 80-246-0419-1

- 29.[online]
<http://www.faf.cuni.cz/studium/Materialy/Katedra%20analytick%C3%A9%20chemie/Farmacie/Speci%C3%A1ln%C3%AD%20metody%20instrument%C3%A1ln%C3%AD%20anal%C3%BDzy/P%C5%99edn%C3%A1%C5%A1ky/2011%2010%20S MIA%20POKROKY%20HPLC.pdf> [vid. 5. března 2012]
30. [online] http://chromservis.cz/media/0/05_pdf/Kinetex_br63680808_I_3.pdf
[vid. 4. března 2012]
31. [online] http://www.shodex.de/index.php?reiter=r_applic&seitenid=1&applic=1472
[vid. 5. března 2012]
32. [online] <http://web.natur.cuni.cz/~analchem/bosakova/hplc2.pdf>
[vid. 5. března 2012]
33. [online] <http://web.natur.cuni.cz/analchem/bosakova/hplc3.pdf>
[vid. 5. března 2012]
34. KLIMEŠ J. a kolektiv, *Kontrola léčiv II.*, Praha: Nakladatelství Karolinum, 2007, ISBN 978-80-246-1460-1
35. [online] http://users.prf.jcu.cz/sima/vybrane_kapitoly/kapal_chrom_vyber.htm
[vid. 6. března 2012]
36. [online] www.kvasnyprumysl.cz/download.php?clanek=151
[vid. 6. března 2012]
37. [online] http://www.teknolab.no/pdf/Alltech_NQAD_Presentation.pdf
[vid. 6. března 2012]
38. KAZAKEVICH Y., LOBRUTTO R., *HPLC for Pharmaceutical Scientists*, New Jersey: Wiley-Interscience, 2007, ISBN 978-0-471-68162-5

39. NEJEDLÝ, T., *Hodnocení biologicky aktivních látek kapalinovou chromatografií XI: diplomová práce*. Hradec Králové: Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, 2011.