

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE  
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ  
KATEDRA BIOFYZIKY A FYZIKÁLNÍ CHEMIE



## DIPLOMOVÁ PRÁCE

VYUŽITÍ CORE-SHELL KOLON PRO STANOVENÍ FLUKONAZOLU

Vedoucí diplomové práce: Ing. Martin Drastík, Ph.D.

HRADEC KRÁLOVÉ, 2014

KATEŘINA BROKEŠOVÁ

## **Poděkování**

Děkuji vedoucímu práce Ing. Martinu Drastíkovi, Ph.D. za odborné vedení práce a poskytování cenných rad. Také bych ráda poděkovala Katedře farmaceutické technologie, jmenovitě PharmDr. Evě Šnejdrové, Ph.D., za přípravu a poskytnutí vzorků k analýze.

„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 jsou řádně citovány. Práce nebyla použita k získání jiného nebo stejného titulu.“

V Hradci Králové 11. 5. 2014

# 1. OBSAH

1.	OBSAH .....	4
2.	ÚVOD.....	6
3.	ZADÁNÍ – CÍL PRÁCE .....	7
4.	TEORETICKÁ ČÁST.....	8
4.1	Vysokoučinná kapalinová chromatografie - HPLC .....	8
4.1.1	Úvod .....	8
4.1.2	Kapalinový chromatograf .....	8
4.1.3	Princip.....	9
4.2	Core-shell kolony.....	10
4.2.1	Složení core-shell kolon .....	10
4.2.2	Rychlost separace .....	11
4.2.3	Rozlišovací schopnost.....	12
4.2.4	Citlivost.....	13
4.2.5	Odolnost.....	14
4.2.6	Kolony s RP-Amidem.....	14
4.3	Flukonazol .....	16
4.3.1	Základní charakteristika .....	16
4.3.2	Mechanismus účinku .....	16
4.3.3	Farmakokinetika .....	18
4.3.4	Indikace .....	18
4.3.5	Nežádoucí účinky.....	18
4.3.6	Stanovení flukonazolu .....	19
4.4	PLGA.....	19
4.4.1	Syntéza .....	20
4.4.2	Degradace.....	20
4.4.3	Využití.....	21
5.	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST .....	22
5.1	Použité chemikálie .....	22
5.2	Přístrojové vybavení .....	22

5.3	Příprava roztoků .....	23
5.3.1	Příprava acetátového pufru o pH 5,0.....	23
5.3.2	Příprava roztoku standardu flukonazolu.....	23
5.3.3	Příprava kalibračních roztoků flukonazolu.....	23
5.4	Příprava vzorků.....	24
6.	VÝSLEDKY A DISKUSE .....	25
6.1	Vývoj chromatografické metody .....	25
6.1.1	Optimalizace složení mobilní fáze.....	25
6.1.2	Optimální podmínky .....	28
6.2	Validace .....	29
6.2.1	Selektivita .....	29
6.2.2	Linearita.....	30
6.2.3	Opakovatelnost .....	31
6.2.4	Faktor symetrie $A_s$ .....	33
6.2.5	Zdánlivý počet teoretických pater $N$ .....	33
6.2.6	LOD/LOQ.....	34
6.3	Měření vzorků .....	34
7.	ZÁVĚR .....	40
8.	ABSTRAKT .....	41
9.	ABSTRACT.....	42
10.	POUŽITÉ ZKRATKY.....	43
11.	SEZNAM TABULEK .....	44
12.	SEZNAM OBRÁZKŮ .....	45
13.	SEZNAM GRAFŮ.....	46
14.	POUŽITÁ LITERATURA.....	47

## 2. ÚVOD

Flukonazol patří mezi azolová antimykotika s vysokou antifungální specifikou účinku. Je vhodný jak k perorálnímu, tak parenterálnímu podání. Mechanismus účinku spočívá v inhibici syntézy ergosterolu u citlivých hub. Flukonazol se využívá v léčbě různých druhů kandidóz, např. u systémových, slizničních, jícnových a mukokutanních kandidóz genitálu. Léčba zahrnuje i kryptokokózy, dermatomykózy a systémové endemické mykózy. (1)

V posledních letech se dostávají do popředí polymery využívané jako nosiče léčiv. Mezi tyto polymery patří také sloučeniny kyseliny mléčné a glykolové. V dnešní době se využívají jako vstřebatelný šicí materiál v chirurgii a tkáňovém inženýrství, ale také při formulaci léčivých přípravků. Výhodou použití těchto kyselin v praxi, zejména jako nosiče léčiv, je jejich biodegradabilita. Tyto látky se fyziologicky vyskytují v lidském těle. Po rozpadu matrice, která obsahuje inkorporované léčivo, se kyselina mléčná dostává do citrátového cyklu, kde se ve formě oxidu uhličitého a vody dostává z těla. Kyselina glykolová je z větší části z těla exkretována, v menším podílu vstupuje do citrátového cyklu. (2; 3)

Jednou z často využívaných metod pro stanovení identity a obsahu flukonazolu je vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC). Výhoda metody spočívá zejména v rychlosti a citlivosti analýzy. Mezi další přednosti řadíme minimální potřebu vzorku a možnost automatizace. (4)

### **3. ZADÁNÍ – CÍL PRÁCE**

Cílem této diplomové práce je vyvinout, optimalizovat a validovat HPLC metodu pro stanovení obsahu flukonazolu ve vzorcích získaných při disoluci matric, které jsou tvořeny kopolymerem kyseliny mléčné a glykolové. Při práci budou použity core-shell kolony, které disponují výhodnými vlastnostmi, které by měly ulehčit vývoj HPLC metody. Během práce bude vybrána vhodná mobilní fáze, optimalizován průtok a teplota, při které bude analýza probíhat. Při optimalizaci metody HPLC bude také kladen důraz na vlastnosti výsledných chromatogramů, jako jsou retenční časy určovaných látek, dále šířka a symetrie píků. Vypracovaná metoda by měla být rychlá a jednoduchá, aby mohla být použita pro větší série vzorků z disolučních testů prováděných Katedrou farmaceutické technologie.

## 4. TEORETICKÁ ČÁST

### 4.1 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie - HPLC

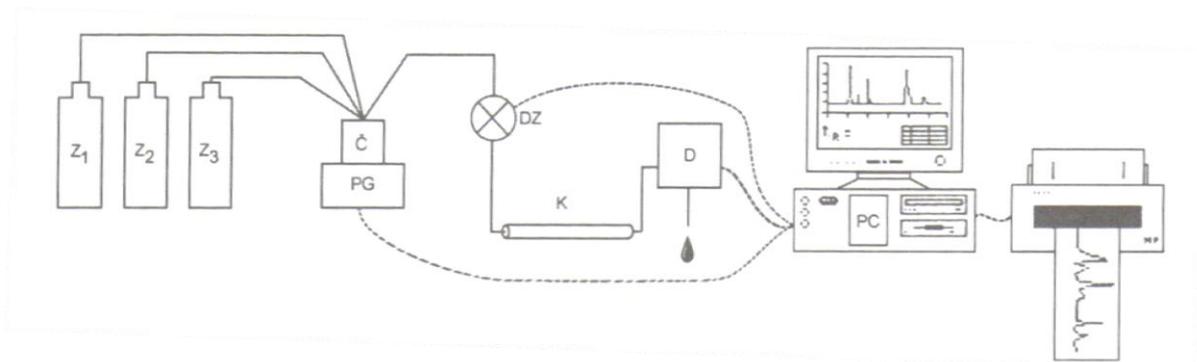
#### 4.1.1 Úvod

HPLC (High Performance Liquid Chromatography) patří v současné době k nejvíce využívaným analytickým metodám, které se uplatňují ve všech oblastech analýzy léčiv, např. stanovení obsahu, totožnosti a čistoty léčiv, analýza složených lékových přípravků, stabilitní studie a monitorování metabolitů a léčiv v tělních tekutinách.

Hlavní přednosti HPLC : (4)

- Jedná se o separační metodu umožňující kvalitativní i kvantitativní analýzu separovaných složek směsi
- Rychlost analýzy, vysoká citlivost
- Použití minimálního množství vzorku
- Možnost automatizace
- Srovnatelnost s plynovou chromatografií; avšak vzhledem k tomu, že většina léčiv není těkavá, HPLC v analýze léčiv jednoznačně dominuje

#### 4.1.2 Kapalinový chromatograf



**Obrázek 1 Kapalinový chromatograf (4)**

Vysvětlivky: Z<sub>1, 2, 3</sub>, - zásobníky mobilní fáze, Č – čerpadlo, PG – programovací jednotka, DZ – dávkovací zařízení, K – kolona, D – detektor, PC - počítač

Chromatograf se skládá ze zásobníku mobilní (pohyblivé) fáze. Další částí je čerpadlo, které čerpá mobilní fázi do chromatografického systému a je schopno vyvinout tlak až kolem 50 MPa. Vysoký tlak je nezbytný vzhledem k náplni kolon a (v porovnání s plyny) ke značné viskozitě kapalně mobilní fáze. Díky těmto okolnostem jsou kladeny vysoké požadavky na kvalitu a výkonnost čerpadla, dále na těsnost spojů i samotných kolon. Velice často se před čerpadlo zařazuje degazér, jehož úkolem je odplynění mobilní fáze. Vzduch rozpuštěný v mobilní fázi by se mohl, například při mísení různých složek mobilní fáze, uvolnit a vzniklé vzduchové bublinky by pak rušily analýzu. Na vstupu kolony je umístěno dávkovací zařízení vzorku. Nástřik vzorku je možno provádět dvojitým způsobem a to buď manuálně za pomoci mikrostříkačky, nebo s použitím automatického dávkovače. Chromatografické kolony jsou zhotoveny z kovu (nerez) nebo mohou být skleněné, konstruované pro vysoké používané tlaky. Kolony bývají dlouhé 5–30 cm o vnitřním průměru 2–8 mm. Náplň kolony je tvořena malými sférickými částicemi sorbentu (velikost 1,7–5  $\mu\text{m}$ ) a musí být nanejvýš rovnoměrná. Další částí systému je průtokový detektor, na jehož citlivosti a spolehlivosti závisí ve velké míře výsledek analýzy. Detektory můžeme dělit podle způsobu detekce na spektrofotometrické, fluorimetrické, elektrochemické, refraktometrické a další. Signál detektoru byl dříve snímán a registrován zapisovačem a případně zpracován integrátorem. Dnes je ovládání kapalinového chromatografu plně automatické a ovládané počítačem za pomoci chromatografického softwaru, který slouží ke sběru a následnému zpracování dat. (5; 6)

### **4.1.3 Princip**

HPLC je separační metoda, při níž dochází k dělení složek směsi na koloně naplněné sorbentem v důsledku ustálení rovnováhy mezi mobilní a stacionární fází. Jednotlivé složky jsou děleny na základě odlišných interakcí s těmito dvěma fázemi. (4)

V HPLC se nejčastěji používají tzv. chemicky vázané stacionární fáze. Silikagelová zrnka s -OH skupinami váží vhodnou chemickou reakcí různé radikály. Nejčastěji se jedná o uhlovodíkové řetězce, které mají zpravidla 18 uhlíkatých atomů (případně 8). Tyto fáze mají nepolární charakter a používají se v tzv. reverzním modu, kdy mobilní fáze je polární a stacionární fáze je nepolární. Dalšími příklady používaných radikálů mohou

být tří-uhlíkaté řetězce s navázanými skupinami  $-NH_2$ ,  $-CN$  aj. Tyto látky mají středně polární charakter a dají se použít v obou modech – reverzní i normální chromatografie. (4)

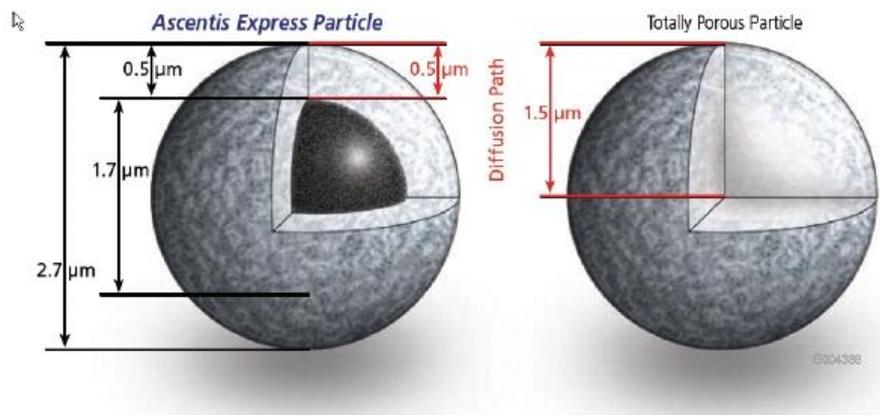
Jako mobilní fáze se v reverzní chromatografii používají především methanol, acetonitril, tetrahydrofuran, voda a jejich směsi. Při chromatografickém stanovení bazických nebo kyselých látek se zpravidla organické rozpouštědlo mísí s vodným roztokem pufru. Tímto se ustaví a následně během chromatografického procesu i udržuje ionizační rovnováha dělených látek, která má podstatný vliv na jejich distribuci a eluční parametry. (5)

## **4.2 Core-shell kolony**

Core-shell kolony znamenaly průlom v metodě HPLC. Jejich částice mají stejné výhody jako menší  $2\ \mu m$  částice, ale navíc dovolují stanovení za nižšího tlaku. Tyto výhody následně zahrnují možnost provádět rychlejší analýzy s vyšším rozlišením. (7)

### **4.2.1 Složení core-shell kolon**

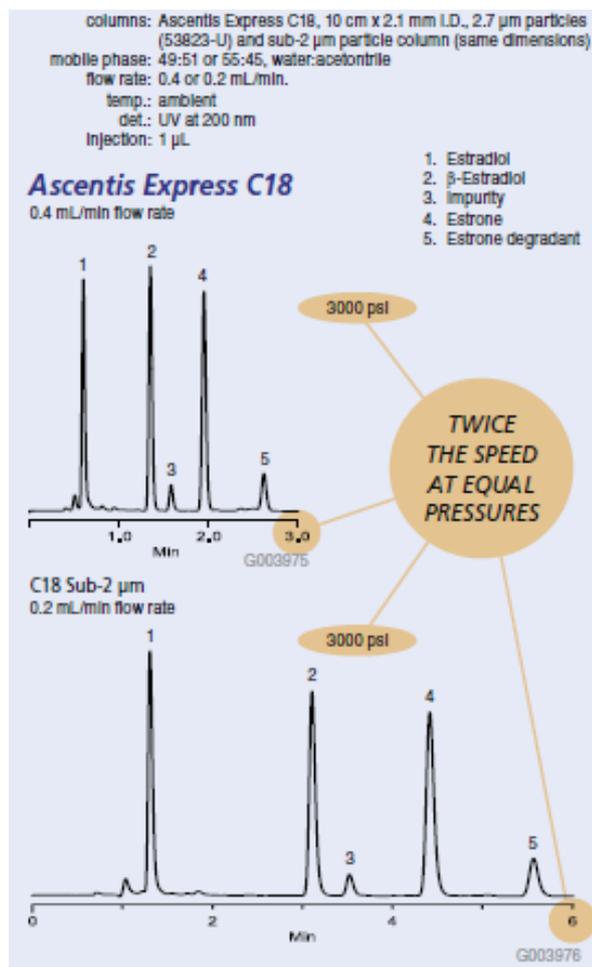
Core-shell kolony obsahují  $2,7\ \mu m$  velké částice, které se skládají z  $1,7\ \mu m$  velkého pevného jádra a  $0,5\ \mu m$  širokého porézního obalu. Jejich výhodou je kratší difúzní dráha ve srovnání s částicemi, které jsou plně porézní. Je to způsobeno právě přítomností pevného jádra. Tato částečná pórovitost snižuje axiální disperzi analytů a minimalizuje rozmývání píku. Mají srovnatelnou účinnost s částice menšími než  $2\ \mu m$  a jsou téměř dvakrát účinnější než  $3\ \mu m$  částice. Jejich další výhodou je větší velikost částic, která dovoluje přibližně o polovinu menší tlak za stejných podmínek a velikosti kolony. (7)



**Obrázek 2 Porovnání struktury plně porézní (vpravo) a core-shell částice (vlevo) (7)**

#### **4.2.2 Rychlost separace**

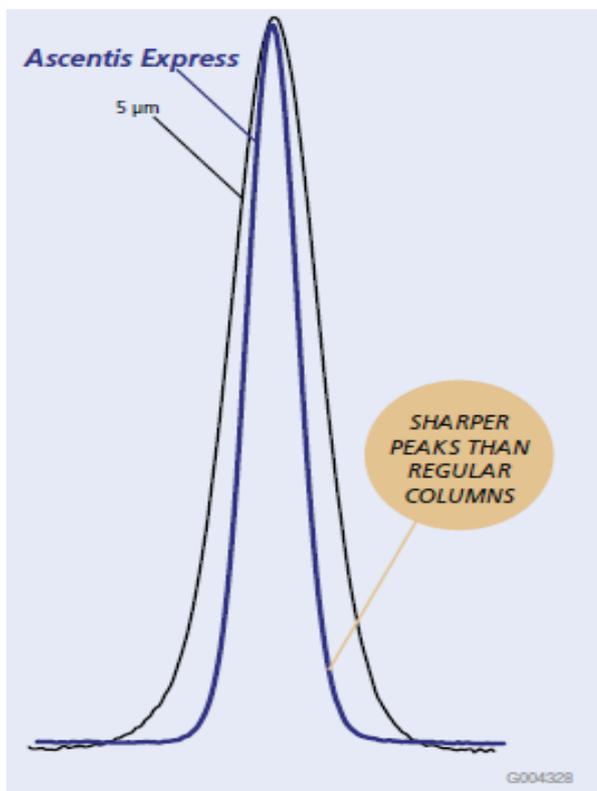
Jednou z výhod těchto kolon je rychlost separace. Ve srovnání s částicemi menšími než 2 μm, částice core-shell kolon vytvářejí přibližně poloviční tlak. To umožňuje použít jak delší kolony, tak rychlejší průtok. Na Obrázku 3 jsou znázorněny rozdíly mezi běžnými kolonami obsahující částice menší než 2 μm a core-shell kolonami. Rychlost separace je až několikrát větší v důsledku většího průtoku při zachování stejného tlaku. (7)



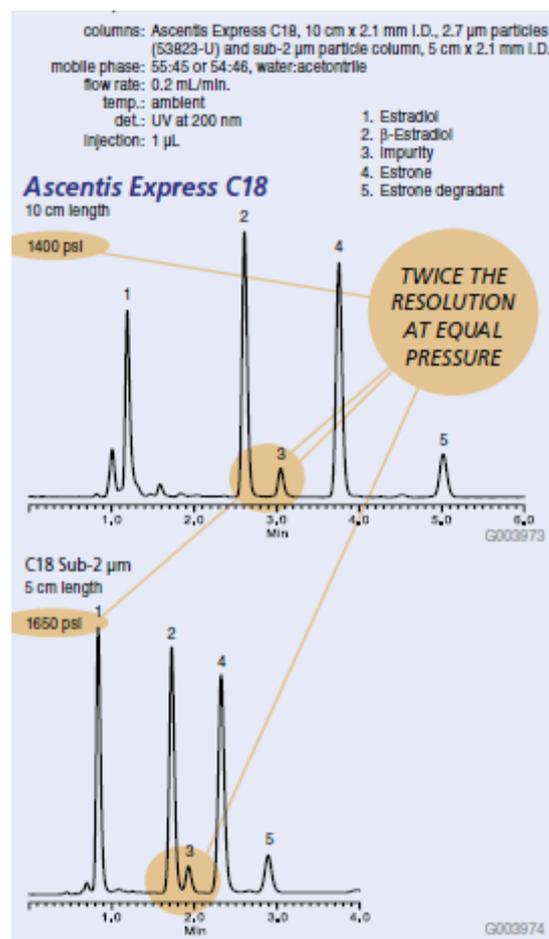
**Obrázek 3 Porovnávání rychlostí separace (7)**

### 4.2.3 Rozlišovací schopnost

Další užitečnou vlastností je vysoká rozlišovací schopnost. Ve srovnání s běžnými 3  $\mu\text{m}$  a 5  $\mu\text{m}$  částicemi, částice core-shell kolon vytvářejí ostřejší pík, jak ukazuje Obrázek 4. Tyto částice jsou navíc i více propustné, vykazují menší tlak, a proto můžeme použít delší kolony pro ještě větší rozlišení. Touto vlastností však nedisponují částice menší než 2  $\mu\text{m}$  z toho důvodu, že vytvářejí větší tlak, a proto se vylučuje použití delších kolon ke zlepšení rozlišení. (7)



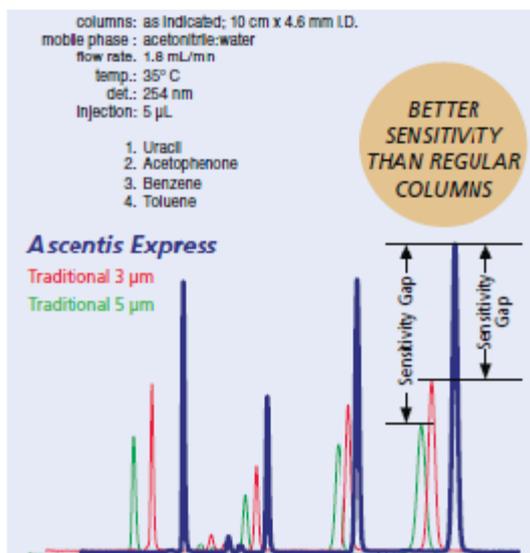
**Obrázek 4 Porovnání ostrosti píků (7)**



**Obrázek 5 Porovnání rozlišovací schopnosti (7)**

#### 4.2.4 Citlivost

Další výhodou core-shell kolon je vysoká citlivost. Píky jsou vyšší a vykazují vyšší S/N poměr. Přičtením citlivosti k vysoké účinnosti tohoto systému můžeme odečítat rozdíly v citlivosti jednotlivých chromatogramů, jak je znázorněno na Obrázku 6. (7)



**Obrázek 6 Porovnání citlivosti chromatogramů (7)**

#### 4.2.5 Odolnost

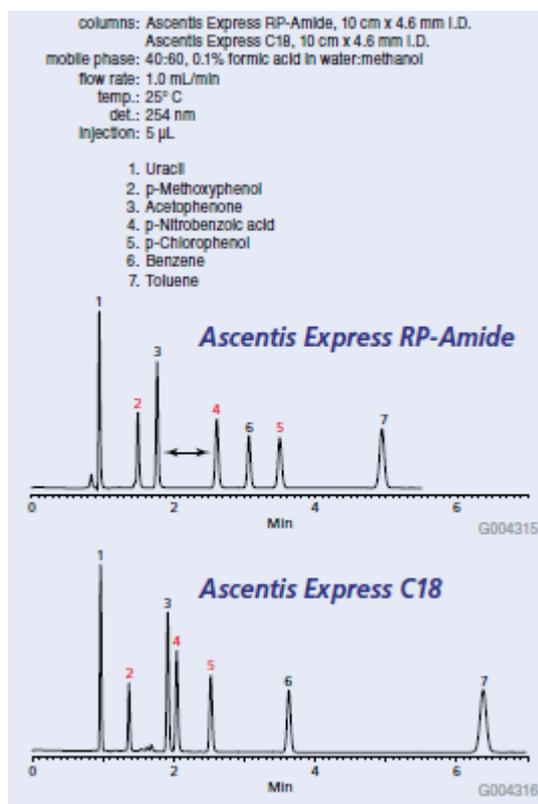
Částice core-shell kolon se vyrábějí tak, aby byly všechny zhruba stejně velké. Stejná velikost poté umožňuje použití frit s velikostí pórů 2  $\mu\text{m}$ . Toto je výhoda ve srovnání s částicemi menšími než 2  $\mu\text{m}$  z toho důvodu, že tyto menší částice vyžadují menší pórovitost frit (0,5  $\mu\text{m}$  a menší) a jsou tedy náchylnější k zanášení, což vede k rozdělování píků a vyššímu tlaku. Toto pak snižuje životnost kolony. (7)

Dalším rysem, který přispívá k odolnosti systému, je fakt, že částice mají vyšší hustotu než plně porézní částice a vytvářejí tak vysoce stabilní lůžko. Nedochozí tedy k vytváření cestiček v lůžku (channeling) a analyty mohou pak plně interagovat se stacionární fází. (7)

#### 4.2.6 Kolony s RP-Amidem

Kolony obsahující RP-Amid poskytují vyšší selektivitu k polárním sloučeninám, a to především k těm, které tvoří vodíkové vazby. Amidová skupina poskytuje rozšíření selektivity pro analyty, které tvoří vodíkové vazby s heteroatomy. Fenoly, karboxylové kyseliny, aminy a v menší míře i alkoholy vykazují zvýšenou retenci na RP-Amidové koloně ve srovnání s neutrálními nepolárními látkami. Na Obrázku 7 je porovnání kolony C18 s RP-Amidovou kolonou. Směs pro analýzu obsahuje neutrální nepolární

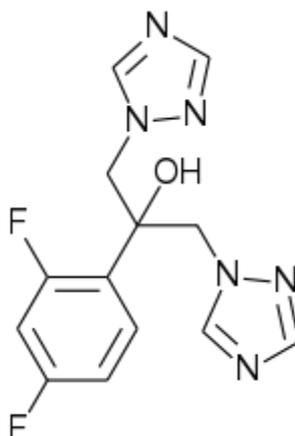
sloučeniny (benzen, toluen) a protické látky (p-methoxyfenol, p-nitrobenzoovou kyselinu a p-chlorfenol). Jak je vidět na prvním chromatogramu, neutrální molekuly vykazují snížené zadržení na koloně a jsou eluovány o něco dříve než na druhém chromatogramu. Polární sloučeniny jsou naopak více zadržovány na RP-Amidové koloně, mají delší retenční časy a dokonce zde dochází i ke změně pořadí eluce. (7)



**Obrázek 7 Rozdílná selektivita kolon (7)**

Kolony s RP-Amidem mají stejnou účinnost a pracují za stejného tlaku jako kolony s C18. Obě separace používají stejnou mobilní fázi. Toto je důležité pro aplikaci této metody. Pokud není separace dostačující na klasické koloně C18, není nutné měnit mobilní fázi, jednoduše se vymění za kolonu RP-Amidovou a pokud směs obsahuje protické částice, dochází ke změně selektivity. (7)

## 4.3 Flukonazol



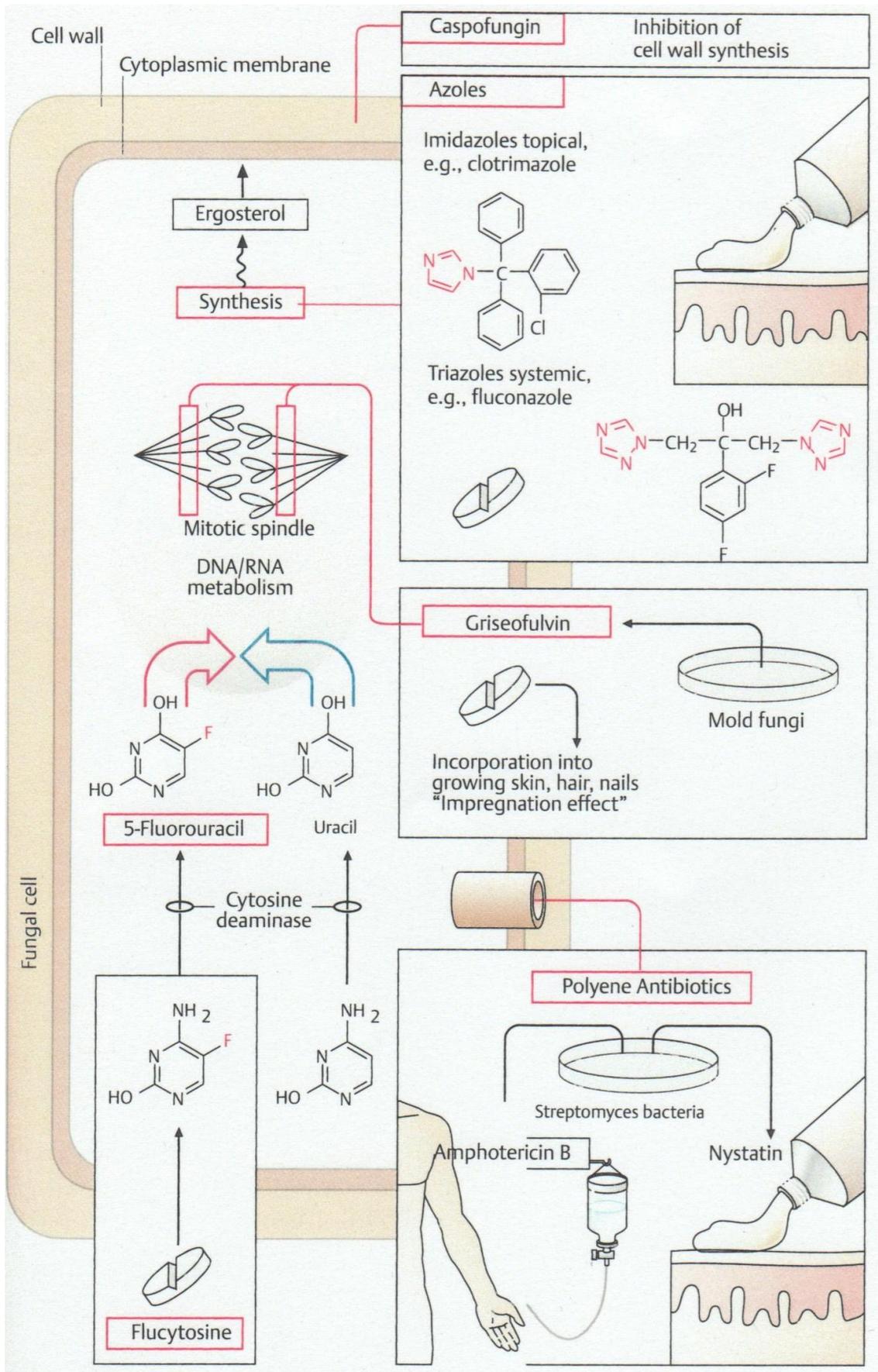
Obrázek 8 Vzorec flukonazolu (8)

### 4.3.1 Základní charakteristika

Flukonazol se řadí mezi novější systémová antimykotika. Je to bis-triazolový derivát propanolu ze skupiny azolových antimykotik s vysokou antifungální specifikou účinku. Je vhodný k perorálnímu a parenterálnímu podání. Ve srovnání s ostatními antimykotiky se liší ve farmakokinetice (je hydrofilní), má také vyšší terapeutický index, méně nežádoucích účinků a lékových interakcí. (1; 9)

### 4.3.2 Mechanismus účinku

Mechanismus účinku azolových antimykotik spočívá v ovlivnění enzymu 14- $\alpha$ -demetylázy, důležitého při biosyntéze ergosterolu v mikrozomech citlivých hub. Působí fungistaticky. (10; 11)



**Obrázek 9 Mechanismus účinku antimykotik (12)**

### 4.3.3 Farmakokinetika

Flukonazol podaný p.o. se rychle a téměř úplně absorbuje nezávisle na příjmu potravy a pH žaludku. Biologická dostupnost po p.o. podání je 95 %. Výše koncentrací v plazmě jsou tedy podobné po perorálním i nitrožilním podání. Vazba na plazmatické bílkoviny je nízká (10–12 %), dobře proniká do všech tkání a tělesných tekutin, včetně likvoru, placenty a mateřského mléka. V moči a kůži jsou koncentrace 10krát vyšší, 2–3krát vyšší jsou i ve fagocytujících buňkách, kde se flukonazol dlouhodobě ukládá. Velká část flukonazolu (asi 80 %) je vylučována ledvinami v aktivní formě, jeho biologický poločas (25–30 hodin) se zvyšuje při poškození funkcí ledvin. (1; 13)

### 4.3.4 Indikace

Účinnost flukonazolu zahrnuje kvasinky (*Candida spp.*), které jsou nejcitlivější, a dermatofyty (*Trichophyton rubrum*). Uplatnění nachází i u široké škály subkutánních a systémových mykóz. Patří sem např. blastomykózy, kandidózy, kokcidiomykózy, kryptokokózy, dermatofyty, histoplazmózy a parakokcidiomykózy. Vysoce rezistentní jsou *Candida krusei* a *Candida glabra*, neúčinný je u zygomykóz. (10)

Flukonazol se také používá profylakticky u infekcí způsobených *Candida spp.* u pacientů s neutropenií a pacientů s AIDS. Tato léčba je však spojena s rostoucím výskytem systémových infekcí, které jsou způsobeny flukonazol-rezistentními kmeny. (14)

### 4.3.5 Nežádoucí účinky

Flukonazol je všeobecně dobře snášen. Nežádoucí účinky jsou podobné jako u dalších azolů. Jsou jimi např. dyspeptické potíže, nauzea, zvracení, bolest hlavy, kožní exantém, zvýšení jaterních enzymů a reverzibilní alopecie. Flukonazol je inhibitorem cytochromu P-450, zejména isoformy CYP2C9, z čehož vyplývá, že snižuje metabolismus a zvyšuje koncentraci všech léčiv metabolizovaných těmito enzymy. Jsou to např. deriváty sulfonamocoviny, warfarin, fenytoin, cyklosporin, midazolam a triazolam. Hladiny flukonazolu v séru mohou být sníženy při současném podávání rifampicinu (urychlení biotransformace) a zvýšeny thiazidovými diuretiky. (1; 15)

### 4.3.6 Stanovení flukonazolu

Nejčastější metoda pro stanovení flukonazolu je vysokoúčinná kapalinová chromatografie. Lékopisné stanovení flukonazolu využívá kolonu C18 (150 x 4,6 mm), teplotu 40 °C. Jako mobilní fáze je použita směs objemových dílů acetonitrilu R a roztoku mravenčanu amonného R (0,63 g/l) v poměru 14:86. Detekce má být provedena spektrofotometricky při vlnové délce 260 nm. (16) Tato metoda je však zastaralá a ke stanovení flukonazolu se používají jiné metody.

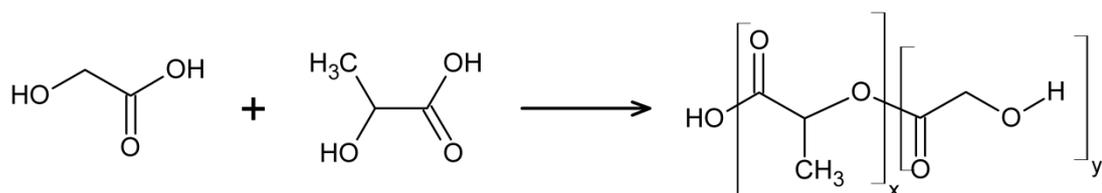
T. Wattananat a W. Akarawut dávají přednost stanovení flukonazolu v lidské plazmě metodou HPLC za těchto podmínek: kolona C18 (150 x 4,6 mm), teplota 35 °C a jako mobilní fázi používají směs 10 mM pufru octanu sodného a methanolu (65:35) při průtoku 1 mL/min. Detekce byla provedena při 210 nm. Retenční čas flukonazolu je 7 min. Navržená metoda je dostatečně citlivá a reprodukovatelná ve farmakokinetických a bioekvivalenčních studiích. (17)

Jako další možnost stanovení se jeví použití vody a acetonitrilu (60:40) jako mobilní fáze při průtoku 0,5 mL/min a při laboratorní teplotě. Detekce byla provedena při 210 nm. Retenční čas flukonazolu byl 9,3 min. Tato metoda byla použita při monitorování flukonazolu v plazmě u pacientů s popáleninami. (18)

Další stanovení flukonazolu bylo provedeno dle Zhanga a kol. za těchto podmínek: kolona C18 (250 x 4,6 mm), mobilní fáze složená z acetonitrilu a vody (36:64), při průtoku 0,8 mL/min a detekci při 210 nm. Retenční čas flukonazolu byl 4,7 min, celá analýza trvala 10 min. Tato metoda umožňuje reprodukovatelné a přesné měření flukonazolu ve vzorcích krve u dětských pacientů. (19)

## 4.4 PLGA

PLGA je konvenční označení pro poly(laktidy-co-glykolidy), což jsou kopolymery kyseliny D,L-mléčné a kyseliny glykolové. Kyselina mléčná a glykolová patří mezi  $\alpha$ -hydroxykyseliny. Jejich kondenzací a následnou polymerací vznikají sloučeniny, které mají široké využití nejen v chirurgii, ortopedii, tkáňovém inženýrství a při formulaci léčivých přípravků, ale také při výrobě biodegradabilních předmětů s ekologickým akcentem. (2)



**Obrázek 10 Kys. glykolová a kys. mléčná reagující na poly(laktid-co-glykolid)**

#### 4.4.1 Syntéza

Polyestery lze syntetizovat více způsoby. Jsou to např. přímá katalytická polykondenzace za snížení tlaku, azeotropická polykondenzace, polymerace v pevném stavu nebo polymerace za otevření kruhu. (20)

Jako nosiče léčiv se nejvíce uplatňují větvené polymery s nižší molární hmotností. Jejich výhodou je kratší doba degradace v délce řádově několika hodin až několika dnů. Tyto polymery mohou být syntetizovány stupňovou kopolymerací ternárního systému složeného z ekvimolární směsi kyseliny glykolové a kyseliny D,L-mléčné, doplněné větvicím monomerem různého typu a koncentrace. V důsledku toho mají různý stupeň větvení a různou maximálně dosažitelnou molární hmotnost. Jako větvicí složky jsou nejčastěji využívány vícesytné alkoholy a cukry, jako je např. manitol, pentaerythritol, glukosa nebo polyvinylalkohol. Tato struktura zvyšuje bioodbouratelnost při zachování ostatních výhodných vlastností, jako jsou stabilita a příznivé mechanické vlastnosti. (2; 21)

#### 4.4.2 Degradace

Degradace alifatických  $\alpha$ -hydroxykyselin probíhá mechanismem hydrolýzy nestabilních esterových vazeb v polymerním řetězci. Ve vodném prostředí dochází k penetraci vody do polymerního tělesa a následnému ataku chemické vazby v amorfní fázi polymeru. Dochází ke štěpení řetězců za snížení molární hmotnosti. U vysokomolárních polyesterů zatím bez úbytku hmotnosti polymerního tělesa. Následuje další fáze, nazývaná eroze, ve které dochází ke snížení molární hmotnosti a zároveň i snížení hmotnosti tělesa, tvoří se ve vodě rozpustné oligomery a polymery, které difundují k povrchu tělesa. Polymerní nosiče léčiv na bázi homopolymerů a kopolymerů kyseliny mléčné a glykolové jsou rozkládány mechanismem homogenní degradace,

tj. degradace probíhající v celém objemu polymerního tělesa. Rychlost penetrace vody do polymerního tělesa je tedy stejná nebo vyšší než rychlost difúze rozpustných degradačních produktů z polymerního tělesa. (22)

#### **4.4.3 Využití**

Tyto biodegradabilní polymerní systémy jsou využívány hlavně k parenterální aplikaci léčiv ve formě tuhých implantátů, částicových systémů a implantátů in situ. Jako nosiče léčiv se v těchto systémech nejvíce využívají kopolymery a homopolymery kyseliny mléčné a glykolové, do nichž se inkorporují léčiva používaná při léčbě chronických chorob, např. nádorových onemocnění, drogové závislosti, infekcí. Dále se využívají v antikoncepčních přípravcích, vakcínách a pro řízené uvolňování růstových hormonů v tkáňovém inženýrství. (2; 23)

## 5. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

### 5.1 Použité chemikálie

Methanol for gradient elution (Sigma Aldrich – Španělsko)

Purifikovaná voda (Milli Q – Millipore – Německo)

Octan sodný (Sigma Aldrich – Japonsko)

Kyselina octová (Lach-Ner, s.r.o. – ČR)

Flukonazol (Zentiva Group, a.s. – ČR)

### 5.2 Přístrojové vybavení

Termostat: Shimadzu CTO-10ACVP

UV/VIS detektor: Shimadzu SPD-20A

Pumpa: Shimadzu LC-10AD VP

Degazér: Shimadzu GT-154

Směšovací jednotka: Shimadzu FCV-10AL VP

Kolona: Ascentis Express RP-Amide; 10 cm x 3,0 mm; 2,7 µm

Software: Clarity Lite version 3.0.5.505

pH konduktometr: InoLab pH / Cond 720 (Německo)

Magnetická míchačka: MrHei-Mix S (Německo)

Vakuové čerpadlo: Vace-space 20 (Slovensko)

Odstředivka: Hettich Zentrifugen D-78532 (Německo)

Laboratorní váhy: Sartorius GMBH – typ: A200S (Německo)

## **5.3 Příprava roztoků**

### **5.3.1 Příprava acetátového pufru o pH 5,0**

K přípravě pufru byl použit roztok 0,01 M kyseliny octové a 0,01 M octanu sodného v poměru 5:9 (v/v). Zásobní roztok byl připraven z koncentrované kyselina octové ( $M_m$  60,05 g/mol, hustota 1,055 g/cm<sup>3</sup>). 2,8 ml koncentrované kyseliny octové bylo převedeno do 500 ml odměrné baňky a doplněno po rysku vodou. Navážka 0,82 g octanu sodného byla převedena do odměrné baňky o objemu 1000 ml a doplněna vodou po rysku. Příslušné roztoky byly smíchány v poměru 5:9 (v/v) a převedeny do kádinky. U výsledného roztoku bylo stanoveno pH, případné odchylky od požadovaného pH 5,0 byly upraveny přidáním roztoku kyseliny či soli. Bylo-li pH roztoku nejméně hodinu konstantní, roztok byl přefiltrován za sníženého tlaku přes filtr o velikosti pórů 0,45  $\mu$ m.

### **5.3.2 Příprava roztoku standardu flukonazolu**

Pro přípravu roztoku flukonazolu o koncentraci 5 g/l byla použita navážka flukonazolu o hmotnosti 0,0510 g, která byla převedena do 10 ml odměrné baňky a doplněna roztokem voda:methanol (65:35) po rysku. Takto připravený roztok byl následně použit jako standard flukonazolu a vycházelo se z něj při ředění kalibračních roztoků s nižší koncentrací flukonazolu.

### **5.3.3 Příprava kalibračních roztoků flukonazolu**

K přípravě kalibračních roztoků byl použit zásobní roztok flukonazolu o koncentraci 5,1 g/l. Kalibrační roztoky v koncentracích 0,3 g/l, 0,2 g/l, 0,15 g/l, 0,1 g/l, 0,075 g/l, 0,05 g/l, 0,02 g/l a 0,004 g/l byly ředěny roztokem voda:methanol (80:20).

## 5.4 Příprava vzorků

Vzorky byly získány z Katedry farmaceutické technologie jako součást disolučního testu větveného PLGA obsahujícího známé množství inkorporovaného flukonazolu. Navážky, které tvořila matrice a flukonazol, obsahovaly 5 % této účinné látky. Zkoumané oligoestery se pak lišily v množství a druhu použitého větvicího činidla.

Kód matrice	Navážka (mg)	Obsah flukonazolu (mg)
1P	206,70	10,34
3P	203,60	10,18
5P	206,60	10,33
1T	206,40	10,32
3T	208,40	10,42
5T	208,20	10,41

**Tabulka 1 Navážky vzorků a množství flukonazolu v nich**

Navážka vzorku terpolymeru byla umístěna na dno scintilační lahvičky a nahřátím natavena tak, že se rovnoměrně rozprostřela po celém dně. Poté se nechala zchladnout na laboratorní teplotu. Vzorek byl zalit 15 ml disolučního média, kterým byl citrát-fosfátový pufr o pH 7,4, a umístěn na třepačku do vodní lázně o teplotě 37 °C. V pravidelných časových intervalech bylo disoluční médium slito a nahrazeno čerstvým. Tyto intervaly byly 5 hodin, 22 hodin, 48 hodin, 4 dny, 6 dní a 11 dní. Následně byly takto získané vzorky analyzovány již vyvinutou HPLC metodou. Před měřením byly vzorky uchovávány v lednici při teplotě 5 °C.

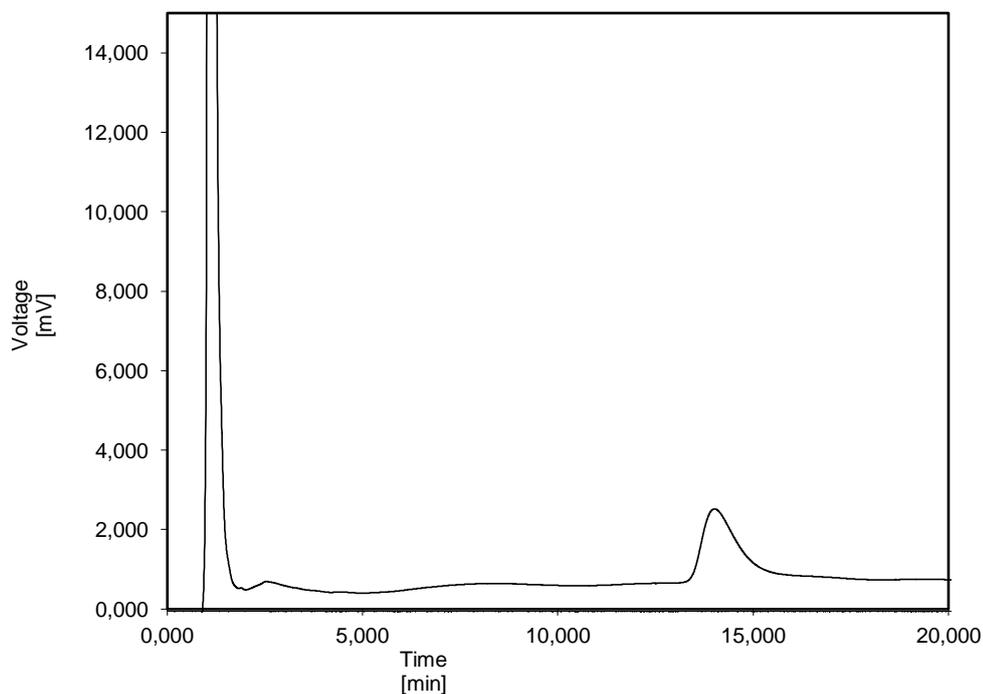
Před nástřikem na kolonu byla provedena centrifugace roztoku vzorku při 2 000 otáčkách/min po dobu 1 min. Tento krok byl zařazen proto, aby byly odstraněny případné zbytky uvolněné matrice, které se u některých vzorků vyskytovaly z důvodu nedokonalého odebrání disolučního média. Nedegradované zbytky matrice by totiž mohly způsobit ucpání kolony, pokud by byly nastříknuty.

## 6. VÝSLEDKY A DISKUSE

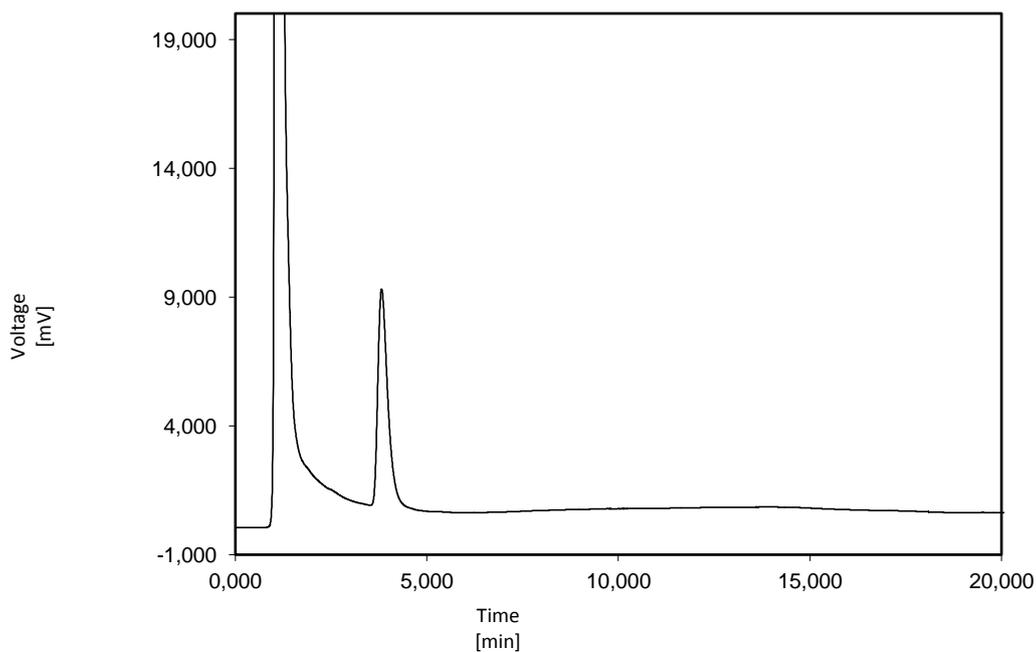
### 6.1 Vývoj chromatografické metody

#### 6.1.1 Optimalizace složení mobilní fáze

Jako výchozí mobilní fáze byla zvolena voda:methanol v různých poměrech mezi 85:15 až 70:30. Při použití této mobilní fáze nebylo dosaženo optimálního oddělení píku nebo analýza trvala příliš dlouho.

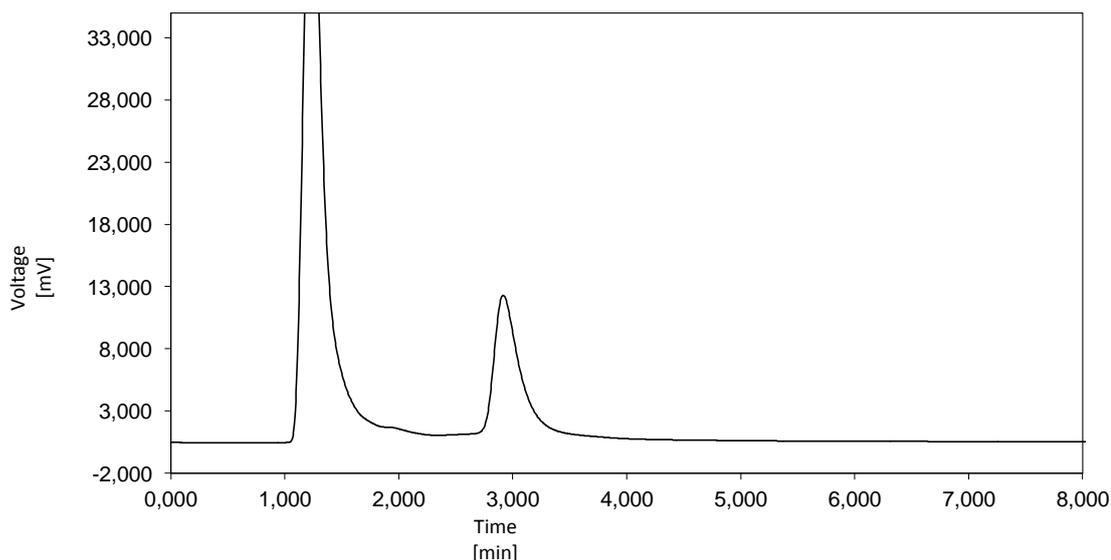


**Obrázek 11** Chromatogram roztoku vzorku flukonazolu, mobilní fáze voda:methanol (85:15), průtok 0,45 ml/min, teplota 35 °C, vlnová délka 260 nm

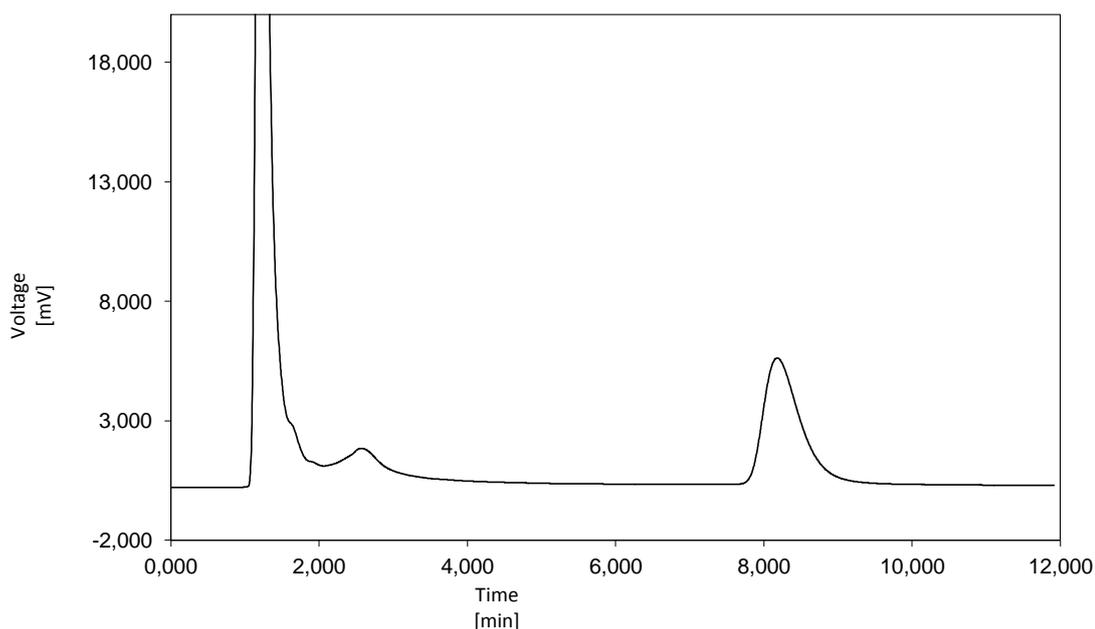


**Obrázek 12 Chromatogram roztoku vzorku flukonazolu, mobilní fáze voda:methanol (70:30), průtok 0,45 ml/min, teplota 35 °C, vlnová délka 260 nm**

Jako další uvažovaná mobilní fáze byl zvolen acetátový pufr o pH 5,0:methanol. Základní poměr byl 65:35. Při tomto poměru však nebylo dosaženo oddělení píku flukonazolu a stanovení jeho obsahu. Poměry složek mobilní fáze byly následně měněny vždy o 5 dílů, tedy v rozsahu od 65:35 až do 80:20. V jednotlivých vzorcích byly přítomny různé degradační produkty s různým retenčním časem, ale za použití mobilní fáze pufr:MeOH 80:20 vždy bezpečně docházelo k separaci degradačních produktů matrice a analytu. Proto byl tento poměr zvolen jako optimální (Obrázek 14).



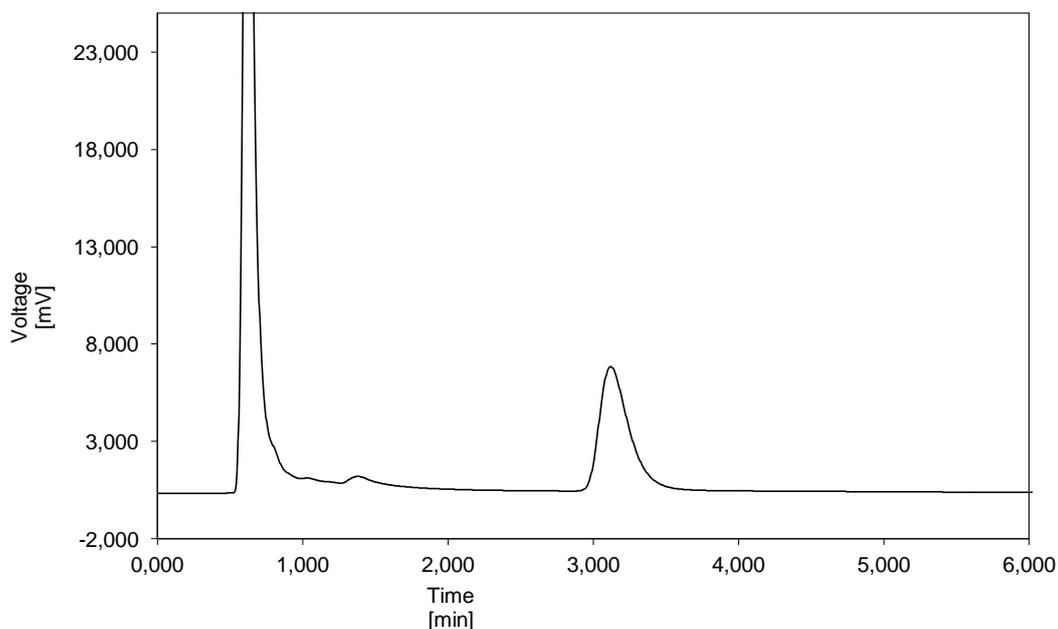
**Obrázek 13 Chromatogram roztoku vzorku flukonazolu, mobilní fáze acetátový pufr o pH 5,0:methanol (65:35), průtok 0,40 ml/min, teplota 35 °C, vlnová délka 260 nm**



**Obrázek 14 Chromatogram roztoku vzorku flukonazolu, mobilní fáze acetátový pufr pH 5,0:methanol (80:20), průtok 0,40 ml/min, teplota 35 °C, vlnová délka 260 nm**

Pro urychlení analýzy byl zvyšován průtok mobilní fáze. Aby se zabránilo nežádoucímu zvýšení zpětného tlaku, byla zároveň zvyšována i teplota. K původní teplotě 35 °C se postupně přidávalo vždy po 5 °C a prováděla se průběžná měření až do teploty 50 °C. Průtok byl volen tak, aby tlak v systému nepřekračoval 20 MPa a optimálně se

pohyboval kolem 15 MPa. Z počáteční hodnoty 0,40 ml/min bylo postupným navyšováním dosaženo průtoku mobilní fáze 0,80 ml/min (Obrázek 15).



**Obrázek 15 Chromatogram roztoku vzorku flukonazolu, mobilní fáze acetátový pufr o pH 5,0:methanol (80:20), průtok 0,80 ml/min, teplota 50 °C, vlnová délka 260 nm**

### 6.1.2 Optimální podmínky

Všechny vzorky byly následně měřeny za těchto podmínek:

*Kolona:* Ascentis Express RP-Amide; 10 cm x 3,0 mm; 2,7  $\mu$ m

*Mobilní fáze:* Acetátový pufr o pH 5,0:methanol (80:20)

*Průtok:* 0,70 ml/min

*Teplota:* 50 °C

*Vlnová délka:* 260 nm

*Tlak:* 16,7 MPa

*Dávkování:* 5  $\mu$ l

*Retenční čas:* 3,3 min.

*Celkový čas analýzy:* 4 min.

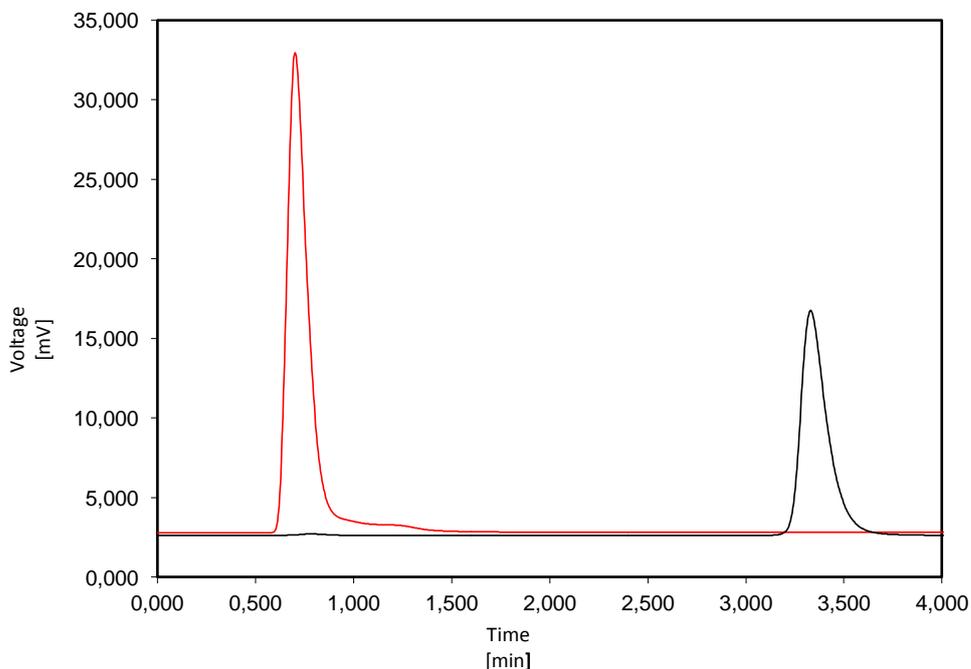
## 6.2 Validace

Hodnoty, pro ověření vhodnosti chromatografického systému (opakovatelnost, faktor symetrie, počet teoretických pater), byly získány při měření roztoku standardu flukonazolu o koncentraci 0,05 g/l. Bylo provedeno šest měření.

### 6.2.1 Selektivita

Pro ověření selektivity metody byl použit vzorek označen jako placebo, což bylo disoluční médium získané po disolučním testu matrice neobsahující žádný flukonazol.

Smyslem této zkoušky bylo ověřit, zda se v daném retenčním čase vyskytuje ještě nějaká jiná látka, která by mohla ovlivnit měření obsahu flukonazolu ve vzorcích. Po nástřiku placebo bylo na chromatogramu jasně vidět, že se v daném retenčním čase nevyskytují žádné další látky, které by mohly výsledky analýzy zkreslit (Obrázek 16).



**Obrázek 16 Chromatogram placebo (červeně) a roztoku standardu flukonazolu 0,15 g/l (černě), mobilní fáze acetátový pufr o pH 5,0:methanol (80:20), průtok 0,7 ml/min, teplota 50 °C, vlnová délka 260 nm**

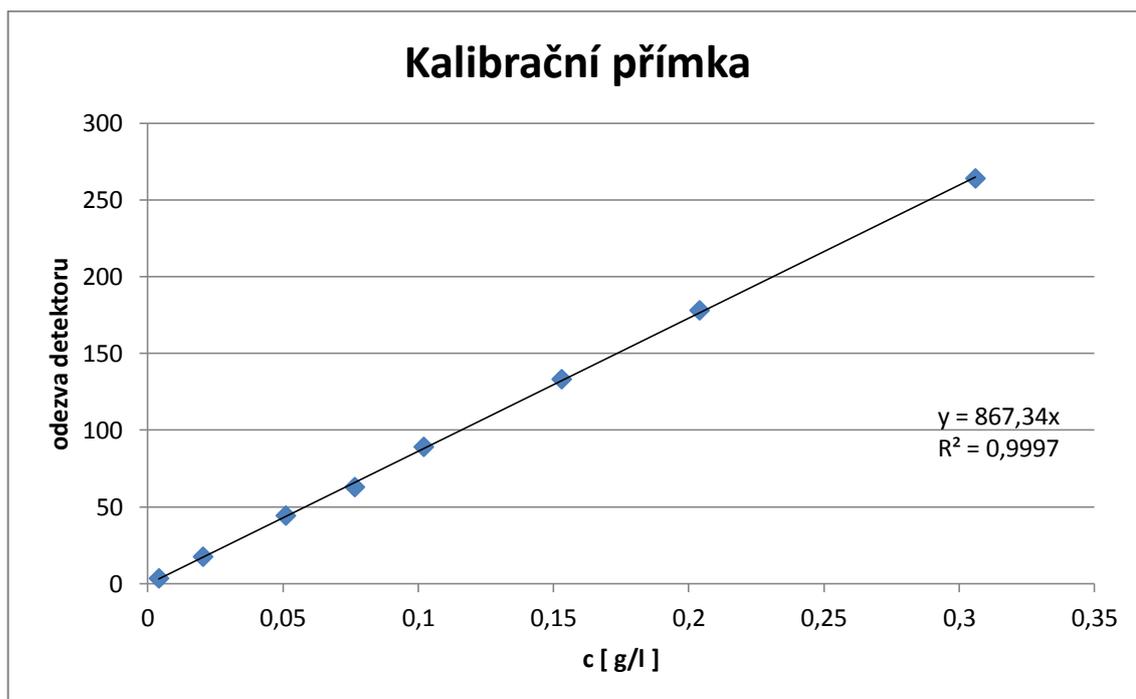
## 6.2.2 Linearita

Pro určení obsahu flukonazolu v neznámých vzorcích bylo potřeba zjistit odezvu detektoru u naředěných standardů flukonazolu a následně z nich sestavit kalibrační přímku.

Pro sestavení kalibrační přímky byly zvoleny tyto koncentrace: 0,3 g/l, 0,2 g/l, 0,15 g/l, 0,1 g/l, 0,075 g/l, 0,05 g/l, 0,02 g/l a 0,004 g/l. Každá koncentrace byla měřena 3krát; v Tabulce 2 jsou uvedeny průměry:

c (g/l)	odezva
0,306	264,00
0,204	178,00
0,153	133,10
0,102	89,00
0,077	62,80
0,051	44,20
0,020	17,40
0,004	3,30

**Tabulka 2** Odezva detektoru v závislosti na koncentraci



**Graf 1** Odezva detektoru v závislosti na koncentraci

Směrnice:  $867,3 \pm 6,4$

### 6.2.3 Opakovatelnost

Opakovatelnost odezvy se vyjadřuje jako odhad relativní směrodatné odchylky (RSD%) v procentech pro řadu následných měření porovnávacího roztoku. Vypočítá se dle vzorce: (16)

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

$y_i$  jednotlivé hodnoty vyjádřené jako plocha píku, výška píku nebo poměr ploch u metody vnitřního standardu

$\bar{y}$  průměr jednotlivých hodnot

$n$  počet jednotlivých hodnot

číslo měření	plocha píku
1	43,8
2	42,4
3	42,0
4	42,5
5	42,6
6	42,6

**Tabulka 3 Opakovatelnost analýzy**

$n$	6
$\bar{y}$	42,65
SD	0,606
<b>RSD [%]</b>	<b>1,42</b>

Požadavek Českého lékopisu vypočtený dle vzorce: (16)

$$RSD_{\max} = \frac{KB\sqrt{n}}{t_{90\%,n-1}}, \text{ v něm značí:}$$

$K$  konstanta (0,349) získaná ze vztahu  $K = \frac{0,6}{\sqrt{2}} \cdot \frac{t_{90\%,5}}{\sqrt{6}}$ , v něm  $\frac{0,6}{\sqrt{2}}$  představuje požadovanou RSD pro 6 nástřiků a pro  $B = 1,0$

$B$  horní limit obsahu uvedený v jednotlivých lékopisných člancích mínus 100 %

$n$  počet opakovaných nástřiků porovnávacího roztoku ( $3 \leq n \leq 6$ )

$t_{90\%,n-1}$  Studentův parametr  $t$  při 90 % pravděpodobnosti (oboustranný) pro  $n-1$  stupňů volnosti

je **RSD<sub>[%]</sub>=0,42**

Hodnota 1,42 % neodpovídá lékopisnému požadavku.

Požadavky na vývoj metody vycházely z potřeb Katedry farmaceutické technologie. Technologická příprava vzorků, ve kterých byl chromatografickou metodou stanovován flukonazol, zahrnovala několik nepřesných kroků, které ovlivňují měřené koncentrace analytu. Množství flukonazolu přidané k testovanému polymeru bylo definováno jako 5 % z celkové hmotnosti vzorku, nebyla tedy známá jeho přesná navážka. Pro výpočet množství flukonazolu přidaného k testovanému polymeru byla použita celková hmotnost polymeru s flukonazolem, resp. 5 % z ní. Objem citrátového pufru, ve kterém postupně docházelo k degradaci testovaného polymeru s inkorporovaným flukonazolem, byl 15 ml. V určených časových odstupech byl pufr odebrán a v tomto vzorku stanoven flukonazol. Objem stanovovaného vzorku byl bez ohledu na případné změny objemu vlivem rozpouštějícího se polymeru a ztráty při dekantaci určen jako 15 ml.

Vzhledem k nepřesnostem v přípravě technologického vzorku, byla opakovatelnost nástřiku 1,42 % vyhodnocena jako dostačující, přestože nesplňuje požadavky lékopisu.

## 6.2.4 Faktor symetrie $A_s$

Faktor symetrie píku ( $A_s$ ) se vypočítá podle vzorce: (16)

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

v něm značí:

$w_{0,05}$  šířku píku v jedné dvacetině jeho výšky

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

Hodnota faktoru symetrie 1,0 značí úplnou (ideální) symetrii píku. Český lékopis požaduje faktor symetrie v rozmezí 0,8 -1,5. (16)

n	$A_s$
1	1,407
2	1,389
3	1,357
4	1,407
5	1,389
6	1,389

**Tabulka 4 Faktor symetrie píku**

Ø  $A_s = 1,389$

Hodnota 1,389 odpovídá požadavkům Českého lékopisu.

## 6.2.5 Zdánlivý počet teoretických pater $N$

Účinnost kolony se může vypočítat jako zdánlivý počet teoretických pater ( $N$ ), dle následujícího vzorce: (16)

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

kde:

$t_R$  retenční čas (nebo objem) nebo vzdálenost podél základní linie od bodu nástříku ke kolmici spuštěné z vrcholu píku v polovině jeho výšky

$w_h$  šířka píku v polovině jeho výšky

Zdánlivý počet teoretických pater se mění se stanovovanou složkou, kolonou a retenčním časem. Účinnost kolony roste s počtem teoretických pater. (16)

číslo měření	počet pater N
1	3564
2	3564
3	3790
4	3555
5	3790
6	3790

**Tabulka 5 Zdánlivý počet teoretických pater**

Ø N = 3676

Naměřená hodnota odpovídá požadavku N > 1500.

### 6.2.6 LOD/LOQ

Limit detekce se vypočítá dle vzorce:  $LOD = 3 * \sum / b_1$

Limit kvantifikace se vypočte dle vzorce:  $LOQ = 10 * \sum / b_1$

LOD = 0,11 mg/L

LOQ = 0,38 mg/L

### 6.3 Měření vzorků

Vzorky skladované v chladu se nechaly vytemperovat na laboratorní teplotu. Do mikrozkušavky byly odebrány 2 ml vzorku a zkumavka byla vložena do centrifugy z důvodu oddělení kusů uvolněné matrice. Následoval nástřik vzorků na kolonu v objemu 5 µl. Vzorky byly měřeny třikrát. Naměřené hodnoty ploch (Tabulka 6) byly pomocí rovnice kalibrační přímky přepočítány na koncentraci a následně byla ze znalosti odebíraného objemu stanovena hmotnost flukonazolu v jednotlivých vzorcích (Tabulka 7).

$$y = 867,34x$$

$$R^2 = 0,9997$$

Kód matrice	Odezva detektoru						
	5 hodin	22 hodin	48 hodin	4 dny	6 dní	11 dní	Součet
<b>1P</b>	262,00	55,60	114,00	96,00	18,53	17,90	564,03
<b>3P</b>	67,30	81,10	200,00	137,70	59,60	50,80	596,50
<b>5P</b>	80,40	57,00	264,00	138,70	57,80	43,70	641,60
<b>1T</b>	471,00	92,90	16,26	102,00	28,83	25,20	736,19
<b>3T</b>	207,00	0,00	68,10	41,30	85,10	116,00	517,50
<b>5T</b>	71,80	0,00	78,20	159,00	90,20	114,00	513,20

**Tabulka 6 Odezva detektoru měřených vzorků**

Kód matrice	Množství flukonazolu ve vzorcích (mg)						
	5 hod	22 hod	48 hod	4 dny	6 dní	11 dní	Součet
<b>1P</b>	4,53	0,96	1,97	1,66	0,33	0,32	<b>9,77</b>
<b>3P</b>	1,16	1,40	3,45	2,38	1,03	0,88	<b>10,30</b>
<b>5P</b>	1,39	0,99	4,57	2,39	1,00	0,76	<b>11,10</b>
<b>1T</b>	8,15	1,61	0,28	1,76	0,50	0,44	<b>12,74</b>
<b>3T</b>	3,58	0,00	1,18	0,71	1,47	2,00	<b>8,94</b>
<b>5T</b>	1,24	0,00	1,35	2,75	1,56	1,97	<b>8,87</b>

**Tabulka 7 Obsah flukonazolu ve vzorcích**

Následně byl porovnán obsah flukonazolu stanovený pomocí vyvinuté HPLC metody se skutečnou navázkou.

Kód matrice	Navážka flukonazolu (mg)	Naměřené množství flukonazolu (mg)	Výtěžek (%)
<b>1P</b>	10,34	9,77	<b>94</b>
<b>3P</b>	10,18	10,30	<b>101</b>
<b>5P</b>	10,33	11,10	<b>107</b>
<b>1T</b>	10,32	12,74	<b>123</b>
<b>3T</b>	10,42	8,94	<b>86</b>
<b>5T</b>	10,41	8,87	<b>85</b>

**Tabulka 8 Porovnání navážky a naměřeného množství flukonazolu**

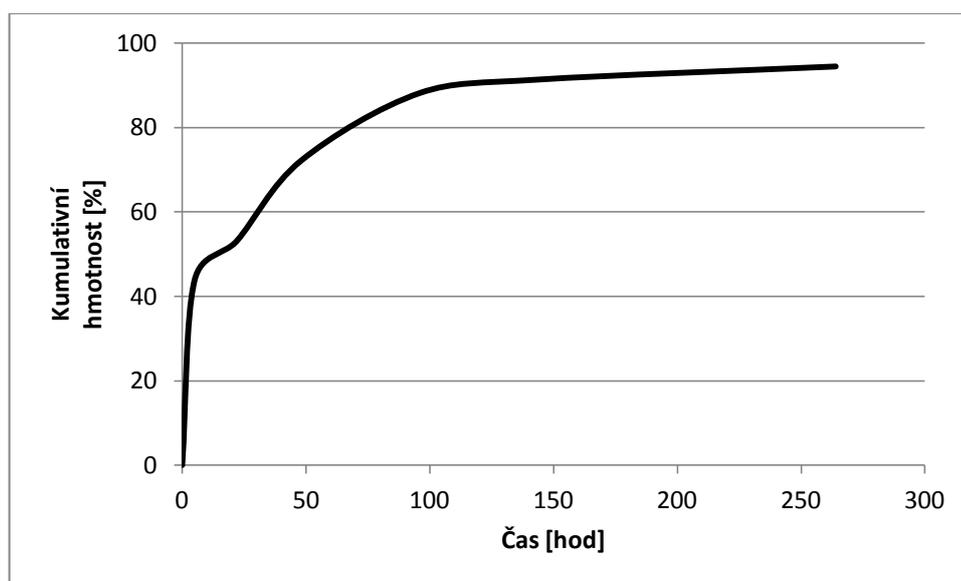
Naměřené hodnoty se liší od skutečné navážky flukonazolu (Tabulka 8). Důvodem může být celá řada faktorů, např. chyba v navážce flukonazolu, v odběru vzorků při disoluci, nástřiku vzorků na kolonu nebo odtržení části matrice s inkorporovaným

flukonazolem, který se pak následně nemohl uvolnit v další fázi disolučního testu. Chyba v odběru vzorků nebo záměna s placebem během měření pravděpodobně byla důvodem nulové koncentrace flukonazolu ve vzorku 3T – 22 hod a 5T – 22hod (Tabulka 7).

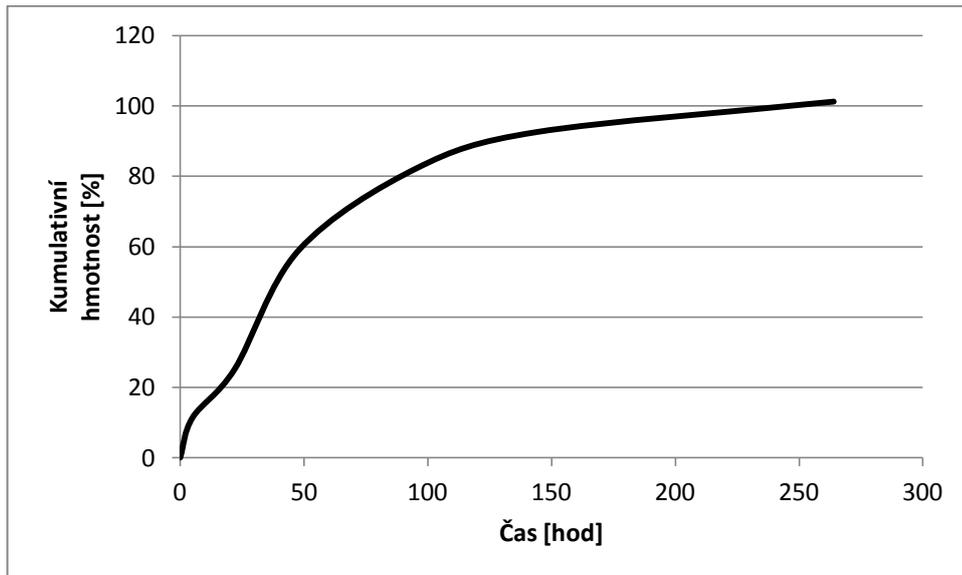
Kinetiky uvolňované látky inkorporované do matric, které se od sebe navzájem liší, jsou znázorněny v Grafech 2-7.

Kód matrice	Kumulativní hmotnost uvolněné látky [%]					
	5 hod	22 hod	48hod	4 dny	6 dní	11 dní
1P	43,81	53,09	72,15	88,2	91,39	94,49
3P	11,39	25,15	59,04	82,42	92,53	101,18
5P	13,46	23,04	67,28	90,42	100,1	107,45
1T	78,97	94,57	97,29	114,34	119,19	123,45
3T	34,36	34,36	45,68	52,5	66,6	85,8
5T	11,91	11,91	24,88	51,3	66,28	85,21

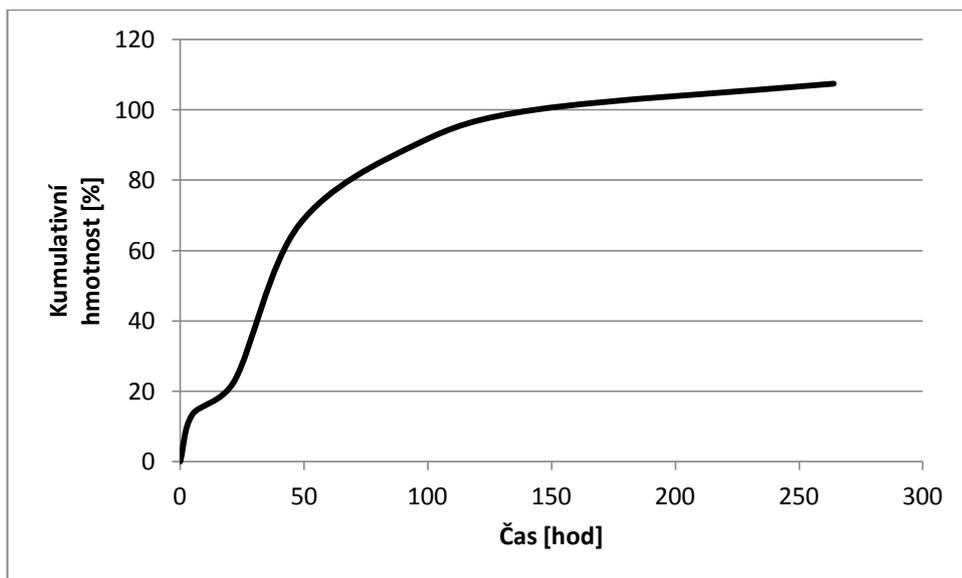
**Tabulka 9 Kumulativní hmotnosti uvolněného léčiva**



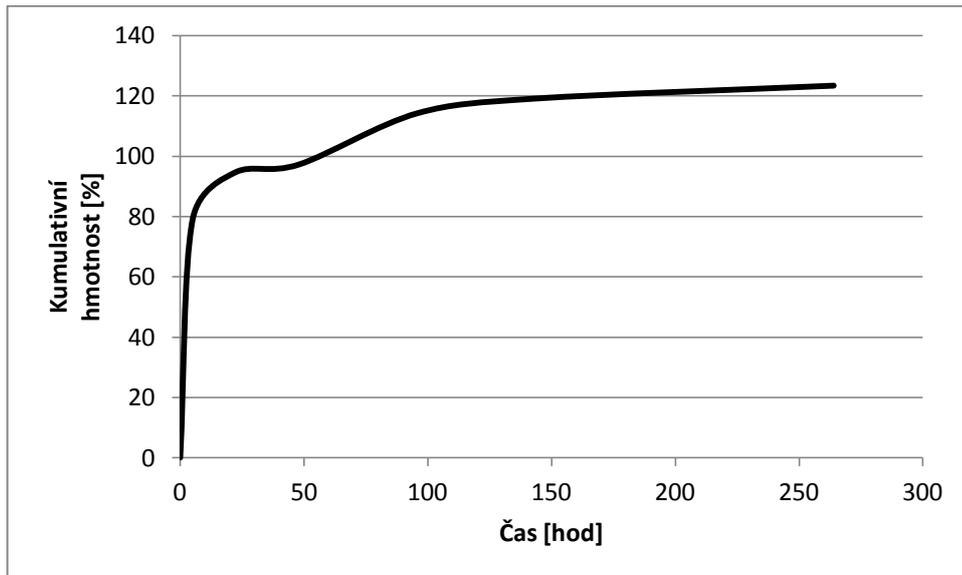
**Graf 2 Uvolňování inkorporovaného léčiva – matrice 1P**



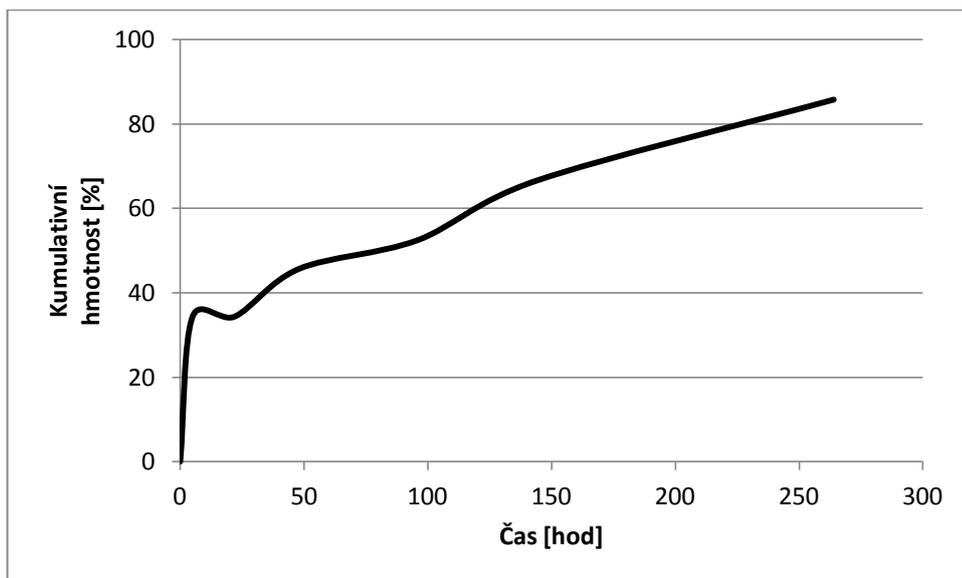
**Graf 3 Uvolňování inkorporovaného léčiva – matrice 3P**



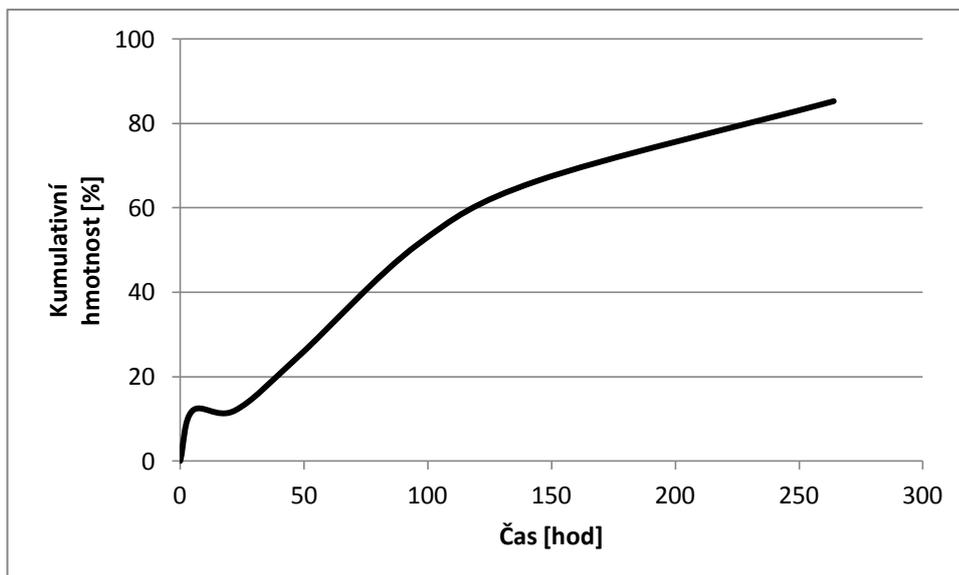
**Graf 4 Uvolňování inkorporovaného léčiva – matrice 5P**



**Graf 5 Uvolňování inkorporovaného léčiva – matrice 1T**

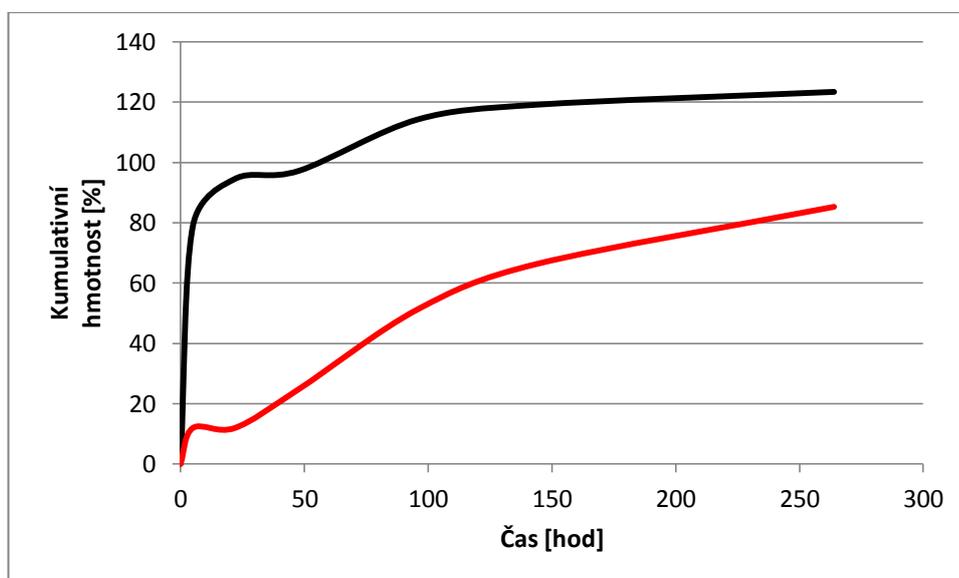


**Graf 6 Uvolňování inkorporovaného léčiva – matrice 3T**



**Graf 7 Uvolňování inkorporovaného léčiva – matrice 5T**

Z předchozích grafů je vidět rozdílné uvolňování inkorporovaného léčiva. To je způsobeno rozdílností ve větvení jednotlivých kopolymerů. Je vidět, že záleží jak na množství použitého větvicího činidla, tak i na jeho druhu. Této vlastnosti se dá využít v systémech s řízeným uvolňováním léčiva. Na Grafu 5 je znázorněn případ, kdy chceme dosáhnout co nejdříve vysoké koncentrace uvolněného léčiva v těle (burst effect). Opačný případ je v Grafu 7, kde dochází k postupnému uvolňování léčiva téměř konstantní rychlostí.



**Graf 8 Porovnání uvolňování inkorporovaných léčiv (matrice 1T – černě, matrice 5T - červeně)**

## 7. ZÁVĚR

Byla optimalizována a částečně zvalidována HPLC metoda pro stanovení flukonazolu uvolněného při disoluci matric tvořených větvenými kopolymerů kyseliny mléčné a glykolové. Vyvinutá HPLC metoda probíhala za těchto chromatografických podmínek:

*Kolona:* Ascentis Express RP-Amide, 10 cm x 3,0 mm; 2,7 μm

*Mobilní fáze:* Acetátový pufr o pH 5,0:methanol (80:20)

*Průtok:* 0,70 ml/min

*Teplota:* 50 °C

*Vlnová délka:* 260 nm

*Tlak:* 16,7 MPa

*Dávkování:* 5 μl

*Retenční čas flukonazolu:* 3,3 min.

*Celkový čas analýzy:* 4 min.

Byly splněny některé podmínky vhodnosti chromatografického systému. Faktor symetrie píku flukonazolu odpovídal rozmezí, které požaduje Český lékopis ( $A_s$  flukonazolu je 1,389). Účinnost kolony vyjádřená jako zdánlivý počet teoretických pater také splňuje předepsané požadavky (naměřená hodnota je 3676). Relativní směrodatná odchylka pro vyjádření opakovatelnosti odezvy je 1,42 %, což neodpovídá lékopisnému požadavku, ale vzhledem k nepřesnostem vyskytujícím se při přípravě vzorků, byla dosažená opakovatelnost vyhodnocena jako dostatečná. Z výsledků analýzy je patrné, že uvolňování léčiva z matrice je závislé na množství a druhu přidaného větvicího činidla. Nosiče léčiv obsahující málo větvené polymery (1 % větvicí látky) uvolňují léčivo v řádu hodin. Naproti tomu matrice složené z více větveného polymeru (3 – 5 % větvicí látky) uvolňují inkorporované léčivo po dobu několika dnů. Této vlastnosti lze využít v systémech s řízeným uvolňováním léčiva.

## 8. ABSTRAKT

Univerzita Karlova v Praze

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra biofyziky a fyzikální chemie

Kandidát: Kateřina Brokešová

Vedoucí práce: Ing. Martin Drastík, Ph.D.

Název diplomové práce: Využití core-shell kolon pro stanovení flukonazolu

Byla vyvinuta HPLC metoda pro stanovení obsahu flukonazolu uvolněného při disoluci matric tvořených polymery kyseliny mléčné a glykolové, kde docházelo k postupnému uvolňování inkorporovaného flukonazolu v závislosti na složení použitých kopolymerů. Metoda využívá kolonu Ascentis Express RP-Amide, 10 cm x 3,0 mm; 2,7  $\mu$ m a UV detekce při 260 nm. Byla použita mobilní fáze složená z acetátového pufru o pH 5,0:methanol (80:20), průtoková rychlost byla 0,70 ml/min. Optimální teplota analýzy byla 50 °C. Retenční čas flukonazolu byl 3,3 min a celkový čas analýzy pak 4 min.

*Klíčová slova:* flukonazol, core-shell kolona, HPLC, PLGA

## 9. ABSTRACT

Charles University in Prague

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Biophysics and Physical Chemistry

Candidate: Kateřina Brokešová

Supervisor: Ing. Martin Drastík, Ph. D.

Thesis title: The use of core-shell columns for fluconazole determination

A novel HPLC method for determination of fluconazole in dissolution test samples was developed and partly validated. A matrix formed by lactic and glycolic acid copolymer branched by different compounds was used as a drug carrier. Fluconazol was incorporated as the model drug. The concentration profile of fluconazole was studied by developed HPLC method during the dissolution test. A modern core-shell column Ascentis Express RP-Amide, 10 cm × 3.0 mm; 2.7 μm was employed. A mixture of acetate buffer pH 5.0:methanol (80:20) served as the mobile phase. The flow rate was 0.70 ml/min and the detection wavelength was 260 nm. The temperature of analysis was 50 °C. The retention time of fluconazole was 3.3 min and the whole analysis took just 4 min.

Keywords: fluconazole, core-shell column, HPLC, PLGA

## 10. POUŽITÉ ZKRATKY

<b>AIDS</b>	syndrom získaného selhání imunity
<b>-CN skupina</b>	nitrilová skupina
<b>Č</b>	čerpadlo
<b>D</b>	detektor
<b>DZ</b>	dávkovací zařízení
<b>HPLC</b>	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
<b>K</b>	kolona
<b>-NH<sub>2</sub> skupina</b>	amidová skupina
<b>-OH skupina</b>	hydroxylová skupina
<b>PC</b>	počítač
<b>PG</b>	programovací jednotka
<b>PLGA</b>	poly(laktidy-co-glykolidy)
<b>RP</b>	reverzní fáze
<b>UV/VIS</b>	ultrafialová/viditelná oblast světla
<b>Z<sub>1,2,3</sub></b>	zásobníky mobilní fáze

## 11. SEZNAM TABULEK

Tabulka 1 Navážky vzorků a množství flukonazolu v nich .....	24
Tabulka 2 Odezva detektoru v závislosti na koncentraci .....	30
Tabulka 3 Opakovatelnost analýzy .....	31
Tabulka 4 Faktor symetrie píku .....	33
Tabulka 5 Zdánlivý počet teoretických pater .....	34
Tabulka 6 Odezva detektoru měřených vzorků .....	35
Tabulka 7 Obsah flukonazolu ve vzorcích .....	35
Tabulka 8 Porovnání navážky a naměřeného množství flukonazolu .....	35
Tabulka 9 Kumulativní hmotnosti uvolněného léčiva .....	36

## 12. SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1 Kapalinový chromatograf (4).....	8
Obrázek 2 Porovnání struktury plně porézní (vpravo) a core-shell částice (vlevo) (7) .....	11
Obrázek 3 Porovnávání rychlostí separace (7) .....	12
Obrázek 4 Porovnání ostrosti píků (7) .....	13
Obrázek 5 Porovnání rozlišovací schopnosti (7) .....	13
Obrázek 6 Porovnání citlivosti chromatogramů (7).....	14
Obrázek 7 Rozdílná selektivita kolon (7) .....	15
Obrázek 8 Vzorec flukonazolu (8).....	16
Obrázek 9 Mechanismus účinku antimykotik (12) .....	17
Obrázek 10 Kys. glykolová a kys. mléčná reagující na poly(laktid-co-glykolid) .....	20
Obrázek 11 Chromatogram roztoku vzorku flukonazolu, mobilní fáze voda:methanol (85:15), průtok 0,45 ml/min, teplota 35 °C, vlnová délka 260 nm.....	25
Obrázek 12 Chromatogram roztoku vzorku flukonazolu, mobilní fáze voda:methanol (70:30), průtok 0,45 ml/min, teplota 35 °C, vlnová délka 260 nm.....	26
Obrázek 13 Chromatogram roztoku vzorku flukonazolu, mobilní fáze acetátový pufr o pH 5,0:methanol (65:35), průtok 0,40 ml/min, teplota 35 °C, vlnová délka 260 nm.....	27
Obrázek 14 Chromatogram roztoku vzorku flukonazolu, mobilní fáze acetátový pufr pH 5,0:methanol (80:20), průtok 0,40 ml/min, teplota 35 °C, vlnová délka 260 nm.....	27
Obrázek 15 Chromatogram roztoku vzorku flukonazolu, mobilní fáze acetátový pufr o pH 5,0:methanol (80:20), průtok 0,80 ml/min, teplota 50 °C, vlnová délka 260 nm .....	28
Obrázek 16 Chromatogram placebo (červeně) a roztoku standardu flukonazolu 0,15 g/l (černě), mobilní fáze acetátový pufr o pH 5,0:methanol (80:20), průtok 0,7 ml/min, teplota 50 °C, vlnová délka 260 nm .....	29

## **13. SEZNAM GRAFŮ**

Graf 1 Odezva detektoru v závislosti na koncentraci .....	30
Graf 2 Uvolňování inkorporovaného léčiva – matrice 1P .....	36
Graf 3 Uvolňování inkorporovaného léčiva – matrice 3P .....	37
Graf 4 Uvolňování inkorporovaného léčiva – matrice 5P .....	37
Graf 5 Uvolňování inkorporovaného léčiva – matrice 1T .....	38
Graf 6 Uvolňování inkorporovaného léčiva – matrice 3T .....	38
Graf 7 Uvolňování inkorporovaného léčiva – matrice 5T .....	39
Graf 8 Porovnání uvolňování inkorporovaných léčiv (matrice 1T – černě, matrice 5T - červeně) .....	39

## 14. POUŽITÁ LITERATURA

1. **Lincová, Dagmar.** *Základní a aplikovaná farmakologie*: Galén, 2007. stránky 509-510. ISBN 9788072623730.
2. **Šnejdrová, Eva a Dittrich, Milan.** Poly( $\alpha$ -hydroxykyseliny) jako nosiče léčiv. *Chemické Listy*. 2011, 105, stránky 27-32.
3. **Middleton, J.C. a Tipton, A. J.** Synthetic biodegradable polymers as orthopedic devices. *Biomaterials*. 2000, stránky 2335-2346.
4. **Klimesh, Jiří a kolektiv.** *Kontrolně-analytické hodnocení léčiv lékopisnými metodami*. Hradec Králové : Nucleus HK, 2011. stránky 36-40. ISBN 978-8087009-29-1.
5. **Majer, Jaroslav.** *Analytická chemia: učebnica pre farmaceutické fakulty*. Martin : Osveta, 1989. stránky 247-252.
6. **Skoog, Douglas A.** *Fundamentals of Analytical Chemistry*. New York : Saunders College Publishing, 1996. ISBN 00-300-5938-0.
7. Sigma-Aldrich Co. . [Online] Sigma-Aldrich, 2008. [Citace: 25. duben 2013.] <http://www.sigmaaldrich.com/analytical-chromatography/hplc/columns/ascentis-express.html>.
8. commons.wikimedia. *commons.wikimedia*. [Online] Creative Commons, 15. srpen 2009. [Citace: 25. duben 2013.] [http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Fluconazole\\_structure.svg?uselang=cs](http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Fluconazole_structure.svg?uselang=cs).
9. **Neal, M.** *Medical pharmacology at a glance*. Chichester, West Sussex : Wiley-Blackwell, 2012. ISBN: 04-706-5789-8.
10. **Mirossay, Ladislav a Mojžíš, Ján.** *Základná farmakologia a farmakoterapia: Equilibria*, 2009. str. 301. ISBN 9788089284436.
11. **Weiss, Stephanie T.** *High-yield pharmacology*. Philadelphia : Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams, 2009. ISBN: 978-078-1792-738.
12. **Simmons, Mark A.** *Pharmacology-An Illustrated Review*: Thieme Publishing Group, 2011. str. 325. ISBN 1604062053.
13. **Bennett, P., Brown, M. a Sharma, P.** *Clinical pharmacology*. Edinburgh : Elsevier, 2012. stránky 225-226. ISBN: 80-726-2423-7.
14. **Edwards, Clive a Walker, Roger.** *Clinical pharmacy and therapeutics*. Edinburgh : Elsevier Science Ltd, 2003. stránky 634-635. ISBN 0443071373.
15. **Katzung, Bertram G.** *Základní a klinická farmakologie*. Praha : Nakladatelství a vydavatelství H and H, 1995. ISBN: 80-857-8735-0.
16. **Český lékopis 2009**. Praha : Grada Publishing, 2009. ISBN 978-802-4729-947.

17. **Wattananat, Triporn a Akarawut, Wiyada.** Validated HPLC method for the determination of fluconazole in human plasma. *Biomedical Chromatography*. 2006, 1, stránky 1-3. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/bmc.538>.
18. **Santos, Silvia Regina Cavani Jorge, a další.** Fluconazole plasma concentration measurement by liquid chromatography for drug monitoring of burn patients. *Clinics*. 2010, 2, stránky 237-243. Dostupné z: [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext).
19. **Zhang, Shimin, a další.** Development and validation of a high-performance liquid chromatographic assay for the determination of fluconazole in human whole blood using solid phase extraction. *Therapeutic Drug Monitoring*. 2008, 3, stránky 314-319. Dostupné z: <http://content.wkhealth.com/linkback/openurl?sid=WKPTLP:landingpage>.
20. **Gupta A. P., Kumar V.** New emerging trends in synthetic biodegradable polymers – Polylactide: A critique. *European Polymer Journal*. 43, 2007, stránky 4035-4074.
21. **Žabka, Marián, Muller, Rainer H. a Hildebrand, Gesine E.** *Moderní lékové formy ve farmaceutické technologii: učebnice pro studijící farmacii, odborná příručka pro farmaceuty v lékárnách, nemocnicích a ve výzkumu*. Bratislava : SAP, 2001. stránky 265-266. ISBN: 80-889-0884-1.
22. **Grizzi, I., a další.** Hydrolytic degradation of devices based on poly(DL-lactic acid) size-dependence. *Biomaterials*. 16, 1995, stránky 305-311.
23. **Rabišková, Miloslava a Komárek, Pavel.** *Technologie léků: galenika*. Praha : Galén, 2006. stránky 272-273. ISBN: 80-726-2423-7.