

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

Hodnocení biologicky aktivních látek pomocí HPLC V.

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: PharmDr. Pavla Pilařová, Ph.D.

Hradec Králové, 2016

Denisa Kokošková

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

V Hradci Králové, 8. května 2016

.....
Denisa Kokošková

Na tomto místě bych ráda poděkovala vedoucí mé diplomové práce PharmDr. Pavle Pilařové, Ph.D. za odborné vedení, věnovaný čas a za poskytnutí cenných rad při zpracování diplomové práce. Dále bych poděkovala PharmDr. Petru Kastrenovi, Ph.D., Doc. PharmDr. Radimu Kučerovi, Ph.D. a všem pracovníkům katedry farmaceutické chemie a kontroly léčiv za vstřícné jednání a pomoc.

Tato práce vznikla za podpory projektu SVV 260 291.

Obsah

1.Úvod.....	9
2.Cíl práce.....	11
3.Teoretická část.....	13
3.1.Kyselina salicylová a její vlastnosti.....	14
3.1.1.Vzorec a chemické vlastnosti.....	14
3.1.2. Výroba.....	15
3.1.3.Indikace.....	15
3.1.4. Farmakokinetické vlastnosti.....	16
3.1.5. Kontraindikace.....	16
3.1.6. Nežádoucí účinky.....	16
3.1.7. Interakce.....	16
3.1.8. Některé přípravky s obsahem kyseliny salicylové na trhu.....	17
3.2.Kyselina acetylsalicylová a její vlastnosti.....	18
3.2.1.Vzorec a chemické vlastnosti.....	18
3.2.2. Výroba.....	19
3.2.3.Indikace.....	20
3.2.4.Mechanismus účinku.....	20
3.2.5.Farmakokinetické vlastnosti.....	20
3.2.6.Kontraindikace.....	20
3.2.7. Nežádoucí účinky.....	21
3.2.8. Interakce.....	21
3.2.9. Některé přípravky s obsahem kyseliny acetylsalicylové na trhu.....	22
3.3. Vysokoučinná kapalinová chromatografie.....	23
3.3.1. Princip HPLC.....	23
3.3.2. Instrumentace HPLC.....	25
3.3.3. Kvalitativní a kvantitativní hodnocení léčiv.....	31
3.3.4. Mobilní fáze.....	33
3.3.5. Stacionární fáze.....	33
3.3.6. Využití HPLC.....	36

3.4. Validace analytických metod.....	37
3.4.1. Správnost.....	37
3.4.2. Přesnost.....	37
3.4.3. Selektivita.....	38
3.4.4. Detekční limit (LOD).....	38
3.4.5. Kvantitativní limit (LOQ).....	38
3.4.6. Linearita.....	38
3.4.7. Robustnost.....	38
3.5. Chromatografické podmínky pro stanovení kyseliny acetylsalicylové kapalinovou chromatografií uvedené v literatuře.....	39
4. Experimentální část.....	41
4.1. Chemikálie a pomůcky.....	42
4.1.1. Chemikálie.....	42
4.1.2. Sestava pro HPLC.....	42
4.1.3. Přístroje.....	43
4.1.4. Pomůcky.....	43
4.2. Příprava roztoků.....	44
4.2.1. Příprava standardů.....	44
4.2.2. Příprava fosfátového pufru.....	45
4.2.3. Příprava mobilních fází.....	46
4.2.4. Příprava vzorků.....	46
4.3. Chromatografické podmínky.....	48
4.3.1. Výchozí nastavení chromatografických podmínek.....	48
4.3.2. Příprava kapalinového chromatografu před měřením.....	48
4.3.3. Optimalizace podmínek.....	48
4.4. Validace analytických metod.....	49
4.4.1. Přesnost.....	49
4.4.2. Správnost.....	49
4.4.3. Linearita.....	50
4.4.4. Selektivita.....	50
4.4.5. Robustnost.....	51
4.4.6. Stabilita.....	51
4.4.7. Kvantitativní limit (LOQ), detekční limit (LOD).....	51

5. Výsledky a diskuze.....	52
5.1. Výběr chromatografických podmínek.....	53
5.2. Výběr vhodného rozpouštědla.....	56
5.3. Přesnost.....	58
5.4. Správnost.....	59
5.5. Linearita.....	60
5.6. Selektivita.....	62
5.7. Robustnost.....	64
5.8. Kvantitativní limit (LOQ), detekční limit (LOD).....	65
6. Závěr.....	66
7. Použitá literatura.....	70

Seznam ilustrací

Obr. 1: Vzorec [1].....	14
Obr. 2: Kolbe-Schmittova reakce výroby kyseliny salicylové [8].....	15
Obr. 3: Vzorec [2].....	18
Obr. 4: Acetylace kyseliny salicylové [8].....	19
Obr. 5: Schéma kapalinového chromatografu [15].....	25
Obr. 6: Schéma elektrochemického detektoru [16].....	28
Obr. 7: Porézní grafitová pracovní elektroda fritového typu [16].....	29
Obr. 8: Rozlišení dvou elektroaktivních komponent lišících se elektrochemickým potenciálem [16].....	30
Obr. 9: Silanolové skupiny v silikagelu [26].....	34
Obr. 10: 5 mM mobilní fáze v poměru 75 : 15.....	54
Obr. 11: 100 mM mobilní fáze v poměru 75 : 15.....	54
Obr. 12: 75 mM mobilní fáze v poměru 75 : 15.....	55
Obr. 13: 50 mM mobilní fáze v poměru 80 : 20.....	55
Obr. 14: Vzorčky tablet v rozpouštědle 0,1 M kyselina chlorovodíková : acetonitril v poměru 50 : 50.....	56
Obr. 15: Nástřík vzorku tablet Acylpyrinu v 50 % acetonitrilu jednou za 24 hodin po dobu 3 dnů.....	57
Obr. 16: Graf kalibrační křivky.....	61
Obr. 17: Směs standardních roztoků kyseliny acetylsalicylové, salicylové, 3-nitrofenolu, kofeinu, paracetamolu.....	62
Obr. 18: Nástřík Acifeinu.....	63
Obr. 19: Standardní směs kyseliny salicylové a 3-nitrofenolu při změně pH.....	64

Seznam tabulek

Tabulka 1: Podmínky pro stanovení kyseliny acetylsalicylové kapalinovou chromatografií popsané v literatuře.....	40
Tabulka 2: Příprava fosfátového pufru.....	45
Tabulka 3: Příprava vzorků pro linearitu.....	50
Tabulka 4: Změna plochy kyseliny salicylové v čase.....	57
Tabulka 5: Přesnost.....	58
Tabulka 6: Správnost.....	59
Tabulka 7: Linearita.....	60

1. Úvod

Kyselina salicylová je léčivo, které patří do skupiny keratolytik. Používá se na kůži k léčbě lupénky a jiné suché a šupinaté kůže, pomáhá odstraňovat odumřelou kůži z bradavic, chodidel a dlaní rukou, používá se také v kosmetice k léčbě akné. Kyselina salicylová je chemicky příbuzná s kyselinou acetylsalicylovou.

Kyselina acetylsalicylová patří do skupiny nesteroidních analgetik - antiflogistik. Používá se při lehčích horečnatých onemocnění nebo při zánětech svalů a kloubů. Kyselina acetylsalicylová dosáhne maximálních lékových hladin za 10 – 20 minut po podání léčiva, kyselina salicylová za 0,3 – 2 hodiny. Vzhledem k různým klinickým odpovědím u jednotlivých pacientů jsou tato léčiva vhodná k terapeutickému monitorování.

Vysokoučinná kapalinová chromatografie (HPLC) je jedna z nejčastěji používaných separačních metod. Umožňuje současně kvantitativní i kvalitativní hodnocení separovaných složek směsi. Výhodou HPLC je citlivost stanovení, rychlost analýzy, minimální množství vzorku a možnost automatizace. Z HPLC záznamu můžeme získat informace o identitě, obsahu a čistotě analyzované látky.

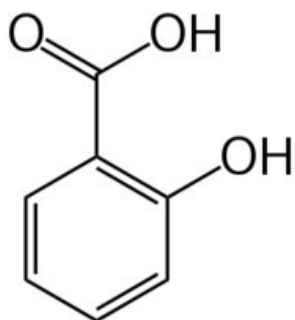
2. Cíl práce

Cílem této diplomové práce je nalezení vhodných analytických podmínek pro stanovení kyseliny salicylové jako hlavního rozkladného produktu kyseliny acetylsalicylové v tabletách. K hodnocení byla využita vysokoúčinná kapalinová chromatografie s elektrochemickou detekcí. Optimalizace a ověření již navržených podmínek elektrochemické detekce bylo zaměřeno na nalezení vhodného složení mobilní fáze a vhodného rozpouštědla vzorku. Stanovení kyseliny salicylové bylo provedeno u léčivých přípravků Acylpyrin, Acylcoffin a Acifein. Optimalizovaná metoda byla validována.

3. Teoretická část

3.1. Kyselina salicylová a její vlastnosti

3.1.1. Vzorec a chemické vlastnosti



Obr. 1: Vzorec [1]

Sumární vzorec: C₇H₆O₃

Systematický název: kyselina 2-hydroxybenzoová

Molekulová hmotnost (Mr): 138,12

Obsahuje 99,0 % až 100,5 % sloučeniny C₇H₆O₃, počítáno na vysušenou látku. [3]

Vlastnosti

Kyselina salicylová je bílý nebo téměř bílý krystalický prášek, bílé nebo bezbarvé jehlicovité krystaly, je těžce rozpustná ve vodě, snadno rozpustná v ethanolu 96 % a mírně rozpustná v dichlormethanu. [3]

Zkoušky na čistotu

- Kapalinová chromatografie
- Chloridy
- Sírany
- Těžké kovy

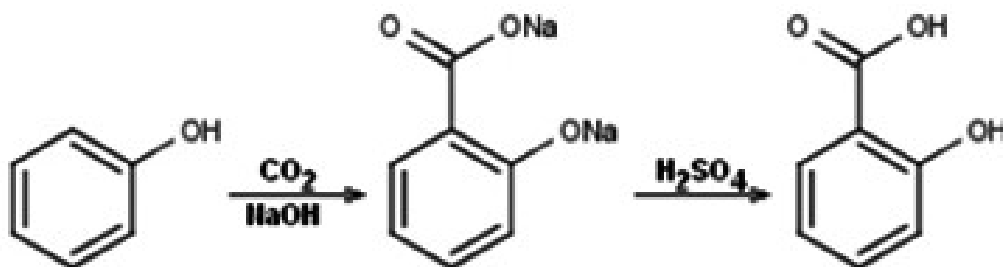
- Ztráta sušením
- Síranový popel [3]

Nečistoty

- kyselina 4-hydroxybenzoová
- kyselina 4-hydroxyisofthalová
- fenol [3]

3.1.2. Výroba

Kyselina salicylová se biosyntetizuje z aminokyseliny fenylalaninu. V rostlině huseníček rolní může být syntetizována nezávisle na dráze pomocí fenylalaninu. Kyselina salicylová se vyrábí Kolbe-Schmittovou reakcí pomocí fenolu, oxidu uhličitého, vysokého tlaku a za přítomnosti hydroxidu sodného. Touto reakcí se připraví disodná sůl kyseliny salicylové a za působení kyseliny sírové se z ní uvolní kyselina salicylová. [8]



Obr. 2: Kolbe-Schmittova reakce výroby kyseliny salicylové [8]

3.1.3. Indikace

Kyselina salicylová je mírně antipyretická, protizánětlivá a používá se v dermatologii. Její soli (salicylany, salicyláty) se používaly jako klasická antirevmatika. Kyselina salicylová patří do skupiny keratolytik a využívá se na kůži k léčbě lupénky a jiné suché, šupinaté kůže, pomáhá odstranit odumřelou kůži z bradavic, dlaní rukou a chodidel. Kyselina salicylová není

rozpuštná ve vodě, ale v tucích. Díky této vlastnosti se používá v léčebné kosmetice, je schopná pronikat do pórů a čistit je zevnitř. Používá se k léčbě akné, dokáže regulovat tvorbu mazu aktivním působením na enzymy, které jsou zodpovědné za tvorbu tohoto mazu. [4, 5, 6]

3.1.4. Farmakokinetické vlastnosti

Kyselina salicylová proniká rychle do horních vrstev kůže, systémově se vstřebává v závislosti na masťovém základu, stavu kůže, okluzi a lokalizaci. Vylučuje se především renálně s poločasem 2 – 3 hodin. U pacientů s renální nebo jaterní insuficiencí se můžou poločasy prodloužit. [4, 6]

3.1.5. Kontraindikace

Přecitlivělost na kyselinu salicylovou a salicyláty. Je zakázáno aplikovat kyselinu salicylovou na zanícená místa, do očí a na sliznice či genitálie (vnitřně). V době těhotenství a kojení by se kyselina salicylová neměla užívat nebo pouze ve výjimečných případech po poradě s lékařem či lékárníkem. Také by se neměla užívat při onemocnění jater, diabetes a při onemocnění krevního oběhu. [6, 10]

3.1.6. Nežádoucí účinky

V místě aplikace se může objevit místní podráždění jako je pálení, zčervenání, odlupování kůže, vyrážka. [4]

3.1.7. Interakce

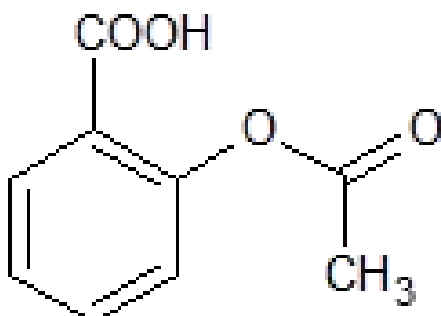
Kyselina salicylová může zesilovat propustnost jiných účinných látek – např. kortikoidů. Vstřebaná kyselina salicylová zesiluje účinek kumarinových derivátů a methotrexátu. [5, 9]

3.1.8. Některé přípravky s obsahem kyseliny salicylové na trhu

- Alpicort, Dr. August Wolff GmbH & Co. KG Arzneimittel, Bielefeld, Německo
- Alpicort F, Dr. August Wolff GmbH & Co. KG Arzneimittel, Bielefeld, Německo
- Belosalic, Belupo, s.r.o., Bratislava, Slovensko
- Kerasal, Galderma-Spirig Česká a Slovenská republika a. s., Bratislava
- Triamcinolon S léčiva, Zentiva, k.s., Praha, Česká republika
- Verrumal, Almirall Hermal GmbH, Reinbek, Německo

3.2. Kyselina acetylsalicylová a její vlastnosti

3.2.1. Vzorec a chemické vlastnosti



Obr. 3: Vzorec [2]

Sumární vzorec: C₉H₈O₄

Systematický název: kyselina 2-acetyloxybenzoová

Molekulová hmotnost (Mr): 180,160

Obsahuje 99,5 % až 101,0 % sloučeniny C₉H₈O₄, počítáno na vysušenou látku. [3]

Vlastnosti

Kyselina acetylsalicylová je bílý nebo téměř bílý krystalický prášek nebo bezbarvé krystaly, je těžce rozpustná ve vodě, snadno rozpustná v ethanolu 96 %. [3]

Zkoušky na čistotu

- Kapalinová chromatografie
- Těžké kovy
- Ztráta sušením
- Síranový popel [3]

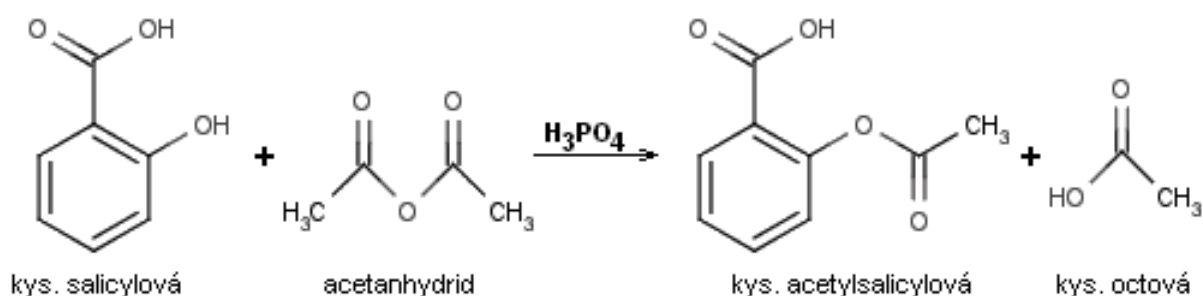
Nečistoty

- kyselina 4-hydroxybenzoová
- kyselina 4-hydroxybenzen-1,3-dikarboxylová (kyselina 4-hydroxyisofthalová)
- kyselina 2-hydroxybenzoová (kyselina salicylová)
- kyselina 2-[(2-acetoxybenzoyl)oxy]benzoová (kyselina acetylsalicylsalicylová)
- kyselina 2-[(2-hydroxybenzoyl)oxy]benzoová (kyselina salicylsalicylová)
- anhydrid kyseliny 2-acetoxybenzoové (anhydrid kyseliny acetylsalicylové) [3]

3.2.2. Výroba

Kyselina acetylsalicylová je derivát kyseliny salicylové, ve formě glykosidu salicynu je obsažená ve vrbové kůře. Kyselina acetylsalicylová se připravuje dvoustupňovou syntézou. V prvním stupni syntézy se Kolbe-Schmittovou reakcí fenolu s oxidem uhličitým za vysokého tlaku a za přítomnosti hydroxidu sodného připraví disodná sůl kyseliny salicylové. Z disodné soli kyseliny salicylové se uvolní kyselina salicylová za působení kyseliny sírové (viz Obr. 2).

Při zahřívání kyseliny salicylové s acetanhydridem za přítomnosti kyselého katalyzátoru, kyseliny fosforečné, dochází k esterifikaci fenolického hydroxyly a vzniká kyselina acetylsalicylová. [8]



Obr. 4: Acetylace kyseliny salicylové [8]

3.2.3. Indikace

Kyselina acetylsalicylová patří do skupiny nesteroidních kyselých analgetik - antiflogistik. Je to ester kyseliny salicylové, má analgetické, antipyretické a protizánětlivé účinky. Používá se při lehčích horečnatých stavech, jako je nachlazení nebo chřipka, při zánětech, bolesti svalů, hlavy, kloubů, při lehčích revmatických problémech, využívá se při ischemické chorobě ke snížení rizika vzniku infarktu myokardu. [12]

3.2.4. Mechanismus účinku

Základním mechanismem účinku je nevratná inhibice enzymu cyklooxygenázy (COX), který je lokalizován na endoplazmatickém retikulu. Tímto mechanismem mírní bolest, tlumí zánětlivé pochody a snižuje horečku. COX je v organismu odpovědná za syntézu prostaglandinů, prostacyklinů a tromboxanů z kyseliny arachidonové. Ireverzibilita je způsobena přenosem acetylové skupiny z molekuly kyseliny acetylsalicylové na enzym. Další nesteroidní antiflogistika inhibují enzym reverzibilně. [11]

3.2.5. Farmakokinetické vlastnosti

Po perorálním podání se kyselina acetylsalicylová rychle a zcela resorbuje v žaludku. V průběhu absorpce a po ní se přeměňuje na svůj aktivní metabolit, kyselinu salicylovou. Pro kyselinu acetylsalicylovou je dosaženo maximálních lékových hladin po 10 - 20 minutách, pro kyselinu salicylovou za 0,3 - 2 hodiny. [12]

3.2.6. Kontraindikace

Pacient nesmí užívat kyselinu acetylsalicylovou při známé přecitlivělosti na salicyláty, při chorobné krvácivosti, při chirurgických zákrocích spojených s rizikem většího krvácení, při průduškovém astmatu, vředové nemoci a v posledních 3 měsících těhotenství. Nedoporučuje se podání dětem do 15 let kvůli riziku Reyova syndromu (neinfekční encefalopatie a jaterní selhání).

Kyselina acetylsalicylová se nesmí podávat v průběhu těhotenství dlouhodobě ani ve vysokých dávkách. Může dojít k posunu termínu porodu vlivem inhibice porodních kontrakcí, u novorozenců by mohlo vzniknout intrakraniální krvácení. [12]

3.2.7. Nežádoucí účinky

K nejčastějším nežádoucím účinkům patří gastrointestinální poruchy jako je bolest břicha, nauzea, zvracení, pálení žáhy. Při dlouhodobém užívání vysokých dávek hrozí riziko žaludečních vředů, krvácení do žaludku, závratí, selhání ledvin a jaterní toxicity. Při vyšších dávkách se mohou objevit závratě, zvonění v uších, poruchy sluchu, pocení a bolest hlavy. Kyselina acetylsalicylová může vyvolat také kopřivku, kožní reakce, alergické reakce nebo astmatický záchvat. [12]

3.2.8. Interakce

- heparin a tiklopidin (léky na ředění krve) – zvýšené riziko krvácení
- methotrexát (lék k léčbě revmatoidní artritidy) – zvýšení toxicity methotrexátu
- kortikosteroidy (léky s protizánětlivým účinkem) – zvýšené riziko krvácení do zažívacího ústrojí
- nesteroidní antirevmatika, antiflogistika (k léčbě zánětu a bolesti) – zvýšené riziko toxicity pro zažívací ústrojí
- ginkgo (lék přírodního původu ke zlepšení prokrvení mozku a končetin) – zvýšené riziko krvácení
- inhibitory ACE (antihypertenziva) – snížení antihypertenzního účinku [12]

3.2.9. Některé přípravky s obsahem kyseliny acetylsalicylové na trhu

- Acifein, Herbacos Recordati s.r.o., Pardubice, Česká republika
- Acylcoffin, Zentiva a.s., Bratislava, Slovensko
- Acylpyrin, Herbacos Recordati s.r.o., Pardubice, Česká republika
- Anopyrin 100 mg, Zentiva a.s., Bratislava, Slovensko
- Aspirin, BAYER s.r.o., Praha, Česká republika
- DUOPLAVIN 75 MG/100 MG, Sanofi Clir SNC, Paris, Francie
- STACYL 100 MG ENTEROSOLVENTNÍ TABLETY, STADA Arzneimittel AG, Bad Vilbel, Německo

3.3. Vysokoúčinná kapalinová chromatografie

Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC – High Performance Liquid Chromatography) patří mezi nejčastěji používané separační metody. Mezi výhody řadíme vysokou účinnost, dobrou opakovatelnost a robustnost. HPLC umožňuje kvalitativní a kvantitativní hodnocení separovaných složek současně. HPLC je založena na rozdílné distribuci dělených látek ve směsi mezi dvě různé fáze, které jsou nemísitelné: mobilní (pohyblivá) fáze a stacionární (nepohyblivá). [14, 19]

3.3.1. Princip HPLC

Vysokoúčinná kapalinová chromatografie je analytická metoda založená na separaci analytů na základě jejich distribuce mezi mobilní a stacionární fází. Mobilní fází je kapalina, stacionární fází je tuhá nebo kapalná látka, která je ukotvená na tuhém nosiči v chromatografické koloně ve formě sorbentu. Při dělení látek dochází k opakovanému ustalování rovnováhy mezi mobilní fází, která unáší analyt, a stacionární fází. Během chromatografického procesu dochází k mnoha typům interakcí. Podle mechanismu separace dělíme HPLC na adsorpční, iontově výměnnou, rozdělovací, gelovou a afinitní.

Adsorpční chromatografie využívá rozdílné adsorpce molekul analytu na povrch stacionární fáze s aktivními centry. Uplatňují se především interakce dipól-dipól, vodíkové a slabé kovalentní vazby, celková polarita analytu, mobilní i stacionární fáze. Obecně platí, že se polární molekuly více adsorbují na polární stacionární fáze. Adsorpce je zesílena použitím nepolární mobilní fáze, polární by se adsorbovala sama na povrchu adsorbentu. V chromatografii se nejčastěji jako stacionární fáze používá silikagel. [13,14]

Principem iontově výměnné chromatografie (chromatografie na měničích iontů, IEC) je rozdílná afinita iontů k iontoměniči. IEC je založena na silných elektrostatických interakcích mezi ionizovanými funkčními skupinami měniče (stacionární fáze) a opačně nabitými ionty v okolí roztoku. Iontoměniče dělíme na katexy – iontoměnič reagující s kationty, na povrchu mají záporné skupiny a anexy – na povrchu mají kladné skupiny. Síla afinity je závislá na hodnotách disociačních konstant ionogenních skupin, pH, ale i na iontové síle mobilní fáze a na různé velikosti iontů. Používají se 4 základní skupiny iontoměničů: sulfonová (silný

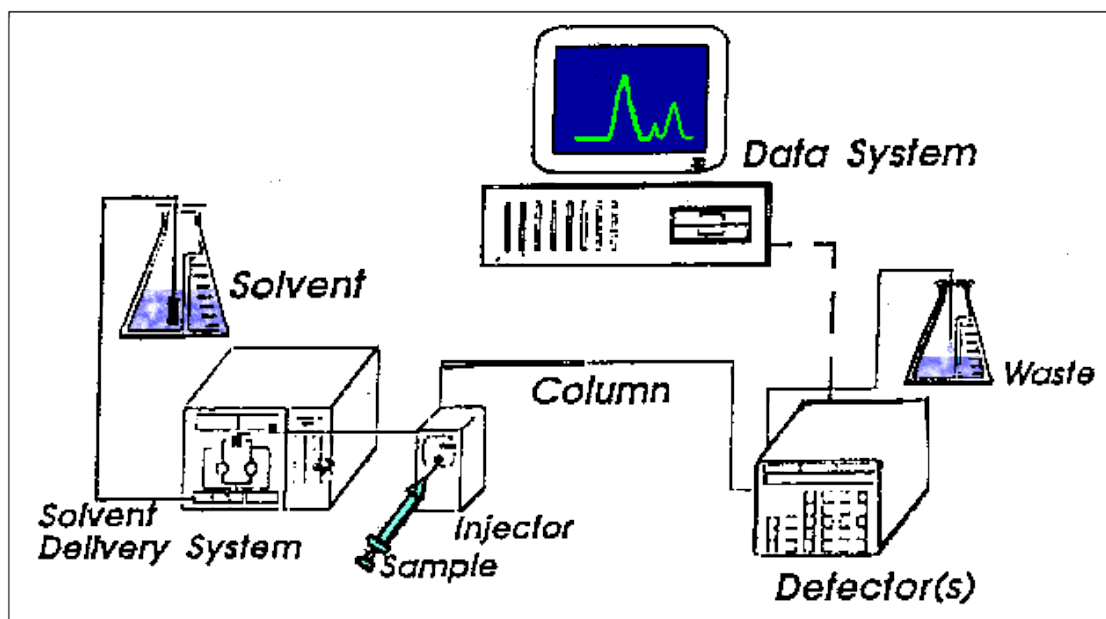
katex), karboxylová (slabý katex), tetraalkylamoniová (silný měnič aniontů), terciární aminoskupina (slabý měnič aniontů). [13,14]

Rozdělovací chromatografie dělí látky na základě rozdílných rozdělovacích koeficientů, dochází k dělení látek na základě rozdílné rozpustnosti analytu ve dvou vzájemně nemísitelných kapalinách. Jako stacionární fáze je kapalina, která je ukotvená na vhodném nosiči, jako mobilní fáze jsou vodné pufry nebo polární rozpouštědla. [13,14]

Gelová chromatografie (size exclusion chromatography – SEC) záleží na rozdělování molekul podle jejich velikosti v koloně, která je naplněna pórovitým polymerním gelem (stacionární fáze). Princip spočívá v rozdílném propouštění molekul rozpuštěné látky do pórů gelu – velké molekuly (větší než póry) procházejí kolonou bez zdržení, malé molekuly jsou zadržovány. [13,14]

Princip afinitní chromatografie je založen na specifické a současně vratné interakci mezi dvěma molekulami různých látek, např. mezi ligandem navázaným na nerozpustnou a inertní matici a analytem s určitou afinitou k tomuto ligandu. Příklad interakcí může být např. enzym-inhibitor, protilátka-antigen, receptor-hormon. [13,14]

3.3.2. Instrumentace HPLC



Obr. 5: Schéma kapalinového chromatografu [15]

Hlavní části typického HPLC systému:

- Zásobník mobilní fáze (Solvent) – skleněná láhev s dostatečným množstvím mobilní fáze pro analýzu. V zásobníku může mít zabudován filtr, který brání vstupu mechanických nečistot do chromatografického systému, a degasser (odplyňovač), který zbavuje mobilní fázi bublinek vzduchu. Bublínky by mohly narušit detekci analytu a funkci čerpadla, mohlo by dojít např. ke kolísání pracovního tlaku a následně ke kolísání retenčních časů, k rušivým píkům. Při isokratické eluci je složení mobilní fáze v průběhu celé analýzy konstantní, při gradientové eluci se složení mobilní fáze mění, je tedy zapotřebí mít více zásobníků mobilní fáze. [14, 21]
- Pumpa (Pump) – zajišťuje konstantní a plynulý tok mobilní fáze chromatografickým systémem.
- Dávkoč (Injector) – najdeme ho před vstupem do kolony, umožňuje vstřík určitého množství složitěho vzorku do proudu mobilní fáze, která ho vede na kolonu. V současné době se nejvíce používají automatické dávkoče autosamplery. Ty jsou spojené se zásobníkem vzorků, kde je uložen větší počet vialek, ze kterých se dávkuje naprogramované objemy bez zásahu obsluhy. [20, 21]

- Kolona (Column) – různě dlouhé trubice v řádech centimetrů (5 – 25 cm), které jsou vyrobené ze skla nebo nerezové oceli. V koloně dochází k rozdělení směsi na jednotlivé složky, které jsou poté unášeny mobilní fází do detektoru. [21]
- Počítač (Data system) – zpracovává a interpretuje výsledky analýzy, které přicházejí do PC ve formě elektronického signálu. Kontroluje všechny parametry přístroje (teplotu, tlak, sekvenci vstříků), pomocí něj se řídí celý provoz přístroje. [14]
- Odpad (Waste) – láhev, do které se sbírá mobilní fáze s eluovanými léčivy po průchodu chromatografickým přístrojem.
- Detektor (Detector) – monitoruje změny složení mobilní fáze pomocí měření fyzikálních a chemických veličin, zaznamenává rozdíl mezi průchodem čisté mobilní fáze a mobilní fáze obsahující eluovanou složku celou detektoru. Detektory se dělí na univerzální (odezva signálu je úměrná celkové vlastnosti eluátu) a selektivní (odezva signálu je úměrná konkrétní vlastnosti eluátu).

Ideální detektor by měl mít tyto vlastnosti:

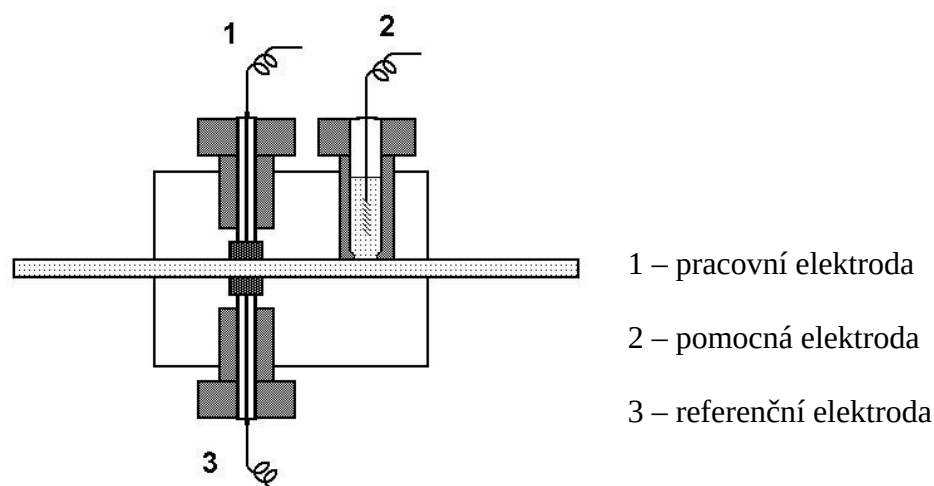
- univerzálnost (detekce všech analytů)
- vysoká citlivost (detekce ve velmi nízkých koncentracích látek)
- nízká úroveň šumu
- okamžitá odezva
- možnost použití gradientu
- rezistence vůči změnám toku mobilní fáze, teploty a tlaku
- nezpůsobovat rozšiřování chromatografických zón

Typy detektorů nejčastěji používaných v HPLC analýze:

- Spektrofotometrické detektory - měří absorbanci elektromagnetického záření složkami eluátu protékajícího celou detektoru. K detekci se používá nejvíce UV oblast spektra, méně viditelná a nejméně infračervená. Používají se detektory s fixní vlnovou délkou, s proměnnou vlnovou délkou (libovolně měnitelná) a diode array detektor, který snímá celé absorpční spektrum a hodnotí léčivo při několika vlnových délkách současně. Výhodou spektrofotometrických detektorů je vysoká

citlivost ($10^{-9} - 10^{-10}$ g/ml) a použitelnost při gradientové eluci.

- Fluorescenční detektory – používáme v případě, když analyzované léčivo vykazuje fluorescenci. Nefluoreskující látky lze vhodnou derivatizací převést pomocí vhodných činidel na fluoreskující deriváty. Principem detektorů je fluorescence a měření sekundárního (emisního) záření, které látka vydá až po absorpci primárního (excitačního) elektromagnetického záření. Tyto detektory jsou méně univerzální než UV detektory, ale jsou více citlivé ($10^{-9} - 10^{-12}$ g/ml), selektivnější a také použitelné pro gradientovou eluci.
- Refraktometrické detektory – řadí se mezi nejstarší používané univerzální detektory. Detekce je založena na principu měření rozdílného indexu lomu u čisté mobilní fáze a eluátu obsahujícím analyzovanou látku. Mezi nevýhody těchto detektorů patří relativně nízká citlivost (10^{-6} g/ml), závislost na teplotě a nepoužitelnost pro gradientovou eluci.
- Hmotnostně-spektrometrické detektory - z eluentu se musí po výstupu z kolony odstranit mobilní fáze, molekuly léčiva v plynném stavu jsou v hmotnostním spektrometru ionizovány nárazy elektronů, termoionizací nebo elektroionizací. Molekulární a fragmentární ionty jsou v magnetickém poli rozděleny podle hmotnosti a náboje a výstupem je hmotnostní spektrum (četnost iontů ve vztahu k poměru – hmotnost/počet nábojů). Tyto detektory jsou vysoce citlivé, selektivní a poskytují řadu údajů k identifikaci analytů.
- Elektrochemické detektory – používají se pro detekci látek schopných elektrochemické reakce, která probíhá na rozhraní elektroda-roztok (mobilní fáze). Detektory měří určitou elektrickou veličinu (elektrodový potenciál, proud) vyvolanou průchodem látky průtokovou celou detektorem, ve které jsou umístěny elektrody s vloženým pracovním napětím nezbytným k průběhu elektrochemické reakce, a to v systému dvouelektrodovém nebo tříelektrodovém zapojení. Většinou se využívá tříelektrodového zapojení, které se skládá z pracovní, referenční a pomocné elektrody. Měřený elektrický signál je úměrný látkovému množství detekované složky. U elektrochemických detektorů je sledována závislost mezi elektrickou veličinou a koncentrací sledované složky. [16, 17, 18]



Obr. 6: Schéma elektrochemického detektoru [16]

Nejčastěji se využívá elektrochemická reakce redoxního systému $\text{Ox}^{n+} + ne^- \leftrightarrow \text{Red}$, podle podmínek měření se elektrochemické detektory rozdělují na několik typů:

- a) elektrochemický článek je v termodynamicky rovnovážném stavu (faradaický proud je nulový, $I=0$) – poté se mluví o potenciometrii
- b) elektrochemický článek je v kinetickém stavu (faradaický proud není nulový, $I \neq 0$) – poté jde o elektrolytickou metodu, článkem protéká proud a jedním směrem probíhá elektrolýza.

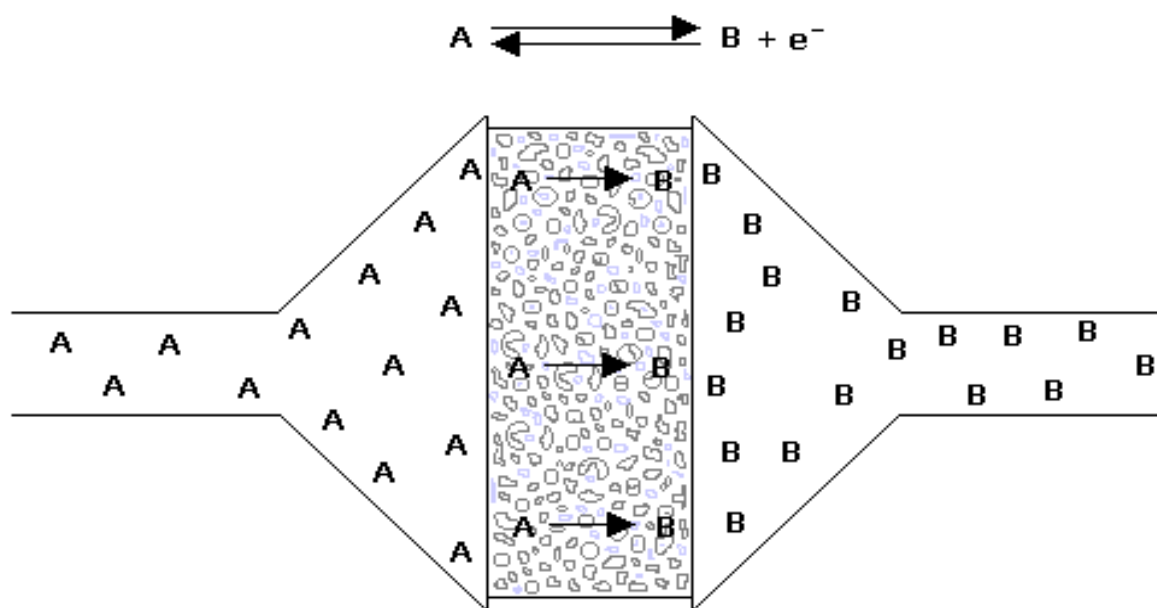
U elektrolytických metod se uplatňují 4 závislé proměnné veličiny: proud (I), potenciál elektrody (E), koncentrace elektroaktivní látky (c), čas (t). Elektrolytické metody se rozdělují podle podmínek elektrolytických metod na:

- a) potenciostatické – měření je provedeno při konstantním potenciálu pracovní elektrody
- b) amperostatické – měření je provedeno při konstantním proudu.

Amperometrické detektory – zaznamenávají elektrický proud, který odpovídá oxidaci (redukci) látek v eluentu při vhodném vloženém napětí na elektrodu. Existuje několik typů amperometrických cel podle konstrukce a umístění pracovní elektrody – wall-jet, tubulární, tenkovrstvá. Amperometrický detektor je vhodný pro práci s kapilárními kolonami a

mikrokolonami, protože vnitřní objem měrných cel je menší než 1 nl. Amperometrický detektor je poměrně levný, selektivní, umožňuje dosáhnout vysoké citlivosti detekce, může se použít ke kvalitativní i kvantitativní detekci látek o malých koncentracích ($10^{-9} - 10^{-10}$ mol/l).

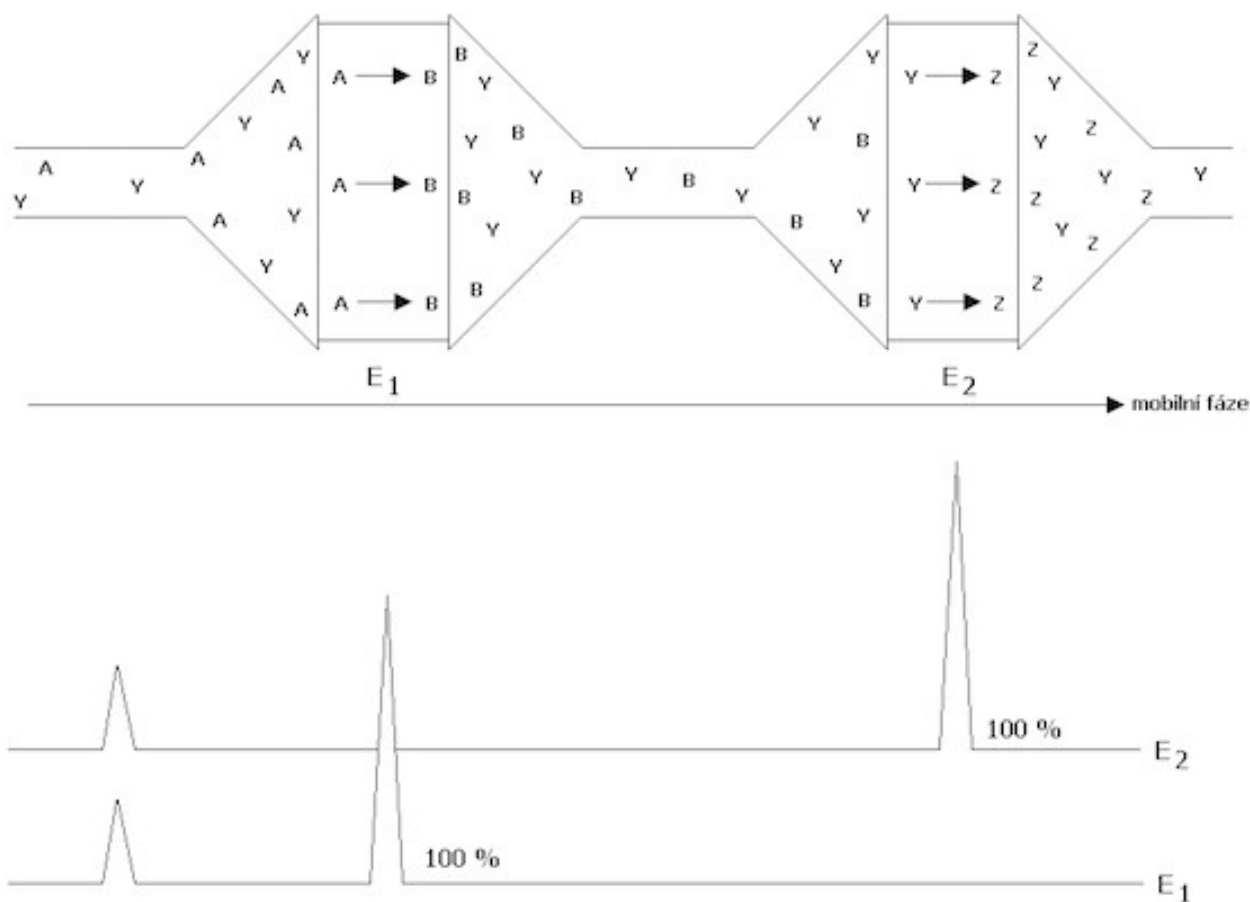
Coulometrické detektory – měří náboj, který je potřebný k oxidaci nebo redukci celkového množství látky při průtoku měrnou celou. Mají vyšší citlivost detekce než amperometrické detektory. Jejich vysoká citlivost je srovnatelná s citlivostí fluorescenčních detektorů. Účinnost elektrochemické reakce se zvýší za použití elektrody fritového typu, kdy mobilní fáze protéká porézní grafitovou pracovní elektrodou.



Obr. 7: Porézní grafitová pracovní elektroda fritového typu [16]

Porézní grafitová pracovní elektroda je vysoce účinná, selektivní a stabilní (snižuje se poměr signálu k šumu), má větší povrch než klasická elektroda. Na povrchu elektrody podléhá oxidačně-redukčnímu ději více než 90 % přítomného analytu. Výhodou coulometrického detektoru je možnost zvýšení selektivity zapojením dvou a více elektrod za sebou, na které je vloženo různé napětí. Analyt se na coulochemické elektrodě podrobuje 100 % elektrolýze, proto eluent již neobsahuje žádnou elektroaktivní komponentu, která by mohla podléhat elektrochemické reakci při daném napětí. Jsou-li v systému dvě separované komponenty, které se liší svými elektrochemickými vlastnostmi (elektrochemickým potenciálem nejméně

o 60 mV), můžou se rozlišit voltametriky. K odstranění nečistot z mobilní fáze se používá chránící (guard) cela. Je to porézní grafitová elektroda s určitým vloženým napětím odstraňující elektroaktivní nečistoty před vstupem do injektoru, analytické cely a kolony. [16, 18]



Obr. 8: Rozlišení dvou elektroaktivních komponent lišících se elektrochemickým potenciálem [16]

Nevýhodou elektrochemických detektorů je vysoký požadavek na čistotu, dokonalé odplynění mobilní fáze (odstranění kyslíku) a odstranění veškerých stop kovových iontů – to je podmínka pro dosažení stabilní nulové linie a pro reprodukovatelnost výsledků. Mobilní fáze musí být vodivá, ve vodně-organických mobilních fázích by neměl být příliš vysoký obsah organické fáze vedoucí ke snížení vodivosti. Tento typ detektoru není vhodné použít v systému normálních fází. [18]

3.3.3. Kvalitativní a kvantitativní hodnocení léčiv

Vysokoučinná kapalinová chromatografie je separační metoda, která umožňuje současně jak kvalitativní, tak kvantitativní analýzu separovaných složek směsi. Hodnocení má vysokou selektivitu, citlivost a probíhá v relativně krátkém čase. Z HPLC záznamu získáme detailní informace o identitě, obsahu a čistotě analyzované látky.

Kvalitativní analýza se používá k identifikaci nebo důkazu přítomnosti určité látky ve vzorku. K identifikaci látek slouží retenční čas (t_r). Je to doba, která se měří od okamžiku, kdy se vzorek nastříkne na kolonu, k maximu chromatografického píku. Jestliže se podmínky mezi jednotlivými hodnoceními nemění, retenční čas se používá jako identifikační (kvalitativní) charakteristika látky. Hodnota retenčního času závisí na rychlosti průtoku mobilní fáze kolonou. Čím rychlejší je rychlost průtoku mobilní fáze kolonou, tím je retenční čas dané látky menší. Přítomnost látky ve vzorku je dokázána shodou retenčního času chromatografického píku analyzované látky s retenčním časem píku standardu.

Kvantitativní hodnocení má za úkol zjistit množství (koncentrace) analytu ve vzorku. Tato analýza vychází většinou z plochy píku, zřídka z výšky píku. Plocha píku i výška jsou přímo úměrné koncentraci analytu. Pro vyhodnocování se používají: metoda vnějšího standardu, metoda vnitřního standardu, metoda normalizace, kalibrační postup. [19]

- Metoda vnějšího standardu – Dva kroky: nejprve se nastříkne roztok analyzované látky, poté se nastříkne roztok vnějšího standardu. Vnější standard bývá standard stanovované látky, který se označuje CRL (chemická referenční látka). Koncentrace analytu se vypočítá z poměru ploch (výšek) píků jednotlivých složek směsi a plochy píku vnějšího standardu.

Stanovovaná koncentrace se může vypočítat dle vztahu:

$$c_{vz} = A_{vz} / A_{st} \cdot c_{st}$$

A_{vz} - plocha stanovované látky o neznámé koncentraci c_{vz}

A_{st} – plocha standardu

c_{st} – koncentrace standardu

- Metoda vnitřního standardu – spočívá v přidání definovaného objemu roztoku vhodného vnitřního standardu ke známému objemu roztoku vzorku. Po promíchání se směs nastříkuje na kolonu. Koncentrace stanovované látky se vypočítá z poměru ploch (výšek) píků jednotlivých separovaných složek směsi a plochy píku vnitřního standardu. K nárokům na vnitřní standard patří: chemická inertnost, eluce standardu v blízkosti píků stanovovaných látek, podobná chemická struktura a koncentrace jako u látek stanovovaných.

Stanovovaná koncentrace se může vypočítat dle vztahu:

$$c_{vz} = \{ [A_{vz}/A(IS)_{vz}] / [A_{st}/A(IS)_{st}] \} \cdot c_{st}$$

- Metoda normalizace – vypočítá se obsah zkoušené látky v procentech (x %) z celkové plochy všech píků (100 %) na chromatogramu. Do celkové plochy všech píků se nezapočítávají píky rozpouštědel a přidaných činidel a píky, které mají plochu pod limit zanedbatelnosti.
- Kalibrační postup – obsah zkoušené látky se stanoví na základě kalibrační křivky, což je lineární závislost koncentrace (osa x) na ploše píku (osa y).

Rovnice kalibrační přímky:

$$y = ax + b$$

3.3.4. Mobilní fáze

Mobilní fáze se podílí na separačním procesu. Pro zlepšení rozlišení látek při separaci je snadnější měnit mobilní fázi než použít jinou stacionární fázi. Izolaci látek můžeme ovlivnit změnou zastoupení různých rozpouštědel v mobilní fázi, změnou pH, iontové síly nebo přidáním iontově párových činidel. [25]

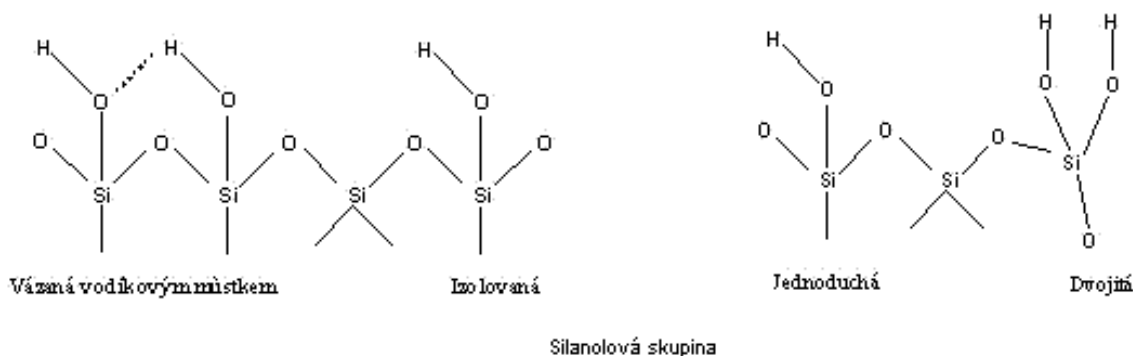
3.3.5. Stacionární fáze

Stacionární fáze patří k nepohyblivé složce chromatografického systému, je to náplň chromatografické kolony, kde probíhá vlastní rozdělení směsi látek na základě různých separačních dějů a mechanismů, které závisí na povaze sorbentu i analytu.

Obecné požadavky na stacionární fázi:

- tepelná stabilita
- tvar částic – pravidelný kulovitý tvar s jednotnou velikostí (zamezí se turbulentnímu proudění mobilní fáze)
- velikost pórů, které odpovídají velikosti molekul analytu
- mechanická stabilita – odolnost vůči vysokým tlakům

Nejčastěji používaným materiálem pro výrobu stacionární fáze v HPLC je polární anorganický silikagel – SiO_2 . Samostatně je používán pro separaci na normálních fázích, po chemickém navázání ligandů se využívá pro chromatografické separace na reverzních fázích. Mezi jeho výhody patří vysoká mechanická odolnost (lze použít i při vysokých tlacích), chemická inertnost (nebobtná, nesráží se), chemické vlastnosti a modifikace povrchu nebo množství výrobců na trhu. Silikagel se připravuje ve velmi čisté formě s různě upravenými fyzikálními vlastnostmi. Pro záměry HPLC se vyrábí s poměrně velkým specifickým povrchem ($5 - 500 \text{ m}^2/\text{g}$), s velkým objemem pórů ($0,7 \text{ ml/g}$). K aktivním centřům silikagelu patří hydroxylové skupiny – silanolové skupiny Si-OH (existuje několik rozdílných druhů).



Obr. 9: Silanolové skupiny v silikagelu [26]

Limitující faktory silikagelu:

- pH mobilní fáze nad 7,5 – dochází k rozpouštění silikagelu a ztrátě chromatografické účinnosti
- nestabilita při teplotě vyšší než 60°C
- použití fosforečnanových a uhličitanových pufrů vede k rozpouštění silikagelu [27]

K nejčastějším modifikačním skupinám pro nepolární systém tzv. rezervních fází patří funkční skupiny C₁₈ (oktadecylsilikagel) a C₈ (oktylsilikagel), pro středně polární fáze jsou to amino- a kyano- modifikace.

Dalšími polárními anorganickými sorbenty jsou např. oxid hlinitý a zirkoničitý, které patří do skupiny stacionárních fází na bázi kovových oxidů. Jejich výhodou je velká teplotní stabilita a použití v širším rozsahu pH. Další náhrada silikagelu můžou být organické polymery (methakrylát, akrylamid). Ty jsou odolné v celém rozsahu pH, mají nižší separační a mechanickou odolnost.

Dalším druhem stacionárních fází jsou monolity (monolitické kolony). Monolitická kolona je tvořena jediným blokem zhotoveným z porézní hmoty. Obsahují dva typy pórů, které mají odlišné velikosti. Monolitem prochází všechna mobilní fáze, tím je dosaženo rychlejšího přenosu hmoty. Kolony se používají tam, kde je nutné provádět rychlé a ultra rychlé separace.

Monolitické materiály se rozdělují na dva základní typy:

- monolity na bázi oxidu křemičitého (siliky)
- monolity z organických polymerů (metakrylátové, polystyrenové, akrylamidové).

Monolity na bázi siliky mají bimodální strukturu – tzn., že se skládají z křemenné kostry, mezopórů (2 - 20 nm) a makropórů (0,5 – 8 μm). Mezopóry jsou středně velké póry zvětšující povrch sorbentu a tím i separační činnost, tvoří jemnou porézní strukturu vnitřku kolony. Makropóry jsou velké póry snižující zpětný odpor kolony, díky tomu se používají vysoké průtokové rychlosti.

Monolity na bázi siliky se připravují sol-gel procesem. Tetraalkoxysilany (tetramethoxysilan, tetraethoxysilan) podléhají hydrolyticky iniciované polykondenzaci ve vodném roztoku kyseliny octové a za přítomnosti ve vodě rozpustného organického polymeru (porogenu). Kyselina octová má zde funkci katalyzátoru, porogen formuje křemíkovou síťovou strukturu. U silikových monolitů dochází během přípravy k velkému smrštění stacionární fáze. Vyžaduje to tedy dvoukrokovou přípravu. Nejprve je monolit připraven ve vhodné formě a poté vpraven do pouzdra ze smrštivého materiálu PEEK (poly(ether-ether-keton)) plnící funkci těla kolony. Konečný průměr 4,6 mm získáme z výchozí formy o průměru 6 mm. Délka kolony by neměla přesahovat 15 cm z důvodu ohybu. Příprava silikových monolitů je v laboratorních podmínkách obtížná, pro separace se používají komerčně dostupné kolony. Komerčně dostupná monolitická kolona na bázi siliky je kolona Onyx od firmy Phenomenex. [29, 30]

Kolona Onyx obsahuje dva typy pórů – mezopóry (13 nm) a makropóry (2 μm). Porozita je větší než 80 %, pH stabilita se pohybuje v rozmezí 2,0 – 7,5. Je-li pH nižší než 2,0, dochází k hydrolyze vázaných funkčních skupin, je-li pH vyšší než 8, způsobuje to rozpouštění silikové podpory. Pro bazické, nepolární, kyselé, kovové ionty chelatující sloučeniny je vhodná Onyx Monolithic C18, která má selektivitu srovnatelnou s konvenčními C18 reverzními kolonami. Je k dispozici v délkách 100 mm, 50 mm a 25 mm. Dále se také používá kolona Onyx Monolithic C8 o rozměrech 100 x 4,6 mm. Onyx umožňuje zkrácenou dobu analýzy, účinnost separace je srovnatelná s klasickými kolonami 3 μm částicemi, při změně podmínek analýzy nabízí výrazně kratší dobu k reekvilibraci. U monolitické kolony se může pracovat při vysokých průtokových rychlostí s minimální ztrátou rozlišení píku. [31, 32]

Mezi výhody monolitických stacionárních fází můžeme zařadit možnost změny vnitřní struktury (objemu a distribuce pórů), a tím ovlivňování separační vlastnosti

chromatografických kolon. Největší výhodou těchto kolon jsou hydrodynamické vlastnosti. Také se u monolitických kolon objevují určitá omezení, např. u monolitů na bázi organického polymeru je to botnání v organických rozpouštědlech, které ovlivňuje separační účinnost a celkovou porozitu stacionární fáze, u anorganických monolitů rozpustnost oxidu křemičitého v alkalickém prostředí a obtížnější příprava v laboratorních podmínkách. [29]

3.3.6. Využití HPLC

Vysokoučinnou kapalinovou chromatografií řadíme mezi široce používané separační metody, používá se ve vývojových i rutinních analytických laboratořích všech zaměření. Umožňuje současně kvantitativní a kvalitativní hodnocení léčiv. Separace se děje na základě interakce dělených látek se stacionární a mobilní fází.

Využití v kontrole chemických léčiv:

- Lékopisná kontrola (stanovení obsahu, identifikace léčiv, čistota)
- Hodnocení složených lékových přípravků
- Analýza přírodních léčiv v rostlinném materiálu – obsah a zastoupení alkaloidů, glykosidů, vitaminů v příslušných drogách
- Monitorování léčiv a jejich metabolitů v tělních tekutinách – je nutné izolovat léčivo a metabolity z analyzované tělní tekutiny, nejčastěji extrakcí do vhodného organického rozpouštědla. HPLC kvantifikuje původní léčivo i jeho metabolity najednou.
- Problém stability léčiv – kvantitativně se hodnotí postupný úbytek analyzovaného léčiva a zároveň se kvantitativně i kvalitativně analyzují rozkladné produkty, které vznikají. [19]

3.4. Validace analytických metod

Validace je proces, při kterém se zjišťují nejdůležitější charakteristiky metody. Cílem validace je ukázat, že vypracovaný postup metody je pro daný účel vhodný, určit podmínky, při kterých je daný postup použitelný a zabezpečit spolehlivost při opakujícím se uplatnění v jedné nebo v různých laboratořích. Validace se provádí při vývoji nové metody, při změně metody nebo při průkazu rovnocennosti dvou metod. [19]

3.4.1. Správnost

Správnost je definována jako shoda mezi získaným výsledkem měření a správnou hodnotou. Správná hodnota se zjišťuje přípravou modelových vzorků ze všech složek přípravku a přidáním přesného množství standardu nebo jinou nezávislou metodou s ověřenou přesností. Nejčastěji se správnost zjišťuje analýzou nejméně šesti vzorků, respektive analýzou třech vzorků na třech koncentračních úrovních. Poté se vyjádří jako rozdíl správné a získané hodnoty nebo jako výtěžnost. [19]

$$\text{Výtěžnost} = (100 \times \text{získaná hodnota}) / \text{správná hodnota}$$

3.4.2. Přesnost

Přesnost metody je míra shody výsledků měření získaných opakovaně s jedním homogenním vzorkem. Vzorek se šestkrát analyzuje celým postupem včetně přípravy vzorku. Jako relativní směrodatná odchylka se vyjádří přesnost těchto šesti měření. Přesnost se hodnotí na třech úrovních:

- opakovatelnost – metoda, která se opakuje jedním pracovníkem stejným způsobem a stejnými činidly na jednom přístroji
- mezilehlá přesnost – metoda, která se dělá s různými činidly, pracovníky, přístroji, v různé dny, ale ve stejné laboratoři se stejným vzorkem
- reprodukovatelnost – metoda stejná s mezilehlou přesností, ale probíhá v různých laboratořích [23, 38, 39]

3.4.3. Selektivita

Selektivita je schopnost analytické metody změřit správně a specificky danou látku v přítomnosti jiných látek, jež lze očekávat. Můžou to být další účinné látky ve složených přípravcích, pomocné látky, nečistoty z výroby, zbytková rozpouštědla nebo rozkladné produkty. [19]

3.4.4. Detekční limit (LOD)

Detekčním limitem se vyjadřuje citlivost metody. Vyjadřujeme ho jako nejnižší množství analyzované látky ve vzorku, které může být pro danou metodu detekováno, aniž by muselo být kvantitativně stanovované. U instrumentálních metod se detekční limit určuje jako koncentrace analyzované látky s poměrem signálu k šumu s hodnotou 3, u neinstrumentálních metod se hledá experimentálně. [23, 38]

3.4.5. Kvantitativní limit (LOQ)

Kvantitativní limit vyjadřuje také citlivost metody. Je definován jako nejnižší koncentrace látky, která je stanovitelná s přijatelnou přesností a správností. Kvantitativní limit se může vyjádřit jako koncentrace, při jejíž analýze se dosáhne relativní směrodatné odchylky 10 %. Vyjadřuje se jako koncentrace s poměrem signálu k šumu s hodnotou 10. [19]

3.4.6. Linearita

Linearita je schopnost dosáhnout výsledků, které jsou přímo úměrné koncentraci stanovované látky. Stanovuje se alespoň pět různých koncentrací v rozmezí 80 – 120 % deklarovaného obsahu, respektive 50 – 150 %. Díky tomu, že se rušivé vlivy u reálných vzorků hodnotí jinými parametry validace, se může pracovat s roztoky standardů. [19]

3.4.7. Robustnost

Robustnost je definována jako míra její schopnosti zůstat neovlivněna při malých změnách jejích parametrů. Robustnost se testuje již během vývoje metody. Cílem robustnosti je upozornit na podmínky, které mohou ovlivnit výsledky analýzy. [23, 38, 39]

3.5. Chromatografické podmínky pro stanovení kyseliny acetylsalicylové kapalinovou chromatografií uvedené v literatuře

Kyselina acetylsalicylová lze stanovit kapalinovou chromatografií několika způsoby (viz Tabulka 1)

Metoda č. 1	
Stacionární fáze	Phenosphere ODS-2 C18 (250 mm x 4,6 mm, 5 µm)
Mobilní fáze	Voda/methanol/ledová kyselina octová 54:45:1
Detekce	254 nm
Úprava vzorku	-
Zdroj literatury	40
Metoda č. 2	
Stacionární fáze	Inertsil ODS-2 (150 mm x 4,6 mm, 5 µm)
Mobilní fáze	Methanol/voda/kyselina fosforečná 85% 40:60:0,2
Detekce	245 nm
Úprava vzorku	-
Zdroj literatury	41
Metoda č. 3	
Stacionární fáze	Bondapak C18 (300 mm x 3,9 mm)
Mobilní fáze	Methanol/voda 35:65 pH upraveno pomocí 10% kys. fosforečné
Detekce	235 nm
Úprava vzorku	-
Zdroj literatury	42
Metoda č. 4	
Stacionární fáze	Nucleosil 100-10 C18 (250 mm x 4 mm, 10 µm)
Mobilní fáze	850 ml voda/150 ml acetonitril/2g heptan-1-sulfonát sodný pH=3,4
Detekce	280 nm
Úprava vzorku	-
Zdroj literatury	43

Metoda č. 5	
Stacionární fáze	Silikagel pro chromatografii oktadecylsilylovaný R (5 µm)
Mobilní fáze	Kyselina fosforečná R/acetonitril/voda R (2+400+600)
Detekce	237 nm
Úprava vzorku	-
Zdroj literatury	3

Tabulka 1: Podmínky pro stanovení kyseliny acetylsalicylové kapalinovou chromatografií popsané v literatuře

4. Experimentální část

4.1. Chemikálie a pomůcky

4.1.1. Chemikálie

- Acifein, Herbacos Recordati s.r.o, Česká republika
- Acylcoffin, Slovakofarma, Slovensko
- Acylpyrin, Galmed, Biomedica, Česká republika
- kyselina salicylová, Penta, Česká republika
- kyselina acetylsalicylová, Biomedica, Česká republika
- 3-nitrofenol, Fluka AG, Švýcarsko
- kofein, Penta, Česká republika
- paracetamol, Dr. Kulich Pharma, Česká republika
- kyselina fosforečná, Sigma Aldrich, Německo
- amoniak sodný roztok 25-29%, Penta, Česká republika
- acetonitril, chromasolv gradient grade for HPLC, Sigma Aldrich, Německo
- kyselina mravenčí, ACS reagent, Sigma Aldrich, Německo
- kyselina chlorovodíková, Penta, Česká republika
- voda čištěná

4.1.2. Sestava pro HPLC

- kontrolní jednotka: CTO-20 AC VP Shimadzu
- čerpadlo: LC-20 AD XR VP Shimadzu
- degasér: DGU-20 A₃ VP Shimadzu
- termostat kolony: CTO-20 AS VP Shimadzu
- PC program: Shimadzu-CLASS-VP 5
- UV-VIS detektor: SPD-20A VP Shimadzu

- autosampler: SIL-20 AC XR VP Shimadzu
- řídicí jednotka: CBM-20A VP Shimadzu
- chromatografická kolona: Phenomenex 100 x 4,6 mm, Onyx monolithic C8
- elektrochemický detektor: Coulochem III, esa
- pumpa: Guard cell 5020

4.1.3. Přístroje

- digitální váhy: Sartorius AG typ A200S, Německo
- pH-metr: SCHOTT CG 843, Schott Instruments GmbH, Německo
- magnetické míchadlo s míchadélky, IKA Color Squid, Německo

4.1.4. Pomůcky

- kádinky, odměrné baňky, odměrné válce, dělené pipety, balónek k pipetě, zkumavky, stojan na zkumavky, vialky, laboratorní lžičky, stříčka, injekční jehla, membránový filtr 0,22 μm , membránový filtr 0,45 μm , alobal

4.2. Příprava roztoků

4.2.1. Příprava standardů

Standardní roztok kyseliny salicylové:

Do 10 ml odměrné baňky byl navážen 1 mg kyseliny salicylové. Navážka byla rozpuštěna ve 100 % acetonitrilu. Objem baňky byl doplněn acetonitrilem po rysku a důkladně promíchán (základní roztok). Z tohoto roztoku (100 µg/ml) bylo odebráno 0,1 ml do 100 ml baňky. Tato baňka byla doplněna vodou po rysku a důkladně promíchána. Tento roztok (100ng/ml) byl nastříknut na kolonu.

Standardní roztok kyseliny acetylsalicylové:

Do 10 ml odměrné baňky byl navážen 1 mg kyseliny acetylsalicylové. Tato navážka byla rozpuštěna ve 100 % acetonitrilu. Objem baňky byl doplněn acetonitrilem po rysku a důkladně promíchán (základní roztok). 0,1 ml tohoto roztoku (100 µg/ml) bylo odebráno do 100 ml baňky. Baňka byla doplněna vodou po rysku a důkladně promíchána (100 ng/ml). Roztok byl nastříknut na kolonu.

Standardní roztok 3-nitrofenolu:

Do 10 ml odměrné baňky byl navážen 1 mg 3-nitrofenolu a rozpuštěn ve 100 % acetonitrilu. Objem baňky byl doplněn acetonitrilem po rysku a řádně promíchán (základní roztok). 0,1 ml tohoto roztoku (100 µg/ml) bylo doplněno vodou do 100 ml baňky po rysku (100 ng/ml). Roztok byl nastříknut na kolonu.

Standardní roztok kofeinu:

1 mg kofeinu byl navážen do 10 ml odměrné baňky a rozpuštěn ve 100 % acetonitrilu. Objem baňky byl doplněn acetonitrilem po rysku a řádně promíchán (základní roztok). Z tohoto roztoku bylo odebráno 200 µl (20 µg/ml) a doplněno vodou do 100 ml baňky po rysku (0,2 µg/ml). Roztok byl promíchán a nastříknut na kolonu.

Standardní roztok paracetamolu:

1 mg paracetamolu byl navážen do 10 ml odměrné baňky, navážka byla rozpuštěna ve 100 % acetonitrilu. Objem baňky byl doplněn acetonitrilem po rysku, řádně promíchán (základní roztok). 200 µl tohoto roztoku (20 µg/ml) bylo odebráno do 100 ml baňky a doplněno vodou po rysku (0,2 µg/ml). Po promíchání byl roztok nastříknut na kolonu.

Směs standardních roztoků kyseliny salicylové, kyseliny acetylsalicylové a 3-nitrofenolu:

1 ml základního roztoku kyseliny salicylové, kyseliny acetylsalicylové a 3-nitrofenolu byl odebrán do 5 ml odměrné baňky a doplněn vodou po rysku (20 µg/ml). Z tohoto roztoku bylo odebráno 0,1 ml do 10 ml odměrné baňky a doplněno vodou po rysku (0,2 µg/ml). Baňka byla řádně promíchána a roztok byl nastříknut na kolonu.

Směs standardních roztoků kyseliny salicylové, kyseliny acetylsalicylové, 3-nitrofenolu, kofeinu a paracetamolu:

Z každého standardního roztoku bylo odebráno 200 µl do 100 ml odměrné baňky a doplněno vodou po rysku. Po důkladném promíchání byl roztok nastříknut na kolonu.

4.2.2. Příprava fosfátového pufru

Příslušné množství kyseliny fosforečné bylo naředěno příslušným množstvím vody (viz Tabulka 2). Objem baňky byl důkladně promíchán. Pomocí 4 % amoniaku bylo upraveno pH na hodnotu 2,5.

Molarita	Množství H₃PO₄	Množství H₂O
5mM	0,052 ml	200 ml
20 mM	0,2074 ml	199,8 ml
50 mM	0,52 ml	199,5 ml
75 mM	0,78 ml	199,2 ml
100 mM	1,04 ml	199 ml

Tabulka 2: Příprava fosfátového pufru

4.2.3. Příprava mobilních fází

Fosfátový pufr o daném pH byl smíchán s acetonitrilem v jednotlivých poměrech. Výsledný roztok byl přefiltrován přes mikrofiltr 0,45 µm.

4.2.4. Příprava vzorků

Vzorek Acifein v 50 % acetonitrilu:

K 0,0262 g Acifeinu bylo přidáno 20 ml 50 % acetonitrilu. Roztok byl důkladně promíchán a část tohoto roztoku byla přefiltrována. Z filtrátu bylo odebráno 200 µl do 10 ml odměrné baňky, bylo přidáno 10 µl základního roztoku 3-nitrofenolu. Baňka byla doplněna 25 % acetonitrilem po rysku, roztok byl řádně promíchán a nastříknut na kolonu.

Vzorek Acifein v rozpouštědle (0,1 M kyselina chlorovodíková : acetonitril 50 : 50, kyselina mravenčí : acetonitril 1 : 99):

K navážce Acifeinu 0,0441 g bylo přidáno 25 ml rozpouštědla (0,1 M HCl : ACN 50 : 50, HCOOH : ACN 1 : 99), tento roztok byl promíchán a část byla přefiltrována. Z filtrátu byl odebrán 1 ml do 10 ml odměrné baňky, dále bylo přidáno 10 µl základního roztoku 3-nitrofenolu a doplněno 25 % acetonitrilem po rysku. Po promíchání byl roztok nastříknut na kolonu.

Vzorek Acylpyrin v 50 % acetonitrilu:

Do kádinky bylo naváženo 0,0262 g Acylpyrinu přidáno 20 ml rozpouštědla (50 % acetonitril). Roztok byl důkladně promíchán a přefiltrován. Do 10 ml odměrné baňky bylo odebráno 200 µl filtrátu, poté bylo přidáno 10 µl základního roztoku 3-nitrofenolu a baňka byla doplněna 25 % acetonitrilem po rysku. Roztok byl promíchán a nastříknut na kolonu.

Vzorek Acylpyrin v rozpouštědle (0,1 M kyselina chlorovodíková : acetonitril v poměru 50 : 50, kyselina mravenčí : acetonitril v poměru 1 : 99):

K navážce Acylpyrinu 0,0199 g bylo přidáno 25 ml rozpouštědla (0,1 M HCl : ACN 50 : 50, HCOOH : ACN 1 : 99). Roztok byl promíchán a přefiltrován. Z filtrátu byl odebrán 1 ml do

10 ml odměrné baňky, k tomu bylo přidáno 10 μ l základního roztoku 3-nitrofenolu a doplněno 25 % acetonitrilem po rysku. Po promíchání byl roztok nastříknut na kolonu.

Vzorek Acylcoffin v 50 % acetonitrilu:

K 0,0262 g Acylcoffinu bylo přidáno 20 ml 50 % acetonitrilu. Roztok byl promíchán a přefiltrován. Z filtrátu bylo odebráno 200 μ l do 10 ml odměrné baňky, přidáno 10 μ l základního roztoku 3-nitrofenolu a baňka byla doplněna 25 % acetonitrilem po rysku. Po promíchání byl roztok nastříknut na kolonu.

Vzorek Acylcoffin v rozpouštědle (0,1 M kyselina chlorovodíková : acetonitril 50 : 50, kyselina mravenčí : acetonitril 1 : 99):

Navážka Acylcoffinu 0,0220 g byla přidána k 25 ml rozpouštědla (0,1 M HCl : ACN 50 : 50, HCOOH : ACN 1 : 99), roztok byl promíchán a část byla přefiltrována. 1 ml filtrátu byl odebrán do 10 ml odměrné baňky, k filtrátu se přidalo 10 μ l základního roztoku 3-nitrofenolu a baňka byla doplněna po rysku 25 % acetonitrilem. Baňka byla promíchána a roztok byl nastříknut na kolonu.

Vzorek kyseliny salicylové pro měření správnosti:

Do 50 ml odměrné baňky bylo naváženo 24,88 mg kyseliny salicylové, doplněno acetonitrilem po rysku a řádně promícháno (0,4975 mg/ml). Z tohoto roztoku byl odebrán 1 ml do 100 ml odměrné baňky a baňka byla doplněna rozpouštědlem 0,1 M kyselina chlorovodíková : acetonitril v poměru 50 : 50. Baňka byla promíchána.

4.3. Chromatografické podmínky

4.3.1. Výchozí nastavení chromatografických podmínek

Všechna měření probíhala na koloně Onyx monolithic C8 s tímto nastavením chromatografu:

- Mobilní fáze fosfátový pufr (5mM, 20 mM, 50 mM, 75 mM, 100 mM, pH=2,5) : ACN
- Teplota na koloně: 25 °C
- Průtok: 1,0 ml/min
- Injikovaný objem: 10 µl
- Elektrický potenciál: $E_1= 300 \text{ mV}$, $E_2= 850 \text{ mV}$
 $E_1= 300 \text{ mV}$, $E_2= 900 \text{ mV}$
- Rozsah: 1 µA, 5 µA , 10 µA, 50 µA

4.3.2. Příprava kapalinového chromatografu před měřením

Před každým prvním měřením a při jakékoliv změně mobilní fáze byl chromatograf řádně propláchnut mobilní fází. Aby byla dostatečná ekvilibrace přístroje, systémem se nechala alespoň 45 minut protékat volně mobilní fáze – kratší doba se pro ustálení základní linie jevila jako nedostatečná.

4.3.3. Optimalizace podmínek

Mobilní fáze byla složená ze směsi fosfátového pufru a acetonitrilu. Byly zkoumány různé koncentrace a poměry mobilních fází. Nejprve byla použita 20 mM mobilní fáze skládající se z fosfátového pufru o pH 2,5 a acetonitrilu v poměru 75 : 25 při průtoku 1 ml/min, při teplotě 25 °C a elektrických potenciálech $E_1= 300 \text{ mV}$, $E_2= 850 \text{ mV}$. Hodnota pH byla upravována pomocí amoniaku. Poté byla testována 50 mM mobilní fáze tvořená fosfátovým pufrem o pH 2,5 a acetonitrem v poměru 75 : 25 při stejném průtoku i stejné teplotě ale při elektrickém potenciálu $E_1= 300 \text{ mV}$, $E_2= 900 \text{ mV}$ a $E_1= 300 \text{ mV}$, $E_2= 850 \text{ mV}$. Dále byla použita 5 mM, 100 mM a 75 mM mobilní fáze ve stejném složení a poměru jako předchozí mobilní fáze, s elektrickým potenciálem $E_1= 300 \text{ mV}$, $E_2= 850 \text{ mV}$. Jako další byly testovány 50 mM mobilní

fáze fosfátového pufru o pH 2,5 a acetonitrilu v poměru 85 : 15 a 80 : 20 s elektrickým potenciálem jako předchozí mobilní fáze. Díky zjištěným poznatkům o tvaru píků standardních roztoků byla použita u jednotlivých vzorků 50 mM mobilní fáze fosfátového pufru o pH 2,5 a acetonitrilu v poměru 80 : 20 při průtoku 1 ml/min a při teplotě 25 °C.

Vzorky Acifeinu, Acylcoffinu a Acylpyrinu byly rozpuštěny ve 3 různých rozpouštědlech:

- 50 % acetonitril
- směs 0,1 M kyseliny chlorovodíkové a acetonitrilu v poměru 50 : 50
- směs kyseliny mravenčí a acetonitrilu v poměru 1 : 99.

4.4. Validace analytických metod

4.4.1. Přesnost

Přesnost metody byla provedena na reálném vzorku tablet Acylpyrinu Galmed. Z 10 rozdrcených tablet byly připraveny vzorky postupem uvedeným na str. 37. Vzorek byl šestkrát analyzován celým postupem včetně přípravy vzorku. Relativní směrodatnou odchylkou bude vyjádřena přesnost těchto šesti měření.

Ø hmotnost 1 tablety Acylpyrinu: 0,6007 g

4.4.2. Správnost

Správnost metody byla ověřena na 6 modelových vzorcích jednotlivě připravených. K navážce kyseliny salicylové byla přidána navážka placebo. Postupem uvedeným na str. 37 byly roztoky připraveny a analyzovány.

4.4.3. Linearita

Pro linearitu byla použita metoda vnitřního standardu, jako vnitřní standard byl použit 3-nitrofenol. Kalibrační křivka byla sestavena z 5 vzorků. Příslušné množství kyseliny salicylové a příslušné množství 3-nitrofenolu bylo odměřeno do 10 ml baňky, doplněno vodou po rysku a řádně promícháno. Koncentrace kyseliny salicylové se postupně zvyšovala (1 ng/ml, 6 ng/ml, 12 ng/ml, 15 ng/ml, 18 ng/ml), koncentrace vnitřního standardu 3-nitrofenolu byla stále stejná - 15 ng/ml. Každý roztok byl nastříknut třikrát. Z naměřených hodnot byla vypočtena průměrná hodnota plochy píku pro každou koncentraci. Výsledky měření jsou uvedeny v tabulce 5.

Koncentrace (c)	Množství kys. salicylová	Množství 3-nitrofenol
1 ng/ml	0,1 ml	1,5 ml
6 ng/ml	0,6 ml	1,5 ml
12 ng/ml	1,2 ml	1,5 ml
15 ng/ml	1,5 ml	1,5 ml
18 ng/ml	1,8 ml	1,5 ml

Tabulka 3: Příprava vzorků pro linearitu

4.4.4. Selektivita

Selektivita byla ověřena na jiné HPLC sestavě Shimadzu s UV detekcí u vzorku směsi standardních roztoků kyseliny acetylsalicylové, kyseliny salicylové, 3-nitrofenolu, paracetamolu a kofeinu. Dále také u vzorků tablet Acylpyrinu, Acylcoffinu a Acifeinu v 50 % acetonitrilu.

- Kolona: Onyx monolithic C8
- Mobilní fáze: fosfátový pufr (50 mM, pH 2,5) : acetonitril v poměru 80 : 20
- Teplota na koloně: 25 °C
- Průtok: 1,0 ml/min
- Detekce: 237 nm
- Injikovaný objem: 10 µl

Sestava pro HPLC s UV detekcí:

- kontrolní jednotka: CTO-20AC VP Shimadzu
- čerpadlo: LC-20AD XR VP Shimadzu
- degasér: DGU-20A3 VP Shimadzu
- termostat kolony: CTO-20AS VP Shimadzu
- PC program: Shimadzu LC Solution
- UV-VIS detektor: SPD-20A VP Shimadzu
- autosampler: SIL-20AC XR VP Shimadzu
- řídicí jednotka: CBM-20A VP Shimadzu

4.4.5. Robustnost

Byla testována změna hodnoty pH mobilní fáze o +/- 0,05 ve složení fosfátový pufr pH 2,5 : 100 % acetonitril v poměru 80 : 20.

4.4.6. Stabilita

U vzorku tablet Acylpyrinu připravených v 50 % acetonitrilu a vzorku Acylpyrinu v rozpouštědle 0,1M kyselina chlorovodíková : acetonitril (50 : 50) byla sledována stabilita za laboratorní teploty a za přístupu světla. Oba roztoky byly nastříknuty na kolonu 3krát za 48 hodin.

4.4.7. Kvantitativní limit (LOQ), detekční limit (LOD)

Na kolonu byl nastříknut roztok kyseliny salicylové o koncentraci 0,0001 µg/ml. Roztok byl graficky vyhodnocen z chromatografického záznamu. Detekční limit (LOD) kyseliny salicylové byl určen jako poměr signálu k šumu s hodnotou 3, kvantitativní limit (LOQ) s hodnotou 10.

5. Výsledky a diskuze

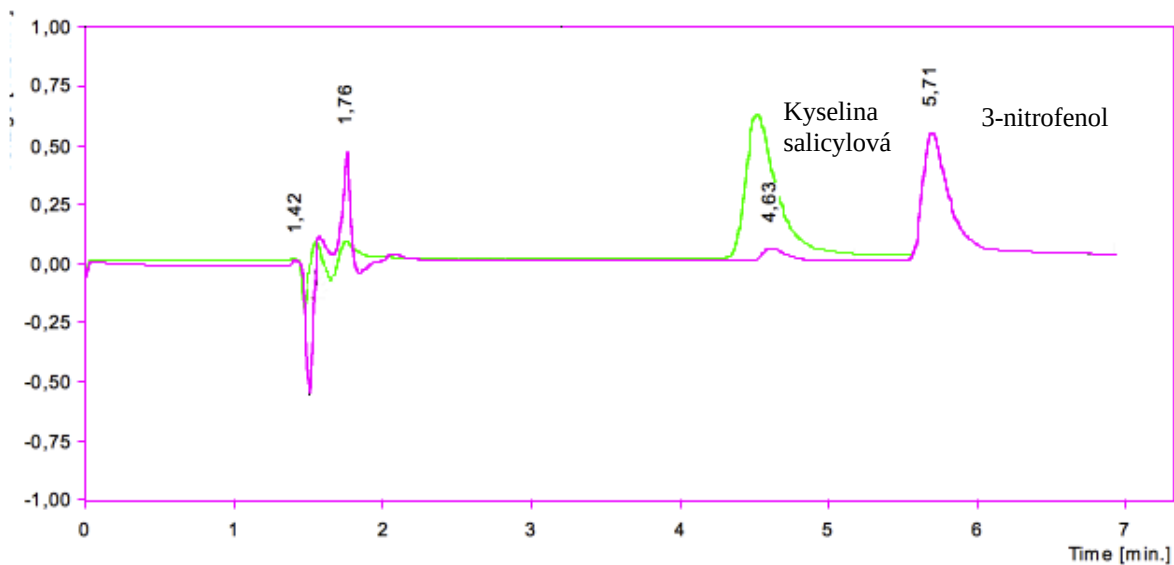
5.1. Výběr chromatografických podmínek

Výběr chromatografických podmínek pro stanovení kyseliny salicylové jako hlavního rozkladného produktu kyseliny acetylsalicylové vycházel z již navržených podmínek složení mobilní fáze. Výchozí podmínky byly: mobilní fáze složená z 20 mM fosfátového pufru o pH 2,5 : acetonitril v poměru 75 : 25. Píky standardních roztoků kyseliny salicylové a 3-nitrofenolu byly v tomto případě z důvodu výrazného chvostování píků nevyhovující.

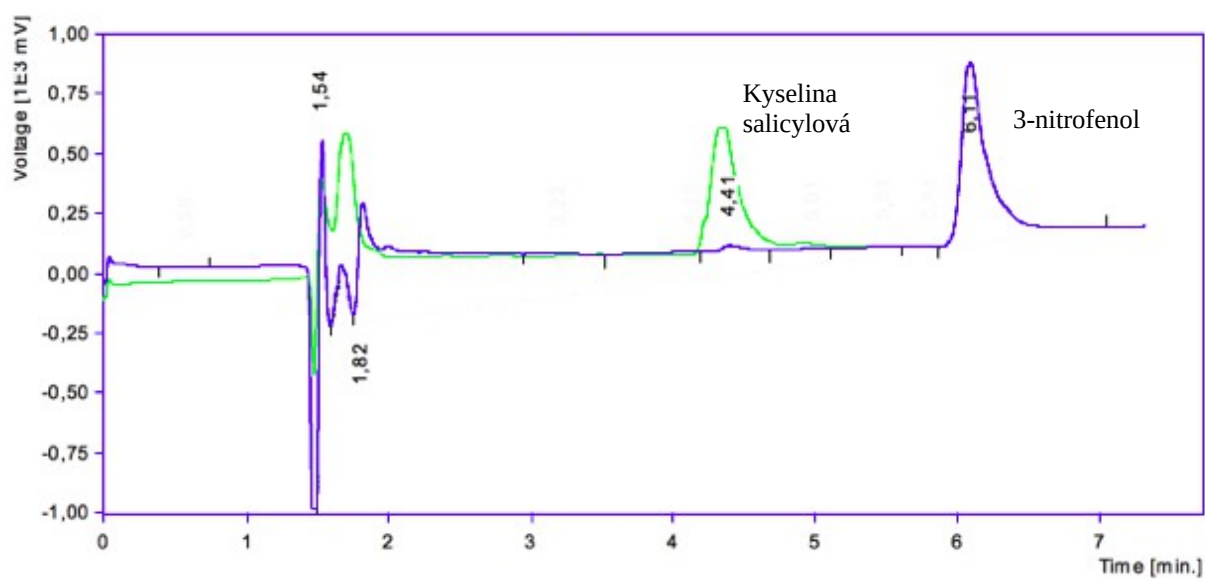
Byly testovány jiné koncentrace fosfátového pufru: 50 mM, 5 mM, 100 mM a 75 mM stejného složení a poměru jako výchozí mobilní fáze. Dále byly zkoušeny různé poměry acetonitrilu a 50 mM fosfátového pufru o pH 2,5. Ze získaných poznatků o tvaru píků a retenčních časů standardních roztoků kyseliny salicylové a 3-nitrofenolu v jednotlivých mobilních fázích byla vybrána mobilní fáze: 50 mM fosfátový pufr o pH 2,5 : acetonitril v poměru 80 : 20.

Vybrané chromatografické podmínky detekce:

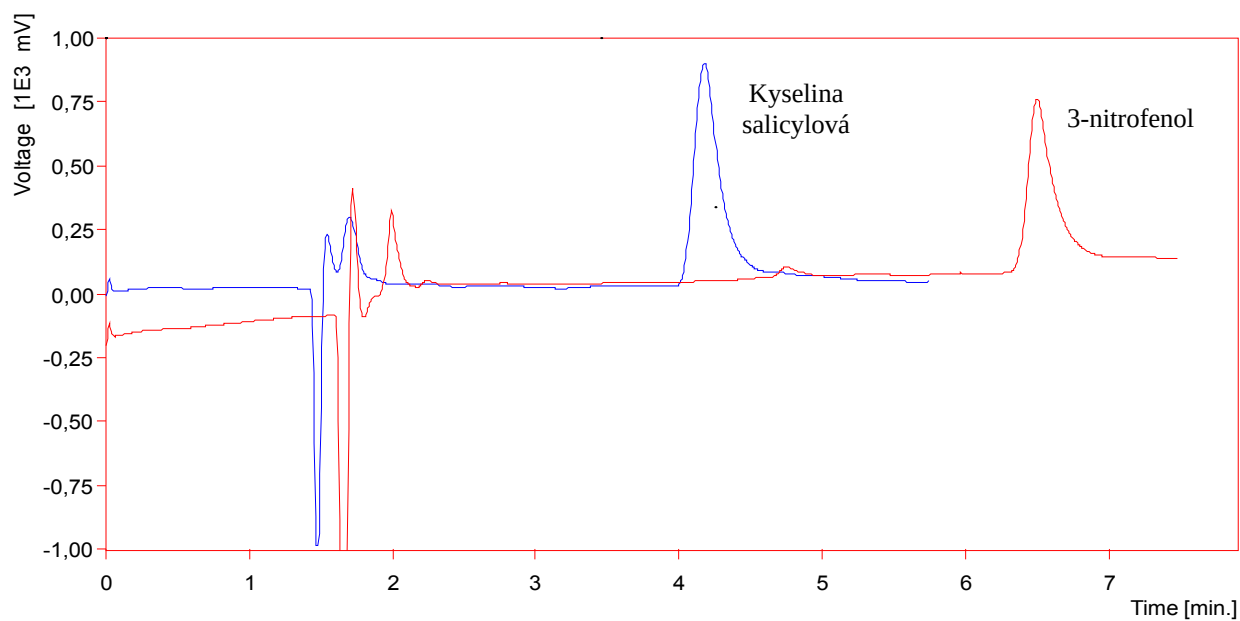
- Mobilní fáze: 50 mM fosfátový pufr o pH 2,5 : acetonitril 80:20
- Teplota na koloně: 25 °C
- Průtok: 1,0 ml/min
- Injikovaný objem: 10 μ l
- Elektrický potenciál: $E_1= 300$ mV, $E_2= 850$ mV



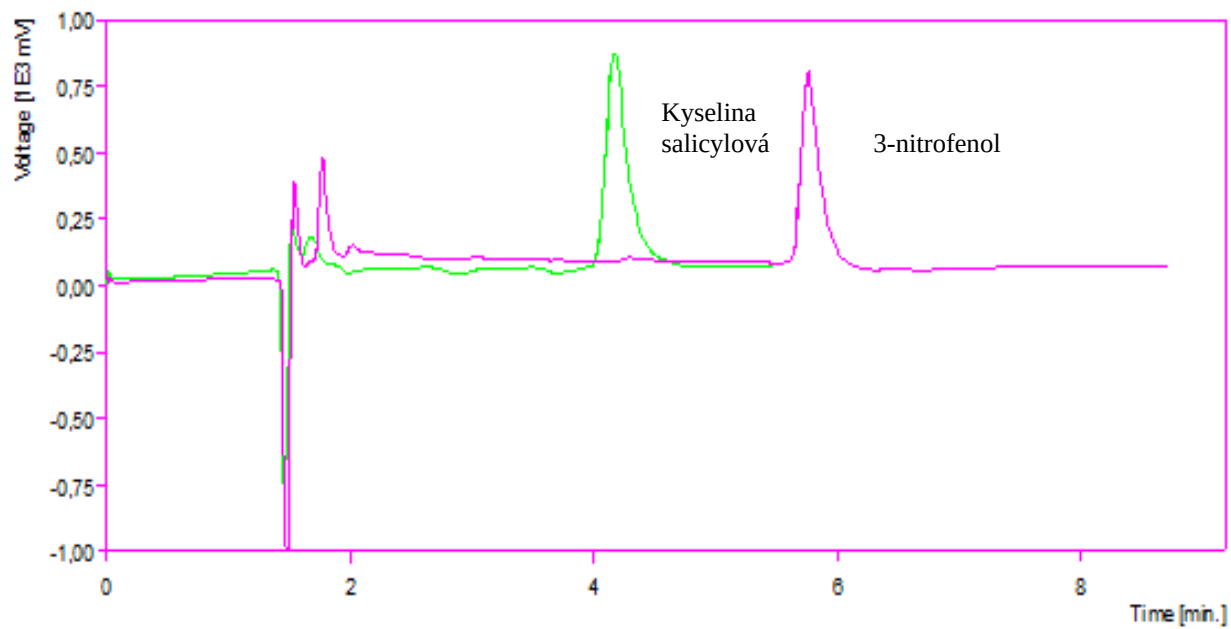
Obr. 10: 5 mM mobilní fáze v poměru 75 : 15



Obr. 11: 100 mM mobilní fáze v poměru 75 : 15



Obr. 12: 75 mM mobilní fáze v poměru 75 : 15



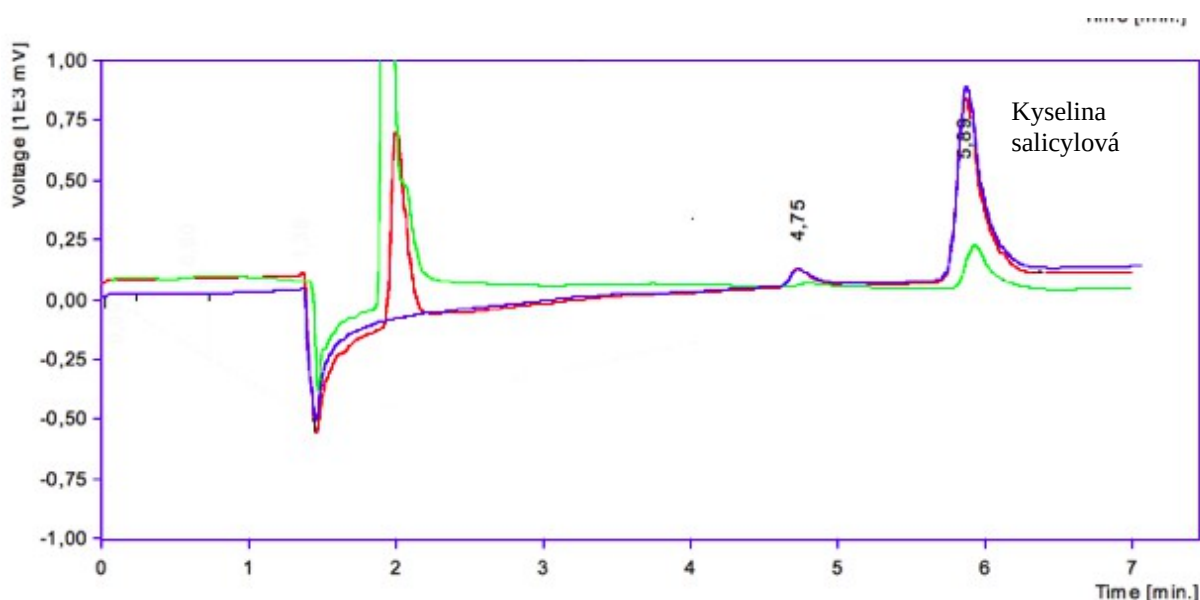
Obr. 13: 50 mM mobilní fáze v poměru 80 : 20

5.2. Výběr vhodného rozpouštědla

Byly zkoušeny různé druhy rozpouštědel ve složení:

- voda : acetonitril v poměru 50 : 50
- 0,1 M kyselina chlorovodíková : acetonitril 50 : 50
- kyselina mravenčí : acetonitril 1 : 99

Žádné z uvedených rozpouštědel výrazně neovlivnilo analýzu vzorků Acylpyrinu, Acylcoffinu a ani Acifeinu. V případě rozpouštědla kyseliny mravenčí : acetonitrilu byl pík ve 4. minutě z rozpouštědla. Nadále se používalo rozpouštědlo 0,1 M kyselina chlorovodíková : acetonitril (50 : 50). V tomto rozpouštědle byly vzorky tablet stabilnější oproti 50 % acetonitrilu.



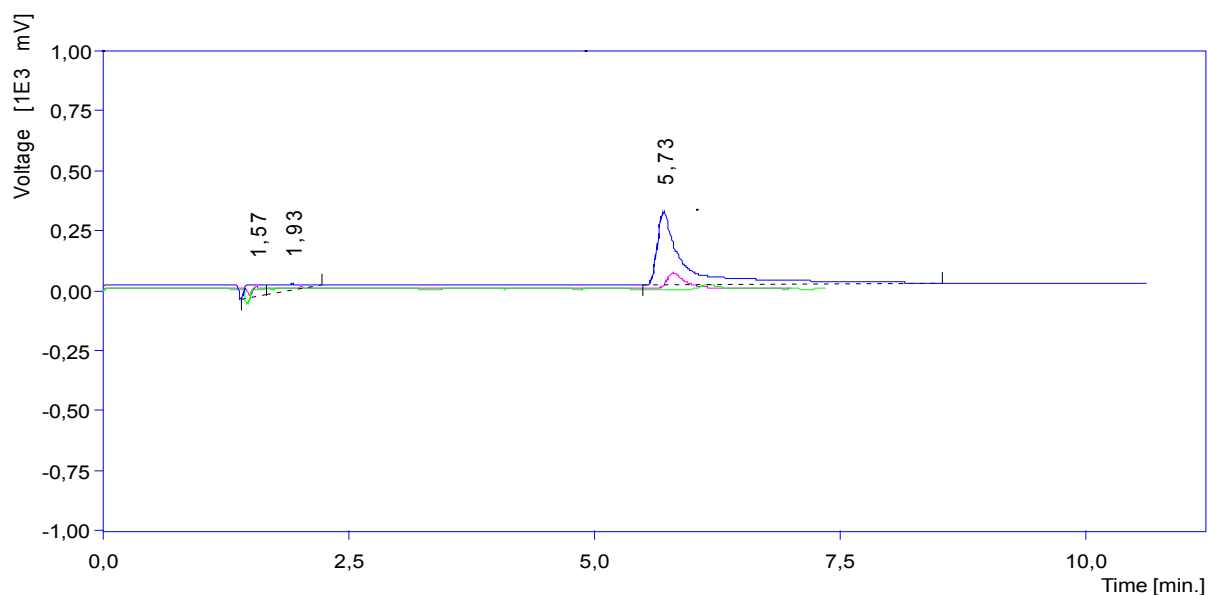
Obr. 14: Vzorky tablet v rozpouštědle 0,1 M kyselina chlorovodíková : acetonitril v poměru 50 : 50

modrá – Acylpyrin

červená – Acylcoffin

zelená – 100krát zředěný Acifein – vzorek tablet Acifeinu musel být zředěn kvůli rozsahu.

V rozpouštědle 50 % acetonitril a v 0,1M kyselina chlorovodíková : acetonitril (50 : 50) byla testována stabilita vzorku tablet Acylpyrinu 3krát po dobu 48 hodin. (viz Tabulka 4)



Obr. 15: Nástřik vzorku tablet Acylpyrinu v 50 % acetonitrilu jednou za 24 hodin po dobu 3 dnů

Vzorek Acylpyrinu v 50 % acetonitrilu	Čas	A _{st} (SA)	% SA	Vzorek Acylpyrinu v rozpouštědle 0,1 M HCl:ACN	Čas	A _{st} (SA)	% SA
	0 hod	139,88	0,001		0 hod	282,46	0,002
	24 hod	692,73	0,005		24 hod	558,43	0,004
	48 hod	6230,34	0,043		48 hod	2084,04	0,014

Tabulka 4: Změna plochy kyseliny salicylové v čase

Stabilita byla stanovována na vnější standard. Plocha píku kyseliny salicylové se výrazně zvyšovala v rozpouštědle 50 % acetonitril. V 50 % acetonitrilu docházelo k rychlejšímu rozkladu kyseliny acetylsalicylové na kyselinu salicylovou, proto bylo pro další rozpouštění tablet zvoleno rozpouštědlo 0,1 M kyselina chlorovodíková : acetonitril (50 : 50).

5.3. Přesnost

Vzorek číslo	Navážka přípravku (mg)	Kyselina salicylová (%)
1	20,0	0,141
2	20,4	0,138
3	19,3	0,146
4	18,9	0,149
5	20,9	0,135
6	21,2	0,133
Průměr		0,140
Relativní směrodatná odchylka (%)		4,62

Tabulka 5: Přesnost

RSD = 4,62 %

Relativní směrodatná odchylka pro příbuzné látky u přípravků by neměla být větší než 7 %.

Přesnost byla potvrzena.

5.4. Správnost

Bylo připraveno 6 vzorků následujícím postupem:

K navážce placebo 3,32 mg bylo přidáno 5 ml roztoku kyseliny salicylové pro správnost do 25 ml odměrné baňky a doplněno rozpouštědlem 0,1 M kyselina chlorovodíková : acetonitril v poměru 50 : 50. Roztok byl protřepán a přefiltrován. Z filtrátu byl odebrán 1 ml do 10 ml odměrné baňky, k tomu bylo přidáno 10 µl základního roztoku 3-nitrofenolu a doplněno 25 % acetonitrilem po rysku. Po promíchání byl roztok nastříknut na kolonu.

Vzorek	Navážka placebo (mg)	Přidané množství kyseliny salicylové (ng/ml)	Naměřené množství kyseliny salicylové (ng/ml)	Recovery (%)
1	3,36	99,5	92,46	92,92
2	3,34	99,5	103,82	104,34
3	3,31	99,5	96,26	96,74
4	3,38	99,5	94,19	94,66
5	3,34	99,5	107,53	108,07
6	3,39	99,5	110,22	110,77
			Průměr	101,25

Tabulka 6: Správnost

Takové množství placebo odpovídá 16,58 mg kyseliny acetylsalicylové na navážku 0,0199 g tabletoviny. Kyselina acetylsalicylová nebyla přidávána, protože by docházelo k uvolňování kyseliny salicylové a ke zkreslení výsledků.

Povolený limit je 85 – 115 %, správnost vyhovuje.

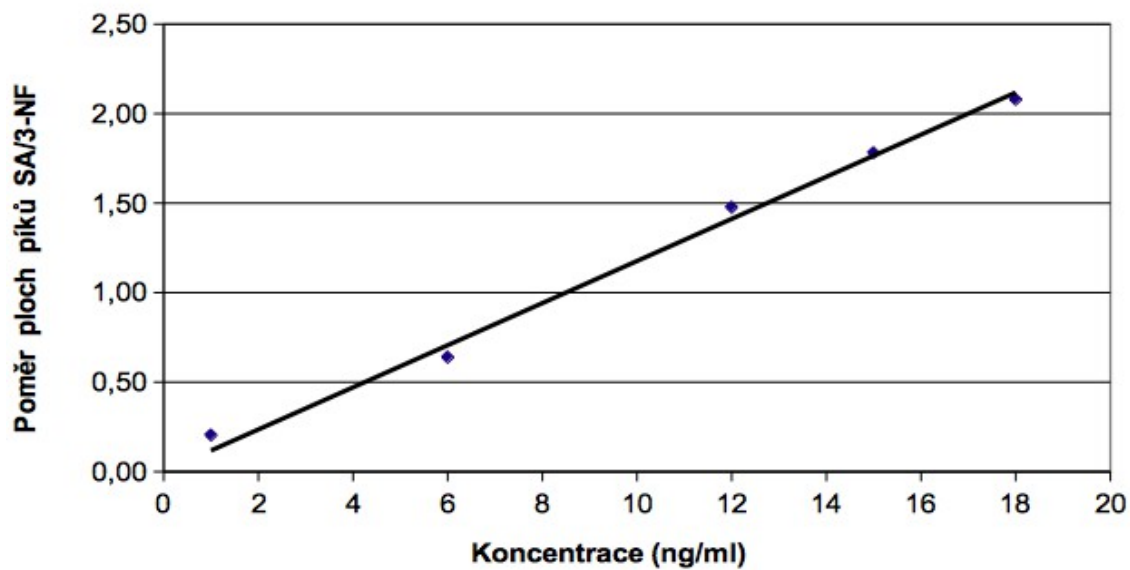
5.5. Linearita

1 ng/ml	A (SA)	118,07	122,03	116,31			
	A (3-NF)	559,54	600,26	588,46			
Poměr ploch	SA/3-NF	0,2110	0,2033	0,1976		Průměr:	0,2040
6 ng/ml	A (SA)	386,96	350,60	391,33			
	A (3-NF)	596,84	584,15	586,10			
Poměr ploch	SA/3-NF	0,6483	0,6002	0,6677		Průměr:	0,6387
12 ng/ml	A (SA)	869,17	882,17	861,10			
	A (3-NF)	593,35	583,32	592,31			
Poměr ploch	SA/3-NF	1,4649	1,5123	1,4538		Průměr:	1,4770
15 ng/ml	A (SA)	1062,43	1076,95	1018,41			
	A (3-NF)	588,90	590,85	593,70			
Poměr ploch	SA/3-NF	1,8041	1,8227	1,7154		Průměr:	1,7807
18 ng/ml	A (SA)	1155,18	1083,87	1142,76			
	A (3-NF)	585,86	533,38	511,61			
Poměr ploch	SA/3-NF	1,9718	2,0321	2,2337		Průměr:	2,0792

Tabulka 7: Linearita

SA – kyselina salicylová

3-NF – 3-nitrofenol



Obr. 16: Graf kalibrační křivky

Determinační koeficient: 0,9982

Korelační koeficient: 0,9991

Rovnice kalibrační přímky: $y = 0,1176659519 x$

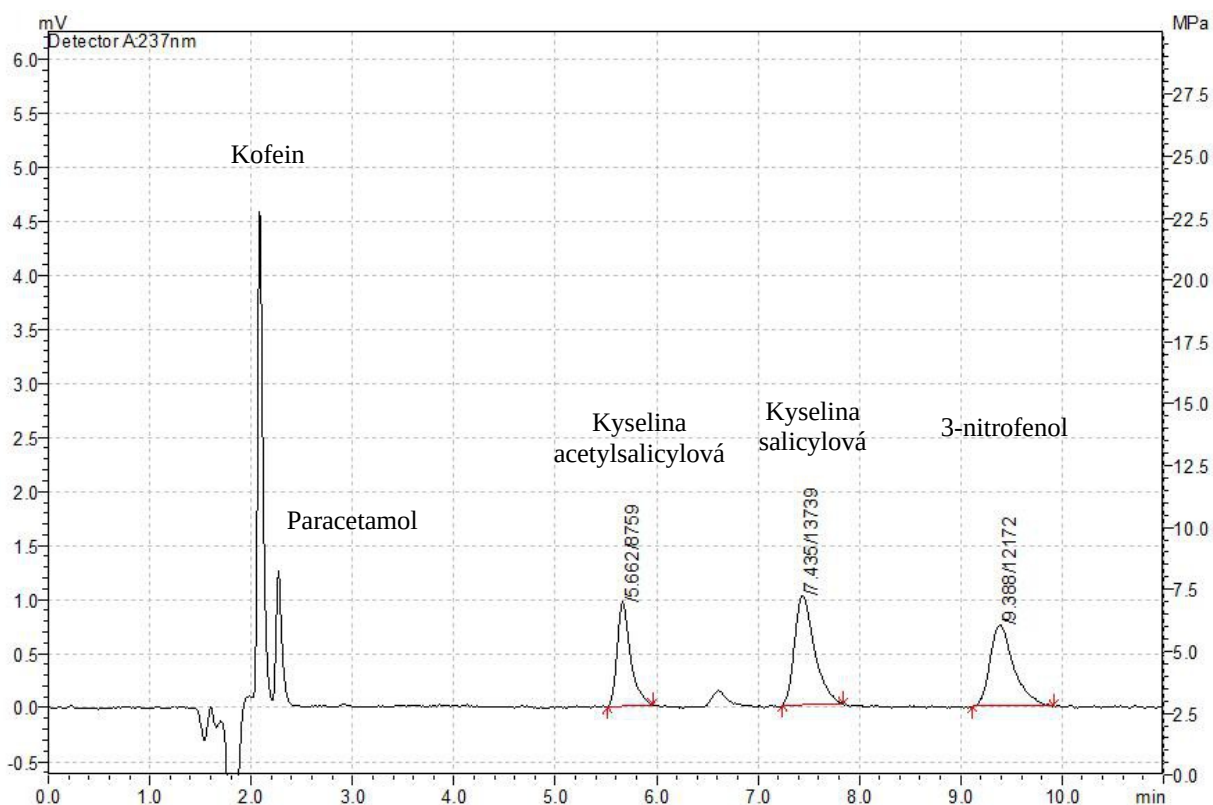
Linearita splňuje požadavky validace, korelační koeficient je větší než 0,99.

5.6. Selektivita

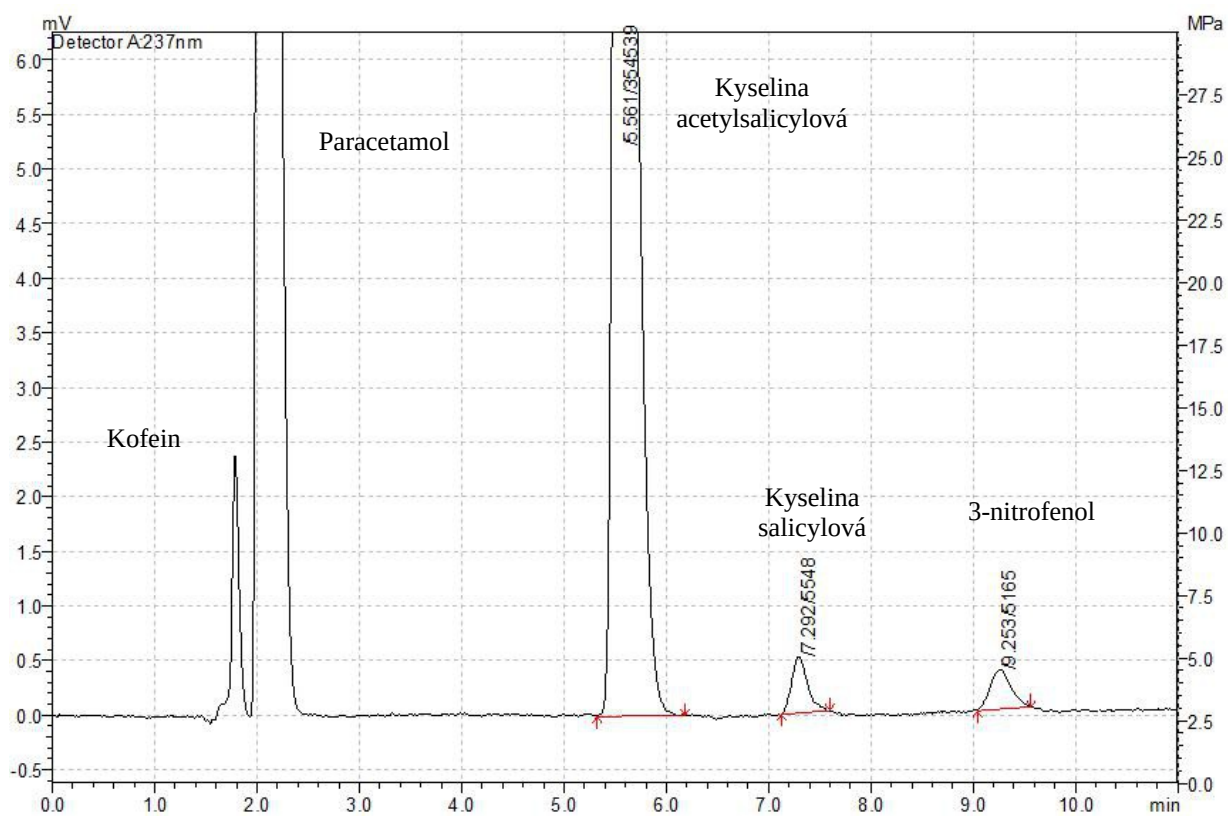
Selektivita byla hodnocena stejnou metodou, pouze jiným způsobem detekce, na HPLC sestavě Shimadzu LC 20 Prominence s UV detekcí.

Podmínky detekce:

- Kolona: Onyx monolithic C8
- Mobilní fáze: fosfátový pufr (50 mM, pH 2,5) : acetonitril v poměru 80 : 20
- Teplota: 25 °C
- Průtok: 1,0 ml/min
- Detekce: 237 nm
- Injekovaný objem: 10 µl



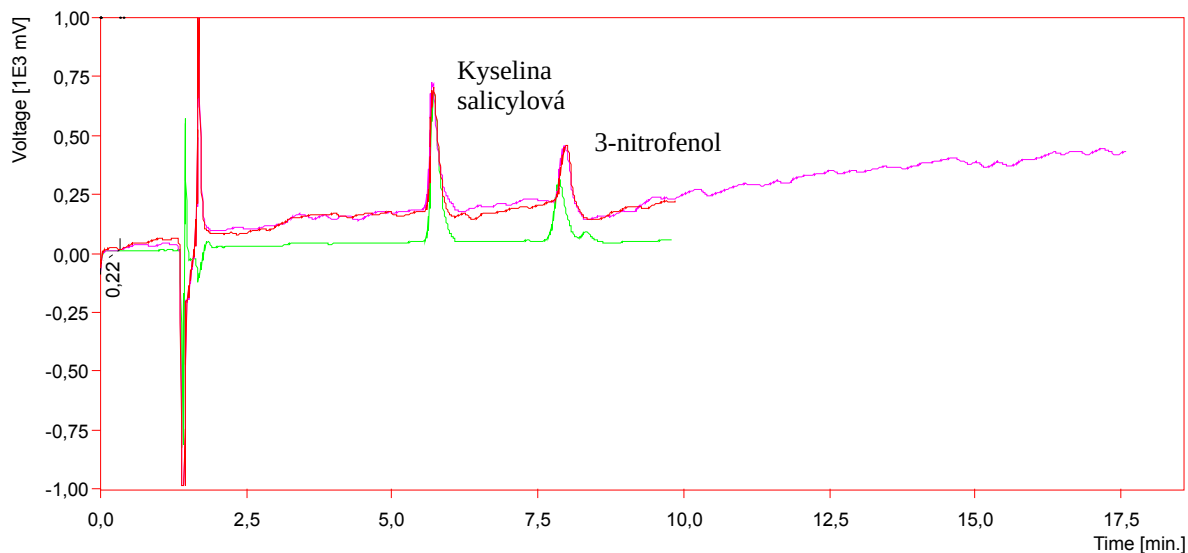
Obr. 17: Směs standardních roztoků kyseliny acetylsalicylové, salicylové, 3-nitrofenolu, kofeinu, paracetamolu



Obr. 18: Nástřik Acifeinu

Jiným způsobem detekce se potvrdilo, že spolu píky neinterferují.

5.7. Robustnost



Obr. 19: Standardní směs kyseliny salicylové a 3-nitrofenolu při změně pH

Změnou složení mobilní fáze nebyla ovlivněna doba analýzy. U všech mobilních fází došlo k separaci obou složek vzorku. Metoda je z hlediska pH robustní, změna hodnoty pH mobilní fáze o +/- 0.05 neovlivnila retenci látek.

červená – pH 2,5

růžová – pH 2,45

zelená – pH 2,55

5.8. Kvantitativní limit (LOQ), detekční limit (LOD)

Byl vypočítán kvantitativní limit (LOQ) a detekční limit (LOD) pro kyselinu salicylovou. Detekční limit (LOD) kyseliny salicylové byl určen jako poměr signálu k šumu s hodnotou 3.

$$\text{LOD}_{\text{SA}} = 0,36 \text{ ng/ml}$$

Kvantitativní limit (LOQ) byl určen jako poměr signálu k šumu s hodnotou 10.

$$\text{LOQ}_{\text{SA}} = 1,20 \text{ ng/ml}$$

6. Závěr

1. Byly zpracovány literární zdroje týkající se kyseliny salicylové, kyseliny acetylsalicylové a vysokoučinné kapalinové chromatografie.
2. Byla optimalizována vhodná metoda pro stanovení kyseliny salicylové v léčivém přípravku pomocí HPLC.
3. Pro stanovení kyseliny salicylové z léčivého přípravku byla vybrána metoda s použitím 50 mM mobilní fáze o složení fosfátový pufr (pH 2,5 - upraveno pomocí 4 % amoniaku) : acetonitril v poměru 80 : 20. Pro hodnocení byla použita monolitická kolona Phenomenex 100 x 4,6 mm, Onyx monolithic C8. Průtok mobilní fáze byl 1 ml/min, teplota 25 °C, vlnová délka byla nastavena na 237 nm, elektrický potenciál $E_1 = 300$ mV, $E_2 = 850$ mV.
4. Byla testována stabilita vzorku ve dvou rozpouštěcích médiích po dobu 72 hodin.
5. Tato metoda byla aplikována na léčivé přípravky Acylpyrin, Acylcoffin a Acifein.
6. Byla ověřena přesnost. Relativní směrodatná odchylka je 4,62 %.
7. Byla ověřena správnost metody. Správnost je 101,25 %.
8. Dále byla ověřena selektivita, robustnost.
9. Byla ověřena linearita v rozmezí koncentrací 1 ng/ml – 18 ng/ml. Korelační koeficient byl 0,9991.
10. Detekční limit je 0,36 ng/ml, kvantifikační limit odpovídá hodnotě 1,20 ng/ml.
11. Tato metoda lze využít pro hodnocení kyseliny salicylové jako nečistoty ve višesložkových přípravcích obsahujících kyselinu acetylsalicylovou.

Abstrakt

Hodnocení biologicky aktivních látek pomocí HPLC V.

Diplomová práce

Denisa Kokošková

Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmaceutické chemie a kontroly léčiv

Byla optimalizována metoda stanovení kyseliny salicylové jako hlavního rozkladného produktu kyseliny acetylsalicylové v tabletách Acylpyrinu, Acylcoffinu a Acifeinu. K hodnocení byla použita vysokoúčinná kapalinová chromatografie s elektrochemickou detekcí. Pro analýzu byla využita monolitická kolona Phenomenex 100 x 4,6 mm, Onyx monolithic C8. Optimalizace a ověření již navržených podmínek elektrochemické detekce bylo zaměřeno na nalezení vhodného složení mobilní fáze a rozpouštědla vzorku. Jako vhodná mobilní fáze byl použit 50 mM roztok fosfátového pufru o pH 2,5 a acetonitrilu v poměru 80 : 20. Průtok kolonou byl 1 ml/min, teplota 25 °C, injikovaný objem 10 µl. Elektrický potenciál byl nastaven na hodnoty $E_1 = 300$ mV, $E_2 = 850$ mV. Rozsah byl 1 µA. Optimalizovaná metoda byla validována, parametry validace byly přesnost, správnost, linearita, selektivita, robustnost, kvantitativní a detekční limit. Byla sledována stabilita vzorku tablet Acylpyrinu po dobu 48 hodin.

Abstract

Determination of the Biologically Active Substances using High Liquid Chromatography

V.

Thesis

Denisa Kokošková

Charles University in Prague, Faculty of Pharmacy in Hradci Králové

Department of Pharmaceutical Chemistry and Drug Control

In this thesis was optimized determination method of salicylic acid, as the main decomposition product, from acetylsalicylic acid, which is presented in Acylpyrin, Acylcoffin and Acifein. For evaluation was used high performance liquid chromatography with electrochemical detection. Through monolithic column was analyzed Phenomenex 100 x 4,6 mm, Onyx monolithic C8. Optimization and verifying of suggested conditions electrochemical detection was focused on exploration of mobile phase and sample dissolvent. Suitable mobile phase was 50mM phosphate buffer liquid (pH 2,5) and acetonitrile in ration 80 : 20. Flowing throw column was 1ml/min, temperature 25°C, injected volume 10 µl. Electrical potential was adjusted to values $E_1 = 300$ mV, $E_2 = 850$ mV. Range was 1 µA. Optimized method was validated, parameters were precision, accuracy, linearity, specificity, robustness, limit of quantitation and limit of detection. The sample stability of Acylpyrin tablets was monitored for 48 hours.

7. Použitá literatura

1. Ťaháky-referáty [online]. 2007 [cit. 2015-11-24]
Dostupné z: <http://referaty.aktuality.sk/hydroxykyseliny/referat-22761>
2. Mojechemie [online]. 2008 [cit. 2015-11-24].
Dostupné z: <http://www.mojechemie.cz/Soubor:Acetylsalicilova.png>
3. Český lékopis 2009: Doplněk 2014. 2014. vyd. Praha: Grada Publishing a.s., 2014.
ISBN 978-80-247-5193-1
4. WebMD [online]. 2005 [cit. 2015-11-24].
Dostupné z: <http://www.webmd.com/drugs/2/drug-18-576/salicylic-acid-topical/salicylicacid6-topical/details#side-effects>
5. Beautyservis [online]. [cit. 2015-11-24].
Dostupné z: <http://www.beautyservis.cz/nejznamejsi-kyseliny-a-jejich-ucinky>
6. Everydayhealth [online]. 2014 [cit. 2015-11-24].
Dostupné z: <http://www.everydayhealth.com/drugs/salicylic-acid-topical>
7. Eluc [online]. 2014 [cit. 2015-11-24].
Dostupné z: <https://eluc.kr-olomoucky.cz/verejne/lekce/2463>
8. Wikipedie [online]. 2015 [cit. 2015-11-26].
Dostupné z: https://cs.wikipedia.org/wiki/Kyselina_acetylsalicilová
9. Olecich [online]. 2013 [cit. 2015-11-26].
Dostupné z:
http://www.olecich.cz/uploads/infoLISTY/02570_SUKL_Infolisty_2013_03.pdf
10. PharmDr. Arndt T. Celostnimedica.cz [online]. 2012 [cit. 2015-11-26].
Dostupné z: <http://www.celostnimedica.cz/vrba-bila-salix-alba.htm>
11. Lüllmann H., K. Mohr a L. Hein. Barevný atlas farmakologie. Grada Publishing a.s. 2007. 372 s.
12. Bayer [online]. 2015 [cit. 2015-11-26].
Dostupné z: https://www.bayer.cz/html/pdf/Produkty/Aspirin_Protect_100_Spc.pdf
13. Analýza léčiv [online]. [cit. 2015-12-08].
Dostupné z: <http://anl.zshk.cz/vyuka/separacni-metody.aspx>

14. Nováková, L., M. Douša. Moderní HPLC separace v teorii a praxi. 1. vyd. Hradec Králové: Lucie Nováková, 2013, 235 s. ISBN 978-80-260-4243-3
15. HPLC [online]. [cit. 2015-12-08].
Dostupné z: <http://pioneer.netserv.chula.ac.th/~skitipat/hplc/hplcman.html>
16. Elektrochemické HPLC detektory [online]. [cit. 2015-12-15].
Dostupné z: http://www.hplc.cz/teorie/ec_detector.html
17. Cvačka, J. Detekce ve vysokoúčinné kapalinové chromatografii [online]. 2010 [cit. 2015-12-17].
Dostupné z: <http://web.natur.cuni.cz/~analchem/bosakova/hplc3.pdf>
18. Churáček J., Jandera P.: Úvod do vysokoúčinné kapalinové kolonové chromatografie. SNTL, Praha 1985
19. Klimeš, J. a kol. Kontrolně-analytické hodnocení léčiv lékopisnými metodami; Nucleus: Hradec Králové, 2011. ISBN 978-80-87009-29-1
20. Snyder L.R., J. J. Kirkland, J. L. Glajch., Practical HPLC method development 2nd edition, John Wiley & Sons, Inc., New York 1997.
21. Kazakevich, Y. a R. Lobrutto. HPLC for pharmaceutical scientists [online]. Hoboken, N.J.: Wiley-Interscience, c2007, xxvi, 1104 p. [cit. 2015-12-18]. ISBN 04-716-8162-8
Dostupné z: <http://faculty.ksu.edu.sa/hisham/Documents/eBooks/HPLC%20for%20Pharmaceutical%20Scientists%20%282007%29.pdf>
22. High performance liquid chromatography - hplc [online]. 2007 [cit. 2015-12-19].
Dostupné z: <http://www.chemguide.co.uk/analysis/chromatography/hplc.html>
23. Klimeš, J. Kontrola léčiv II. 1. vyd. Praha: Karolinum, 2004. ISBN 80-246-0818-9
24. Nováková, L., M. Douša. Moderní HPLC separace v teorii a praxi II. 1. vyd. Hradec Králové: Lucie Nováková, 2013, ISBN 978-80-260-4244-0
25. Pacáková V., K. Stulík. Vysokoúčinná kapalinová chromatografie, 1. vyd. Státní pedagogické nakladatelství, Praha 1986, 144 s.
26. Adsorbenty a chemicky vázané fáze [online]. 2010 [cit. 2015-12-27].
Dostupné z: <http://www.hplc.cz/Teorie/adsorbent.html>
27. ZirChrom [online]. 2004 [cit. 2015-12-27].
Dostupné z: <http://www.zirchrom.com/pdf/DRPMDG.pdf>

28. Nawrocki J., C. Dunlap, J. Li, J. Zhao, C.V. McNeff, A. McCormick, P. W. Carr. Part II. Chromatography using ultra-stable metal oxide-based stationary phases for HPLC. 2004, 1028, 31-62. [cit. 2015-27-12].
Dostupné z: https://www.researchgate.net/publication/8690402_Part_II_Chromatography_Using_Ultra-stable_Metal_Oxide-based_Stationary_Phases_for_HPLC
29. Švec F., Chem. Listy 108, 2014, 127-134
30. Švec F. Chem. Listy 98, 2004, 232
31. Chromservis [online]. [cit. 2016-01-05].
Dostupné z: <https://www.chromservis.eu/p/onyx-monolithic-c8-hplc-column-100-x-4-6-mm>
32. Onyx Monolithics HPLC Columns [online]. 2013 [cit. 2016-01-05].
Dostupné z: <https://phenomenex.blob.core.windows.net/documents/2791ff52-0585-4146-9c00-fbb700e390f0.pdf>
33. Lee Robert, Mark Roberts, Alexandre Paccou and Michelle Wood. Development of a new uplc®/ms method for systematic toxicological analysis. 2009. [cit. 2016-01-05].
Dostupné z: http://www.waters.com/webassets/cms/library/docs/development_of_a_new_uplc-ms_method_for_systematic_toxicological_analysis.pdf
34. Nováková L., L. Matysová, P. Solich. Advantages of application of UPLC in pharmaceutical analysis. 2006. [cit. 2016-01-10].
Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18970409>
35. Cvačka, J. Vysokoúčinná kapalinová chromatografie [online]. 2011 [cit. 2016-01-10].
Dostupné z: <http://web.natur.cuni.cz/~analchem/bosakova/hplc1.pdf>
36. Swartz E. Michael, Ph.D. Ultra Performance Liquid Chromatography (UPLC): An Introduction. 2005. [cit. 2016-01-18].
Dostupné z: http://images.alfresco.advanstar.com/alfresco_images/pharma/2014/08/22/0ebf99b9-8cfb-413b-8f66-a134d1b34c59/article-164646.pdf
37. Kazakevich Y., R. LoBrutto. HPLC for Pharmaceutical Scientists. USA: WILEY. 2007. 1164 s. ISBN 978-0-471-68162-5
38. American Pharmacopoeial Convention Inc. United State Pharmacopoeia (USP 32). Rockville. 2009. ISBN 1-889788-69-2

39. Bliesner D. M. Validating chromatographic methods: A Practical Guide. USA: WILEY. 2006. 291 s. ISBN 978-0-471-74147-3
40. Torriero Angel A.J., Juan M. Luco, Leonides Sereno, Julio Raba. Voltammetric determination of salicylic acid in pharmaceuticals formulations of acetylsalicylic acid. *Talanta*. 2004, 62, 247–254
41. Venema P. Dini, Peter C. H. Hollman,, Karin P. L. T. M. Janssen and Martijn B. Katan. Determination of Acetylsalicylic Acid and Salicylic Acid in Foods, Using HPLC with Fluorescence Detection. *J. Agric. Food Chem.* 1996, 44, 1762–1767
42. Cemal Akay, Ismail Tuncer Degim, Ahmet Sayal, Ahmet Aydin, Yalçın Özkan, Hüsamettin Gül. Rapid and simultaneous determination of acetylsalicylic acid, paracetamol, and their degradation and toxic impurity products by HPLC in pharmaceutical dosage forms. *Turk J Med Sci.* 2008; 38 (2): 167-173
43. Garrido Jorge M. P. J. , José L. F. C. Lima and Cristina D. Matos. Flow injection determination of acetylsalicylic acid in pharmaceutical preparations with an amperometric detector. Presented at International conference on modern electroanalytical methods, Seč, 1999, September 19–23