

Grażyna GAŁĘZOWSKA², Marian KAMIŃSKI^{1*}

¹ Politechnika Gdańska, Wydział Chemiczny,
Katedra Technologii Chemicznej,
ul. G. Narutowicza 11/12, 80-952 Gdańsk
e-mail: mknkj@chem.pg.gda.pl*

² Gdański Uniwersytet Medyczny, Wydział Nauk o Zdrowiu,
Zakład Toksykologii Środowiska,
ul. Powstania Styczniowego 9b, 81-519 Gdynia,
e-mail: grazynagalezowska@gumed.edu.pl

Nowa metoda oznaczania komponentów skomplikowanych mieszanin typu specyfiki farmaceutyczne z wykorzystaniem rozdzielania grupowego i wielowymiarowej wysokosprawnej chromatografii cieczowej

New method of complex mixtures like pharmaceutical specifics determination using multidimensional high performance liquid chromatography and group type separation

Streszczenie: *Rozdzielanie i oznaczanie poszczególnych analitów w skomplikowanych mieszaninach jest bardzo trudnym zadaniem analitycznym. Obecnie coraz częściej stosowana jest wielowymiarowa chromatografia cieczowa.*

W pracy porównano różne techniki ekstrakcji/lugowania analitów ze skomplikowanych matryc (2 specyfiki farmaceutyczne) oraz wykazano korzyści ze stosowania różnego typu układów chromatograficznych do ich rozdzielania. Wykorzystano chromatografię wykluczania bez oraz z jednoczesnymi oddziaływaniami sorpcyjnymi i chromatografię w odwróconym układzie faz. Wyniki kilku tego typu analiz były podstawą do rozwiązania układów równań liniowych i opisu składników mieszaniny.

Słowa kluczowe: *skomplikowane mieszaniny składników, specyfiki farmaceutyczne, ekstrakcje/lugowanie, chromatografia wielowymiarowa, rozdzielanie grupowe, kalibracja wielowymiarowa, układ równań*

Abstract: *A detailed separation and content determination of very complicated mixtures is an extremely difficult analytical task. Moreover it is time- and solvent-consuming analysis. In researches comparative studies of extraction techniques were investigated for their time consuming and efficiency. The definition of analytical principles and standard procedures for content determination of complicated mixtures of compounds, especially of pharmaceutical specifics with the use of group-type chromatographic separation (GPC/SEC and NP-HPLC and RP-HPLC) under isocratic conditions with refractometric (RID) and spectrophotometric (UV-DAD) detection, the use of back-flow in the column (BF) - (GPC/SEC-NP/RP-BF-2E-HPLC) and solution of the linear equations based on the detector's signal of partly resolved peaks – the part of the investigation concerns about cosmetics and pharmaceutical specifics. The number of equations (m) were more than number of unknowns (n). Such process should minimize uncertainty.*

Key words: *complicated mixtures, pharmaceutical species, extraction, multidimensional chromatographic separation, group-type separation, multidimensional calibration, equation*

1. Wstęp (Introduction)

Leki bywają podawane w różny sposób. Jedne z form to maści i żele. Żele są koloidalną dyspersją ciała stałego w cieczy, przy czym w przeciwieństwie do roztworów koloidalnych, obie fazy są fazami ciągłymi. Cząstki ciała stałego, w układzie tym, łączą się siłami Van der Waalsa bądź wiązaniami wodorowymi lub oddziaływaniami dyspersyjnymi [1]. W postaci żeli występują bardzo często specyfiki farmaceutyczne, których użycie wiąże się z korzystnymi efektami leczniczymi. Idea przez skórę podania niektórych leków jest bardzo stara, a ostatnio znowu coraz częściej stosowana. Podstawową barierę hamującą wchłanianie substancji leczniczych przez skórę stanowi zewnętrzna warstwa komórek naskórka, stąd można w ten sposób podawać jedynie preparaty, których składniki przenikają przez skórę. Wchłanianie leku zależy od właściwości fizykochemicznych substancji leczniczych, rodzaju podłoża i jego właściwości, wzajemnego oddziaływania lek – podłoże – skóra, jak również obecności substancji pomocniczych, które stanowią składniki żelu [2].

Potrzeba rozdzielania i oznaczania składników produktów farmaceutycznych jest przede wszystkim związana z kontrolą jakości. Niekiedy, znaczenie ma także, potrzeba zbadania ewentualnego sfałszowania produktu, jego zepsucia się w wyniku skażenia, a także zbadanie składu w celu opisu składu produktów konkurencyjnych lub wyjaśnienia technologii ich otrzymywania.

Tego rodzaju zadania analityczne należą do szczególnie trudnych ze względu na najczęściej szeroki zakres mas molekularnych komponentów, ich polarność, hydrofilowość i hydrofobowość oraz wielofazowość postaci fizycznej. Często też, niektóre składniki są bardzo trudno- albo nierozpuszczalne w cieczach, a jeśli rozpuszczalne to w formie roztworów koloidalnych.

Przegląd literatury wykazał, iż istnieje wiele prac nad oznaczaniem określonych wybranych składników specyfików farmaceutycznych, szczególnie substancji czynnych co jest wymagane przez Farmakopeę. Niestety, w literaturze brak jest informacji na temat sposobów postępowania w celu rozdzielania i oznaczania wszystkich komponentów omawianego typu specyfików farmaceutycznych, czy produktów kosmetycznych. W tabeli 1 zestawiono najważniejsze przykłady techniki rozdzielania i oznaczania określonych składników specyfików farmaceutycznych opisane w literaturze oraz zastosowane techniki detekcji.

Tabela 1. Przykłady układów chromatograficznych wykorzystywanych do oznaczania składników specyfików farmaceutycznych i kosmetycznych (w postaci żeli, maści i kremów)

Table 1. Examples of chromatographic procedures for determination of pharmaceutical specifics and cosmetics (in the form of gels, ointments or creams)

Substancja rozdzielana (Substance)	Próbka (Sample)	Przygotowanie próbek (Sample preparation)	Kolumna (Column)	Układ chromatograficzny/eluent lub program eucji (Chromatographic system/eluent)	Detekcja (Detection)	Literatura (Reference)
triamcinolon, metylo- i propyloparaben, hydrokortyzon octowy	krem-Triamcinolon	rozpuszczenie	C18	ACN:H ₂ O 40:60(v/v)	UV	[3]
kompleksowane żelazo	żel pod prysznic, mydło	rozpuszczenie w eluencie filtracja przez filtr 0,45 µm	IP-C18	MeOH:bufor 10:90(v/v) 20mM wodorosulfonian tetrabutylaminy, 15mM mrówczan sodu pH4 (kw. mrówkowy)	UV	[4]
witamina A	krem	ekstrakcja do MeOH+CH ₃ Cl	C18	A: MeOH: H ₂ O 10 mM octanu aminy 70:30 (v/v) B: MeOH: CH ₃ Cl 40:60 (v/v) 15min 100%A do 100%B, 15 min. 100%B	UV	[5]
metylo-dibromoglutaronitryl	krem do ciała	ekstrakcja w 60°C, 10 min do 80% MeOH	C 8	Aceton: H ₂ O (2 mM chlorek sodu, 20mM sulfonianu sodu) 40:60 (v/v)	EC	[6]
metylo-, porpyloparaben, octan hydrokortyzonu	krem farmaceutyczny	ekstrakcja do ACN 10 min ultradźwięki odwirowanie	C18	MeOH:ACN: H ₂ O 15:27:58(v/v/v)	UV	[7]
mirystynian nikotyny	preparat dermatologiczny	ekstrakcja w fazie ruchomej	C18	0,01%TFA:ACN 2:98 (v/v)	UV	[8]
składniki czynne kremów	kremy lecznicze	ekstrakcja oznaczanych substancji do eluentu	SPE	Brak danych	UV	[9]
kwask sorbinowy	krem farmaceutyczny	ekstrakcja do eluentu	PLRP-S	ACN:bufor fosforowy (pH 7): H ₂ O 1:5:94 (v/v/v)	UV	[10]
chinokaina HCl	kremy	ekstrakcja do 0,1 N HCl odwirowanie w warunkach 2000 obr./min., 10 min.	C18	ACN: 0,01 M octan sodu trihydrat 45:55 (v/v) 0,02 zawiera 0,06% (w/v) sól sodowa kwasu heptan sulfonowego pH 4,5 kwas octowy	UV	[11]
chlorokrezol, chloroksynelol	farmaceutyki	ekstrakcja do DMSO 10 min w łaźni ultradźwiękowej	ODS	A: ACN:THF 95:5 (v/v) B: bufor fosforanowy trimetyloaminy (pH 3, 0,05 M) A-B (52:48, v:v)	FLC Derywaty-zacja	[12]

Konieczne jest więc, stosowanie różnych technik rozdzielania, w tym z całą pewnością chromatografii. Chromatografia to grupa technik rozdzielania

szczególnie przydatna do rozwiązywania zadań analitycznych opisanych na wstępie substancji, grup substancji i produktów. Wykorzystanie optymalnego zestawu detektorów i optymalnie dobranych warunków detekcji umożliwia otrzymanie dodatkowych informacji jakościowych, oprócz tych, jakie przynoszą wartości parametrów retencji. Na podstawie otrzymanych chromatogramów można obliczyć parametry retencji dla poszczególnych analitów oraz ich zawartość wykorzystując wartości pola powierzchni, bądź wysokości pików. Jest to łatwe w przypadku, gdy substancje ulegają całkowitemu rozdzielaniu. W przypadku braku pełnego rozdzielania pików analitów można zastosować chromatografię wielowymiarową (najczęściej dwuwymiarową, ale także wyższego stopnia). Uzyskuje się chromatogramy dwuwymiarowe, umożliwiające obliczenie stężeń, na podstawie sumy pól powierzchni lub sumy wysokości pików.

Do oznaczania składu skomplikowanych mieszanin, można również zastosować dwuwymiarową lub wielowymiarową kalibrację [13-15]. Zadaniem tego typu kalibracji jest ustalenie modelu zależności pomiędzy zawartościami (stężeniami) składników w poszczególnych próbkach, a wartościami absorpcji promieniowania przy różnych długościach fali. Jakość i wiarygodność modeli kalibracyjnych zależy od wielu czynników. Zalicza się do nich zarówno reprezentatywność materiału badawczego (próbek), jak i rozmaite aspekty procedury budowy modelu. Dane wektorowe uzyskiwane na podstawie widm absorpcji lub emisji (spektrofotometria, spektrofluorymetria, podczerwień, bliska podczerwień), czy skanów elektrochemicznych (voltamperogramy) mogą zostać wykorzystane ze względu na prostotę stosowania i łatwość interpretacji [14]. Wielowymiarowa kalibracja może być wykorzystywana w przypadku mieszanin o skomplikowanym składzie, w zakresie medycyny, botaniki czy produktów rafineryjnych.

W przypadku analityki składu mieszaniny substancji o znanych składnikach, nawet bez ich całkowitego rozdzielania, „wielowymiarowa” analiza otrzymanych chromatogramów powinna pozwolić na oznaczanie ich zawartości w badanej próbce. „Wielowymiarowość” oznacza w tym przypadku zastosowanie kilku układów rozdzielczych, gdzie składniki mieszaniny będą rozdzielane pod względem różnych właściwości, różnic polarności, hydrofobowości, oddziaływań hydrofilowych, jonowymiennych czy pod względem zróżnicowania mas cząsteczkowych. Utworzenie układu równań, uwzględniającego powierzchnie pików lub wysokości pików lub grup pików poszczególnych składników lub grup składników mieszaniny oraz współczynniki kalibracyjne dla substancji wzorcowych, powinno umożliwić obliczenie zawartości analitów. Celowe będzie wykorzystanie do tego programów algebry komputerowej oraz zasad wykonywania obliczeń przybliżonych. Ważne jest, aby liczba równań była równa lub wyższa od liczby niewiadomych.



2. Metody postępowania (*Experimental methods*)

Materiały (*Materials*)

Substancje wzorcowe stanowiły następujące związki chemiczne: fosforan kindamycyny, allantoina, carbopol 934P i 974NF, glikol propylenowy, makrogol (Renex PEG 400), woda dejonizowana, diklofenak, dietyloamina, alkohol izopropylowy, eter cetostearylowy makrogolu, glikol propylenowy, korkozylokaprylokapronian oraz olej parafinowy.

Badaniom poddano dwie próbki rzeczywiste, specyfików farmaceutycznych dostępnych na rynku – określanych jako specyfik 1 i 2, których składnikami były powyższe wzorce.

W analizie chromatograficznej wykorzystano kolumny chromatograficzne, takie jak: dwie LiChrogel PS1 i dwie LiChrogel PS4 250 x 7 mm, z wypełnieniem cyjanopropylowym 250 x 4 mm, 5 μm i typu RP-18 250 x 4 mm 5 μm , oraz rozpuszczalniki organiczne o czystości do HPLC (Merck, Niemcy): tetrahydrofuran, acetonitryl i wodę dejonizowaną (otrzymaną z systemu oczyszczania wody MilliQ). Dodatkowo na etapie przygotowania próbek do analizy stosowano również dichlorometan, metanol, izopropanol, formamid, heksan (do HPLC, Merck, Niemcy).

Aparatura (*Apparatus*)

Gradientowy chromatograf cieczowy LaChrom Merck-Hitachi (Niemcy) wyposażony w czterokanałowy system do elucji gradientowej z zaworami proporcjonującymi (tzw. gradient niskociśnieniowy), pompę L-6200, zawór dozujący Rheodyne Rh-7725i z pętlą dozującą 50 μl , kolumnę chromatograficzną, termostat, detektor UV– DAD 7450A, detektor fluorescencyjny F 1050, oprogramowanie HSM oraz, dodatkowo, w sześcioprożny dwupołożeniowy zawór V 7226 Knauer (Niemcy), do zmiany kierunku przepływu fazy ruchomej w kolumnie.

Chromatograf cieczowy wyposażony w pompę model 300C Gynkotek (Czechy), zawór dozujący Rheodyne Rh-7725i z pętlą dozującą 100 μl , kolumnę do chromatografii żelowej, detektor refraktometryczny Waters (Czechy), integrator D-2000 Merck-Hitachi (Niemcy).

Gradientowy chromatograf cieczowy LaChrom Ultra (VWR-Hitachi) wyposażony w dwie pompy L-2100, dozownik repetycyjny (autosampler) L-2200, termostat do kolumn L-2300, detektor UV L-2400 oraz system akwizycji i analizy danych dla zestawu LaChrom Ultra Chrom Elite Merck (Niemcy).

Przygotowanie próbek do analizy (*Samples preparation*)

W badaniach rozpuszczano wzorce i specyfiki farmaceutyczne w rozpuszczalnikach różnego typu: woda, acetonitryl, tetrahydrofuran, dichlorometan, metanol, izopropanol, formamid, heksan. Kolejno do rozpuszczalni-



ków dodawano stopniowo komponenty badanych próbek lub produkty (do 5 ml po 10 mg substancji).

Badaniom poddano również szybkość rozpuszczania biorąc pod uwagę takie techniki roztwarzania, jak wytrząsanie, homogenizacja mechaniczna w warunkach wysokich prędkości ścinania, zastosowanie ultradźwięków, mikrofal. Wykorzystane techniki i badane warunki zestawiono w tabeli poniżej.

Tabela 2. Typy ekstrakcji i warunki stosowane w badaniach nad szybkością rozpuszczania próbek rzeczywistych

Table 2. Investigation of extractions type conditions

Typ ekstrakcji (Type of extraction)	Rozpuszczalnik (Solvent)	Temperatura (Temperature)	Czas (Time)
Ekstrakcja w aparacie Soxhleta	woda	90°C	1, 2 godziny
Maceracja z wytrząsaniem	woda	50°C	4, 7, 15 godziny
Ekstrakcja wspomagana ultradźwiękami (w łaźni ultradźwiękowej)	woda	90°C	3, 5, 7 minut
Ekstrakcja wspomagana mikrofalami	woda	90°C	3, 5, 7 minut
Homogenizacja	woda	90°C	3, 5, 7 minut

Efektywność zastosowanych technik oceniano na podstawie sumy powierzchni wszystkich pików chromatograficznych.

3. Analizy chromatograficzne (Chromatographic analysis)

Chromatografia wykluczania (Size exclusion chromatography)

Badane próbki rozpuszczono w tetrahydrofuranie (około 50 mg/ml i 5 mg/ml). Próbki w objętości 50 μ l wprowadzono do czterech szeregowo połączonych kolumn chromatograficznych, dwóch LiChrogel PS1 i dwóch LiChrogel PS4, wypełnionych kulistymi cząstkami z porowatego kopolimeru styren- diwinylobenzen. Kolumny te umożliwiają selektywne rozdzielanie substancji różniących się masą cząsteczkową w zakresie od 100 do 10⁵ Da. Wylot kolumny był połączony z detektorem refraktometrycznym. Objętościowe natężenie przepływu fazy ruchomej, którą był tetrahydrofuran, wynosiło 1,5 ml/min. Zawartość składników nierozpuszczalnych w tetrahydrofuranie oznaczono masowo z zastosowaniem techniki grawimetrycznej.

Chromatografia wykluczania z oddziaływaniami adsorpcyjnymi (Size exclusion chromatography with adsorption)

W badaniach zastosowano kolumnę wypełnioną żelem krzemionkowym modyfikowanym grupami cyjanopropylowymi (typu CN), a jako fazę ruchomą wodę. Objętościowe natężenie przepływu fazy ruchomej wynosiło



1,2 ml/min. Do kolumny wprowadzano 20 μ l roztworów wodnych substancji wzorcowych o stężeniu 50 i 5 mg/ml oraz próbek materiałów badanych o stężeniu 50, 25, 5 mg/ml.

W przypadku nierozpuszczalnych w wodzie korkozylokaprylokapropanu i oleju parafinowego do oznaczenia ich zawartości wykorzystano analizę grawimetryczną.

Chromatografia w odwróconym układzie faz (Revers phase chromatography)

Do rozdzielania składników specyfików, w odwróconym układzie faz, zastosowano kolumnę typu RP-18 z żelom krzemionkowym modyfikowanym grupami oktadecylowymi, oraz z mieszaniną acetonitryl:woda (6:4 v/v) jako fazą ruchomą. Objętościowe natężenie przepływu fazy ruchomej wynosiło 1,2 ml/min. Do kolumny wprowadzano 20 μ l roztworów wodnych substancji wzorcowych o stężeniu 50, 25, 10 i 5 mg/ml oraz próbek badanych o stężeniu 50, 25, 5 mg/ml.

Oznaczenie wody metodą Karla-Fishera (Determination of water with Karl-Fisher method)

Zawartości wody w próbkach specyfików oznaczono metodą Karla-Fishera. Ze względu na dużą zawartość wody w maściach, analizie poddawano 0,5% roztwory specyfików w metanolu. Dodatkowo, wykonano analizę zawartości wody w metanolu, jako ślepą próbę. Otrzymane wyniki zawartości wody w metanolu uwzględniono przy obliczaniu zawartości wody w próbkach specyfików farmaceutycznych.

Oznaczanie dietyloaminy metodą pH-metryczną (Determination of diethylamine with pH-metric method)

Oznaczenie dietyloaminy wykonywano z wykorzystaniem techniki pH-metrycznej - pomiar pH wodnego roztworu specyfiku 2 oraz sporządzonych roztworów kalibracyjnych (0,05; 0,1; 0,2; 0,4% zawartości dietyloaminy w wodzie). Na podstawie 4 punktowej krzywej kalibracyjnej określono zawartość dietyloaminy.

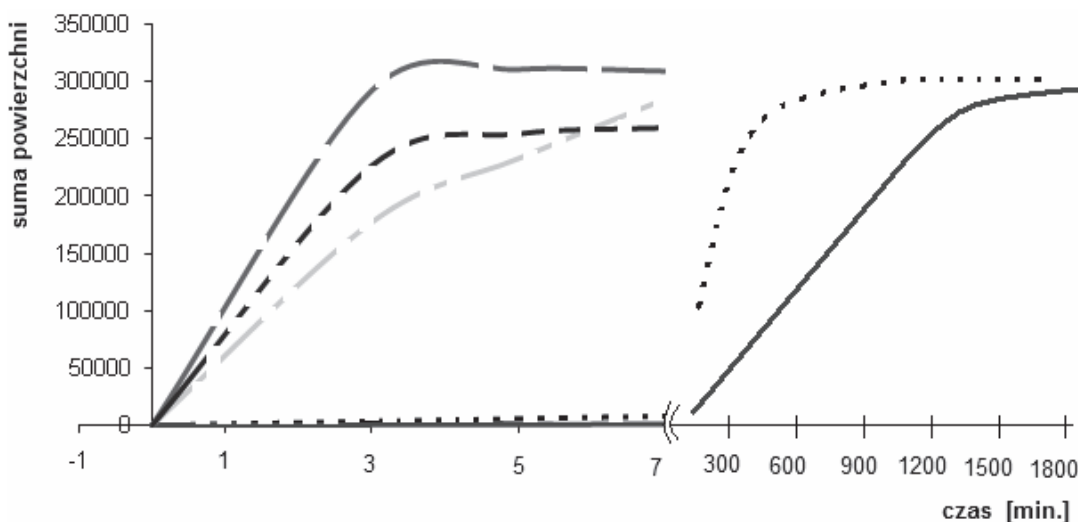
4. Wyniki i dyskusja (Results and discussion)

Badania rozpuszczalności próbek i ich składników (Solubility tests samples and their components)

Jeden z celów cząstkowych przedstawionych badań była próba znalezienia rozpuszczalnika, w którym wszystkie składniki maści będą się rozpuszczać. Zbadano szereg rozpuszczalników, między innymi wodę, acetonitryl, tetrahydrofuran, dichlorometan, metanol, izopropanol, formami, heksan, jednak nie znaleziono uniwersalnego rozpuszczalnika dla wszystkich komponentów maści.

Większość składników rozpuszcza się jedynie częściowo w w/w rozpuszczalnikach. Dodatkowo, tzw. carbopole tworzą żel z wodą, nawet przy małych zawartościach związku, co spowodowało konieczność sporządzania roztworów o bardzo małych stężeniach. W związku z powyższym analizie należy poddawać próbki „rzeczywiste” o różnych stężeniach, aby mieć pewność, że wszystkie anality są rozpuszczone w eluencie. Pomocą w tego typu badaniach jest stosowanie lasera, wirówki oraz mikroskopu w celu stwierdzenia, odpowiednio, za pomocą efektu rozproszenia światła, powstawania osadu oraz występowania ruchów Browna, czy mamy do czynienia z zawiesiną czy z roztworem koloidalnym albo właściwym roztworem. nierozpuszczalną frakcję próbki należy usunąć, najlepiej przez odwirowanie i zdekantowanie supernatantu. Dopiero tak przygotowane próbki można poddać analizie z wykorzystaniem techniki wysokosprawnej chromatografii cieczowej, z wykorzystaniem różnych układów rozdzielczych.

Badania obejmowały również porównanie efektywności wykorzystania takich technik roztwarzania lub ekstrakcji wspomaganych czynnikami zewnętrznymi, jak podwyższona temperatura, ultradźwięki, mieszanie mechaniczne, mikrofały. Wyniki uzyskane dla specyfiku 2 przedstawione są na rysunku 1.



Rys. 1. Efektywność roztwarzania składników próbki z zastosowaniem różnych technik ekstrakcji/lugowania: — — — ekstrakcja wspomagana ultradźwiękami (łaźnia ultradźwiękowa), — — — — — homogenizacja mechaniczna, — · — · — ekstrakcja wspomagana mikrofalami, maceracja z wytrząsaniem, ————— metoda Soxhletha.

Fig. 1. The concentration of compound in extract in condition — — —, ultrasonically assisted extraction, — — — — — extraction with high shear mixer, — · — · — microwave extraction, maceration with shake, ————— Soxhlet's method.

Zastosowanie ekstrakcji z wykorzystaniem maceracji w podwyższonej temperaturze oraz techniki ekstrakcji w aparacie Soxhletha nie wymaga specjalistycznej aparatury, są to proste, łatwe w wykonaniu oraz ciągle powszechnie stosowane techniki. Wadą maceracji i ekstrakcji w aparacie Soxhletha jest czasochłonność operacji. W wyniku czego efektywność roztwarzania jest bardzo niska.

W przeciwieństwie do konwencjonalnych technik ekstrakcyjnych, techniki wykorzystujące ultradźwięki czy promieniowanie mikrofalowe pozwoliły na uzyskanie znacznie wyższej efektywności ekstrakcji/roztwarzania. Podobnie stosowanie homogenizatora mechanicznego przyspiesza rozpuszczanie substancji. Jako czynnik wspomagający rozpuszczanie najbardziej korzystne okazało się zastosowanie ultradźwięków. Już w ciągu 4 minut można osiągnąć rozpuszczenie wszystkich komponentów badanych próbek (tych, które są rozpuszczalne). W przypadku zastosowania aparatu Soxhleta identyczny wynik otrzymuje się po 24 godzinnej ekstrakcji.

Na podstawie powyższych badań stwierdzono, że optymalną procedurą przygotowania próbek do analizy chromatograficznej jest zawieszenie w eluencie, następnie umieszczenie w łaźni ultradźwiękowej na 4 minuty, oraz odwirowywanie supernatantu. Tak przygotowane próbki poddawano analizie chromatograficznej.

Oznaczanie składu specyfików farmaceutycznych (*Determination of pharmaceutical compounds*)

Chromatografia wielowymiarowa jest coraz częściej powszechnie stosowana do rozdzielania skomplikowanych mieszanin. W przypadku, gdy nie wszystkie składniki próbki rozpuszczają się w eluencie pozostaje zastosowanie kilku układów chromatograficznych, w wyniku, czego rozdzielaniu i analizie poddaje się komponenty i mieszaniny składników, rozpuszczalnych w określonym eluencie. Wyniki kilku tego typu analiz, wykonanych w różnych układach chromatograficznych, są podstawą do rozwiązania układów równań liniowych i opisu składników mieszaniny.

Na podstawie przeprowadzonych badań stwierdzono, iż stosowane układy chromatograficzne powinny różnić się rodzajem oddziaływań, dlatego zastosowano rozdzielanie, w następujących warunkach:

- w odwróconym układzie faz, z wykorzystaniem faz stacjonarnych typu żel krzemionkowy modyfikowany grupami oktadecylowymi, oktylowymi lub fenyłowymi i mieszanin acetonitryl:woda, metanol:woda w różnych proporcjach, jako fazy ruchome;
- pod względem masy cząsteczkowej, czyli wykorzystanie chromatografii wykluczania/żelowej, z wykorzystaniem fazy stacjonarnej-kopolimer styrenu diwinylobenzenu i tetrahydrofuranu lub dichlorometanu, jako eluentu;
- w normalnym układzie faz, z wykorzystaniem następujących faz stacjonarnych: żel krzemionkowy, żel krzemionkowy modyfikowany grupami cyjanopropylowymi, aminowymi, typu DIOL, z niepolarnymi fazami ruchomymi, takimi jak n-heksan lub n-heptan i ich mieszaninami z eterem metyloowo tert-butyłowym (MTBE), tetrahydrofuranem (THF). Ograniczeniem stosowania układu NP jest mała rozpuszczalność komponentów farmaceutycznych w n-heksanie czy n-heptanie, a także niska w rozpuszczalniku takim jak MTBE;
- w układzie połączenia oddziaływań chromatografii wykluczania z jednoczesną, kontrolowaną adsorpcją, wykorzystując takie fazy

stacjonarne jak SiO_2 , CN, DIOL, NH_2 i inne, ze względnie polarnymi fazami ruchomymi, takimi jak: woda czy mieszaniny heksanu z izopropanolem.

Oprócz technik chromatografii należy także wziąć pod uwagę inne techniki analityczne. Można w łatwy sposób oznaczyć zawartość wody metodą Karla- Fishera, bądź za pomocą pomiaru pH oznaczyć stężenie dimetyloaminy, jeśli jest jedyną substancją zasadową.

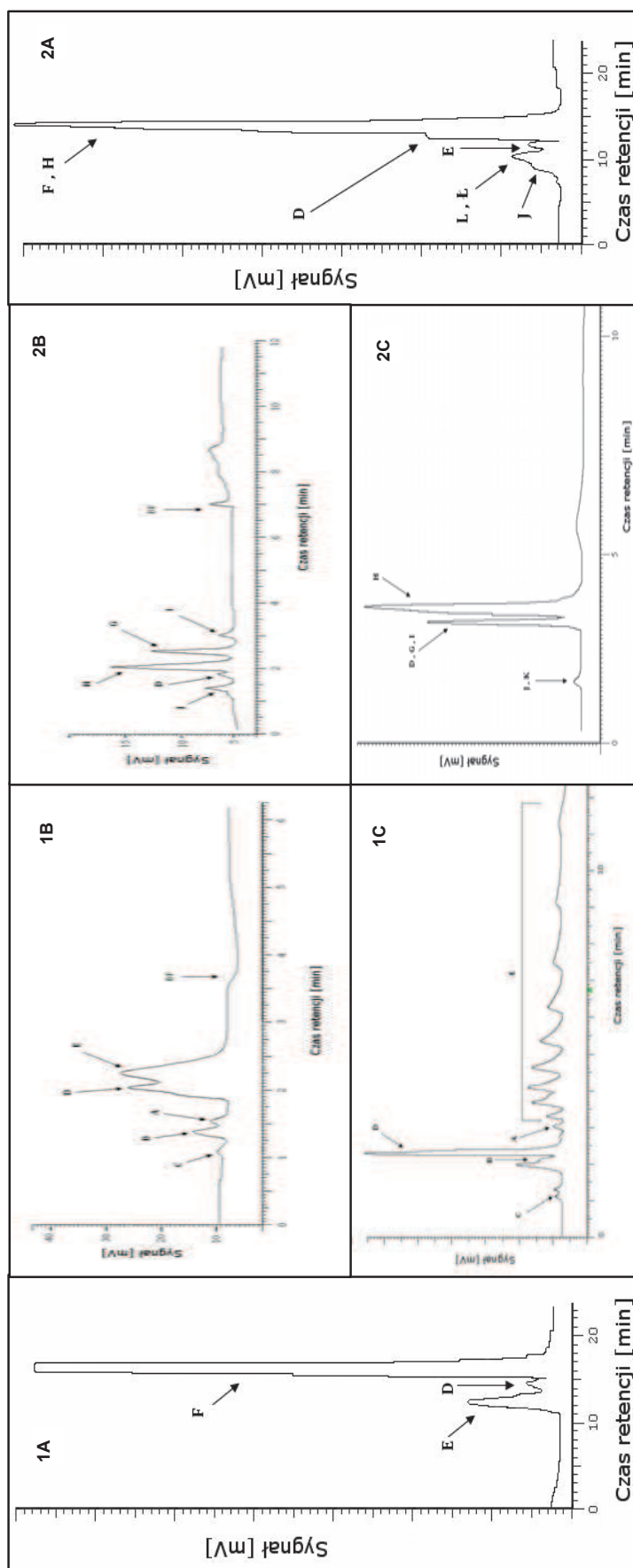
Zastosowanie chromatografii, wiąże się z koniecznością kalibracji. W tym celu zastosowano roztwory czystych składników specyfików, jako substancje wzorcowe oraz metodę krzywej kalibracyjnej wykorzystując powierzchnie otrzymanych pików.

Zawartość substancji lub grup substancji nierozpuszczalnych w stosowanych eluentach oznaczano grawimetrycznie. Wyznaczano procent nierozpuszczalnej części specyfiku, co stanowiło ilość substancji lub grup substancji. W przypadku specyfiku 1 nierozpuszczalne w THF były alantoina, kindamycyny fosforan, carbopol, co stanowiło 3,37% masy próbki specyfiku. Komponenty specyfiku 2 były w większości były rozpuszczalne w THF, oprócz carbopolu, który stanowił 2,97% masy próbki.

Próbki roztworów specyfików farmaceutycznych rozdzielano w trzech układach chromatograficznych (wyniki przedstawiono na rysunku 2):

- chromatografii wykluczania z tetrahydrofuranem, jako eluentem oraz szeregowo połączonymi kolumnami dwiema PS1 i dwiema PS4;
- chromatografii wykluczania z kontrolowaną adsorpcją, z wykorzystaniem kolumny typu CN, z wodą, jako eluentem;
- chromatografii w układzie faz odwróconych z kolumną typu C18 oraz mieszaniną acetonitryl:woda 6:4 (v/v), jako eluentem.

Analiza otrzymanych wyników, dla trzech różnych układów chromatograficznych, wykorzystanie techniki Karla-Fishera do oznaczania zawartości wody oraz pomiaru pH roztworów wodnych (oznaczanie dietyloaminy) i rozwiązanie układu wielu równań przedstawionego w kolejnym rozdziale, umożliwi obliczenie zawartości poszczególnych analitów w próbkach badanych specyfików.



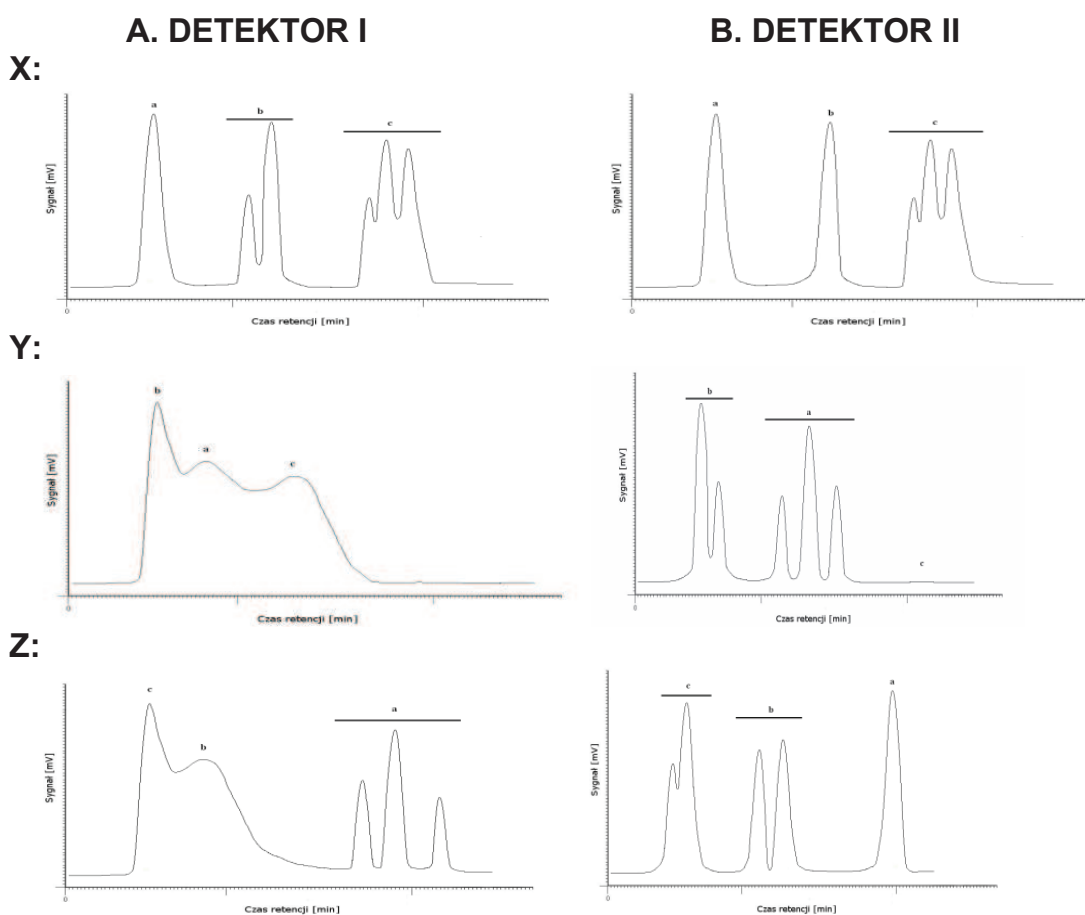
Rys. 2. RID chromatogramy rozdzielania specyfiku farmaceutycznego 1 i 2 z zastosowaniem układów Chromatograficznych: A- GPC/SEC-HPLC (kolumny 2xPS1+2xPS4, eluent- THF), B- RP- HPLC (kolumna C18, eluent: acetonitryl: woda 6:4 pH 7,6), C- GPC z kontrolowaną adsorpcją (kolumna CN, eluent: woda), substancje rozdzielane A-kindamycyny fosforan, B-alantoina, C-carbopol 934P, D-glikol propylenowy; E-makrogol Renex PEG 400 F-woda, G-diklofenak dimetyloaminy; H- izopropanol, I-dietyloamina, J-makrogol eter cetostearylowy, K-carbopol 974 NF, L-korkozylodikaprylokapronian, Ł- parafina ciekła

Fig. 2. Examples of RID chromatograms of two pharmaceutical specifics („1” and „2”) using A) GPC/SEC-HPLC (copolymer of styrene divinylbenzene column –Lichrologel 2xPS1+2xPS4 (Merck), eluent - tetrahydrofurane), B) RP-HPLC (RP18e column (Merck), eluent - acetonitrile:water 6:4 (v/v), pH 7,6) C) GPC/SEC WITH SIMULTANEOUS ADSORPTION (CN column (Merck), eluent - water)

Obliczenie zawartości poszczególnych składników specyfików farmaceutycznych (Calculation of the components content in samples)

Na podstawie otrzymanych wyników rozdzielania grupowego, bądź szczegółowego z wykorzystaniem techniki chromatografii cieczowej, oznaczania składników grawimetrycznie (zarówno grupowo i szczegółowo, w zależności od rozpuszczalności) oraz oznaczania wody metodą Karla-Fishera wyprowadzono układ równań umożliwiający obliczenie zawartości poszczególnych składników specyfików farmaceutycznych (program algebry komputerowej). Wykorzystaną metodologię przedstawiono poniżej.

Przyjmijmy, iż wykonujemy rozdzielanie, w różnych układach chromatograficznych, skomplikowanej mieszaniny składników z zastosowaniem dwóch detektorów, selektywnego i uniwersalnego. Otrzymujemy chromatogramy przedstawione na rysunku 3.



Rys. 3. Przykładowe chromatogramy rozdzielania skomplikowanej mieszaniny w trzech układach chromatograficznych X, Y, Z, z zastosowaniem dwóch detektorów: A - detektora uniwersalnego, B - detektora selektywnego

Fig. 3. Examples of chromatograms of complicated mixtures using chromatographic systems: X, Y, Z, with two detectors: A - universal, B - specific

Na podstawie chromatogramów, dla kilku układów chromatograficznych „L” z zastosowaniem kilku detektorów „j” otrzymujemy zależności:

DETEKTOR 1:

$$\mathbf{X}: C_a^I = k_{a1}^I \cdot F_{a1}^I + k_{a2}^I \cdot F_{a2}^I + k_{a3}^I \cdot F_{a3}^I \quad (1)$$

$$C_b^I = k_{b1}^I \cdot F_{b1}^I + k_{b2}^I \cdot F_{b2}^I \quad (2)$$

$$C_c^I = k_{c1}^I \cdot F_{c1}^I + k_{c2}^I \cdot F_{c2}^I + k_{c3}^I \cdot F_{c3}^I \quad (3)$$

$$\mathbf{Y}: C_a^I = k_{b1}^I \cdot F_{b1}^I + k_{a2}^I \cdot F_{a2}^I \quad (4)$$

$$C_b^I = k_{a1}^I \cdot F_{a1}^I + k_{b2}^I \cdot F_{b2}^I \quad (5)$$

$$C_c^I = k_{c1}^I \cdot F_{c1}^I + k_{c2}^I \cdot F_{c2}^I + k_{c3}^I \cdot F_{c3}^I + k_{a3}^I \cdot F_{a3}^I \quad (6)$$

$$\mathbf{Z}: C_a^I = k_{a1}^I \cdot F_{a1}^I + k_{a2}^I \cdot F_{a2}^I + k_{c2}^I \cdot F_{c2}^I \quad (7)$$

$$C_b^I = k_{a3}^I \cdot F_{a3}^I + k_{b1}^I \cdot F_{b1}^I + k_{c3}^I \cdot F_{c3}^I \quad (8)$$

$$C_c^I = k_{b2}^I \cdot F_{b2}^I + k_{c1}^I \cdot F_{c1}^I \quad (9)$$

DETEKTOR 2:

$$\mathbf{X}: C_a^{II} = k_{a1}^{II} \cdot F_{a1}^{II} \quad (10)$$

$$C_b^{II} = k_{b1}^{II} \cdot F_{b1}^{II} \quad (11)$$

$$C_c^{II} = k_{c1}^{II} \cdot F_{c1}^{II} + k_{c2}^{II} \cdot F_{c2}^{II} + k_{c3}^{II} \cdot F_{c3}^{II} \quad (12)$$

$$\mathbf{Y}: C_a^{II} = k_{b1}^{II} \cdot F_{b1}^{II} + k_{c2}^{II} \cdot F_{c2}^{II} + k_{c3}^{II} \cdot F_{c3}^{II} \quad (13)$$

$$C_b^{II} = k_{a1}^{II} \cdot F_{a1}^{II} + k_{c1}^{II} \cdot F_{c1}^{II} \quad (14)$$

$$\mathbf{Z}: C_a^{II} = k_{c1}^{II} \cdot F_{c1}^{II} \quad (15)$$

$$C_b^{II} = k_{a1}^{II} \cdot F_{a1}^{II} + k_{b1}^{II} \cdot F_{b1}^{II} \quad (16)$$

$$C_c^{II} = k_{c2}^{II} \cdot F_{c2}^{II} + k_{c3}^{II} \cdot F_{c3}^{II} \quad (17)$$

Odpowiednie wartości współczynników kalibracyjnych k_i^j dla detektora „j” są takie same dla układów chromatograficznych / warunków chromatograficznych X, Y, Z, eluent nie powoduje wytworzenia sygnału przez detektor. Jeśli powoduje, warunki nie są takie same i należy uwzględnić to w powyższych równaniach, co komplikuje wyprowadzone zależności. Stąd trzeba dobrać tylko takie warunki detekcji gdzie eluent nie ma wpływu na sygnał detektora. Korzystne jest, w przypadku gdy eluent ma wpływ na sygnał detektora, dobranie takich warunków detekcji (nawet o niższej czułości) by takiego wpływu nie było.

Ostatecznie zmienne dla pracy na bazie powierzchni pików to:

- grupy substancji oznaczanych - *groups of compound*: a, b, c, ...
- I
- substancje oznaczane - *compounds*: a_1, b_1, c_1, \dots
- i
- detektory - *detectors*: I, II, ...
- j
- kolumny/ układy rozdzielania – *columns/ separation systems*: X, Y, Z, ...
- L



- stężenia grup substancji – *concentration of compounds groups*: c_a, c_b, c_c, \dots
 - $c_i^j(L) = \sum c_i^j(L)$
- stężenie składników – *concentration of compounds*: $c_{a1}, c_{a2}, c_{a3}, \dots$
 - $c_i^j(L) = F_i^j(L) k_i^j(L)$
- powierzchnia pików – *area of peaks*: $F_a = \sum F_{ai}^j, F_b = \sum F_{bi}^j, \dots$
 - $F_i^j(L)$
- współczynniki kalibracyjne – *calibration coefficients*: $k_a^I, k_a^{II}, k_b^I, k_b^{II}, \dots$
 - $k_i^j(L)$.

Jeśli przymnie się powyższe oznaczenia można dla każdego z chromatogramów, wykonanych w różnych układach rozdzielania X, Y, Z: L, z zastosowaniem detektora „j” napisać:

$$c_i = \sum c_i \quad (18)$$

$$c_i = F_i^j k_i^j \quad (19)$$

W przypadku pików rozdzielonych należy wyznaczyć wartość c_i .

W przypadku pików nierozdzielonych należy rozwiązać, po wykonaniu analiz w układach rozdzielczych X, Y, Z (w tym przypadku „trójwymiarowy układ rozdzielczy”), z zastosowaniem detektora „j”- układ równań liniowych (20), postaci:

$$\begin{array}{l} X: \\ Y: \\ Z: \end{array} \left\{ \begin{array}{l} F_i^j(X) = \sum F_i^j(X) \\ F_i^j(Y) = \sum F_i^j(Y) \\ F_i^j(Z) = \sum F_i^j(Z) \end{array} \right. \quad (20)$$

podstawiając jako dane wartości, wyznaczonych podczas kalibracji, współczynników kalibracyjnych k_i^j , które w przypadku dobrania odpowiednich warunków detekcji i braku wpływu składu eluentu na sygnał detektora, mają takie same wartości w każdym z zastosowanych „wymiarów” rozdzielania.

Rozwiązaniem powyższych układów równań mogą być wartości poszukiwanych stężeń składników „i” mieszaniny, tzn. wartość „ c_i ”, a stąd „ c_i ”, gdy chodzi o uzupełnienie kalibracji- wartości brakujących współczynników kalibracyjnych k_i^j , a gdy wartości detekcji zależą od warunków rozdzielania- wartość $k_i^j(L)$.

Dodatkowo istnieje możliwość zastosowania w obliczeniach znanych wartości parametrów fizyko-chemicznych substancji oraz wyznaczenia nieznanymi parametrów fizyko-chemicznych rozdzielanych składników mieszaniny. Idea opisana powyżej może także zostać zastosowana w tym celu, jednak wymaga następującej modyfikacji:

- dla pików „izolowanych” o znanym stężeniu składników rozdzielonych w próbce dozowanej trzeba wyznaczyć średnie całkowite stężenia składnika
- *average integral component concentration* (21):

$$\hat{par}_i = \frac{1}{\Delta t} \int_{t_{pi}}^{t_{ki}} par_i dt \quad (21)$$

i skorzystać z zależności:

$$par_i v_i = v_p \hat{par}_i \quad (22)$$

gdzie par_i - oznaczenie standardowe – *standard determination*.

Jeżeli detektorem jest spektrofotometr typu UV-VIS/DAD lub innego typu detektor umożliwiający otrzymanie widma lub nałożonych widm określonych składników rozdzielanej mieszaniny i jeżeli składniki mieszaniny różnią się widmami, to można dodatkowo ułożyć i rozwiązać układ równań typu:

$$\sum \frac{\hat{c}_i}{\varepsilon_i^\lambda} \frac{I_k}{W_i} = \sum c_i v_i \quad (23)$$

bazujące na wartościach sumy absorpcji światła częściowo nałożonych na widmach. Na tej podstawie w zależności od potrzeby można wyznaczyć, albo stężenie substancji – *concentration of component* c_i , albo współczynnik absorpcji molowej dla substancji - molar absorption coefficient for the substance $\xi\lambda$, przy określonej długości fali - *wavelength* λ , a wybierając określoną wartość λ detekcji - także wartość k_{ij} .

Biorąc pod uwagę powyższą metodologię obliczeń, w przypadku próbek rzeczywistych dwóch specyfików farmaceutycznych określono zawartość ich poszczególnych składników (tabela 3).

Wyniki, zestawiono w tabeli poniżej.

Tabela 3. Zawartość poszczególnych składników specyfików farmaceutycznych

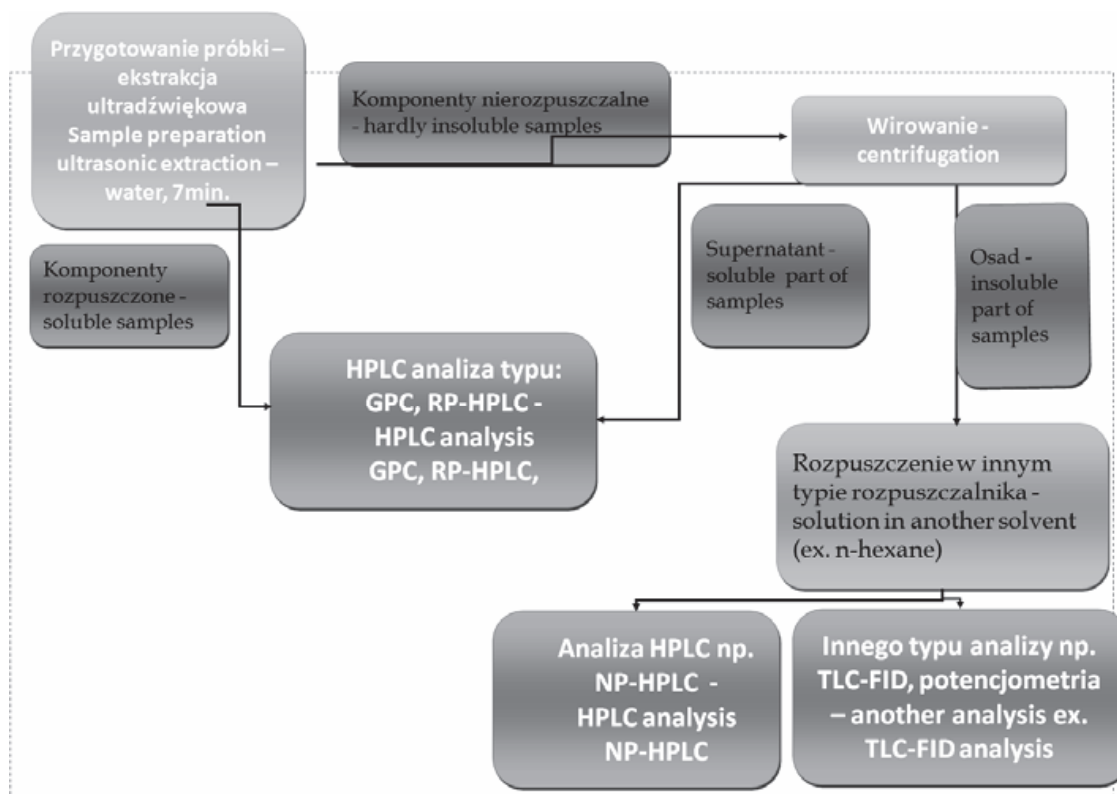
Table 3. Composition of the components of the pharmaceutical species

Specyfik 1	Składniki (compound)	[%]	RSD
	kindamycyny fosforan	1,08	0,01
	alantoina	0,37	0,01
	carbopol 934P	2,02	0,01
	glikol propylenowy	11,48	0,06
	makrogol, Renex PEG 400	11,20	0,05
	woda	72,80	1,26

Specyfik 2			
	diklofenak	0,96	0,01
	dietyloamina	0,29	0,01
	alkohol izopropylowy	16,40	0,15
	makrogol eter cetostearylowy	1,88	0,01
	carbopol	2,97	0,01
	glikol propylenowy	10,20	0,09
	korcozylokaprylokapronian	7,98	0,01
	olej parafinowy	0,11	0,01
	woda	59,40	1,19

5. Wnioski

Na podstawie przeprowadzonych badań można zaproponować, przedstawiony na rysunku poniżej (rys. 4), schemat ideowy procedury postępowania podczas oznaczania składników skomplikowanych mieszanin.



Rys. 4. Schemat postępowania podczas oznaczania składników skomplikowanych mieszanin
Fig. 4. Scheme of procedure during determination of components of complicated mixtures

Pierwszym krokiem podczas każdej analizy mieszanin o skomplikowanych składzie, powinno być zbadanie rozpuszczalności próbek badanych materiałów, jak również ich komponentów w różnych rozpuszczalnikach o szerokim zakresie polarności. Ważne jest także ustalenie zakresu stabilności termicznej w przypadku materiałów całkowicie niezidentyfikowanych.

Wykazano, że wielowymiarowe rozdzielanie i zastosowanie metodyki rozwiązania odpowiedniego układu równań liniowych umożliwia oznaczenie pełnego składu specyfików farmaceutycznych także wówczas, gdy niektóre składniki są niemożliwe do rozdzielania w żadnym układzie rozdzielczym. Można wówczas poprzestać na rozdzielaniu grupowym niektórych komponentów i obliczeniu zawartości poszczególnych składników z układu równań z wieloma niewiadomymi.

W przypadku polarnych komponentów specyfików farmaceutycznych najbardziej korzystne jest zastosowanie chromatografii, z wykorzystaniem kolumny na bazie żelu krzemionkowego, modyfikowanego grupami cyjanopropylowymi oraz wody i roztworów rozpuszczalnych w wodzie cieczy organicznych jako eluentów.

Stosowanie przepływu zwrotnego eluentu w kolumnie okazało się bardzo korzystne ze względu na możliwość elucji substancji silnie sorbowanych do fazy stacjonarnej, co umożliwia oznaczenie ich grupowej zawartości jako danej uzupełniającej.

Conclusions

First step in each analysis of the mixture of complex composition should be examination of the samples' solubility, and the solubility of their components (fig. 4).

It was proved that multidimensional analysis allows for the labelling of the full composition of the pharmaceutical specifics, whereby, the detailed separation is not necessary, but group component separation can be used and afterwards calculation of the final content using the set of equations with many unknowns.

In case of the polar components of the pharmaceutical specifics it is beneficial to use the hydrophilic influence (interaction), using the column based on the silica gel modified with the cyanic-propyl groups.

Feedback flow of the eluent in the column turned out to be beneficial, due to the elution of the substances (matters) strongly connected with stationary phase, what additionally allowed for the group labelling.

6. Podziękowania

(Acknowledgements)

Praca współfinansowana przez Unię Europejską w ramach Europejskiego Funduszu Społecznego. Projekt systemowy Województwa Pomorskiego pn. „InnoDoktorant - stypendia dla doktorantów”, I edycja.

Literatura (Literature)

1. W.S. Brund, R. Glinka, *Technologia Kosmetyków, Cosmetics technology*, MA Oficyna Wydawnicza, Łódź Poland 2001.
2. R. Glinka, *Receptura kosmetyczna, Cosmetic formulation*, MA Oficyna Wydawnicza, Łódź Poland 2003.
3. L. Novakova, L. Matysova, P. Solich, *Advantages of application of UPLC in pharmaceutical analysis*, *Talanta*, **68**(2006)908.
4. L. Katata, V. Nagaraju, A.M. Crouch, *Determination of ethylenediamine-tetraacetic acid, ethylenediaminedisuccinic acid and iminodisuccinic acid in cosmetic products by capillary electrophoresis and high performance liquid chromatography*, *Anal. Chim. Acta*, **579**(2006)177.
5. A.B. Barua, *A simple rapid method of sample preparation for LC analysis of retinoyl b-glucuronide and retinoic acid in water-based creams*, *J. Pharmac. Biomed. Anal.*, **32**(2003)563.
6. S.C. Rastogi, C. Zachariae, J.D. Johansen, C. Devantier, T. Menné, J. *Determination of methyl dibromoglutaronitrile in cosmetic products by high-performance liquid chromatography with electrochemical detection. Method validation*, *J. Chromatogr. A*, **1031**(2004)315.
7. R. Hajkova, P. Solich, J. Dvorak, J. Sicha, *Simultaneous determination of methylparaben, propylparaben, hydrocortisone acetate and its degradation products in a topical cream by RP-HPLC*, *J. Pharmac. Biomed. Anal.*, **32**(2003)921.
8. B.M. Tashtoush, J. Qasemb, J.D. Williams, T.P. DeWald, E.L. Jacobson, M.K. Jacobson, *Analysis and stability study of myristyl nicotinate in dermatological preparations by high-performance liquid chromatography*, *J. Pharmac. Biomed. Anal.*, **43**(2007)893.
9. D. Bonazzi, V. Andrisano, R. Gatti, V. Cavrini, *Analysis of pharmaceutical creams: a useful approach base on solid- phase extraction SPE and UV spectrometry*, *J. Pharmac. Biomed. Anal.*, **13** (1995)1321.
10. J. Aluoch- Orwa, I. Quintens, E. Roets, J. Hoogmartens, *Quantitative analysis of sorbic acids in pharmaceutical cream formulations by liquid chromatography on poly(styrene-divinylbenzene)*, *Europ. J. Pharmac. Sci.*, **5**(1997)155.
11. A. El-Gindy, M.A. Korany, M.F. Bedair, *First derivative spectrophotometric and high-performance liquid chromatographic determination of cinchocaine hydrochloride in presence of its acid degradation product*, *J. Pharmac. Biomed. Anal.*, **17**(1998)1357.
12. R. Gatti, P. Roveri, D. Bonazzi, V. Cavrini, *HPLC-fluorescence determination of chlorocresol and chloroxylenol in pharmaceuticals*, *J. Pharmac. Biomed. Anal.*, **16**(1997)405.
13. E. Dine, A. Ozdemir, *Linear regression analysis and its application to multivariate chromatographic calibration for the quantitative analysis of two- component mixtures*, *II Farmac.*, **60**(2005)591.

14. G.M. Escandar, P.C. Damiani, H.C. Goicoechea, A.C. Olivieri, *A review of multivariate calibration methods applied to biomedical analysis*, *Microchem. J.*, **82**(2006)29.
15. C. Tistaerta, B. Dejaeghera, N. Nguyen Hoaiab, G. Chataignec, C. Rivierec, V. Nguyen Thi Hongb, M. Chau Vanb, J. Quetin-Leclercq, Y. Vander Heydena, *Potential antioxidant compounds in *Mallotus speciosus* fingerprints. Part I: Indication, using linear multivariate calibration techniques*, *Anal. Chim. Acta*, **649**(2009)24.