



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

261198

(11)

(B1)

(22) Přihlášeno 05 05 87
(21) PV 3175-87.H

(51) Int. Cl.⁴

G 01 N 30/34

(40) Zveřejněno 15 06 88

(45) Vydáno 15 06 89

(75)

Autor vynálezu

BENEŠ KAREL RNDr., PAVELEK ZDENĚK RNDr., OPAVA

(54) Způsob stanovení 1,6-bis/5-(4-chlorfenyl)-diguanidino/-hexanu

1,6-bis/5-(4-chlorfenyl)-diguanidino/-hexan, chlorhexidin, který je složkou různých farmaceutických přípravků, je stanovován kapalinovou chromatografií na koloně naplněné sorbentem silikagelového typu s kovalentně vázanými kyanoethylovými skupinami mobilní fází tvořenou roztokem octanu sodného nebo draselného ve směsi acetonitrilu a vody. Všechny vzorky byly rozpuštěny popřípadě řešeny mobilní fází. Za těchto podmínek se zjistila lineární závislost velikosti píku chlorhexidinu na koncentraci v rozsahu 0,005 až 1,5 mol/m³.

Vynález se týká stanovení 1,6-bis/5-(4-chlorfenyl)-diguandino/-hexanu, dále jen chlorhexidinu, zvláště ve farmaceutických přípravcích, zejména v tekutých lékových formách.

Stanovení chlorhexidinu, který se používá zpravidla ve formě soli jako dioctan nebo glukonan, v lékových formách se provádí různými metodami. Nejběžnější je titrace v kyselině octové odměrným roztokem kyseliny chloristé (ICI, Standard Official Methods No. DH 129 B, 1959), která však v žádném případě není spolehlivá v přítomnosti jiných bazických složek. Jako selektivní se jeví titrace odměrným roztokem tetrafenylboronanu sodného v prostředí octanového ústoje (Pinzanti S., Porta E. La: Pharm. Acta Helv. 56, 1981, s. 155), výsledky jsou však příliš závislé na složení přípravků a metoda je málo citlivá. Velmi rozšířené jsou různé spektrální metody, které využívají buď barevných reakcí samotného chlorhexidinu, nebo jeho rozkladného produktu, 4-chloranilinu (Holbrook A.: J. Pharm. Pharmacol. 10, 1958, s. 370; Goodall R. R., Goldman J., Woods J.: Pharmacol. J. 200, 1968, s. 33; Cropper E., Platt P., Puttnam N. A.: J. Soc. Cosmet. Chem. 26, 1975, s. 255; Lowry J. B.: J. Pharm. Sci. 68, 1979, s. 110; Andermann G., Bahler M. O., Erhart M.: J. Pharm. Sci. 69, 1980, s. 215; Vaar F. J. van de, Hulshoff A., Indemans A. W.: Pharm. Weekbl., Sci. Ed. 2, 1980, s. 179; Pinzanti S. et al.: Pharm. Acta Helv.: 57, 1982, s. 334; Arzamascev A. P. et al.: Chim. Farm. Ž. 17, 1983, s. 247; Sukiasjan A. N., Kopylova A. I., Malyševa L. F.: Chim. Farm. Ž. 18, 1984, s. 1 271). Tato stanovení vesměs nejsou použitelná na barevné roztoky a jejich citlivost a spolehlivost je silně závislá na složení přípravků. Rovněž ani použití polarografické metody (Jacobsen E., Glyseth B.: Talanta 22, 1975, s. 1 001) nebylo úspěšné.

Vzhledem ke složitým lékovým formám jsou použitelné pouze separační metody. Plynové chromatografie se používá při stanovení rozkladného produktu 4-chloranilinu (Siefert K., Casgrande D., Silberman H.: J. Chromatogr. 109, 1975, s. 193; Matsushina H., Sakuri N.: Nipon Kosho Eisei Zasshi 29, 1982, s. 135; Minibel L. et al.: J. Chromatogr. 268, 1983, s. 321) respektive se samotný chlorhexidin rozloží nebo silyluje. Tyto metody jsou však buď velmi pracné anebo značně nepřesné, neboť neodliší produkt samovolného rozkladu. Tenkovrstvá chromatografie sice stanovuje chlorhexidin přímo (Güven K. C.: Eczaelik Bul. 12, 1970, s. 111; Dalrup T., Susanto F., Mischalke P.: Z. Anal. Chem. 308, 1981, s. 413), ale její citlivost stejně jako přesnost není dostačující. Nejvýhodnější se jeví vysokotlaká kapalinová chromatografie, kdy se zpravidla používá kolona naplněná modifikovaným silikagelem a jako mobilní fáze se obvykle volí směs vody s acetonitrilem nebo methylalkoholem obsahující iontopárovací látku (například kyselinu heptansulfonovou, kyselinu pentansulfonovou, kyselinu pentafluorooctanovou ap.) (Collins A. J., Campbell A. T., Bain R.: J. Clin. Pharmacol. 4, 1979, s. 205; Stuber B., Mueller H. K.: Pharm. Acta Helv. 55, 1980, s. 171; Bachner J., Heinisch G., Matous H.: J. High Resol. Chromatog. Commun. 4, 1981, s. 132; Perez R. L.: J. Chrom. Sci. 19, 1981, s. 570; Huston C. E., et al.: J. Chromatogr. 237, 1982, s. 457; Lake O. A. et al.: Pharm. Weekbl., Sci. Ed. 5, 1983, s. 15; Bauer M., et al.: J. Chromatogr. 259, 1983, s. 360; 315, 1984, s. 457; Richard A., Elbaz M., Anderman G.: J. Chromatogr. 298, 1984, s. 356).

Pro stanovení chlorhexidinu v lékových formách však není vhodná žádná z uvedených metod. Neselektivní metody neumožňují stanovení samotného chlorhexidinu. Selektivní metody nejsou použitelné z důvodů rušivých vlivů pomocných látek respektive ostatních aktivních složek obsažených ve vzorcích. Přestože bylo navrženo více aplikací pro kapalinovou chromatografii, žádná z nich neposkytuje uspokojivé a reprodukovatelné výsledky.

Uvedené nevýhody odstraňuje způsob stanovení chlorhexidinu podle vynálezu, jehož podstata spočívá ve stanovení kapalinovou chromatografií metodou kalibrační křivky nebo metodou vnějšího standardu na koloně naplněné sorbentem silikagelového typu s kovalentně vázanými kyanoethylovými skupinami o velikosti částic 5 až 10 μm . Mobilní fáze je tvořena roztokem octanu sodného nebo draselného o koncentraci 100 až 200 mol/m^3 rozpuštěného ve směsi 40 až 80 % obj. acetonitrilu a 20 až 60 % obj. destilované deionizované vody. Průtok mobilní fáze je v rozmezí 0,5 až 2 ml/min, přičemž se všechny vzorky včetně kalibračních roztoků rozpouští popřípadě ředí mobilní fází a získaný roztok obsahuje minimálně 80 % obj. mobilní fáze.

Způsob stanovení podle vynálezu je výhodný pro svoji jednoduchost, rychlost a spolehlivost. Příprava vzorku k analýze je výhodná, protože je na minimum snížena možnost vnášení systematické chyby při přípravě.

Způsob stanovení podle vynálezu byl ověřován kapalinovou chromatografií, kdy chromatograf byl spojen s počítačím integrátorem. Skleněná kolona byla naplněna sorbentem silikagelového typu s kovalentně vázanými kyanoethylovými skupinami o zrnění 5 μm . Mobilní fáze obsahovala 100 až 200 mol/m^3 octanu sodného popřípadě draselného ve směsi acetonitril s vodou. K detekci byla využita absorbce ultrafialového záření o vlnové délce 235 nm. Byla zjištěna lineární závislost mezi velikostí píku chlorhexidinu a jeho koncentrací v rozsahu 0,005 až 1,5 mol/m^3 s korelačním koeficientem 0,999 98 z dvanácti měření.

Způsob podle vynálezu umožňuje stanovení chlorhexidinu v komplikovaných lékových formách, jež bylo dosavadními metodami značně nespolehlivé a v neposlední řadě významně urychluje a usnadňuje stanovení, a tak do značné míry příznivě ovlivňuje ekonomiku výroby.

Následující příklady provedení způsob podle vynálezu pouze dokládají, ale neomezuji.

P ř í k l a d 1

Chemikálie: octan sodný p. a.

octan draselný p. a.

acetonitril pro UV

destilovaná deonizovaná voda

Přístroje: kapalinový chromatograf ve spojení s počítačím integrátorem

spektrofotometrický detektor

kolona skleněná, 150x3 mm vnitřní rozměr, naplněná silikagelem s kovalentně vázanými kyanoethylovými skupinami o zrnění 5 μm

Chromatografické podmínky: Mobilní fáze - 65 % obj. acetonitrilu, 35 % obj. vody, octan draselný o koncentraci 100 mol/m^3 . Průtok 0,5 ml/min. Retenční čas chlorhexidinu byl 6,2 min. Vyhodnocení metodou kalibrační křivky. Příprava vzorku: 1 ml vzorku byl zředěn na 10 ml mobilní fází. Deklarovaný obsah glukonanu chlorhexidinu ve vzorku byl 0,2 g/l. Stanovený obsah glukonanu chlorhexidinu činil (0,194 $\pm$ 0,002) g/l, vypočteno ze tří měření.

P ř í k l a d 2

Chemikálie, přístroje a chromatografické podmínky jako v příkladě 1. Vyhodnocení metodou vnějšího standardu. Jako kalibrační roztok byl použit roztok připravený rozpuštěním 25,6 mg dioctanu chlorhexidinu v 50 ml methanolu a zředěním 1:10 mobilní fází. Takto připravený roztok obsahoval 51,2 mg/l dioctanu chlorhexidinu, což odpovídá 73,5 mg/l glukonanu chlorhexidinu. Příprava vzorků popřípadě jejich ředění mobilní fází, deklarovaný obsah a stanovený obsah glukonanu chlorhexidinu v g/l jsou uvedeny v tabulce:

T a b u l k a

Číslo	Ředění	Deklarovaný obsah	Stanovený obsah
1	1:10	0,50	0,485
2	1:10	0,50	0,501
3	1:5	0,10	0,090
4	1:5	0,10	0,092
5	1:50	2,5	2,46
6	1:50	2,5	2,47
7	1:10	1,0	1,01
8	1:10	1,0	0,995

P ř í k l a d 3

Chemikálie a přístroje jako v příkladě 1. Chromatografické podmínky. Mobilní fáze - 60 % acetonitrilu, 40 % vody, octan sodný o koncentraci 200 mol/m³. Ostatní podmínky jako v příkladě 1. Retenční čas chlorhexidinu 8,0 min. Vyhodnocení metodou vnějšího standardu. Jako kalibrační roztok byl použit roztok připravený rozpuštěním 82,4 mg dioctanu chlorhexidinu do 100 ml methylnalkoholu a zředěním tohoto roztoku 1:10 mobilní fází. Takto připravený roztok obsahoval 82,4 mg/l dioctanu chlorhexidinu. Vzorek tlakového balení s deklarovaným obsahem dioctanu chlorhexidinu 0,50 % byl nejdříve celý vystříkán do odměrné baňky o objemu 100 ml. Hmotnost obsahu zjištěná diferenčním vážením byla 38,2 g. Po dokonalém odstranění všech těkavých složek byl vzorek doplněn na 100 ml methylnalkoholem. Takto připravený roztok byl ředěn 1:25 mobilní fází. Stanovený obsah dioctanu chlorhexidinu byl $(0,503 \pm 0,004) \%$ vypočteno ze tří měření.

P R E D M Ě T V Y N Ā L E Z U

Způsob stanovení 1,6-bis/5-(4-chlorfenyl)-diguandino/-hexanu kapalinovou chromatografií metodou kalibrační křivky nebo metodou vnějšího standardu na koloně naplněné sorbentem silikagelového typu s kovalentně vázanými kyanoethylovými skupinami vyznačující se tím, že se eluce provede mobilní fází tvořenou roztokem octanu sodného nebo draselného o koncentraci 100 až 200 mol/m³ ve směsi 40 až 80 % obj. acetonitrilu a 20 až 60 % obj. destilované deionizované vody, přičemž se vzorky včetně kalibračních roztoků rozpouští popřípadě ředí mobilní fází, načež získaný roztok obsahuje minimálně 80 % obj. mobilní fáze před nanesením na kolonu.