

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

Biologicky aktivní látky – analýza VI

Diplomová práce

Hradec Králové 2006
Vedoucí diplomové práce

Lucie Minaříková
PharmDr. Petr Kastner, Ph.D.

V úvodu své práce děkuji PharmDr. Petru Kastnerovi, Ph.D. za odborné a cenné rady, za ochotnou a trpělivou spolupráci při vypracovávání diplomové práce. Za ochotnou pomoc děkuji také pracovníkům katedry farmaceutické chemie a kontroly léčiv.

OBSAH

1. ÚVOD	5
1.1. Úvod a cíl práce	6
2. TEORETICKÁ ČÁST	7
2.1. Biologicky aktivní látky	8
2.1.1. Dexamethason	8
2.1.1.1. Chemické a fyzikálně chemické vlastnosti:	8
2.1.1.2. Farmakologické vlastnosti:	8
2.1.2. Cinchokain hydrochlorid	9
2.1.2.1. Chemické a fyzikálně chemické vlastnosti:	10
2.1.2.2. Farmakologické vlastnosti:	10
2.2. Vysokoúčinná kapalinová chromatografie	11
2.2.1. Princip metody	11
2.2.2. Chromatograf:	12
2.2.2.2. Využití HPLC	14
2.3. Validace analytických metod	16
2.3.1. Druhy validací	16
2.3.2. Parametry validací	16
3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	20
3.1. Materiál, pomůcky a přístroje	21
3.1.1. Chemikálie:	21
3.1.2. Sestava pro HPLC :	21
3.1.3. Ostatní přístroje a pomůcky :	22
3.2. Příprava mobilní fáze a vzorků :	22
3.2.1. Příprava mobilní fáze:	22
3.2.2. Příprava vzorků:	23
3.3. Příprava vzorků pro selektivitu	23
3.4. Příprava vzorků pro linearitu:	24
3.4.1. Příprava zásobních roztoků:	24
3.4.2. Roztoky pro linearitu	25
3.5. Roztoky pro opakovatelnost nástřiků	25
4. VÝSLEDKY	26
4.1. Chromatografické podmínky	27
4.1.1. Optimalizace složení mobilní fáze	27
4.2. Rozkladné produkty, Selektivita	28
4.3. Validace	32
4.3.1. Linearita	32
4.3.1.1. LOQ:	32
4.3.1.2. Linearita rozkladných produktů	34
4.4. Opakovatelnost nástřiků	37
5. DISKUSE	39
6. ZÁVĚR	42
7. POUŽITÁ LITERATURA	44

1. ÚVOD

1.1. Úvod a cíl práce

Jedním z cílů farmacie je zajistit pacientovi kvalitní, bezpečný a účinný lék v dostatečném množství. Hodnocením kvality, bezpečnosti a účinnosti léčivého přípravku se zabývají různé analytické metody.

Jednou z nejčastěji používaných analytických metod je vysoce účinná kapalinová chromatografie (High Performance Liquid Chromatography, dále jen HPLC). Tato metoda umožňuje separaci i složitých směsí chemických látek, kterými obvykle léčivé přípravky jsou, a tím je možná současně jejich identifikace i kvantifikace.

Předmětem práce je hodnocení cinchokainu hydrochloridu a dexamethasonu v léčivém přípravku s využitím HPLC. Hodnoceným léčivým přípravkem byly ušní kapky.

Již dříve navržená metodika pro hodnocení rozkladných produktů ve výše charakterizovaném přípravku nebyla dostatečně citlivá. Metodu je nutno nejprve modifikovat a potom validovat. Práce je tedy zaměřena hlavně na proměření parametrů požadovaných při validaci metody.

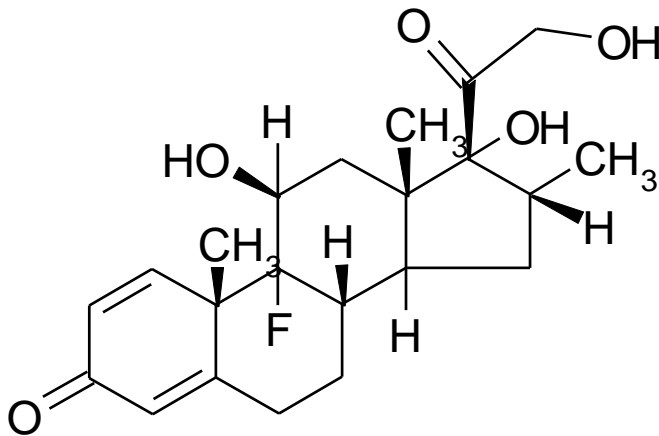
2. TEORETICKÁ ČÁST

2.1. Biologicky aktivní látky

2.1.1. Dexamethason

Dexamethason je 9 α - fluor - 11 β , 17 α , 21- trihydroxy - 16 α - methyl - 1, 4 - pregnadien - 3, 20- dion.

(Obr.1) Chemická struktura Dexamethasonu:



2.1.1.1. Chemické a fyzikálně chemické vlastnosti:

Dexamethason je bezbarvý až žlutobílý krystalický prášek o teplotě tání 268 - 271°C, molekulové hmotnosti 392,45. Rozpustný v ethanolu, acetonu a chloroformu, obtížně rozpustný v etheru a prakticky nerozpustný ve vodě. [1 - 4]

2.1.1.2. Farmakologické vlastnosti:

Dexamethason je syntetický účinný kortikosteroid s glukokortikoidním účinkem a s minimálními účinky mineralokortikoidními (nepůsobí na retenci Na⁺ a vody). Glukokortikoidy jsou hormony s účinkem na glycidový metabolismus (způsobují

hyperglykémii), metabolismus bílkovin (mají katabolické účinky, je snížena syntéza proteinů) a lipidů (způsobují redistribuci tělesného tuku).

Jsou to látky s výrazným protizánětlivým a imunosupresivním účinkem. Ovlivňují všechny typy zánětlivých reakcí bez ohledu na příčinu.

Dexamethason je nejčastěji používán k imunosupresivní terapii, k léčbě očních nemocí, k diferenciální diagnóze Cushingova syndromu, k léčbě akutních alergických reakcí, inhalačně u bronchiálního astma, ve vysokých dávkách k léčbě otoku mozku.

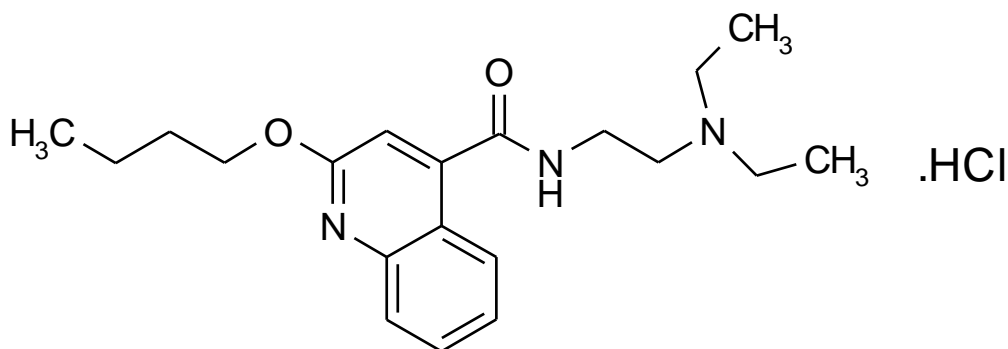
Podává se lokálně, ve formě mastí, krémů, kapek, a systémově, perorálně i parenterálně.

K nejčastějším nežádoucím účinkům patří zhoršení diabetu, glukózové tolerance, osteoporóza, suprese až atrofie kůry nadledvin. Po delším podání jsou typické atrofické změny a zhoršení sekundárních infekcí. [5 - 7]

2.1.2. Cinchokain hydrochlorid

Cinchokain je 2 – butoxy – N - [2 – (diethylamino) ethyl]chinolin – 4 – karboxamid – hydrochlorid.

(Obr.2) Chemická struktura Cinchokain-hydrochloridu:



2.1.2.1. Chemické a fyzikálně chemické vlastnosti:

Cinchokain hydrochlorid je bílý krystalický prášek, nebo bezbarvé krystaly o teplotě tání 95 - 100°C a molekulové hmotnosti 379,9. Je to hygroskopická látka velmi dobře rozpustná ve vodě, snadno rozpustný v acetonu, ethanolu, dichlormethanu. Velmi snadno se sráží. [1 - 4]

2.1.2.2. Farmakologické vlastnosti:

Cinchokain je látka patřící mezi lokální anestetika. Jsou to látky, které reverzibilně tlumí až blokují vedení vzruchu senzitivními neurony, tím dochází k místnímu znecitlivění. Amidová lokální anestetika působí na napětově řízených Na⁺ kanálech, kde postupnou redukcí průchodu Na⁺ iontů zvyšují práh excitability, snižují rychlost vzestupu akčního potenciálu, tím klesá vedení vzruchu.

Cinchokain je nejúčinnější a nejtoxičtější lokální anestetikum, je používán ke všem typům anestezie, ale v současnosti je nejčastější topické použití. Samotný Cinchokain je 30 – 50 krát účinnější než kokain a 20 krát účinnější než prokain, vyznačuje se rychlým nástupem účinku a delší dobou působení.

Cinchokain je určen k lokálnímu znecitlivění před drobnými dermatologickými či chirurgickými zákroky, dále k útlumu bolesti i svědění u lokalizovaných dermatóz.

[5 - 7]

2.2. Vysokoučinná kapalinová chromatografie

Vysokoučinná kapalinová chromatografie (HPLC) je jedna z nejvíce používaných separačních metod, umožňující jak kvalitativní, tak i kvantitativní analýzu separovaných složek směsi.

Je to velmi rozšířená a oblíbená metoda, díky svým přednostem je hojně využívána v lékopisných monografiích:

- vysoce citlivé stanovení, vysoká selektivita stanovení, přijatelná rychlost analýzy.
- pro analýzu stačí jen velmi malé množství vzorku.
- velmi výhodná je možnost automatizace díky automatickým dávkovačům.

HPLC je využitelná i v případě, kdy nelze principiálně využít jiné analytické metody, např. spektrofotometrii, nebo v případě analýzy přírodních látek a jiných složitých směsí. [8 - 10]

HPLC je separační metoda založená na dělení látek mezi kapalnou (mobilní) fází a stacionární fází, kterou je v koloně naplněn tuhý sorbent, zakotvená kapalina nebo chemicky vázaná na tuhý nosič, ionex, gel.

Separace je založená na mechanismu adsorpce, rozdělení, iontové výměně nebo na specifických interakcích závislých na typu stacionární fáze. [11]

2.2.1. Princip metody

Základem metody je mnohonásobné ustalování rovnováhy složek směsi mezi dvěma vzájemně nemísitelnými fázemi. Stacionární, nepohyblivá, fáze různou měrou zadržuje jednotlivé složky směsi; mobilní, pohyblivá, fáze tyto složky směsi vymývá (eluuje) ze stacionární fáze a odnáší je různou rychlostí, tím dojde k jejich oddělení. (Rychlost eluce závisí na velikosti interakcí mezi složkou směsi a oběma fázemi).

Účinnost separace závisí na velikosti částic stacionární fáze, separační účinnost se zvyšuje se stejnoměrností a menší velikostí částic stacionární fáze. Separace pak probíhá na větší ploše.

Separace je také závislá na rychlosti průtoku mobilní fáze, která se řídí tlakem čerpadla. [8 - 11]

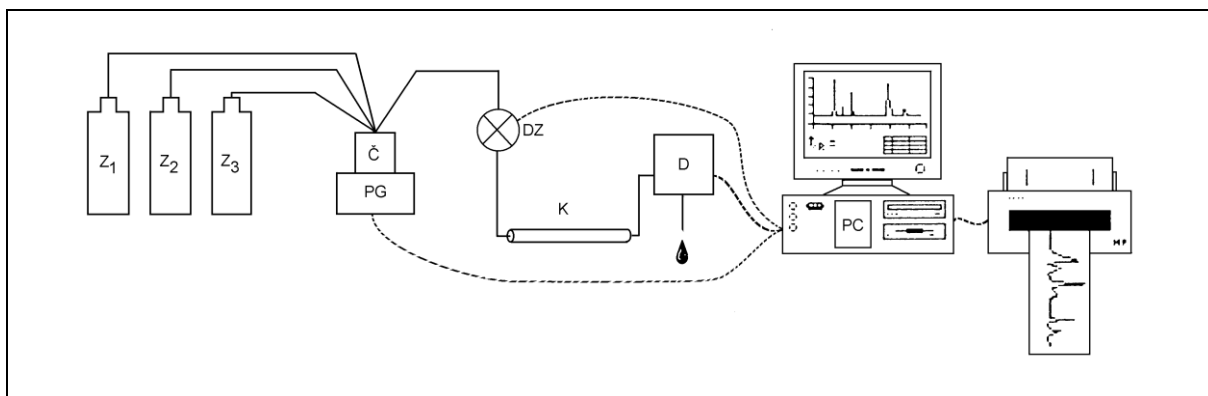
Jestliže se eluční parametry příliš neliší, lze HPLC analýzu provést za konstantního složení mobilní fáze v průběhu celé analýzy, tzv. isokratická eluce. Některé směsi se ale tímto způsobem dostatečně neoddelí, v tomto případě lze využít tzv. gradientové eluce, při které se k jedné mobilní fázi plynule přimíchává rostoucí množství druhé mobilní fáze. [8]

Základní kvalitativní charakteristikou v HPLC je retenční (eluční) čas t_R , to je čas od nástřiku vzorku na kolonu po vrchol chromatografického píku. Kvantitativní charakteristika v HPLC je plocha (nebo výška) chromatografického píku.

2.2.2. Chromatograf:

Hlavními částmi kapalinového chromatografu jsou zásobníky mobilní fáze, čerpadla, zajišťující konstantní průtokovou rychlost mobilní fáze přes kolonu do detektoru, dále dávkovací zařízení, chromatografická kolona, kde dochází k dělení směsi na jednotlivé složky, tyto složky jsou unášeny mobilní fází do detektoru. Detektor umožňuje kontinuální detekci a stanovení sledovaných látek eluovaných z kolony. Signál z detektoru je přenášen do počítače, kde je zpracován. Počítač současně řídí chod celého chromatografu. [9, 11]

(Obr. 3) Schéma kapalinového chromatografu:



Popis:

Z1, Z2, Z3 – zásobníky mobilní fáze, Č – vysokotlaké čerpadlo, PG – programovací jednotka, DZ – dávkovací zařízení, K – chromatografická kolona, D – detektor, PC – počítač se zapisovacím zařízením (tiskárna) [9]

2.2.2.1.1. Dávkovací zařízení

Vzorek lze dávkovat buď manuálně speciálním smyčkovým dávkovacím ventilem, nebo automatickým dávkovacím zařízením. [11]

2.2.2.1.2. Kolona

Nejčastěji používané jsou skleněné nebo nerezové ocelové kolony, které jsou naplněné vhodným sorbentem (stacionární fází) . Abychom dosáhli vysoké účinnosti, pak musí být náplň kolony homogenní a rovnoměrná, proto se téměř výhradně používají kolony plněné a testované přímo výrobcem.

Pro HPLC se nejčastěji používají kolony dlouhé 10 – 25 cm o vnitřním průměru 3 – 5 mm.

[8 , 9 , 11]

2.2.2.1.3. Detektory

Detektor poskytuje informace o složení eluátu vycházejícího z kolony, tím umožní kvalitativní i kvantitativní hodnocení výsledků analýzy. Proto jsou na detektory kladeny vysoké požadavky:

- vysoká citlivost – detekce se pohybuje ve velmi nízkých koncentracích (ng - µg/ml)
- reprodukovatelnost a linearita odezvy.
- nezávislost odezvy ke změně složení mobilní fáze při gradientové eluci.
- univerzálnost detekce pro všechny oddělené složky směsi.

Nejčastěji se používají detektory spektrofotometrické, fluorimetrické a elektrochemické. Případně méně často i refraktometrické. Nověji se také využívá propojení HPLC s hmotnostním spektrometrem. [8, 9, 11]

Spektrofotometrické detektory jsou nejčastěji používanými při HPLC analýze léčiv. Registrují absorbanci eluátu protékajícího celou detektorem. K detekci léčiv se využívá hlavně UV oblast spektra, méně často viditelná a infračervená oblast.

Aby látka absorbovala toto záření, musí ve své molekule obsahovat tzv. chromofory, to je seskupení atomů schopné absorbovat v rozmezí 200 – 800 nm. Jsou to látky, které v molekule obsahují systém konjugovaných dvojných vazeb nebo násobné vazby mezi atomy. Při absorpci záření dochází k přechodu valenčních elektronů.

Používají se : UV detektory s fixní vlnovou délkou, při které absorbuje většina léčiv.

UV-VIS detektory s volitelnou vlnovou délkou, obvykle v oblasti 200 – 800 nm.

Více informací lze získat spektrofotometrem s diodovým polem (diode array detektor). Je řízen počítačem, snímá celé absorpční spektrum eluátu současně při několika vlnových délkách. Výsledek je trojrozměrný chromatogram jako závislost absorbance na vlnové délce na čase. [8, 9]

2.2.2.2. *Využití HPLC*

V oblasti kontroly léčiv k identifikaci, stanovení obsahu a ke kontrole čistoty. Při použití vhodných chromatografických podmínek lze z jednoho nástřiku určit totožnost, obsah látky i případné nečistoty.

V oblasti stability léčiv – na chromatogramu je patrný hlavní pík analyzované látky a menší píky rozkladných produktů. Rozkladné produkty lze sledovat z kvalitativního i kvantitativního hlediska.

Použití k analýze přírodních léčiv v rostlinném materiálu. HPLC umožňuje hodnotit obsah a zastoupení alkaloidů, glykosidů, vitamínů, atd. v drogách.

HPLC umožňuje monitorovat léčiva a jejich metabolity v tělních tekutinách (v krvi, séru, moči). Nejprve je třeba vzorek vhodně izolovat a tím připravit k analýze. [8 , 9]

2.3. Validace analytických metod

Validace analytické metody je proces, kterým jsou zjišťovány nejdůležitější charakteristiky metody. Validací se demonstruje, že vypracovaná metoda je vhodná k použití. Cílem validace je určit podmínky, za kterých je metoda použitelná, a zajistit spolehlivost při opakovaném použití v jedné nebo různých laboratořích. [10]

Validace se používá vždy při objevu nové metody, při změně metody, při převodu validované metody, při kontrole způsobilosti systému, při revalidaci metody (podmínky revalidace jsou stanoveny) . [12]

Zjištěné hodnoty validovaných parametrů se zpracovávají do validačního protokolu, k protokolu musí být přiložena patřičná dokumentace (přístroje, chromatogramy) . [10]

2.3.1. Druhy validací

Validace metody v rámci jedné laboratoře je interní (vnitřní) validace . Cílem interní validace je na omezeném počtu vzorků stanovit, jestli je daná analytická metoda vhodná k plánovanému použití. To se zjistí vyhodnocením požadovaných validačních parametrů.

Validace externí (vnější) zahrnuje validaci interní společně se srovnáním výsledků validace metody z více laboratoří. [12]

2.3.2. Parametry validací

- Správnost – vyjadřuje těsnost shody hodnoty získané s hodnotou správnou. Jde o statisticky významnou odlišnost mezi získanou a skutečnou hodnotou. Hodnocením správnosti metody se určí možná přítomnost náhodné soustavné chyby zjištěním rozdílu mezi hodnotou danou (správnou) a získanou.

Tyto hodnoty se získají porovnáním se standardem, referenčním materiálem, porovnáním analýzy ověřované s již osvědčenou metodou.

Správnost se obvykle zjistí analýzou nejméně šesti vzorků a vyjádřením jako rozdíl správné a získané hodnoty, nebo jako výtěžnost, recovery v %.

$$\text{rec (\%)} = \frac{\text{nalezená hodnota} * 100}{\text{skutečná hodnota}}$$

- Přesnost – je míra shody mezi jednotlivými výsledky metody opakovaně získanými s jedním homogenním vzorkem. Tento vzorek se obvykle šestkrát nezávisle analyzuje kompletním způsobem včetně přípravy vzorků.

Přesnost metody závisí pouze na rozdělení náhodných chyb, ke správné hodnotě nemá vztah.

Přesnost se vyjádří jako směrodatná odchylka výsledků zkoušek. [10 , 12]

$$\text{RSD}_{\%} = \frac{100}{\bar{y}} * \sqrt{\frac{\sum (y - \bar{y})^2}{n - 1}}$$

\bar{y} - průměr jednotlivých hodnot, y – jednotlivé hodnoty vyjádřené jako plochy píků, n – počet jednotlivých hodnot

Podle podmínek opakování se rozlišují tři úrovně přesnosti:

Opakovatelnost – Definována jako těsnost shody mezi navzájem nezávislými výsledky zkoušek získanými za podmínek opakovatelnosti – výsledky zkoušek se získají opakovaným použitím stejné zkušební metody, za použití identického materiálu, měření ve stejné laboratoři, týmž pracovníkem, za použití stejných přístrojů a zařízení během krátkého časového rozmezí. [12]

Mezilehlá přesnost – Postup obdobný jako u Opakovatelnosti, ale metoda se provádí s různými činidly, různými pracovníky, přístroji i zařízeními, v různou dobu, ale v jedné laboratoři a se stejným vzorkem.

Reprodukovatelnost – Postup podobný jako u Mezilehlé přesnosti, ale měření probíhá v různých laboratořích. [10]

- Selektivita – Selektivita metody je schopnost přesného a správného určení analytu i v přítomnosti jiných látek, které lze očekávat. Tyto látky mohou být další účinné látky (u složených přípravků), pomocné látky, nečistoty z výroby, rozkladné produkty.

Selektivita metody se doloží výsledky analýzy standardu, vzorků bez analyzované látky obsahující všechny ostatní složky přípravku, rozkladné produkty, nečistoty. [10 , 12]

- Detekční limit (LOD) – Vyjadřuje citlivost metody. Je to nejnižší koncentrace analyzované látky, stanovované kvalitativně.

Určuje se jako koncentrace analyzované látky s poměrem signálu k šumu rovné 3. Tento detekční limit se ověří analýzou zjištěné koncentrace vzorku.

- Kvantitativní limit (LOQ) – Také vyjadřuje citlivost metody. LOQ je nejnižší koncentrace látky, která je stanovitelná s přijatelnou přesností a správností.

Tato koncentrace je vyjádřena poměrem signálu k šumu v hodnotě 10. [10]

Poměr signálu k šumu - $S / N = 2H / h$

H – Výška píku složky na chromatogramu předepsaného porovnávacího roztoku měřená mezi vrcholem píku a základní linií signálu. Signál se sleduje v 20-ti násobku šířky píku v polovině jeho výšky.

h – Rozsah šumu na chromatogramu získaného při slepé zkoušce a zaznamenaného na vzdálenosti rovné 20-ti násobku šířky píku v polovině výšky předepsaného porovnávacího roztoku, je-li to možné, je tato vzdálenost měřena rovnoměrně na obě strany od místa, kde by se tento pík nacházel. [2]

- Linearita – Je schopnost dát výsledky přímo úměrné koncentraci stanovované látky. Stanovuje se minimálně pět vzorků různých koncentrací (v rozmezí 50 – 150 % deklarovaného obsahu). V případě stanovení nečistot se sleduje linearita v rozmezí LOD až minimálně 120 % horního limitu nečistoty. Každou koncentraci je stanovena dvakrát a poté se provede regresní analýza.

K měření je možno použít roztoky standardů.

Je-li metoda lineární, určí se směrnice z jednoho kalibračního bodu. Není-li, pak se směrnice určuje z celé kalibrační přímky. [10 , 12]

- Rozsah – Rozsah se stanovuje z linearit metody. Je to koncentrační hranice, ve které je metoda použitelná. Dolní limit může být limit detekce, horní limit může být maximální odezva, při jejímž dosažení přístroj už nepracuje přesně. [10]

- Robustnost – Robustnost metody je definována jako míra vlivu kolísání úrovně jednotlivých parametrů na výsledek analytického stanovení. Sledují se poznatky z vývoje metody s cílem upozornit na podmínky, které mohou ovlivnit výsledek. U HPLC se sledují např. složení mobilní fáze, pH vodné složky, teplota na koloně, rychlost průtoku, kolísání tlaku, stabilita analyzovaných vzorků, rozdíl různých šarží, atd. [10 , 12]

3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1. Materiál, pomůcky a přístroje

3.1.1. Chemikálie:

Dexamethasone Base : BP 93 Tamda a.s. Olomouc

Š: 021204

Cinchocaini hydrochloridum : Tamda a.s. Olomouc

Š: 382

1,3-Butylene glycol : Celanese Ltd.

Š: LOT 901100504

Glycerol 99,5% : Spectrophotometric grade, Sigma – Aldrich Chemie

Š: 191612-1L

Amoniak : vodný roztok min. 25% čistý, Lachema Lach - Ner s.r.o.

Š: 1/2 – 26- 36/ 37/ 39 – 45 – 61

Kyselina mravenčí: 98 – 100% p.a. Lachema Brno

Acetonitrile CHROMASOLV for HPLC, Sigma – Aldrich, Germany

Methanol – p.a. Lachema, Lach – Ner s.r.o.

Destilovaná voda

3.1.2. Sestava pro HPLC :

Vše bylo měřeno na přístroji firmy SHIMADZU:řada 20 – Prominence

Autosampler:SIL-20AC

2x Pumpa:LC-20AD

Degasser DGU-20A3

Kolonový termostat: CTO-20AC

Detektor: SPD-20A

Řídící jednotka CBM-20A

3.1.3. Ostatní přístroje a pomůcky :

Digitální váhy

Laboratorní magnetická míchačka

Acidimetr

Elektrická pec

Sušárna

Pipety a balónek k pipetování.

Zkumavky a zátky se zábrusem

Kádinky, zkumavky, odměrné baňky, odměrné válce, Erlenmayerovy baňky, odsávací baňky, fritra, nálevky, laboratorní lžička, stříčka, vialky.

3.2. Příprava mobilní fáze a vzorků :

Optimální složení mobilní fáze a vhodné chromatografické podmínky byly známy již z měření, které prováděla Doubravka...???

Použitá chromatografická kolona : Waters Spherisorb ® Phenyl (250 x 4,6 mm, 5 µ m)

Měření probíhalo při 238 nm.

Složení mobilní fáze: Mravenčanový pufr pH = 3,6 a acetonitril v poměru 67 : 33

Průtok mobilní fáze byl 1 ml / min. Teplota na koloně byla nastavena na 30°C. [14]

3.2.1. Příprava mobilní fáze:

Vodná část: Odměřit 1,57 ml amoniaku do odměrné baňky 1000 ml a doplnit destilovanou vodou po značku. Poté upravit kyselinou mravenčí 10% na pH = 3,6. Vodnou část smíchat s acetonitrem ve daném poměru a na závěr zbavit nečistot filtrací přes fritu za podtlaku.

V analýze byl poměr mravenčanového pufru a acetonitrilu v mobilní fázi nejprve 67 : 33 [14], potom byl poměr upraven na 70 : 30 z důvodu lepšího oddělení píků na chromatogramu. Ostatní chromatografické podmínky zůstaly stejné.

3.2.2. Příprava vzorků:

K měření byly použity vzorky standardních látek stejné koncentrace jako je koncentrace látek v originálním přípravku.

Vzorky byly označeny: Z D C
 Z D
 Z C
 Z
 Orig

Z.....základ (směs rozpouštědel použitých v léčivém přípravku .
Glycerol a 1,3 – Butandiol)

D..... dexamethason

C..... cinchokain hydrochlorid

Orig... originál léčivého přípravku

Původní převzatá metoda: 0,500 g vzorku se rozpustí v 0,5 ml mobilní fáze. Na kolonu se nastříkuje 20 μ l. [13] [14]

Optimalizovaná metoda : 1,000 g vzorku se doplní mobilní fází do 10,0 ml. Na kolonu se nastříkuje 200 μ l.

Pro získání rozkladných produktů byly vzorky zahřívány v sušárně při teplotě 100°C po dobu 20 hodin. [14]

3.3. Příprava vzorků pro selektivitu

Všechny vzorky se připraví z 1,0 g standardní látky nebo originálního přípravku a doplnění do objemu 10 ml mobilní fázi. Vzorky připravíme vždy dvakrát, od každého jeden dáme zahřát po dobu 20 hodin při 100°C. Získáme tak rozkladné produkty.

Pro snadnější a přesnější navažování si nejprve nachystáme zásobní roztok Dexamethasonu: 20,0 mg D se odváží do 10 ml odměrné baňky a doplní po rysku acetonitrilem. Získáme tak roztok o koncentraci $c = 2$ mg/ml.

(Tab.1) Navážky vzorků pro selektivitu:

Navážka	Z	D	C
Vzorek	(g)	(ml roztoku D)	(mg)
Z	1,0245		
Z zahříváný	1,0478		
ZD	1,0145	0,1	
ZD zahříváný	1,0349	0,1	
ZC	0,9980		5,0
ZC zahříváný	1,0599		5,0
ZDC	0,9741	0,1	5,0
ZDC zahříváný	1,0183	0,1	5,0

3.4. Příprava vzorků pro linearitu:

Nejprve si připravíme zásobní roztoky, ze kterých získáme postupným ředěním vzorky pro linearitu.

100% nečistoty je stanoveno jako 0,02mg/ml pro Dexamethason a 0,5mg/ml pro Cinchokain hydrochlorid.

3.4.1. Příprava zásobních roztoků:

Odvážit 20,0 mg Dexamethasonu do odměrné baňky 10ml a doplnit mobilní fázi po rysku - získáme tak roztok o koncentraci $c = 2\text{mg/ml}$.

1 ml roztoku o koncentraci 2mg/ml zředit v odměrné baňce 10ml po rysku mobilní fázi - získáme roztok o koncentraci $c = 0,2\text{mg/ml}$.

1 ml roztoku o koncentraci 0,2mg/ml zředit v odměrné baňce 10ml po rysku mobilní fázi - získáme roztok o koncentraci $c = 0,02\text{mg/ml}$. Roztok D100%

Odvážit 50,0mg Cinchokain hydrochloridu do odměrné baňky 10ml a doplnit mobilní fází po rysku - získáme roztok o koncentraci $c = 5\text{mg/ml}$.

1 ml roztoku o koncentraci 5mg/ml zředit v odměrné baňce 10ml po rysku mobilní fází - získáme roztok o koncentraci $c = 0,5\text{mg/ml}$. Roztok C100%

3.4.2. Roztoky pro linearitu

Ze zásobních roztoků D100% a C100% získáme postupným ředěním roztoky pro linearitu.

Roztok CD10% : V odměrné baňce doplníme 1ml roztoku D100% a 1ml roztoku C100% po rysku mobilní fází. Z roztoku CD10% naředíme roztoky o koncentraci nečistot 2; 1,5; 1; 0,5 %. Tyto roztoky získáme zředěním 2; 1,5; 1; 0,5 ml roztoku CD10% v odměrné baňce 10ml po rysku mobilní fází.

Roztok CD1% : 1ml roztoku CD10% zředíme v odměrné baňce 10ml po rysku mobilní fází. Z tohoto roztoku naředíme roztoky o koncentraci nečistot 0,1; 0,05; 0,01%. Tyto roztoky získáme zředěním 1; 0,5; 0,1 ml roztoku CD1%.

3.5. Roztoky pro opakovatelnost nástřiků

Pro měření opakovatelnosti nástřiků je použit vzorek o koncentraci na úrovni LOQ, tedy 0,2% roztok Dexamethasonu vzhledem ke 100% obsahu látky v léčivém přípravku a 0,01% roztok Cinchokain hydrochloridu vzhledem ke 100% koncentraci látky v léčivém přípravku.

Roztok získáme postupným ředěním, analogicky jako u vzorků pro linearitu.

4. VÝSLEDKY

4.1. Chromatografické podmínky

Pro analýzu je použita kolona typu Waters Spherisorb® Phenyl (250 x 4,6 mm, 5 µm). Na čerpadle je nastaven průtok mobilní fáze 1 ml/min.

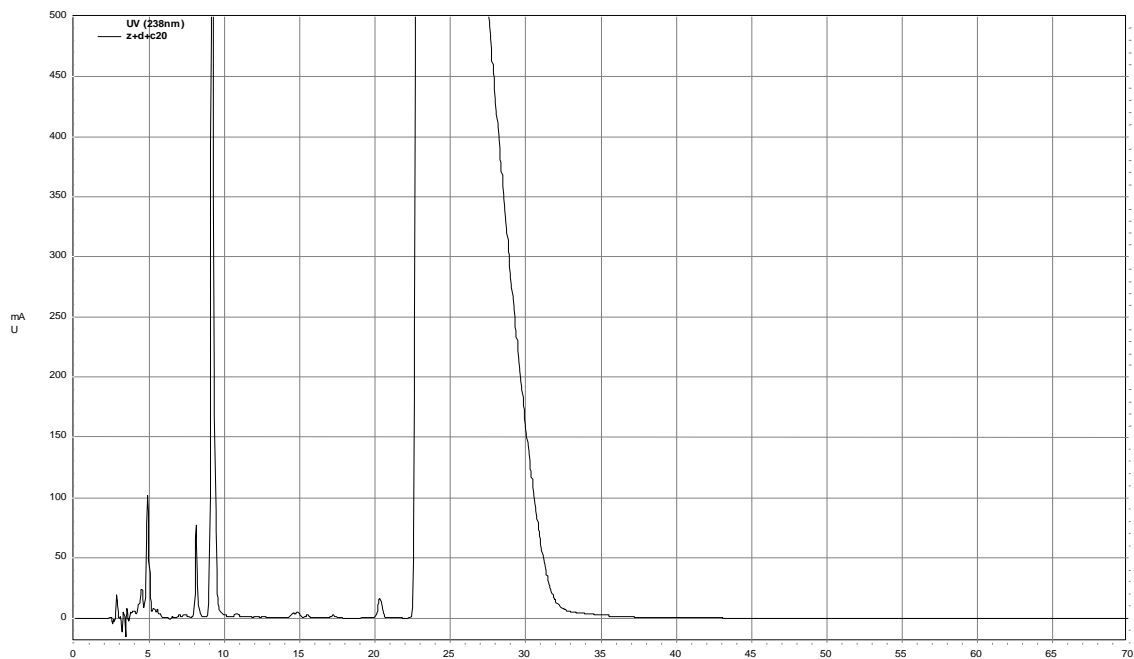
Na spektrofotometrickém detektoru je nastavena vlnová délka 238 nm.

Objem nastříkovaný na kolonu je 200 µl.

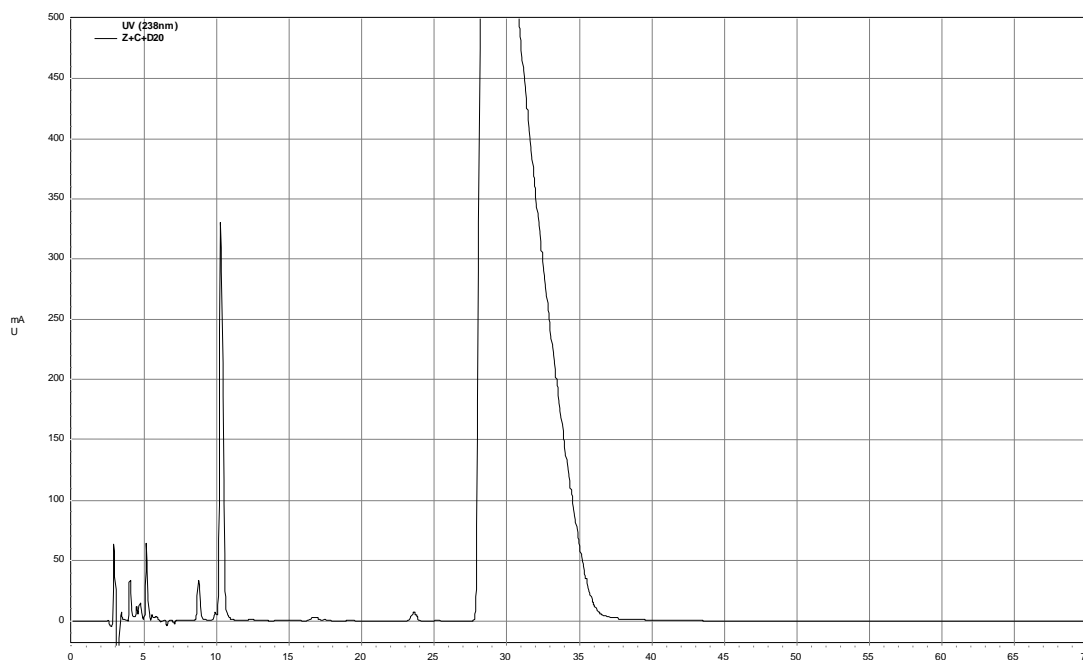
4.1.1. Optimalizace složení mobilní fáze

Původní poměr mravenčanového pufru a acetonitrilu byl 67 : 33 (Obr. 4) Tento poměr byl upraven na poměr mravenčanového pufru a acetonitrilu 70 : 30 (Obr. 5). Úprava složení mobilní fáze byla z důvodu lepšího oddělení píků na chromatogramu.

(Obr.4) Rozdělení píků při složení mobilní fáze v poměru 67 : 33



(Obr.5) Rozdělení píků při složení mobilní fáze v poměru 70 : 30



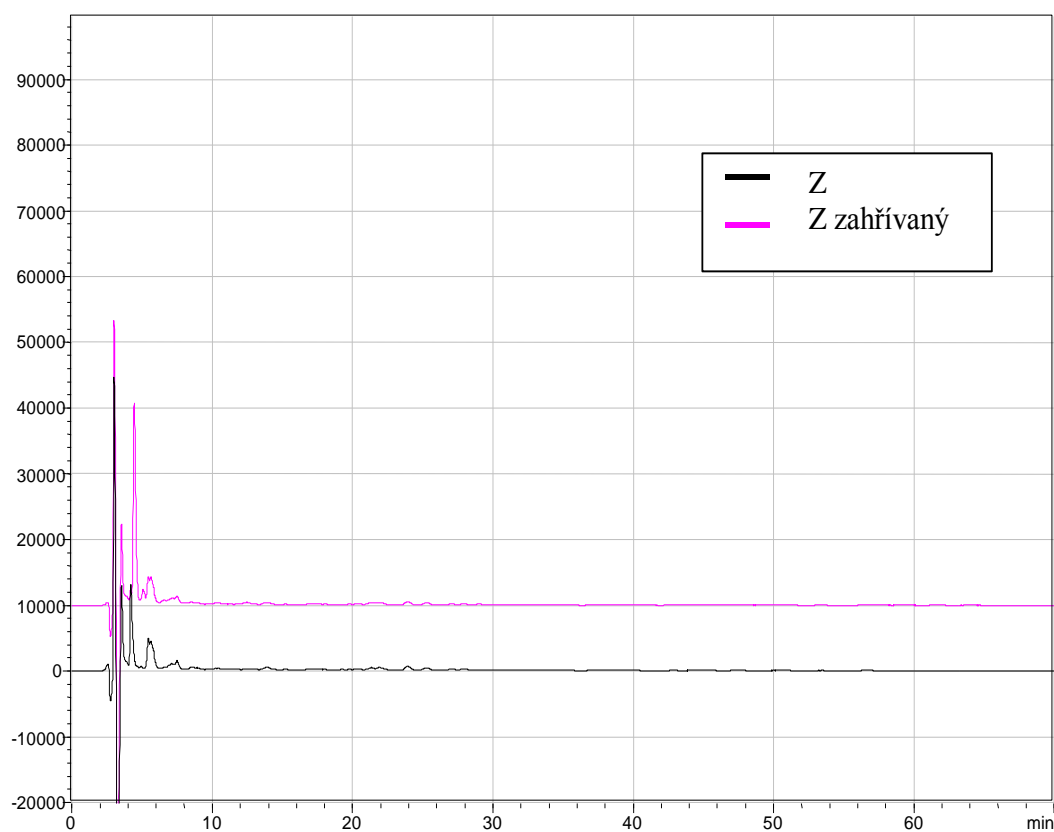
Úprava mobilní fáze sice prodloužila celkovou dobu analýzy, ale umožnila lepší separaci píků. Hlavně píky v 9. a 10. minutě. Jde o rozkladný produkt Dexamethasonu ($R_t = 9$) a hlavní pík Dexamethasonu ($R_t = 10$).

4.2. Rozkladné produkty, Selektivita

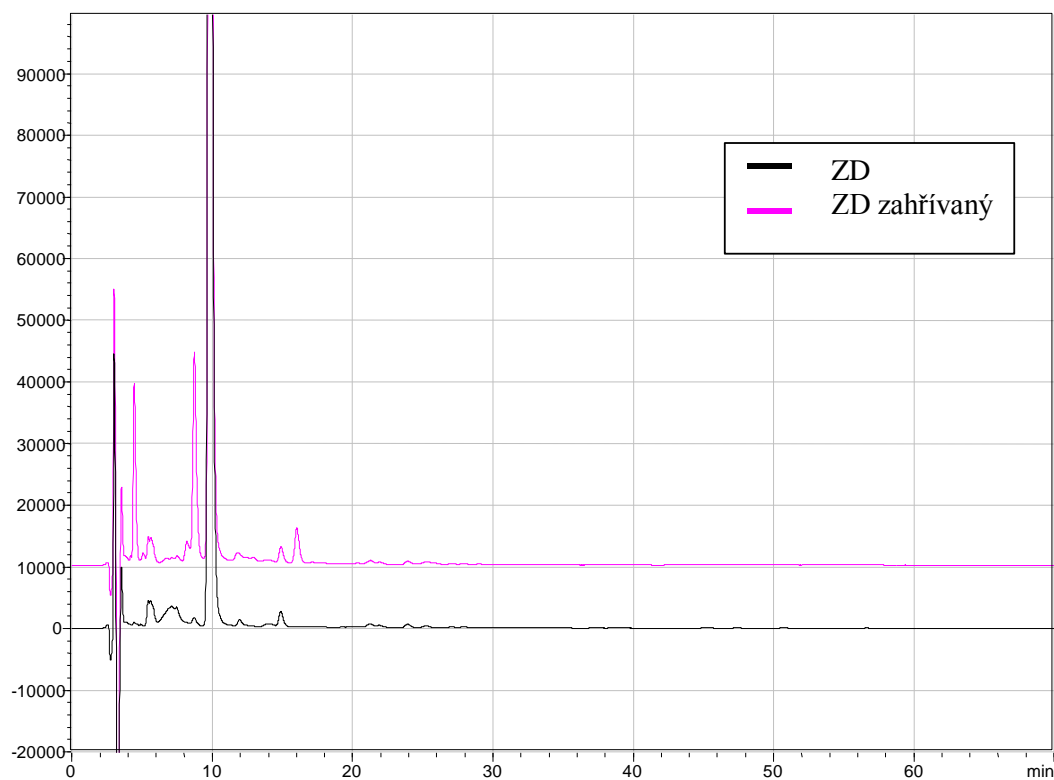
Pro získání rozkladných produktů je nutno vzorky zahřívát po dobu 20 hodin při teplotě 100°C. [14]

Pro lepší identifikaci rozkladných produktů jsou vzorky zahřívány a měřeny postupně, nejprve samotná rozpouštědla (Základ- Z) (Obr. 6), rozpouštědla s Dexamethasonem (Obr.7), Cinchokainem (Obr.8), a také rozpouštědla s Dexamethasonem a Cinchokainem v jednom vzorku (Obr.9). Pro ilustraci je zahříván i vzorek originálního léčiva (Obr.10)

(Obr.6) Chromatogram Z a Z zahříváného



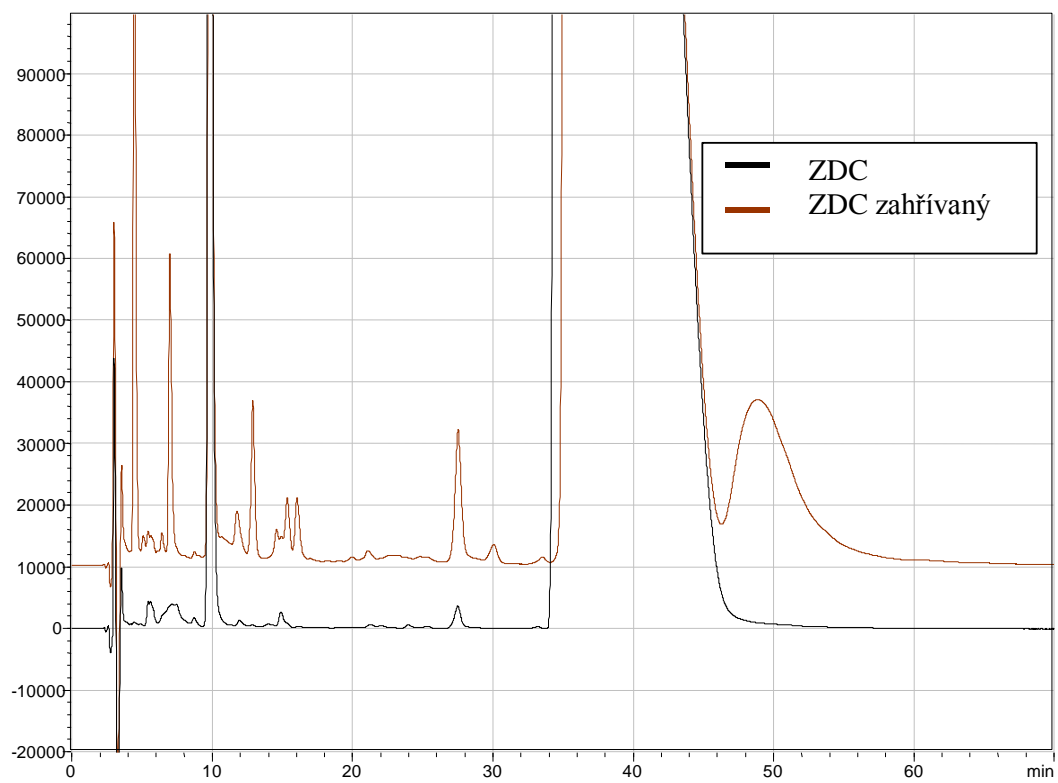
(Obr.7) Chromatogram ZD a ZD zahříváného



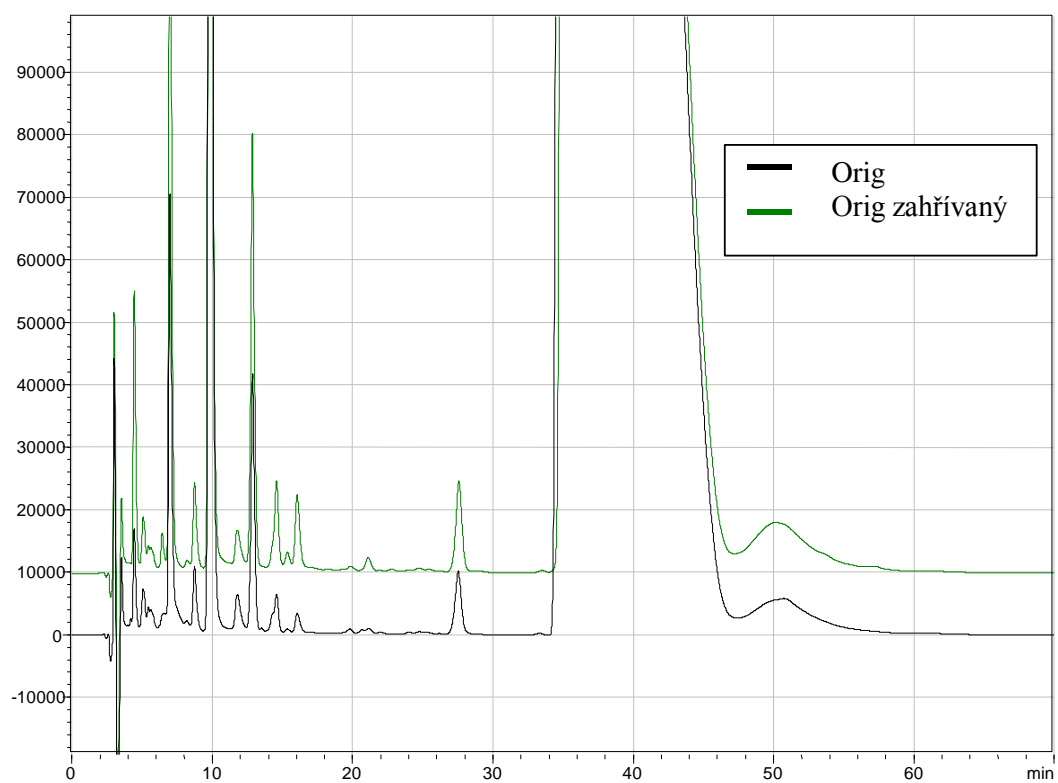
(Obr.8) Chromatogram ZC a ZC zahříváného



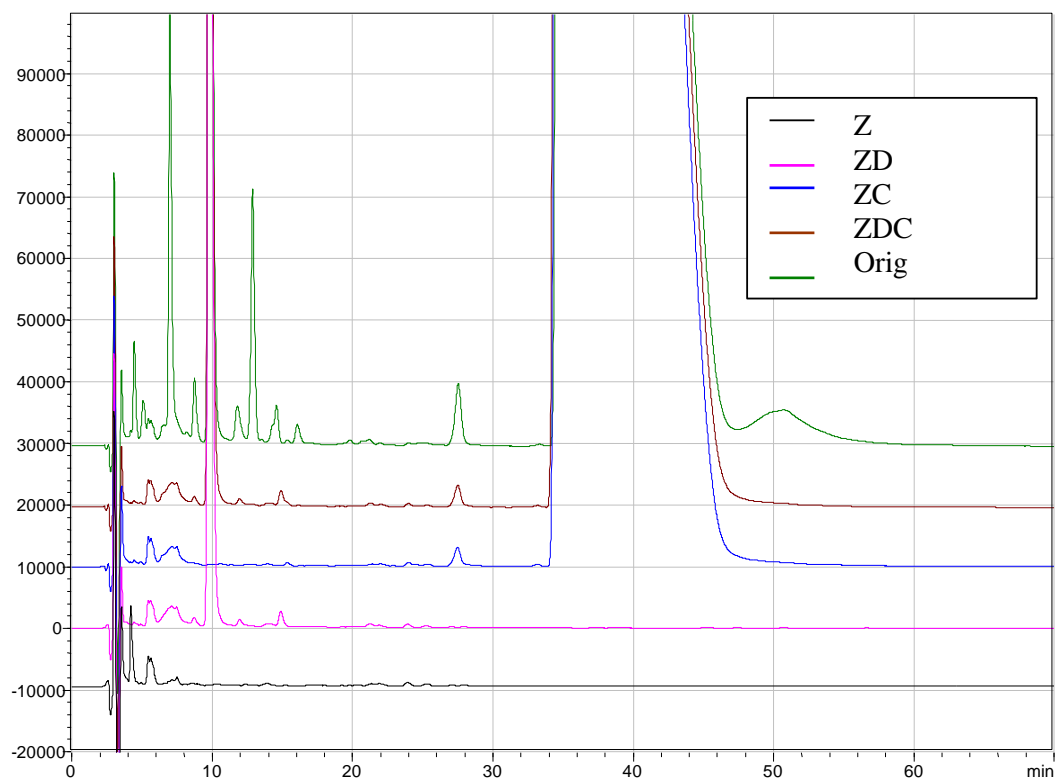
(Obr.9) Chromatogram ZDC a ZDC zahříváného



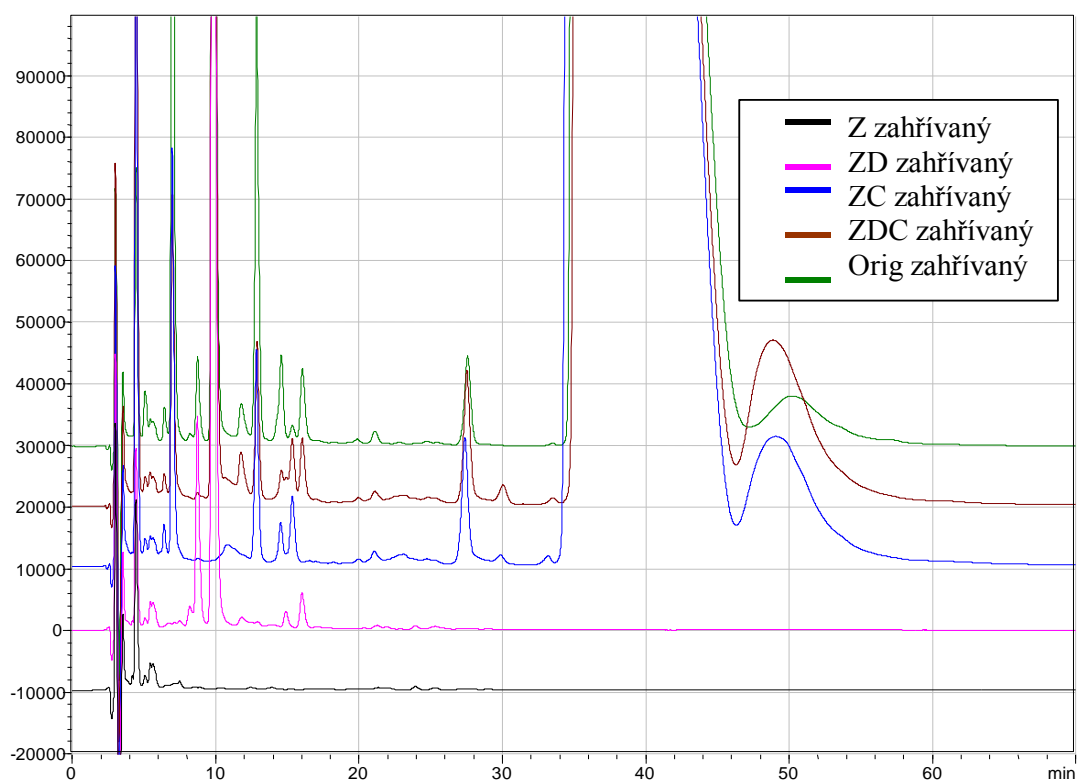
(Obr.10) Chromatogram Orig a Orig zahříváného



(Obr.11) Chromatogram Z, ZD, ZC, ZDC, Orig



(Obr.12) Chromatogram Z, ZD, ZC, ZDC, Orig zahříváných



4.3. Validace

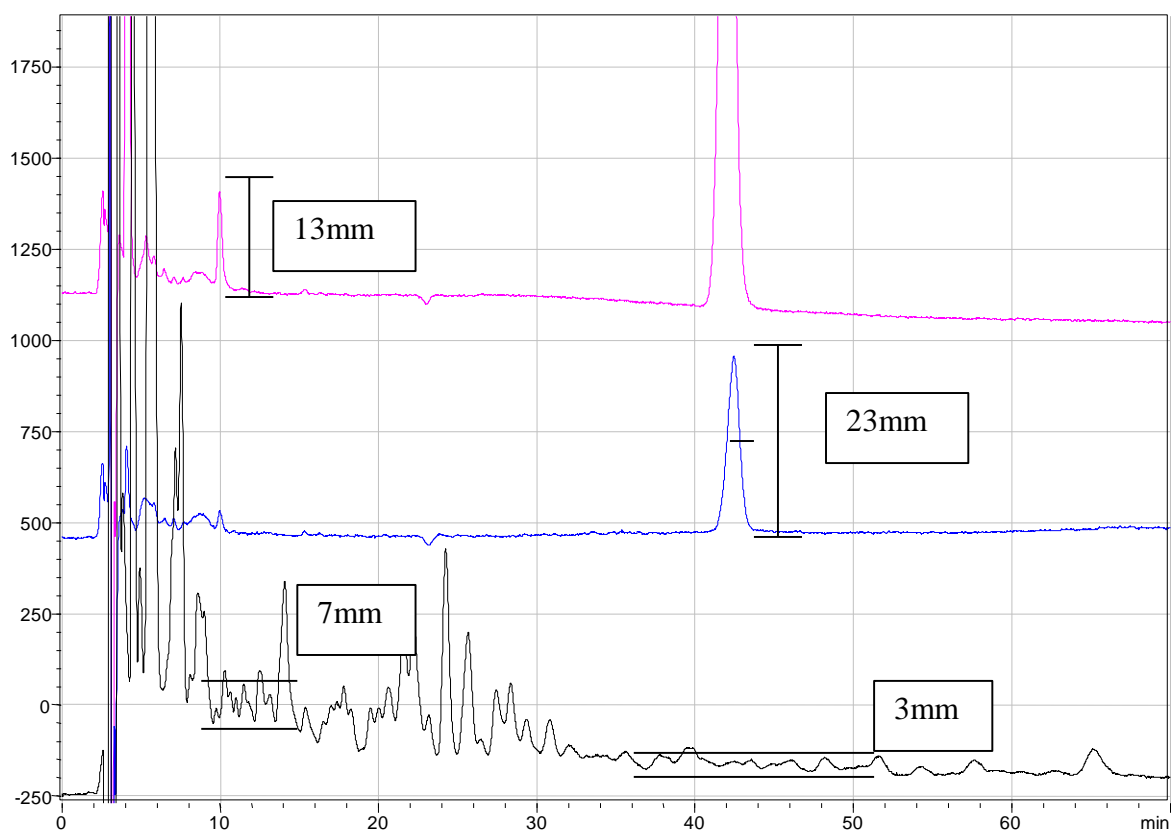
4.3.1. Linearita

K zjištění linearity rozkladných produktů je nejdříve nutno určit LOQ Dexamethasonu i Cinchokainu. Po získání hodnoty LOQ je možno stanovit linearitu.

4.3.1.1. LOQ:

K získání hodnoty LOQ jsou postupně naředěny vzorky standardních látek na koncentraci odpovídající 0,07% nečistot pro Dexamethason (D) a 0,01% pro Cinchokain (C). Tyto vzorky jsou změřeny. Dále je proměřen vzorek obsahující směs rozpouštědel.(Obr.13)

(Obr.13) Výpočet LOQ, resp. LOD



Chromatogramy shora dolů:

Chromatogram standardů D a C naředěných tak, aby obsahovaly stanovovanou látku v koncentracích odpovídajících 0,07 % nečistot.

Chromatogram standardů D a C naředěných tak, aby obsahovaly stanovovanou látku v koncentracích odpovídajících 0,01 % nečistot.

Chromatogram blanku s obsahem 1,3 butandiolu a glycerolu.

Výpočet:

$$\text{LOQ} = \frac{10 \cdot c}{S/N}$$

$$\text{LOD} = \frac{3 \cdot c}{S/N}$$

$$S/N = \frac{2H}{h}$$

LOQ pro Dexamethason je 0,2% vzhledem ke 100% obsahu Dexamethasonu v léčivém přípravku. LOD je vypočteno na 0,05%.

LOQ pro Cinchokain je 0,01% vzhledem ke 100% obsahu Cinchokainu v léčivém přípravku. LOD je 0,002%.

4.3.1.2. Linearita rozkladných produktů

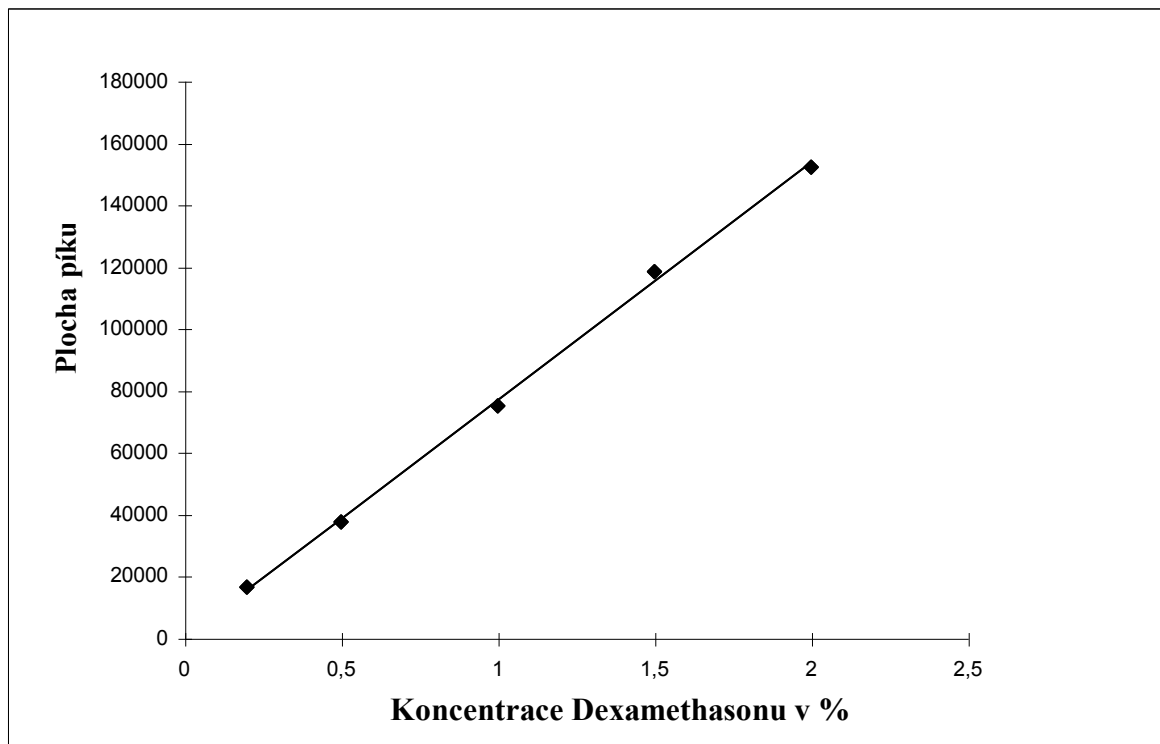
Pro zjištění linearity rozkladných produktů jsou proměřeny roztoky s odstupňovanou koncentrací. Pro Dexamethason to je 5 roztoků, nejnižší koncentrace odpovídá koncentraci na úrovni LOQ. Pro Cinchokain je proměřeno 6 roztoků, nejnižší koncentrace odpovídá koncentraci na úrovni LOQ. Každý vzorek byl nastříknut dvakrát. Požadavek na hodnotu korelačního koeficientu je více než 0,99.

4.3.1.2.1. Linearita Dexamethasonu:

(Tab.2)

Koncentrace Dexamethasonu %	Plocha píku Dexamethasonu 1. měření	Plocha píku Dexamethasonu 2. měření	Průměrná hodnota
2	153520	150841	152180,5
1,5	118507	118432	118469,5
1	75670	73990	74830
0,5	36899	37984	37441,5
0,2	16469	16435	16452

(Obr.14) Graf lineární regrese pro Dexamethason



(Tab.3) Statistické parametry lineární regrese

Regresní funkce		$y = k x$
Počet bodů	5	Směrodatná odchylka k
Směrnice přímky	$k = 7,678E + 4$	$\pm 7,9E + 2$
Korelační koeficient	$R = 0,99926$	
Reziduální odchylka	$S_{rez} = 2,16E + 3$	

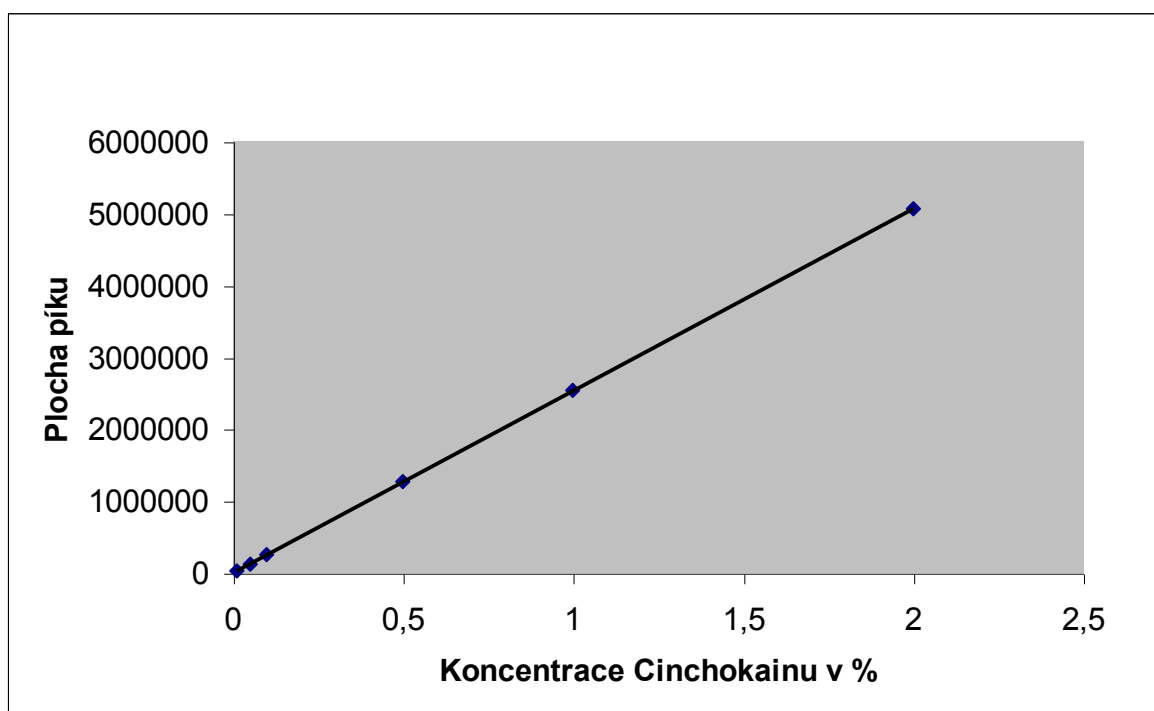
Závislost y na x byla prokázána se spolehlivostí 99,9%

4.3.1.2.2. Linearita Cinchokain hydrochloridu:

(Tab.4)

Koncentrace Cinchokainu %	Plocha píku Cinchokainu 1.měření	Plocha píku Cinchokainu 2.měření	Průměrná hodnota
2	5065274	5056082	5060678
1	2535413	2534029	2534721
0,5	1267319	1267404	1267362
0,1	254342	251803	253072,5
0,05	126279	126515	126397
0,01	23363	23710	23536,5

(Obr.15) Graf lineární regrese pro Cinchokain hydrochlorid



(Tab.5) Statistické parametry lineární regrese

Regresní funkce		$y = k x$
Počet bodů	6	Směrodatná odchylka
Směrnice přímky		$\pm 9,0E + 2$
Korelační koeficient	$R = 0,99999$	
Reziduální odchylka	$S_{rez} = 2,07E + 3$	

Závislost y na x byla prokázána se spolehlivostí 99,9%.

4.4. Opakovatelnost nástřiků

Opakovatelnost nástřiků je měřena v koncentracích na úrovni koncentrací LOQ pro Dexamethason i pro Cinchokain. Nástřik jednoho vzorku se provádí 5krát, hodnotí se shoda retenčních časů a plochy píků.

(Tab.6) Opakovatelnost nástřiků

RSD = relativní směrodatná odchylka

Číslo měření	Retenční čas Dexamethason	Plocha píku Dexamethason	Retenční čas Cinchokain	Plocha píku Cinchokain
1	9,87	16469	44,84	24939
2	9,87	16435	44,89	25297
3	9,86	16888	44,95	26442
4	9,86	16314	44,99	26116
5	9,86	16819	45,05	27201
Průměrná hodnota	9,864	16585	44,97	26287,33
RSD (%)	0,0555	1,5252	0,1831	3,4401

Průměrný retenční čas Dexamethasonu je 9,864 min, RSD odpovídá hodnotě 0,0555%.
Průměrná plocha píku je 16585 s hodnotou RSD rovnou 1,5252%.
Průměrný retenční čas Cinchokainu hydrochloridu je 44,97 min, RSD odpovídá hodnotě 0,1831%. Průměrná plocha píku je 26287,33 s hodnotou RSD rovnou 3,4401%.

5. DISKUSE

Na začátku práce jsme provedli několik změn oproti původní převzaté metodě.

Nejprve byl změněn poměr vodné a organické fáze v mobilní fázi. Došlo tak sice k prodloužení analýzy, ale zároveň se zlepšila separace píků.

Dále jsme pozměnili přípravu vzorků. V původní převzaté metodě jsme získali vzorky v příliš viskózním roztoku. Metoda: 0,5g vzorku zředit 0,5ml mobilní fáze. Tento roztok neumožňuje přesné dávkování, vzorky byly v malém objemu, navážka se špatně doplňovala do 1ml. Balení léčivého přípravku je poměrně malé, proto je pro analýzy výhodnější připravovat vzorek z 1g vzorku zředěním do 10ml mobilní fázi. Dodržení původní koncentrace vzorku nastříknutého na kolonu bylo dosaženo zvýšením nastříkovaného objemu na 200 μ l.

Hodnocení správnosti a přesnosti je vynecháno, protože tyto parametry se hodnotí známým přídatkem známých nečistot nebo rozkladných produktů. Standardy nečistot nejsou k dispozici, proto je testována alespoň opakovatelnost nástřiků na koncentrační úrovni LOQ.

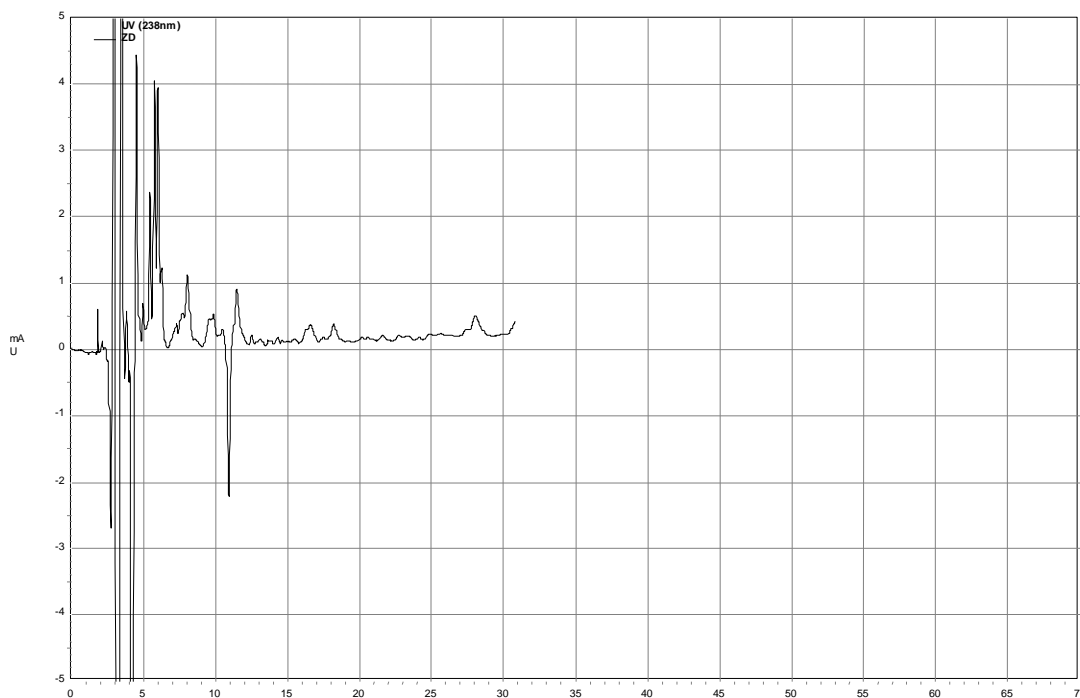
Podle Evropského lékopisu [3] je limit nečistot u Dexamethasonu pro jednotlivou nečistotu 0,5 % a pro sumu nečistot 1,0 % standardu látky.

Podle Evropského lékopisu [3] je limit nečistot u Cinchokain hydrochloridu pro jednotlivou nečistotu 0,2 % a pro sumu nečistot 0,5 % standardu látky.

Limity kvantifikace byly vypočítány pro Dexamethason 0,2% vzhledem ke 100% obsahu látky v přípravku, pro Cinchokain hydrochlorid to je 0,01% vzhledem ke 100% obsahu látky v přípravku. Jsou tedy nižší než limity pro nečistoty v těchto léčivech podle PhEur.

Selektivita: Během analýzy se na chromatogramu začal objevovat záporný pík, který měl retenční čas blízko hlavního píku Dexamethasonu (Obr.16), proto byly chromatogramy nehodnotitelné.

(Obr.16) Chromatogram standardu Dexamethasonu na koncentrační úrovni LOQ. Chromatografické podmínky viz. experimentální část.



Zkusili jsme obměnit jednotlivé části mobilní fáze, a zjistili jsme, že nečistota na chromatogramu má původ v acetonitrilu, Zpočátku studie jsme používali acetonitril kvality p.a., který naprosto dostačoval potřebám a tento negativní pík nebyl ve vzorcích patrný. Použitím nové šarže tohoto rozpouštědla však došlo k této nežádoucí interferenci s píkem dexamethasonu. proto byl pro analýzu použit acetonitril pro chromatografie místo acetonitrilu p.a. a tím byl tento problém odstraněn.

Selektivita metody je demonstrována na obr 6 - 12. Z chromatogramů vzorků a stejných vzorků po tepelné zátěži jsou patrné píky pravděpodobných rozkladných produktů, které budou hodnotitelné v rámci stabilitních testů.

6. ZÁVĚR

1. Byly zpracovány literární údaje týkající se validační problematiky.
2. Byla optimalizována již známá metodika s cílem zlepšit podmínky analýzy a hlavně citlivost. Prodloužil se celkový čas analýzy, pozměnila se příprava vzorků.
3. Nová metoda: Použití kolony typu Waters Spherisorb® Phenyl (250 x 4,6 mm, 5 μm). Průtok mobilní fáze 1ml/min. Spektrofotometrický detektor je nastaven na 238nm. Objem nastříknutý na kolonu je 200μl. Mobilní fáze je složena z mravenčanového pufru pH = 3,6 a acetonitrilu v poměru 70 : 30. Vzorky připravíme zředěním 1,000 g přípravku do 10,0 ml mobilní fáze.
4. Byla nalezena hodnota LOQ a LOD pro Dexamethason i Cinchokain hydrochlorid. Pro Dexamethason LOQ = 0,2 % a LOD = 0,05 % vzhledem ke 100 % obsahu látky v přípravku. Pro Cinchokain LOQ = 0,01 % a LOD = 0,002 % vzhledem ke 100 % obsahu látky v přípravku.
5. Byla zkoušena linearita metody. Linearita byla prokázána s hodnotou korelačního koeficientu pro Dexamethason $R_d = 0,9993$, pro Cinchokain hydrochlorid s hodnotou korelačního koeficientu $R_c = 0,9999$.
6. Byla zkoušena opakovatelnost nástřiků. RSD je pro shodu retenčních časů u Dexamethasonu RSD = 0,06 %, pro Cinchokain je RSD = 0,18 %. RSD pro plochu píky je pro Dexamethason RSD = 1,52 % a pro Cinchokain = 3,44 %.
7. Selektivita metody. Při použité metodě jsou jednotlivé píky dostatečně oddělené a dobře hodnotitelné.

7. POUŽITÁ LITERATURA

1. B. Melichar a kol. : Chemická léčiva, Avicenum, Praha 1987
2. Kol. autorů : Český lékopis 2002, Grada Publishing a.s., Praha 2002
3. European Pharmacopoeia 5th edition, Council of Europe, Strasbourg Cedex, France 2004
4. Pharmazeutische Stoffliste, 8th edition, Arzneiburo der Bundesvereinigung Deutscher Apothekerverbände (ABDA), Frankfurt am Main, 1992
5. Kol. autorů: Remedia Compendium 2.vydání, Panax, Praha 1997
6. Lincová D., Farghali H., et al. : Základní a aplikovaná farmakologie, Praha, Galén, 2002
7. Vokurka M., Hugo J. : Praktický slovník medicíny, , Maxdorf, Praha 2000
8. Karlíček R. a kol. : Analytická chemie pro farmaceuty, Karolinum, Praha, 2001
9. Klimeš J. a kol. : Kontrola léčiv I., Karolinum, Praha, 2002
10. Klimeš J. a kol. : Kontrola léčiv II., Karolinum, Praha, 2004
11. Z. Bezáková a kol. : Základy farmaceutickej analýzy, WA – Print, Bratislava, 2002
12. www.sweb.cz/hplc/
13. American Pharmacopoeial Convection, Inc.: United states Pharmacopoeia 26, Rockville 2003
14. Doubravka Skácelová, Diplomová práce, 2005