

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



DIPLOMOVÁ PRÁCE

Hodnocení vybrané účinné látky v přípravku
pomocí HTLC I

Vedoucí diplomové práce: PharmDr. Petr Kastner, Ph.D.

HRADEC KRÁLOVÉ, 2018 Victoria Sumatokhina

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

V Hradci Králové

Victoria Sumatokhina

Victoria Sumatokhina

Tímto bych chtěla poděkovat svému školiteli PharmDr. Petru Kastnerovi, Ph.D. za odborné vedení mé diplomové práce, cenné rady, trpělivost a vstřícnost. Dále bych chtěla poděkovat Mgr. Petře Reimerové za pomoc se softwarem přístroje a ostatním pracovníkům Katedry farmaceutické chemie a farmaceutické analýzy za rady, ochotu a přátelské pracovní prostředí. Práce vznikla za podpory SVV 260 401.

OBSAH

ABSTRAKT.....	8
ABSTRACT.....	9
ÚVOD.....	10
CÍL PRÁCE.....	11
TEORETICKÁ ČÁST	13
1. CHROMATOGRAFIE.....	14
1.1 Chromatografické metody.....	14
1.2 Součásti chromatografického zařízení.....	15
1.2.1 Kolony.....	16
1.2.1.1 Stacionární fáze v HPLC.....	17
2. VYSOKOTEPLTNÍ KAPALINOVÁ CHROMATOGRAFIE (HTLC).....	17
2.1 Instrumentace HTLC.....	18
2.1.1 Stacionární fáze v HTLC	19
2.1.1.1 Popis zirkoniových fází.....	19
2.1.1.1.2 Možnosti modifikace povrchu ZrO ₂	20
2.1.2 Popis ZirChrom®-PBD kolony.....	21
2.1.3 Výhody ZirChrom®-PBD kolony.....	21
2.1.4 Nevýhody zirkoniových fází.....	22
3. MOŽNOSTI HODNOCENÍ CHROMATOGRAMU.....	22
3.1 Kvalitativní analýza	22
3.2 Kvantitativní analýza	23
4. VALIDACE ANALYTICKÉ METODY.....	24
4.1 Správnost.....	26
4.2 Přesnost.....	26
4.3 Selektivita.....	26
4.4 Linearita.....	27
4.5 Robustnost.....	27
4.5.1 Plackett-Burmanův plán.....	27
4.6 Detekční limit (LOD)	28
4.7 Kvantitativní limit (LOQ)	28
5. CHARAKTERISTIKA ANALYZOVANÝCH LÁTEK	29
5.1 Natrium-pikosulfát (NaP).....	29
5.1.1 Rozkladné produkty NaP.....	30

5.2 Natrium-benzoát (NaB)	31
EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	33
6. MATERIÁL A POMŮCKY	34
6.1 Chemikálie	34
6.2 Pomůcky	34
6.3 HTLC sestava	35
6.4 Přístroje	35
7. OBECNÝ POSTUP	36
7.1 Příprava MF	36
8. PŘÍPRAVA ROZTOKŮ	36
8.1 Roztoky k optimalizaci chromatografických podmínek	37
8.1.1 Příprava roztoků	37
8.1.2 Příprava porovnávacích roztoků (č. 1 - 4)	37
8.2 Příprava porovnávacích roztoků pro stanovení NaP, NaB a IMP	38
8.3 Příprava zkoušeného roztoku	39
9. OPTIMALIZACE CHROMATOGRAFICKÝCH PODMÍNEK	39
9.1 Výběr zkoušené látky	39
9.2 Experimenty s MF	39
9.3 Experimenty s pH	40
9.4 Experimenty s teplotou	40
10. STANOVENÍ NaP a NaB	40
10.1 NaP	41
10.2 NaB	42
11. STANOVENÍ PŘÍBUZNÝCH LÁTEK	42
12. ROZTOKY PRO VALIDACI ANALYTICKÉ METODY	43
12.1 Roztoky pro přesnost - opakovatelnost	43
12.2 Roztoky pro správnost	44
12.2.1 Příprava placebo	44
12.2.2 Příprava roztoků pro správnost	44
12.2.3 Příprava roztoků pro správnost příbuzných látek	45
12.3 Linearita	45
12.3.1 Příprava roztoků pro ověření linearity NaP a NaB	45
12.3.2 Příprava roztoků pro ověření linearity příbuzných látek	46
12.4 Selektivita	47

12.5 Robustnost	47
12.6 Limit kvantifikace (LOQ).....	48
VÝSLEDKY A DISKUSE.....	49
13. STANOVENÍ OPTIMALNÍCH PODMÍNEK PRO ANALÝZU.....	50
13.1 Výběr vhodné mobilní fáze.....	50
13.2 Optimalizace teploty.....	50
13.3 Stanovení průtoku.....	51
13.4 Souhrn optimalizovaných podmínek pro zvolenou metodu.....	51
13.5 Identifikace analytů z porovnávacích roztoků 1 – 4.....	51
14. VÝSLEDKY VALIDACE ANALYTICKÉ METODY.....	52
14.1 Přesnost – opakovatelnost.....	52
14.1.1 Vyhodnocení přesnosti.....	54
14.2 Správnost.....	54
14.2.1. Správnost – NaP.....	54
14.2.2 Správnost – NaB.....	55
14.2.3 Správnost stanovení příbuzných látek	55
14.2.4 Vyhodnocení správnosti.....	56
14.3 Linearita	56
14.3.1 Ověření linearity NaP a NaB.....	56
• NaP.....	56
• NaB.....	57
14.3.2 Ověření linearity příbuzných látek	58
14.3.3 Vyhodnocení linearity.....	59
14.4 Selektivita.....	60
14.5 Robustnost.....	63
14.5.1 RT1 – retenční čas NaP.....	63
14.5.2 RT2 - retenční čas NaB.....	65
14.5.3 RT3 - retenční čas ImpA.....	66
14.5.4 RT4 - retenční čas ImpB.....	67
14.5.5 RS1-2, RS3-4 - rozlišení mezi píky 1 a 2, 3 a 4.....	67
14.5.6 RS2-3 - rozlišení mezi píky 2 a 3.....	68
14.5.7 TF1 - faktor symetrie píku NaP.....	68
14.5.8 ThPINo1 - Počet teoretických pater u píku NaP.....	69
14.5.9 Závěry hodnocení robustnosti metody.....	70

ZÁVĚR.....	71
15. POUŽITÉ ZKRATKY.....	72
16. POUŽITÁ LITERATURA.....	73

ABSTRAKT

Univerzita Karlova v Praze

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmaceutické chemie a farmaceutické analýzy

Kandidát: **Victoria Sumatokhina**

Školitel: **PharmDr. Petr Kastner, Ph.D.**

Název diplomové práce: **Hodnocení vybrané účinné látky v přípravku pomocí HTLC I**

Cílem bylo vytvořit vhodnou metodu, použitelnou pro danou kolonu a taky získat dostatečnou separaci a citlivost pro detekci a kvantifikaci zkoušených látek, dále snížit spotřebu organických rozpouštědel a tím i zátěž životního prostředí. V této práci jsem vyvinula a zvalidovala HTLC metodu pro stanovení natrium-pikosulfát monohydrátu, jeho rozkladných produktů a natrium-benzoátu. Pro separaci látek za zvýšené teploty byla použita kolona ZirChrom®-PBD 100 x 4,6 mm s UV detekcí při 263 nm. Mobilní fáze (MF) se skládala z acetonitrilu (ACN) a fosfátového pufru v poměru 1:19. Pufr obsahoval 25mM kyselinu fosforečnou s výsledným pH 5,0 upraveným pomocí amoniaku. Kolonový prostor byl vytemperován na 80 °C, průtok nastaven na 0,2 ml/min a objem nástřiku zvolen 4 µl.

Metoda byla vyhodnocena jako dostatečně vhodná: citlivá, přesná, správná, lineární a selektivní. Při hodnocení robustnosti, za použití Plackett-Burmanova plánu, bylo zjištěno, že ze zkoušených parametrů největší vliv na retenci analyzovaných látek měly teplota, pH mobilní fáze a rychlost průtoku MF. Se zvyšujícími se hodnotami těchto parametrů se retenční čas analytů snižoval, ale zároveň se zhoršovalo i rozlišení mezi píky.

Vyvinutá metoda je vhodná i pro hodnocení stability přípravku.

ABSTRACT

**Charles University in Prague
Faculty of Pharmacy in Hradec Králové
Department of Pharmaceutical Chemistry and Pharmaceutic Analysis**

**Candidate: Victoria Sumatkhina
Supervisor: PharmDr. Petr Kastner, Ph.D**

Title of diploma thesis: Evaluation of the selected active substance in the preparation using HTLC I

The purpose of the project was to create a suitable method applicable to a given column and also to obtain sufficient sensitivity for detection and quantification of the test substances, further reduce the consumption of an organic solvents and hence the environmental burden. In this thesis I developed and validated UHTLC method for the determination of sodium picosulphate, its decomposition products and sodium benzoate. There was used the ZirChrom®-PBD column of 100 x 4,6 mm with UV detection by 263 nm for the separation of substances at increased temperature. The mobile phase (MF) consisted of acetonitrile (ACN) with a buffer in the ratio 1:19. The buffer contained 25mM phosphoric acid at a pH of 5,0 adjusted with ammonia. The column space was heated at 80 °C, the flow rate was set at 0,2 ml/min and 4 µl injection volume was selected. The method has been evaluated as sufficiently appropriate: sensitive, accurate, precise, linear and selective. For the evaluation of the robustness Plackett-Burman design was used. It was found that the temperature, pH of the mobile phase and the flow rate of MF had the greatest influence on the retention time of analyzed substances. The retention time of the analytes was decreased with increasing values of these parameters, but at the same time the resolution between the peaks was deteriorated.

The developed method can be used for the study of drug stability.

ÚVOD

Hlavními požadavky na léčiva jsou: kvalita, bezpečnost, účinnost. Proto je Farmaceutická kontrola jedním z nejdůležitějších odvětví ve farmacii. Zajišťuje zdravotní nezávadnost a předepsané obsahové množství účinných a pomocných látek v přípravcích.

Dnes je jednou z nejpoužívanějších a nejpřesnějších metodik v kontrolně-analytickém hodnocení léčiv vysokoúčinná kapalinová chromatografie - High Performance Liquid Chromatography (HPLC). Technika HPLC se například používá pro kvalitativní a kvantitativní hodnocení léčivých přípravků a pro studie stability. Ve snaze zdokonalit separaci analyzovaných látek se stále hledají lepší podmínky a tím vznikají nové vylepšené druhy chromatografie.

Vysokoteplotní kapalinová chromatografie – High temperature Liquid Chromatography (HTLC) je poměrně novou analytickou metodou, která využívá vysokých teplot, což má za následek zrychlení analýzy. Další výhodou této metody je menší spotřeba organických rozpouštědel, která vede k menší zátěži životního prostředí a v neposlední řadě ke snížení nákladů.

Provedení analýzy za nestandardních podmínek vyžaduje nestandardní vybavení. Z důvodu určité nestability klasické stacionární fáze na bázi silikagelu se používají stacionární fáze na bázi oxidů přechodných kovů – zejména z oxidu zirkonia. Hlavní výhody spočívají ve vyšší chemické a fyzikální stabilitě (jsou stálé při hodnotách pH 1 až 14, při teplotách až do 150 °C). Příkladem může být kolona ZirChrom®-PBD s modifikovanou zirkoniovou fází, umožňující chromatografickou separaci na systému reverzních fází, která bude použita pro řešení této práce.

CÍL PRÁCE

Základním cílem této diplomové práce je vyzkoušení možností aplikace vysokoteplotní kapalinové chromatografie (HTLC) ve farmaceutické analýze léčiv s využitím ZirChrom®-PBD kolony.

Pilotně bude otestována sada látek (léčiv) různé chemické povahy a z toho bude vybrána substance, která se ukáže jako nejvíc vhodná pro daný typ analýzy.

Dále budou provedeny experimenty s vybraným vzorkem – bude sledován vliv teploty, pH prostředí, koncentrace organické složky v MF na průběh analýzy.

Posledním krokem je vyvinutí a validování vhodné metody pro hodnocení obsahu, případně čistoty vybrané látky.

TEORETICKÁ ČÁST

1. Chromatografie

Chromatografii dnes v každodenní praxi využívá většina analytických laboratoří [1], zejména jsou chromatografické metody využívány v analýze léčiv.

Je to především proto, že jsou to metody separační, které dávají možnost kvalitativně a kvantitativně hodnotit separované složky z analyzované směsi.

Chromatografie je založena na principu separování analyzovaných látek mezi dvěma nemísitelnými fázemi, z nichž jedna je stacionární, tedy nepohyblivá, druhou je fáze mobilní, čili pohyblivá. Obě tyto fáze mají navzájem opačnou povahu, a tím rozdílně interagují s dělenými analyty, což je základním předpokladem pro separaci analyzovaných látek. Během chromatografického procesu se opakovaně a střídavě ustalují rovnovážné stavy dělených látek mezi stacionární a mobilní fází. [2] K separaci dochází díky tomu, že analyzované látky mají různou afinitu k mobilní, respektive stacionární fázi. Separace může být založena na adsorpci, rozdělování, výměně iontů atd.[3]

1.1 Chromatografické metody

Podle charakteru mobilní fáze dělíme chromatografické metody na kapalinovou chromatografii (LC), kde v roli mobilní fáze vystupuje kapalina a na plynovou chromatografii (GC), kde mobilní fáze je plyn.

Existují 3 druhy LC:

1. Papírová chromatografie (PC) - stacionární fází je speciální celulosový papír, dnes se využívá velmi zřídka.

2. Tenkovrstvá chromatografie (TLC) - tenkou vrstvou je stacionární fáze (silikagel, oxid hlinitý atd.) potažena skleněná, hliníková nebo plastová destička. [4]

3. Vysokoučinná kapalinová chromatografie (HPLC) – při tomto uspořádání je mobilní fáze přiváděna do systému pomocí čerpadla za vysokého tlaku. [1]

V této práci se budeme věnovat konkrétně HPLC a proto bych daný druh chromatografie ráda probrala podrobněji.

1.2. Součásti chromatografického zařízení

Hlavními součástmi chromatografu jsou:

zásobníky mobilních fází

vysokotlaká čerpadla

řídící a programovací jednotka

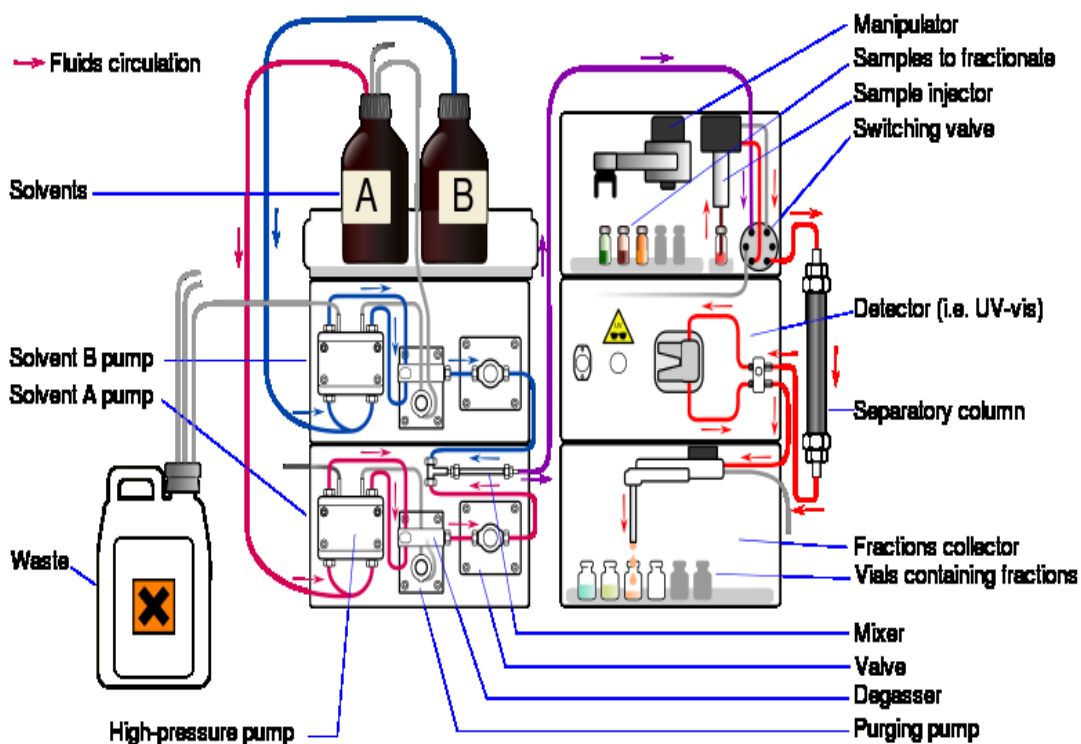
dávkovač

kolona

detektor

počítač s chromatografickým programem

Na obrázku č.1 jsou znázorněny a popsány základní jednotky HPLC.



Obrázek č. 1: Schéma komponentů HPLC. [5]

Všechny komponenty systému, které jsou v jakémkoliv kontaktu s mobilní fází, musí být vyrobené z materiálu nepodléhajícímu

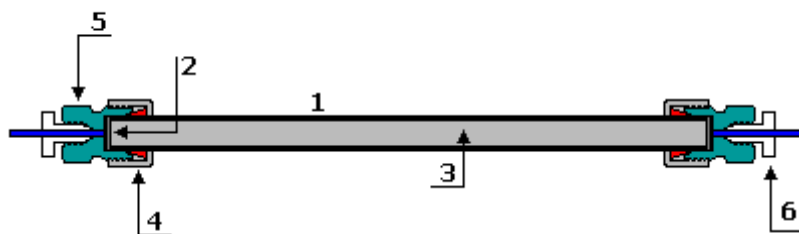
poškození rozpouštědly užívanými k analýze. Veškeré součásti vystavené vysokému tlaku musí být dostatečně odolné vůči vyvíjenému tlaku.

1.2.1 Kolony

V současné době kolony pro aplikace HPLC jsou vyráběné komerčně a uživatel může jen minimálně ovlivnit konstrukci, rozměry a tvar chromatografické kolony. Může si vybrat druh sorbentu a jeho zrnění (velikost částic). [1]

Kolona je tvořena kovovým pláštěm (1), který končí porézní kovovou fritou (2) umožňující plynulý průtok mobilní fáze a zároveň bránící uvolňování stacionární fáze (3). Z obou stran je kolona zakončena ochrannými kroužky (4) s koncovou hlavicí (5), v níž se nachází vstup pro kapiláru se šroubem (6). [6], [7]

Na obrázku č. 2 je znázorněna vzorová kolona.



Obrázek č. 2: Znáznornění chromatografické kolony. [6]

Pro analytické účely jsou dnes používány konvenční kolony o vnitřním průměru 2,1 až 5 mm, délce 10 až 300 mm (preferovány jsou menší rozměry v rozsahu 50 - 100 mm z důvodu zkrácení doby analýzy), plněné náplněmi o velikosti částic 1 až 10 μm . Částice o velikosti 10 μm jsou ale používány zcela výjimečně, zejména pro aplikace starších lékopisných metod. [1]

Podle charakteru sorbentu dělíme kolony na:

- **Náplňové kolony** - jsou tvořeny malými a většinou kulatými částicemi s velkým množstvím pórů, díky čemu se vytváří poměrně velký povrch pro separování látek.

- **Monolitické kolony** - jsou tvořeny jedním kusem sorbentu, který je syntetizován přímo v koloně, případně vloženým sorbentem do polymerního obalu. Mobilní fáze prochází sorbentem přes makropóry (2 μm). Dále sorbent obsahuje mesopóry (10 nm) zodpovědné za separaci. [8]

1.2.1.1 Stacionární fáze v HPLC

Všeobecně nejčastěji používaným materiálem pro výrobu stacionárních fází v HPLC je polární amorfní anorganický silikagel. Existují dvě varianty jeho použití - nemodifikovaný umožňuje separaci za normálního uspořádání fází, silikagel s chemicky navázanými ligandy se aplikuje při separaci na „obrácených“ (reverzních) fázích. Výhodami této SF jsou:

- mechanická odolnost (je možné používat při vysokých tlacích)
- stálost při změnách koncentrace organické složky mobilní fáze (neprobíhá smršťování ani bobtnání).
- dobře známý povrch a jeho chemické vlastnosti
- variace modifikace povrchu
- v neposlední řadě také množství výrobců na trhu. [1], [9]

Nicméně použití silikagelu je poněkud omezeno z důvodu možného rozpouštění při použití běžných pufrů (fosfátový, uhličitanový atd.) ohodnotách pH vyšších než 7,5. Naopak při nízkém pH dochází k hydrolyze siloxanové vazby („krvácení kolony“, které vede k nereprodukovatelnosti výsledků a projevuje se jako šum během analýz). Stejně důležitá je nestabilita při teplotách nad 40 °C.

2. Vysokoteplotní kapalinová chromatografie

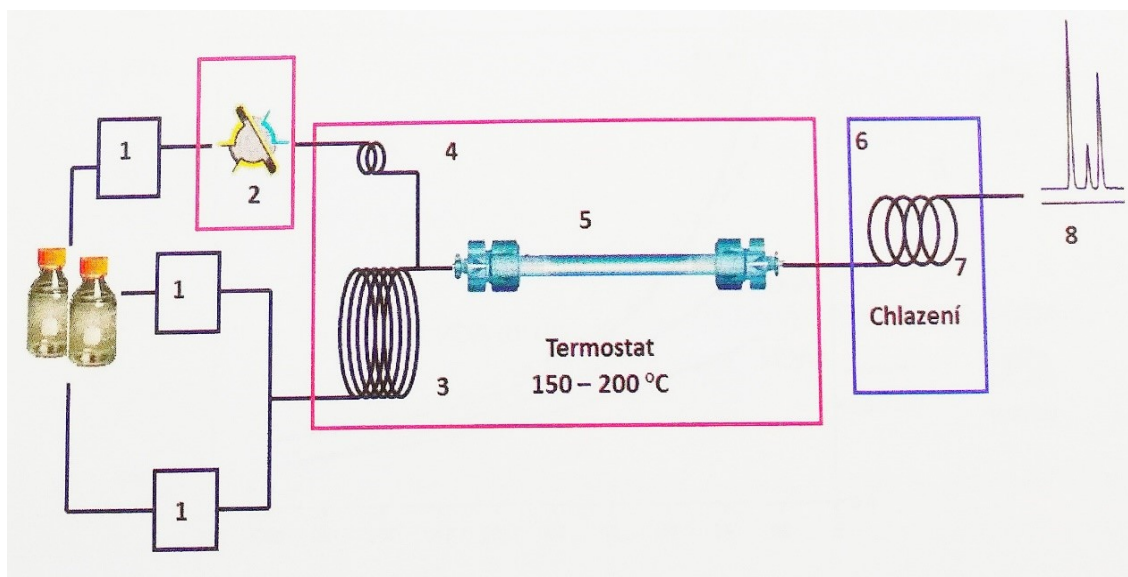
Tento pojem (High Temperature Liquid Chromatography) není v literatuře konkrétně vymezen. Můžeme se dočíst o různých definicích určujících různá teplotní rozmezí. Například „teplota vyšší než pokojová teplota“, „teplota vyšší než bod varu složek mobilní fáze“ nebo „teplota vyšší než 100 °C“. [10]

Donedávna byl vliv teploty jako proměnné při vývoji metody zanedbáván. Kvůli nízké tepelné stabilitě klasické stacionární fáze silikagelu (asi do 40 °C) nebylo možné zvýšení teploty více než o 30-40 °C. [11] Teprve nedávno, s vyvojem stabilnějších stacionárních fází, se začal faktor teploty více studovat.

S rostoucí teplotou klesá viskozita kapalné mobilní fáze, zvyšuje se rychlost difúze analytu, a tím dochází k rychlejší eluci látek z kolony [1]. S nižší viskozitou MF klesá také zpětný tlak v systému a proto je možné s výhodou použít vyšších průtoků, delších analytických kolon anebo například menších částic pro větší účinnost separace. Při vyšších teplotách stačí použití mobilních fází s nižší eluční silou. Dále lze při extrémně vysokých teplotách provádět separaci s čistě vodnými MF.

2.1 Instrumentace v HTLC

Pro práci za zvýšených teplot je nezbytné pořádně přehřívát mobilní fázi před vstupem do analytické kolony, aby bylo zabráněno nežádoucímu rozmývání elučních zon. Důležitou součástí je taky regulátor zpětného tlaku, který se používá na výstupu z detektoru. [1]



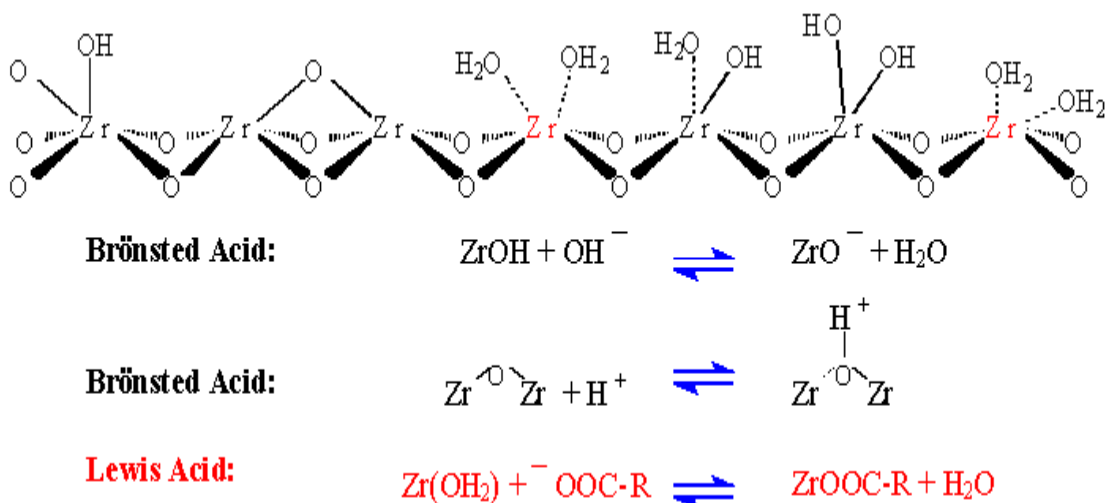
Obrázek č. 3: Schéma uspořádání při HTLC. (1) čerpadlo, (2) dávkování vzorku, (3) předehřívací smyčka pro MF před vstupem do kolony, (4) termostat nebo lázeň, (5) analytická kolona, (6) chladící termostat s chladící smyčkou (7) před vstupem MF do detektoru (8). [1]

2.1.1 Stacionární fáze v HTLC

HTLC analýzy, jak je zřejmé z názvu, probíhají za vysokých teplot. Uvedené nestabilní vlastnosti silikagelu v těchto podmínkách vedly k vývoji a následnému použití oxidů přechodných kovů (ZrO_2 , TiO_2 , Al_2O_3). Oxid zirkoničitý je používanějším a nejprostudovanějším z těchto stálejších sorbentů a v HPLC analýze jasně převažuje použití zirkoniových kolon nad kolonami na bázi TiO_2 a Al_2O_3 . Oxid hlinitý se v současnosti v HPLC téměř nepoužívá kvůli možnosti katalytického štěpení na povrchu stacionární fáze a kvůli možnému rozkladu nebo ireverzibilní adsorpci analyzovaných látek. [1]

2.1.1.1 Popis zirkoniových fází

Od silikagelu se liší oxid zirkoničitý kromě jiného tím, že má vyšší isoelektrický bod, díky čemuž nedochází tolik k interakcím s bazickými látkami. Díky tomu že je amfoterní se může chovat jako anex nebo katex v závislosti na pH prostředí. Obdobně jako u silikagelu, na povrchu této SF jsou přítomny hydroxylové skupiny, navíc má taky adsorpční centra charakteru Lewisových kyselin (viz obrázek níže). Přítomnost těchto center vyžaduje obohacení MF o Lewisovu bázi v podobě pufru, která minimalizuje interakce mezi těmito centry a funkčními skupinami v molekulách analyzovaných látek. Typ interakce pak závisí na vlastnostech analytů, pH a typu pufru, celkové iontové síle, a také na koncentraci organické složky. [1], [9]



Obrázek č. 4: Znázornění povrchu oxidu zirkoničitého a chemických interakcí na jeho povrchu, [12]

Tyto interakce umožňují oxid zirkoničitý používat v několika chromatografických módech. Také lze jeho povrch pestře modifikovat potažením tenkou vrstvou polymeru (např. polybutadienu, polystyrenu), pyrolytickým uhlíkem případně modifikovaným ligandem C-18. [1] U neutrálních látek se uplatňují interakce klasickým mechanismem reverzních fází (tzn. sorpce a desorpce na základě interakcí s hydrofobní částí).

2.1.1.2 Možnosti modifikace povrchu ZrO_2

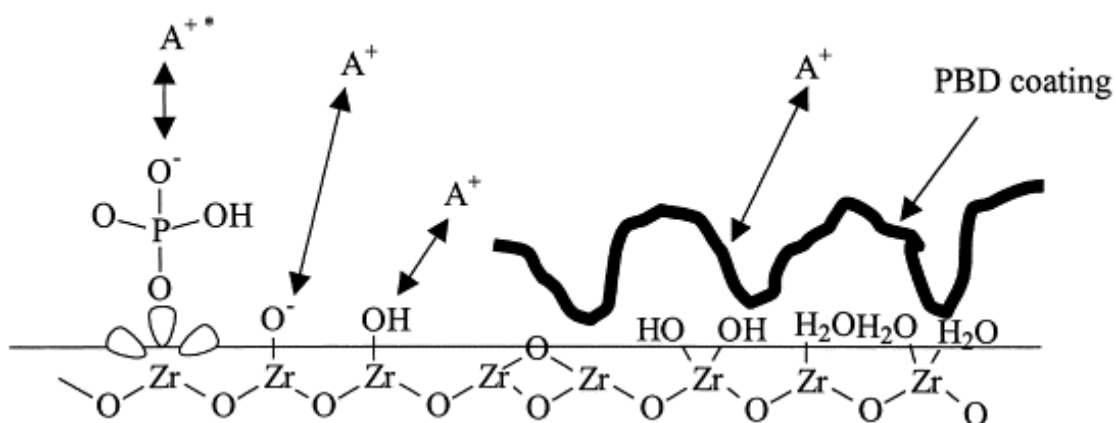
Dynamická modifikace – spočívá v reverzibilním zablokování silně interagujících center charakteru Lewisovy kyseliny obohacením eluentu o pufr charakteru Lewisovy báze (v podobě fosforečnanu, fluoridu, EDTA).

Permanentní modifikace – z důvodu nízké stability Zr-O-Si-R a složité silanizaci zirkoniových hydroxylů kovalentní navázání uhlovodíkových řetězců není vhodné pro zirkoniové SF. Používanou možností stálé modifikace je koordinačně-kovalentní vazba silné Lewisovy zásady na místa charakteru Lewisových kyselin (např. fosfát, fluorid, EDTPA). Další možností modifikace je

kovalentní navázání oktadecylového ligandu k povrchu oxidu zirkoničitého potaženým vrstvou uhlíku. [9], [13]

Fyzikální pokrytí – pro použití polárního ZrO_2 v reverzním módu, je zapotřebí na jeho povrch zavést hydrofobní materiál. V praxi se využívá navázání zesíťovaných polymerů (polybutadien, polystyren) nebo nanesení tenké vrstvy uhlíku na povrch ZrO_2 . [9], [13]

2.1.2 Popis ZirChrom® - PBD kolony



Obr. 5: Zobrazení interakcí na povrchu. * A^+ : kationt analytu. [14]

Je to reverzní stacionární fáze připravená pokrytím polárního oxidu zirkoničitého hydrofobním zesíťovaným polybutadienem (viz obrázek výše). Tato stacionární fáze má podobné vlastnosti s klasickým oktadecylsilikagelem, je ale stabilní až do teploty $150\text{ }^\circ\text{C}$, lze ji použít při pH 1 až 14, je charakterizovaná vysokou separační účinností (> 120 tis. teoretických pater).

2.1.3 Výhody ZirChrom® - PBD kolony

ZirChrom®-PBD poskytuje ultrastabilní alternativu obrácené fáze k fázi silikagelu C-18. Nabízí více možností volby chromatografických podmínek, které přispívají k prodloužení životnosti kolon a snížení ceny analýzy.

Stacionární fáze na bázi ZnO₂, konkrétně i ZirChrom®-PBD, se vyznačují extrémní chemickou a tepelnou stabilitou:

- jsou stabilní při pH 1-14.
- mohou být použity neomezeně při teplotách do 150 °C

Použití vyšších teplot má za následek nižší tlakové ztráty, užší píky a zrychlení analýzy.

Zirkoniové SF nejsou tak hydrofobní jako typické fáze C18 na silikagelu, díky čemuž lze při analýzách použít méně organického rozpouštědla.

Jako další výhodu lze zmínit menší vymývání ligandu (*column bleeding*), a možnost čištění kolon za daleko agresivnějších podmínek z důvodu mimořádné stability vůči rozpouštědlům.

2.1.4 Nevýhody zirkoniových fází

Nevýhodnou charakteristikou mohou být odlišné povrchové chemické interakce, které jsou mnohem složitější než povrchová chemie silikagelu a to může velice ovlivňovat a komplikovat vývoj metody pro složité směsi látek. [1]

3. MOŽNOSTI HODNOCENÍ CHROMATOGRAMU

3.1 Kvalitativní analýza

Kvalitativní hodnocení zjišťuje či potvrzuje identitu analyzované látky. Vždy je nutno zajistit, aby se za daných podmínek eluovaly všechny složky vzorku z kolony. Dále se musí ověřit, zda látky, které byly objeveny na chromatografickém záznamu, jsou skutečně složky analyzovaného vzorku a

nepocházejí např. z nečistot v rozpouštědlech, MF nebo jiných činidlech používaných při přípravě vzorků.

Nejčastěji se k identifikaci látek používají údaje o retenčním čase, což je čas od nástřiku vzorku na kolonu k maximu chromatografického píku. V praxi je nejběžnějším důkazem totožnosti shoda retenčního času píku léčiva v analyzovaném vzorku s retenčním časem píku standardu. [15], [16]

3.2 Kvantitativní analýza

Kvantitativní hodnocení využívá vztah mezi plochou, případně výškou píku a množstvím eluované látky. Kvantitativní analýzu jednotlivých složek ve směsi lze provést následujícími metodami stanovení:

a) Metoda vnějšího standardu

Za vnější standard se zpravidla považuje standard stanovované látky, může to být lékopisný typ standardu s označením CRL (chemická referenční látka), v případě složených lékových přípravků jedna ze stanovovaných složek směsi. Stanovit koncentraci analyzovaných složek směsi se pak dá z poměru hodnot ploch píků jednotlivých stanovovaných látek a plochy píku referenční látky. [17], [15]

b) Metoda vnitřního standardu

Tato metoda je založena na tom, že ke známému objemu roztoku vzorku se přidá přesně známý objem vhodného vnitřního standardu a po promíchání se nastříkuje na kolonu. K výpočtu koncentrace se použije poměr ploch píků jednotlivých separovaných složek a plochy píku vnitřního standardu.

Metoda vnitřního standardu je méně časově náročná a přesnější, zvláště u stanovení, kde je složitá příprava roztoku pro analýzu. Nejdůležitější je správný výběr vhodného standardu, který se musí eluovat v blízkosti píků stanovovaných látek, musí být chemicky inertní apod. [15], [17]

c) Metoda normalizace

Tato metoda se používá pouze pro výpočet procentuálního zastoupení analyzované složky ve vzorku. Obsah jedné nebo více složek zkoušené látky se vypočítá z plochy nebo ploch jako procento celkové plochy všech píků. Do výpočtů se nezahrnují píky pod limitem zanedbatelnosti a píky rozpouštědel atd. [18]

d) Metoda pomocí kalibrační křivky

Dle této metody se nastříkují zvlášť vzorky a zvlášť standardy v takovém koncentračním rozmezí, ve kterém je předpokládána koncentrace vzorku. Změří se plochy píků na v závislosti na koncentraci standardu. Sestrojí se kalibrační křivka, ze které se pak odečítá koncentrace stanovovaného analytu na základě plochy píku. [18]

4. VALIDACE ANALYTICKÉ METODY

Validaci metody můžeme považovat za získání důkazu, potvrzení toho, že vyvíjená metoda nebo určitý proces, bude trvale poskytovat výsledky odpovídající předem určené specifikaci. Účelem validace je prokázat, že daný postup je vhodný pro zamýšlené použití. [19]

Nejdůležitějším krokem při validaci metody je vybrat správné validační parametry. Validace se provádí při vývoji nové metody, v případě změn v již vyvinuté metodě, při přenosu do jiné laboratoře a taky při průkazu rovnocennosti dvou metod. [15] Základní typy validace jsou popsány ve směrnici FDA. Dále lze validační procesy provádět dle směrnice ICH (International Conference of Harmonisation). [20] Hlavním úmyslem této organizace je omezit duplicitní testování, které se provádí při výzkumu a vývoji

nových léčiv. ICH vydává doporučení, jak dosáhnout lepší harmonizace při interpretaci a aplikaci technických pokynů a požadavků na registraci produktu. [21]

Validace metody vyvinuté během řešení této práce byla provedena na základě analytických testů podle směrnice ICH, jejíž validační parametry, doporučené u jednotlivých analytických testů, jsou shrnuty v tabulce č. 1. [15]

	Identifikace	Testování nečistot		Obsah
		Kvantitativní	Limitní	
Správnost	-	+	-	+
Přesnost – opakovatelnost	-	+	-	+
Mezilehlá přesnost	-	+ ¹	-	+ ¹
Selektivita	+	+	+	+
Detekční limit	-	-	+	-
Kvantitativní limit	-	+	-	-
Linearita	-	+	-	+
Rozsah	-	+	-	+
Robustnost	-	+	-	+

Tabulka č. 1: Testované validační parametry

¹ - hodnocení se neprovádí, pokud byla provedena reprodukovatelnost

+ hodnocení se provádí

- obvykle se neprovádí [15]

4.1 Správnost

Správnost (accuracy) analytické metody vyjadřuje těsnost shody mezi naměřeným výsledkem a referenční hodnotou. Referenční hodnotu lze získat například analýzou několika stejně připravovaných modelových vzorků obsahujících všechny složky přípravku (placebo) a přesně přidaný standard. Většinou se správnost ověří analýzou minimálně šesti vzorků a může být vyjádřena jako rozdíl správné a stanovené hodnoty nebo jako výtěžnost:

$$\text{výtěžnost} = \text{nalezená hodnota} \times 100 / \text{správná hodnota} \text{ [15]}$$

4.2 Přesnost

Přesnost analytické metody je definována jako míra těsnosti shody mezi sérií výsledků měření vzorků se stejnou koncentrací za předem specifikovaných podmínek. V závislosti na podmínkách může být přesnost vyjádřena jako opakovatelnost, mezilehlá přesnost a reprodukovatelnost. V této práci bude testována přesnost-opakovatelnost pomocí analýzy šesti (minimální počet měření) nezávisle připravených vzorků jednou osobou na stejném přístroji, se stejnými činidly a ve stejné laboratoři.

Mezilehlá přesnost stanovuje přesnost měření za stejných podmínek v delších časových intervalech, jiným pracovníkem či odlišným měřicím systémem. Reprodukovatelnost vyjadřuje přesnost měření stejnou metodou avšak za různých podmínek (místo, analytik, přístroj). Přesnost může být vyjádřena jako směrodatná odchylka, standardní odchylka nebo variační koeficient ze série měření. [19]

4.3 Selektivita

Selektivita metody je schopnost metody jednoznačně a specificky poskytnout informaci o kvalitativním i kvantitativním složení vzorku v přítomnosti

jiných komponentů obsažených v daném vzorku. Selektivita je testována porovnáním výsledků analýzy standardů s výsledky analýzy reálných vzorků (jsou v nich přítomny nečistoty, rozkladné produkty atd.). [15], [19]

4.4 Linearita

Linearita analytického postupu je definována jako schopnost dávat výsledky, které jsou přímo úměrné koncentraci stanovovaného analytu ve vzorku. Pro ověření linearity se obvykle použije minimálně pět standardů při koncentraci v rozmezí 50 – 150 % uvedeného množství. Výsledkem určení linearity této práce bude graf závislosti odezvy detektoru na koncentraci kalibračních roztoků, rovnice regrese a vypočítaný korelační faktor, jehož hodnota u účinných látek nesmí překročit limit $\geq 0,999$, u konzervačních $\geq 0,995$ a u příbuzných $\geq 0,990$. [19], [22]

4.5 Robustnost

Robustnost popisuje míru vlivu mírného kolísání hodnot jednotlivých proměnných na výsledek analýzy. Odhaluje parametry, které významně ovlivňují výsledky analytického měření a taky ty, jejichž změny nevedou k ztrátě přesnosti a správnosti. Po vyhodnocení jsou vlivy faktoru rozděleny na statisticky významné a statisticky nevýznamné dle odchylek, vyvolaných změnami těchto faktorů.

V této práci robustnost bude testována pomocí Plackett-Burmanova plánu.

4.5.1 Plackett-Burmanův plán

Je jednou z nejpoužívanějších zkrácených multifaktorových analýz pro testování robustnosti. Časté uplatnění má z důvodu vysokého počtu

experimentů a časové náročnosti při úplném faktorovém plánu. Tato metoda zanedbává možnost vzájemného ovlivňování sledovaných proměnných.

Plackett-Burmanův plán je založen na tom, že každé z proměnných jsou přiřazeny dvě hodnoty, vyšší (+1) a nižší (-1). V každém řádku je $m/2$ proměnných s vyšší hodnotou, kde m je počet pokusů. Poslední řádek obsahuje pouze nižší hodnoty. Dále platí, že pro n proměnných můžeme volit jen $n+1=m$ experimentů a $n+1$ musí být dělitelné 4.

Po provedených měřeních se vypočítají hodnoty závislých proměnných (v této práci jsou to retenční časy jednotlivých analyzovaných složek, rozlišení mezi píky, faktor symetrie hlavního píku a počet teoretických pater), provede se lineární regrese a vypočítá se rovnice, která bude obsahovat absolutní člen a koeficienty určující vliv nezávisle proměnné na sledovanou závislou proměnnou. Z výsledků pak můžeme posoudit, jestli můžeme vliv faktoru zanedbat či nikoliv. [24]

4.6 Detekční limit (LOD)

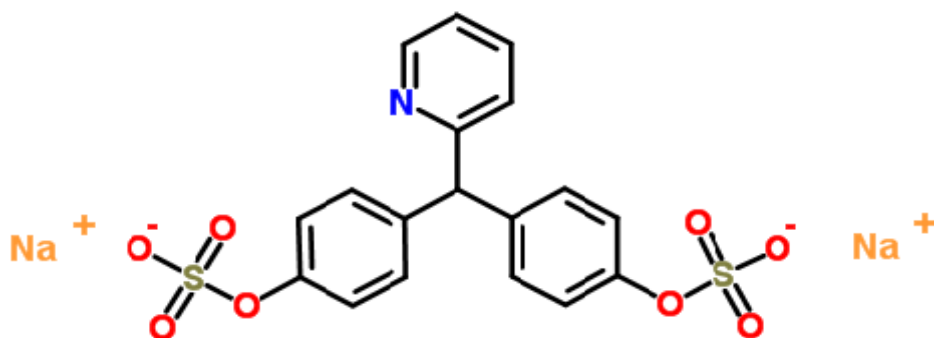
Detekční limit charakterizuje citlivost metody. Je definován jako nejmenší koncentrace analytu ve vzorku, kterou lze detekovat bez kvantitativního stanovení. Hledá se buď experimentálně nebo se určuje poměrem signálu k šumu s hodnotou 3. Nalezená koncentrace se ověřuje provedením analýzy vzorku o příslušné koncentraci. [15]

4.7 Kvantitativní limit (LOQ)

Je dalším parametrem citlivosti metody. Je definován jako nejnižší množství látky, které ještě můžeme stanovit s přijatelnou přesností a správností. Může být vyjádřen jako koncentrace, při jejíž analýze je dosažena limitující směrodatná odchylka 10 % nebo jako koncentrace, při které je poměr signálu k šumu roven 10. [15]

5. CHARAKTERISTIKA ANALYZOVANÝCH LÁTEK

5.1 Natrium-pikosulfát (NaP)



Obrázek č. 6: Strukturální vzorec NaP

Chemický název NaP je:

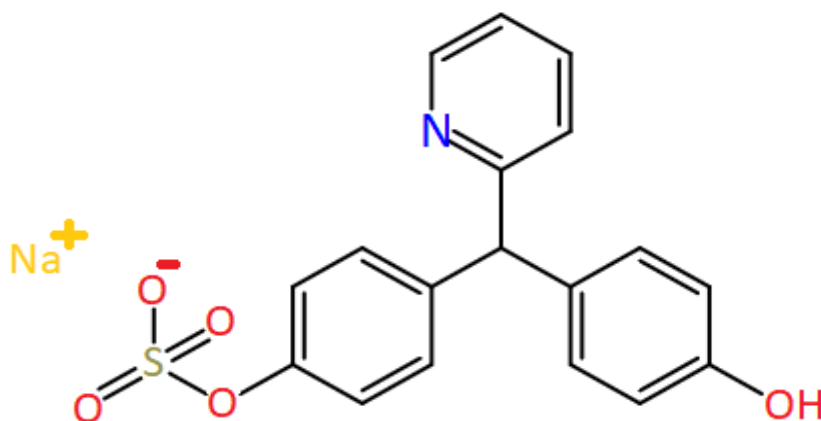
Dinatrium-4, 4'-[(pyridin-2-yl)methylen] difenyl-bis(sulfát)

Jedná se o téměř bílý krystalický prášek, jež je snadno rozpustný ve vodě a těžce v ethanolu 96%, prakticky nerozpustný v etheru. Látka není stálá při nízkém pH, například v kyselině chlorovodíkové se štěpí za vzniku rozkladných produktů. [25] Pikosulfát sodný patří do farmakologické skupiny kontaktních laxativ, která bývá využívána při krátkodobých akutních funkčních problémech se zácpou a k občasnému použití pro usnadnění vyprázdnění při chronické zácpě. Jeho laxativní účinek je vyvolán drážděním nervových pletení ve střevě, čímž způsobí zvýšení peristaltiky tlustého střeva a zároveň napomáhá zadržování vody a elektrolytů do lumen střeva, což vede k stimulaci defekace. Účinek by se měl projevit po 6 - 12 hodinách při perorální aplikaci. [26]

5.1.1 Rozkladné produkty NaP

Rozkladné produkty NaP najdeme v Evropském lékopise jako Impurity A (IMP-A) - nečistota A:

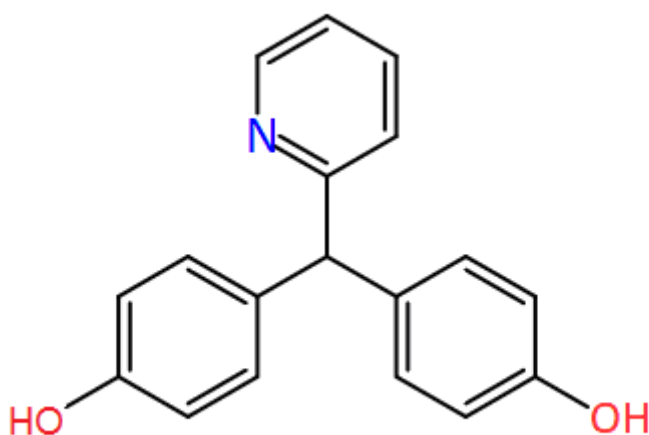
4-[(RS)-(4-hydroxyfenyl)(pyridin-2-yl)methyl]fenylsulfát sodný



Obrázek č. 7: Struktura IMP-A

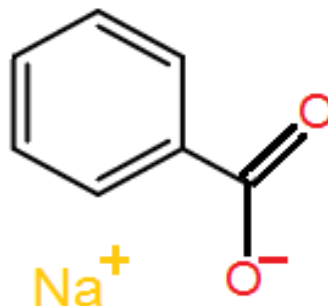
a Impurity B (IMP-B) - nečistota B:

4, 4'-[(pyridin-2-yl)methylen]di(fenol).



Obrázek č. 8: Struktura IMP-B.

5.2 Natrium-benzoát (NaB)



Obrázek č. 9: Strukturní vzorec NaB.

NaB, neboli sodná sůl kyseliny benzoové, je téměř bílý krystalický nebo zrnitý prášek. Je snadno rozpustný ve vodě a mírně rozpustný v 90% ethanolu. Soli a estery této kyseliny se vyskytují i volně v přírodě, např. v brusinkách, švestkách, skořici, ve zralém hřebíčku a jablkách. Nejvíce je využíván jako konzervant pod zkratkou E211 v potravinářství, a to kvůli svým bakteriostatickým a fungistatickým účinkům. [27]

EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

6. MATERIÁL A POMŮCKY

6.1 Chemikálie

Natrium-pikosulfát monohydrát (Biomedica)

Natrium-Benzoát (Biomedica)

Kyselina fosforečná (Penta)

Acetonitril (Sigma-Aldrich)

Kyselina chlorovodíková (Penta)

Hydroxid sodný (Merck)

voda čištěná reverzní osmózou

70% sorbitol

vodný roztok amoniaku (Penta)

Acidum citricum monohydricum (Penta)

Natrium citras dihydricus (Penta)

6.2 Pomůcky

Kádinky, odměrné válce, Erlenmeyerovy baňky, zkoumavky, pipety dělené i nedělené, mikropipety, tyčinky, vialky, filtry - (OLIMPEAK certified filters by teknokroma - syringe filters - 0,22 um), injekční stříkačky, míchadlo, laboratorní lžičky, kopistky, stříčky, vyhřívací plotýnka, skleněná nálevka, odměrné baňky.

6.3 HTLC sestava:

- HPLC jednotka: Schimadzu, Nexera, Japonsko
- řídicí jednotka: CBM-20A
- degaser: DGU-20A(3R) 42
- čerpadlo: LC-30AD
- autosampler: SIL-30AC
- termostat kolony: CTO-30A
- detektor: SPD-M20A (diode array detector)
- PC program: LAB SOLUTIONS, Verzion 5.53, Shimadzu
- Kolona: ZirChrom®-PBD (100 × 4,6 mm)

6.4 PŘÍSTROJE:

Analytické váhy Sartorius CPA22D-0CE, Sartorius AG

pH-metr SCHOTT CG 843, Schott Instruments GmbH

vodní vývěva

magnetická míchačka Color squid, Ika Werke, Německo

ultrazvuková lázeň K10, Kraintek

7. OBECNÝ POSTUP

V první fázi byla připravena MF s potřebným pH a poměrem složek, která byla poté použita pro přípravu analyzovaných roztoků - pro ředění vzorku. Vodná složka MF byla před použitím přefiltrována přes nylonový membránový filtr o rozměrech pórů 0,22 μm . Poté se nastavily vhodné chromatografické podmínky pro HTLC metodu v programu LAB SOLUTIONS. Průtok byl nastaven na 0,2 ml/min, absorbance byla stanovena na vlnovou délku 263 nm (byla převzata z PhEur) a následovalo promytí kolony MF s 5% ACN a ekvibrace (ustálení) kolony. Po stabilizaci stanovených podmínek pro analýzu byla postupně nastříkována série připravených roztoků na kolonu. U každého vzorku byly provedeny minimálně 2 nástřiky pro kontrolu a zajištění správných výsledků. Po optimalizaci metody byla jako nejvhodnější zvolena teplota 80 °C a v této hodnotě byla hlídána. Po ukončení analýzy byla kolona vždy promyta 50% ACN, čímž bylo zaručeno vypláchnutí pufry z kolony. Na závěr byla kolona vždy naplněna 90% ACN.

7.1 Příprava MF

K 250 ml destilované vody bylo přidáno 422 μl kyseliny fosforečné a promícháno pomocí míchadla. Do roztoku se vložily elektrody pH-metru a po stabilizaci se přidával vodný roztok amoniaku do dosažení pH 5,0. Roztok se pak opět zfiltraval a k 190 ml tohoto roztoku se přidalo 10 ml ACN.

8. PŘÍPRAVA ROZTOKŮ

8.1 Roztoky k optimalizaci chromatografických podmínek

8.1.1 Příprava roztoků

Připravené roztoky jsou určeny k vytvoření porovnávacích roztoků č. 1 - 4.

Roztok č. 1: 30 mg NaB bylo zředěno v MF na 10,0 ml. (C = 3 mg/ml)

Roztok č. 2: K 56, 25 mg NaP v odměrné baňce na 25 ml se přidalo 5,0 ml roztoku č. 1 a zředilo se mobilní fází. 5,0 ml tohoto roztoku se dále ještě jednou zředilo MF na 20,0 ml. (cNaB = 0,15 mg/ml), (cNaP = 0,5625 mg/ml).

Roztok č. 3: Bylo naváženo 2,5 mg NaP, k tomu bylo přidáno 0,5 ml kyseliny chlorovodíkové 0,2 mol/l RS a roztok se na 2 minuty vložil do vroucí vodní lázně. K ochlazenému roztoku se poté přidalo 0,5 ml hydroxidu sodného 0,2 mol/l RS a 0,6 ml roztoku č. 1. Směs byla doplněna MF na 5,0 ml. (cNaB = 0,36 mg/ml).

8.1.2 Příprava porovnávacích roztoků (č. 1 - 4)

Porovnávací roztoky jsou určeny k identifikaci analytů a jejich retenčních časů.

Porovnávací roztok č. 1: Tento vzorek je identický s roztokem č. 3.

Porovnávací roztok č. 2: Ke 2,5 mg Nap se přidalo 0,6 ml roztoku č. 1. V odměrné baňce na 5,0 ml byl tento roztok doplněn mobilní fází.

Porovnávací roztok č. 3: 0,6 ml roztoku č. 1 bylo zředěno MF na 5,0 ml.

Porovnávací roztok č. 4: Bylo naváženo 2,5 mg NaP, k tomu bylo přidáno 0,5 ml kyseliny chlorovodíkové 0,2 mol/l RS a roztok se na 2 minuty vložil do vroucí vodní lázně. K ochlazenému roztoku se poté přidalo 0,5 ml hydroxidu sodného 0,2 mol/l RS. Zbýlý obsah odměrné baňky se doplnil MF na 5,0 ml.

V následující tabulce je uveden přehled analytů obsažených v jednotlivých roztocích.

Porovnávací roztok	Analyty
Č. 1	NaP, NaB, ImpA, ImpB
Č. 2	NaP, NaB
Č. 3	NaB
Č. 4	NaP, NaB, ImpA, ImpB

Tabulka č. 2: Analyty jednotlivých roztoků.

8.2 Příprava porovnávacích roztoků pro stanovení NaP, NaB a IMP

Porovnávací roztok (a) - (Pa): Bylo naváženo 37,5 mg Natrii picosulfat monohydricum WS do odměrné baňky, ke kterému bylo přidáno 1,0 ml Pd a doplněno MF do 50,0 ml.

Porovnávací roztok (b) - (Pb): Totožný s roztokem č. 3

Porovnávací roztok (c) - (Pc): Z roztoku Pa bylo odebráno 50 μ l a doplněno MF v odměrné baňce na 50,0 ml.

Porovnávací roztok (d) - (Pd): Bylo naváženo 250,0 mg Natrii benzoas WS do odměrné baňky a doplněno MF do 25,0 ml.

Porovnávací roztok Imp-B - (Pimp-B): K navážce 2,5 mg NaP se přidalo 0,5 ml kyseliny chlorovodíkové 0,2 mol/l RS. Poté se roztok na 30 minut vložil do vroucí vodní lázně. V kyselém prostředí po takové době došlo k úplnému rozpadu NaP na konečný rozkladný produkt ImpB. pH roztoku bylo poté korigováno přidáním 0,5 ml hydroxidu sodného 0,2 mol/l RS. Roztok byl pak v odměrné baňce doplněn MF na 5,0 ml.

8.3 Příprava zkoušeného roztoku

Zkoušený roztok slouží k stanovení obsahu pikosulfátu sodného, jeho příbuzných látek a benzoátu sodného.

Zkoušený roztok pro stanovení obsahu - (Rzk): 1,00 ml přípravku Gallax® bylo zředěno MF v odměrné baňce na 10,0 ml.

9. OPTIMALIZACE CHROMATOGRAFICKÝCH PODMÍNEK

9.1 Výběr zkoušené látky

Při vytvoření metody se vycházelo z vlastností kolony a zkoušely se možnosti jejího použití. Nejprve byla připravena sada různých vzorků různých analytů odlišného charakteru - parabeny, bromhexin, klotrimazol, pikosulfát sodný, acyklovir, fluoxetin a lamotrigin. Roztoky byly připraveny naředěním látek mobilní fází, každý byl nastříknut dvakrát. Nejslibnější výsledný chromatogram měl vzorek Natrium-picosulfátu a proto práce s touto látkou pokračovala dál. Chromatografické záznamy ostatních látek neobsahovala data vhodná pro kvalitativní a kvantitativní stanovení.

9.3 Experimenty s MF

Po předchozích zkušenostech s analyzovanou látkou se nejdříve jako MF použil 50mM roztok triethylaminu ve vodě, který se používal jako mobilní fáze pro

analýzu NaP při klasické HPLC a UHPLC. Avšak při vyšších teplotách se tato MF prokázala jako nevhodná, proto se další analýzy prováděly s 25mM fosfatovým pufrem jako MF.

Dále, co se týče MF, zkoušely se různé koncentrační poměry s ACN - postupně se snižovalo zastoupení organické složky z 50% až na 5%, které bylo považováno za nejvhodnější pro tuto analýzu.

9.4 Experimenty s pH

Při hledání vyhovující mobilní fáze proběhly experimenty s pH - byly vyzkoušeny pH v hodnotách 8 - 2, hledalo se takové, které by odpovídalo požadavkům na dostatečnou separaci jednotlivých píků. V příliš kyselém nebo zásaditém prostředí byly píky rozmyté a míra rozlišení malá, proto jako nejvhodnější bylo zvolené pH 5,0.

9.5 Experimenty s teplotou

Pro experimenty s teplotou byla použita MF se složením a pH uvedeném výše. Zkoušely se teploty v rozmezí 60 až 150 °C. Teplota 80 °C nejvíc odpovídala požadovaným kritériím na separační metodu.

10. STANOVENÍ NaP A NaB

Pro stanovení analyzovaných látek byly použity porovnávací roztoky (**Pa - Pd**), roztok **Rzk**, který obsahoval modelový přípravek Gallax®, za podmínek optimalizované a validované metody pro HTLC analýzu daného analytu. Následující tabulka shrnuje parametry validované metody.

Metoda	HTLC
Průtoková rychlost	0,2 ml/min
Detekce	Spektrofotometrický detektor - 263 nm
Nástřík	4 µl
Teplota kolony	80 °C

Tabulka č. 3: Parametry optimalizované HTLC metody.

10.1 NaP

Pro výpočet obsahu NaP se použijí hodnoty získané z výsledných chromatogramů **Pa** a **Rzk** dle vzorce (výsledek je vyjádřen v mg NaP na 1 ml přípravku):

$$AP = \frac{ArPzk \cdot nPst \cdot oPst}{ArPa \cdot 500}$$

ArPzk -plocha píku NaP ve zkoušeném roztoku

nPst - navážka pracovního standardu NaP pro **Pa** v mg

oPst - obsah NaP v pracovním standardu v %

ArPa - plocha píku NaP v **Pa**

10.2 NaB

Pro výpočet obsahu NaB se použijí hodnoty získané z výsledných chromatogramů **Pa** a **Rzk** dle vzorce (vyjádřeno v mg NaB na 1 ml přípravku):

$$APb = \frac{ArBzk \cdot nBst \cdot oBst}{ArBPa \cdot 12500}$$

ArBzk -plocha píku NaB ve zkoušeném roztoku

nBst - navážka pracovního standardu NaB pro **Pa** v mg

oBst - obsah NaB v pracovním standardu v %

ArBPa - plocha píku NaB v **Pa**

11. STANOVENÍ PŘÍBUZNÝCH LÁTEK

Stanovení příbuzných látek probíhalo za stejných chromatografických podmínek jako stanovení účinné a konzervační látky za použití **Pc** a **Rzk**. Navíc pro stanovení příbuzných látek byly použity korekční faktory převzaté z Evropského lékopisu. [28]

Korekční faktory: nečistota A = 0,7, nečistota B = 0,5

Limit zanedbatelnosti: se rovná polovině plochy hlavního píku na chromatogramu **Pc** (0,05%).

Při výpočtu obsahu nečistot se plocha píku dané nečistoty musí vynásobit příslušným korekčním faktorem. Pro výpočet se použijí hodnoty získané z výsledných chromatogramů **Pc** a **Rzk** dle vzorce (vyjádřeno v %):

$$IMP = \frac{ArIMPzk \cdot CF \cdot nPst \cdot oPst}{ArPc \cdot AP \cdot 5000}$$

ArIMPzk - plocha píku nečistoty NaP ve zkoušeném roztoku

CF - korekční faktor (nečistota A = 0,7; B = 0,5)

nPst - navážka pracovního standardu NaP pro Pa v mg

oPst - obsah NaP v pracovním standardu v %

ArPc - plocha píku NaP v Pc

AP - obsah NaP v přípravku v mg/ml přípravku

12. ROZTOKY PRO VALIDACE ANALYTICKÝ METOD:

12.1 Roztoky pro přesnost - opakovatelnost

Ke stanovení opakovatelnosti byl v souladu s ICH Q2A a Q2B zvolen reálný přípravek Gallax® s obsahem NaP a NaB. Pro toto stanovení bylo připraveno 6 stejných zkoušených roztoků. 1,0 ml tohoto přípravku bylo v

odměrné baňce doplněno MF do 10,0 ml. Výsledky stanovení viz tabulky č. 11, 12 a 13 ve výsledcích a diskuzi.

Pro účinné látky je relativní směrodatná odchylka tolerována do 2,0 %, pro konzervační látky do 5,0 %, pro příbuzné látky je tolerance podle nalezené hladiny, tedy v tomto případě do 7%.

12.2 Roztoky pro správnost

Správnost metody se testovala pomocí šesti individuálně připravených vzorků. Dále se k přípravě těchto roztoků použilo Placebo.

12.2.1 Příprava placeba

K 28,5090 g 70% sorbitolu bylo přidáno 0,0647 g kyseliny citronové bezvodé a 0,0591 g Natrii citras dihydricus. Objem byl v odměrné baňce doplněn čištěnou vodou do 50,0 ml.

12.2.2 Příprava roztoků pro správnost:

K návážce 7,5 mg NaP bylo přidáno 1 ml placeba a doplněno 0,2 ml roztokem **Pd**. Obsah se důkladně promíchal a doplnil MF do 10,0 ml. Dle tohoto postupu bylo připraveno šest roztoků. Obecně přijímané požadavky na výtěžnost činí u účinných látek 98,0 - 102,0 % a u konzervačních látek 95,0 - 105,0 %.

Roztok (Spr)	Navážka NaP mg
Spr č.1	7,48
Spr č.2	7,53
Spr č.3	7,50
Spr č.4	7,49
Spr č.5	7,48
Spr č.6	7,46

Tabulka č. 4: Navážka NaP v mg pro roztok pro správnost.

12.2.3 Příprava roztoků pro správnost příbuzných látek

1ml placebo se v odměrné baňce smíchal s 1,0 ml roztoku 1% linearity (=1% **Pa**) a doplnil se mobilní fází do 10,0 ml.

12.3 Linearita

Linearita metody je ověřena pomocí 5 vzorků, obsahujících NaP a NaB v koncentracích, odpovídajících rozsahu 80 – 120% původního (100%) **Pa**.

12.3.1 Příprava roztoků pro ověření linearity NaP a NaB

Roztoky byly připraveny stejným způsobem jako roztok **Pa**, do odměrných baněk se navážilo určité množství NaP dle potřebné koncentrace, k tomu pak byl

přidán roztok **Pd** taky v závislosti na koncentraci výsledného roztoku. V tabulce č. 5 jsou uvedeny navážky NaP a přídavky **Pd**.

	80%	90%	100%	110%	120%
Navážka NaP mg	30	33,75	37,5	41,25	45
Přídavek Pd ml	0,8	0,9	1	1,1	1,2

Tabulka č. 5: koncentrační úrovně roztoků pro ověření linearity.

12.3.2 Příprava roztoků pro ověření linearity příbuzných látek

Nejprve byl připraven zásobní roztok s koncentrací 10 %: 5,0 ml 100% **Pa** bylo v odměrné baňce na 50,0 ml doplněno mobilní fází. Zásobní roztok se dále ředil na potřebné koncentrace.

3,0 % - do 20 ml odměrné baňky byly pipetovány 6,0 ml zásobního roztoku a doplněny MF po značku.

2,5 % - do 20 ml odměrné baňky bylo odměřeno 5,0 ml zásobního roztoku a doplněny MF po rysku.

2,0 % - do 10 ml odměrné baňky byly pipetovány 2,0 ml zásobního roztoku a doplněny MF po rysku.

1,5 % - do 10 ml odměrné baňky byly pipetovány 1,5 ml zásobního roztoku a doplněny MF po rysku.

1,0 % - do 25 ml odměrné baňky byly pipetovány 2,5 ml zásobního roztoku a doplněny MF po rysku.

0,5 % - do 20 ml odměrné baňky byl pipetován 1,0 ml zásobního roztoku a doplněny MF po rysku.

0,05 % - do 20 ml odměrné baňky byly pipetovány 2,0 ml 0,5% roztoku a doplněn MF po rysku.

12.4 Selektivita

Selektivita metody je hodnocena pomocí chromatografických záznamů:

1. Porovnávacího roztoku č. 1 obsahujícího NaP, NaB, ImpA a ImpB
2. Porovnávacího roztoku č. 3 obsahujícího pouze NaB
3. Porovnávacího roztoku č. 4 obsahujícího NaP, ImpA a ImpB
4. Zkoušeného roztoku pro přesnost s přípravkem Gallax por. gtt. sol.
5. Roztoku pro správnost připraveného z placeba
6. **Pa** vyhovujícího 100% linearitě – standardy NaP a NaB
7. **Pc** obsahujícího 0,1 % roztoku obsahujícího NaP

Důležité bylo dosáhnout dostatečného rozlišení mezi píky NaP, NaB, ImpA a ImpB a vyloučit možnost interference píků analytů s píky látek přítomných ve zkoušeném roztoku.

12.5 Robustnost

Robustnost byla testována na základě Plackett-Burmanova plánu pomocí 12 experimentů. V každém experimentu bylo testováno 7 nezávisle proměnných faktorů, které byly vytipovány, že by mohly ovlivňovat výsledky analytické metody. V následující tabulce můžeme najít proměnné, které se během experimentů hodnotily.

	navážka NaP	v(H ₃ PO ₄)	pH	ACN	průtok	teplota	nástřik
1	1	1	1	1	1	1	1
2	-1	1	-1	1	1	1	-1
3	-1	-1	1	-1	1	1	1
4	1	-1	-1	1	-1	1	1
5	-1	1	-1	-1	1	-1	1
6	-1	-1	1	-1	-1	1	-1
7	-1	-1	-1	1	-1	-1	1
8	1	-1	-1	-1	1	-1	-1
9	1	1	-1	-1	-1	1	-1
10	1	1	1	-1	-1	-1	1
11	-1	1	1	1	-1	-1	-1
12	1	-1	1	1	1	-1	-1

Tabulka č. 6: Plán experimentů pro testování robustnosti pomocí Plackett-Burmanova plánu.

V tabulce níže jsou popsány hodnoty nezávislých proměnných.

	navážka	v(H ₃ PO ₄)	pH	ACN	průtok	teplota	nástřik
-1	1,5 mg	800,85 µl/500	4,8	4,5 %	0,18 ml/min	72 °C	3,5 µl
0	2,5 mg	843 µl/500	5,0	5,0 %	0,2 ml/min	80 °C	4 µl
1	3,5 mg	885,15 µl/500	5,2	5,5 %	0,22 ml/min	88 °C	4,5 µl

Tabulka č. 7: Sledované proměnné pro hodnocení robustnosti.

12.6 Limit kvantifikace (LOQ)

Limit kvantifikace byl stanoven jako koncentrace, při které poměr signálu k šumu, vypočítaný z hodnot z výsledného chromatografického záznamu, je roven 10. Ke stanovení byla využita koncentrace NaP 0,001 mg/ml.

VÝSLEDKY A DISKUSE

13. STANOVENÍ OPTIMÁLNÍCH PODMÍNEK PRO ANALÝZU

Vybrané podmínky pro separaci pomocí HTLC metody byly zvoleny tak, aby bylo možno dostatečně separovat jak účinnou látku a její rozkladné produkty, tak i přítomnou konzervační látku NaB. V souladu s ČL [25] a po předchozích zkušenostech byla pro detekci zvolena absorbance o vlnové délce 263 nm. Další podmínky a jejich výběr jsou popsány níže.

13.1 Výběr vhodné mobilní fáze

V této práci jsou mapovány možnosti HTLC ve farmaceutické analýze, jež by měla být provedena jako “zelená chromatografie“ s důrazem na co nejmenší ekologickou zátěž. Mobilní fáze byla tedy zvolena s co nejnižším zastoupením organického rozpouštědla, tak aby zároveň byla zachována dostatečná separační schopnost metody. Mobilní fáze tvořená samotnou vodou nebo pufrům vedla k překrývajícím se nebo rozmytým píkům, proto nakonec byla zvolena mobilní fáze s obsahem ACN a 25mM fosforečnanový pufr v poměru 1 : 19. pH fosforečnanového pufru bylo upraveno přidávkou amoniaku na hodnotu 5,0, která zaručovala dostatečné rozlišení mezi píky při dostatečné stabilitě NaP.

13.2 Optimalizace teploty

Dalším důležitým testovaným parametrem pro vytvoření co nejvhodnější analytické metody byla teplota. Ta byla testována v rozsahu od 60 do 150°C, v teplotních intervalech po 20 °C bylo postupně provedeno nastříkávání porovnávacího roztoku (a). Cílem bylo najít optimální teplotu, při které separace bude dostatečně účinná a také prověřit stabilitu kolony za vysokých teplot. Ve výsledku optimalizace bylo zjištěno, že se stoupající

teplotou se retenční časy zkracují, zároveň klesá vzdálenost mezi píky a jednotlivé píky jsou více rozmyté, což zhoršuje separaci a tedy rozlišení.

Pro správné vyhodnocování chromatogramů je důležité dostatečné rozlišení mezi jednotlivými píky a zároveň rychlé separování látek ze vzorku je důležité pro ekonomický chod analytické laboratoře. Na základě těchto požadavků byla vyhodnocena jako nejvhodnější teplota 80 °C. Při vyšších teplotách docházelo ke zhoršení separace zejména u dvojice píků NaP a NaB.

13.3 Stanovení průtoku

Na obdobném principu vyhodnocení se stanovoval i průtok eluátu kolonou. Byly testovány hodnoty průtoku 0,4000 ml/min, 0,2000 ml/min a 0,3000 ml/min. Hodnota průtoku 0,2000 ml/min byla vybrána z hlediska dobré separace z obavy aby vyšší průtok nevyvolal problém s vysokým tlakem na koloně.

13.4 Souhrn optimalizovaných podmínek pro zvolenou metodu

- Kolona: Kolona Zirchrom-PBD 100 × 4,6 mm
- MF: 25mM H₃PO₄ (pH upraveno amoniakem na 5,0): ACN (19 : 1)
- Teplota: 80 °C
- Průtok: 0,2 ml/min
- Objem nástřiku: 4µl
- Detekce: absorbance při 263 nm

13.5 Identifikace analytů z porovnávacích roztoků

Identifikace analytů: pořadí a retenční časy jednotlivých analytů byly stanoveny pomocí chromatogramů porovnávacích roztoků 1 – 4. Výsledky z optimalizované metody jsou shrnuty v tabulce č. 8:

Píky	Pík 1 - NaP	Pík 2 - NaB	Pík 3 - Imp-A	Pík 4 - Imp-B
Retenční čas min	2,27	2,62	3,0	11,86

Tabulka č. 8: Retenční čas jednotlivých analytů.

14. VÝSLEDKY VALIDACE ANALYTICKÝCH METOD

14.1 Přesnost - opakovatelnost

Opakovatelnost byla testována na reálném vzorku přípravku Gallax. Pro analýzu byl schválně použit přípravek po expirační době, a proto je zastoupení nečistoty A poněkud vyšší. Výsledky testování opakovatelnosti jsou uvedeny v následujících tabulkách:

Pro hodnocení přesnosti se vypočítává relativní směrodatná odchylka (RSD) z opakovaného stanovení účinných, konzervačních nebo příbuzných látek. Pro účinné látky je relativní směrodatná odchylka tolerována do 2,0 %, pro konzervační látky do 5,0 %, pro příbuzné látky je tolerance podle nalezené hladiny, tedy v tomto případě do 7 %.

NaP - Vzorek č.	Zjištěno (mg/ml přípravku)
1	0,7369
2	0,7575
3	0,7541
4	0,7525
5	0,7527
6	0,7552
Průměr	0,7516
Směrodatná odchylka	0,0074
Relativní směrodatná odchylka (%)	0,98

Tabulka č. 9: Přesnost stanovení NaP.

NaB - Vzorek č.	Zjištěno (mg/ml)
1	0,1736
2	0,1764
3	0,1749
4	0,1767
5	0,1760
6	0,1778
Průměr	0,1759
Směrodatná odchylka	0,00147
Relativní směrodatná odchylka	0,84

Tabulka č. 10: Přesnost stanovení NaB.

IMP - Vzorek č.	Nečistota A %
1	4,368
2	4,445
3	4,438
4	4,361
5	4,375
6	4,389
Průměr	4,396
Směrodatná odchylka	0,0522
Relativní směrodatná odchylka	0,83

Tabulka č. 11: Přesnost stanovení příbuzných látek.

14.1.1 Vyhodnocení přesnosti

Všechny vypočítané hodnoty RSD pro stanovení NaP, NaB i nečistoty A vyhovují stanoveným limitům.

14.2 Správnost

Správnost byla testována na šesti roztocích, obsahujících NaP a Placebo. Výsledky testování správnosti jsou uvedeny v následujících tabulkách:

14.2.1 Správnost – NaP

Vzorek č.	Navážka NaP (g)	Správný obsah	Nalezený obsah (mg/ml)	Výtěžnost (%)
1	0,00746	0,00746	0,007488	100,38
2	0,00753	0,00753	0,007512	99,76
3	0,00750	0,00750	0,007587	101,16
4	0,00749	0,00749	0,007496	100,08
5	0,00748	0,00748	0,007485	100,07
6	0,00748	0,00748	0,007446	99,55
			Průměr (%)	100,17

Tabulka č. 12: Správnost stanovení NaP.

14.2.2 Správnost – NaB

Vzorek č.	Navážka NaP (g)	Správný obsah (mg/ml)	Nalezený obsah (mg/ml)	Výtěžnost (%)
1	0,00746	0,2001	0,201818	100,86
2	0,00753	0,2001	0,20178	100,84
3	0,00750	0,2001	0,20386	101,89
4	0,00749	0,2001	0,2012	99,9
5	0,00748	0,2001	0,19986	100,55
6	0,00748	0,2001	0,20119	100,54
			Průměr (%)	100,76

Tabulka č. 13: Správnost stanovení NaB.

14.2.3 Správnost stanovení příbuzných látek

Vzorek č.	Navážka NaP (g)	Správný obsah (mg/ml)	Nalezený obsah (mg/ml)	Výtěžnost (%)
1	0,007508	0,00746	0,008437	112,38
2	0,007508	0,00753	0,009155	121,93
3	0,007508	0,00750	0,007484	99,68
4	0,007508	0,00749	0,00845	112,56
5	0,007508	0,00748	0,009086	121,03
6	0,00750	0,00748	0,007531	100,68
			Průměr (%)	111,37

Tabulka č. 14: Správnost stanovená u příbuzných látek NaP.

14.2.4 Vyhodnocení správnosti

Při vyhodnocení správnosti u účinných látek je limitní rozmezí výtěžnosti 98,0 - 102,0 %. Výtěžnost NaP byla stanovená na 100,17 %, což odpovídá požadovaným hodnotám. Experimentálně stanovená výtěžnost NaB, která činí 100,76 %, také splňuje požadavky (stanovené limity jsou 95,0 – 105,0). Pro příbuzné látky je uveden limit 85,0 – 115,0 %, čemuž vyhovuje zjištěná hodnota 111,37 %.

14.3 Linearita

14.3.1 Ověření linearity NaP a NaB

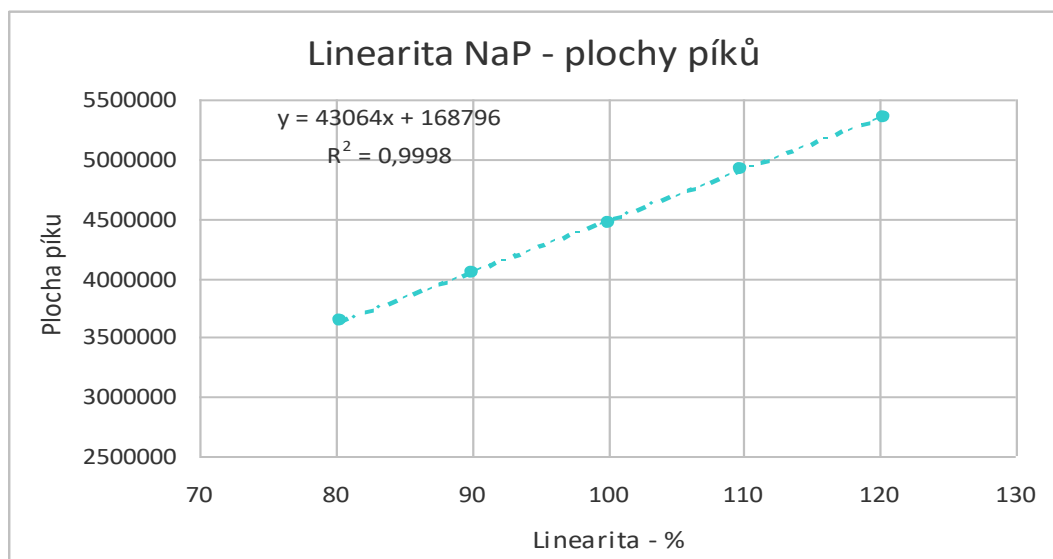
Pro ověření linearity byly analyzovány roztoky standardů v koncentračním rozmezí od 80 – 120 %. Byly provedeny tři nástřiky a z výsledných hodnot ploch píků byly vypočítány průměry pro každou koncentraci. Tyto hodnoty jsou zapsané v tabulce č. 15.

- **NaP**

Naměřené hodnoty průměrných ploch píků jednotlivých standardů:

Ln-%	80	90	100	110	120
Koncentrace roztoku v mg/ml	80,4	90,107	100,107	109,84	120,24
Plocha – průměr	3636269	4049722	4464080	4907749	5347831

Tabulka č. 15 Hodnoty pro vyhodnocení linearity **NaP**.



Graf č. 1: Graf lineární regrese pro NaP.

Parametry lineární regrese:

$$y = 43064x + 168796$$

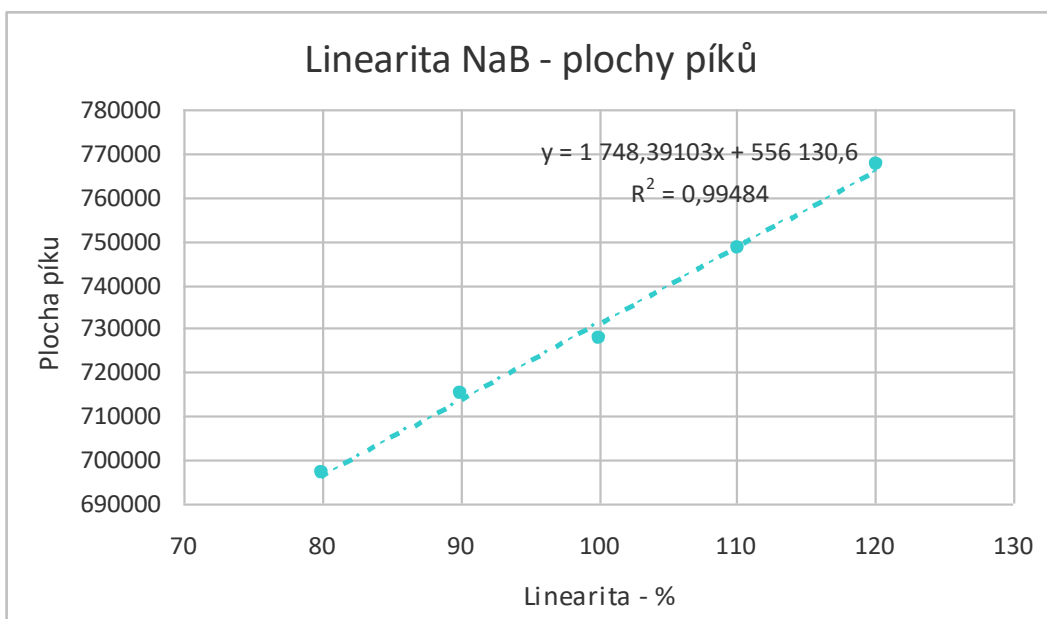
$$R^2 = 0,9998$$

$$R = 0,9996$$

• **NaB**

Ln-%	80	90	100	110	120
Koncentrace roztoku v mg/ml	0,1601	0,1801	0,2001	0,2201	0,2401
Plocha - průměr	696807	714923	727679	748510	767489

Tabulka č.16: Hodnoty vyhodnocení linearit **NaB**.



Graf č.2: Graf lineární regrese pro NaB.

Parametry lineární regrese:

$$y = 1\,748,39x + 556\,130,6$$

$$R^2 = 0,99484$$

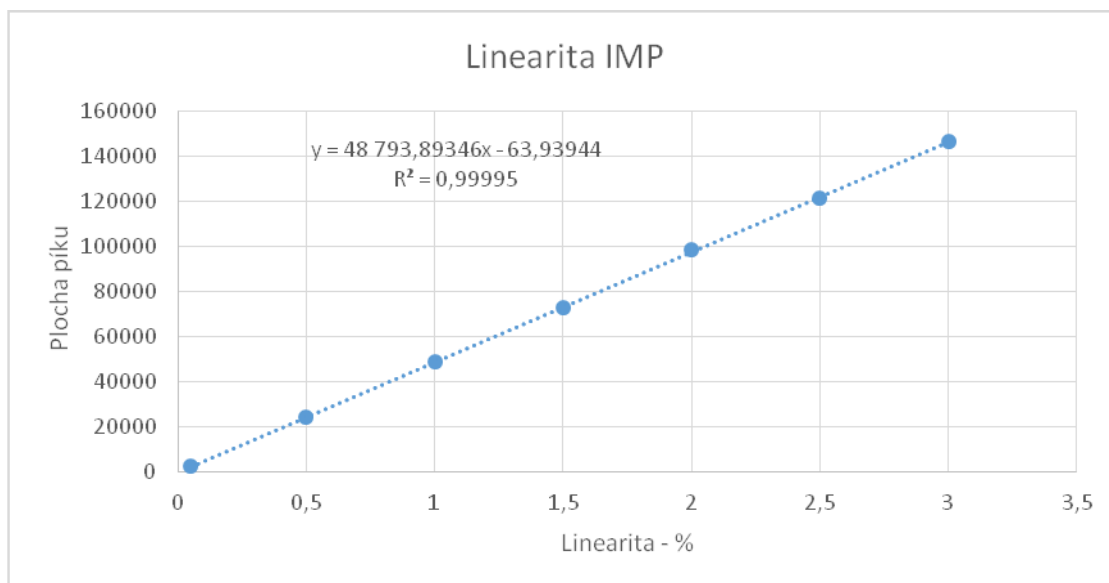
$$R = 0,99742$$

14.3.2 Ověření linearit příbuzných látek

Kvůli nedostupnosti standardů příbuzných látek se vyhodnocovala linearita z koncentrací 0,05 – 3,0 % Pa. Naměřené průměrné plochy píků standardů jsou uvedeny níže:

Koncentrace	0,05 %	0,5 %	1,0 %	1,5 %	2,0 %	2,5 %	3,0 %
Plocha - průměr	2420	24291	486662	72836	98260	12154	14631
						2	7

Tabulka č.17: Hodnoty vyhodnocení linearit příbuzných látek.



Graf č.3: Graf lineární regrese pro příbuzné látky.

Parametry lineární regrese:

$$y = 48\,793,89346x - 63,93944$$

$$R^2 = 0,99995$$

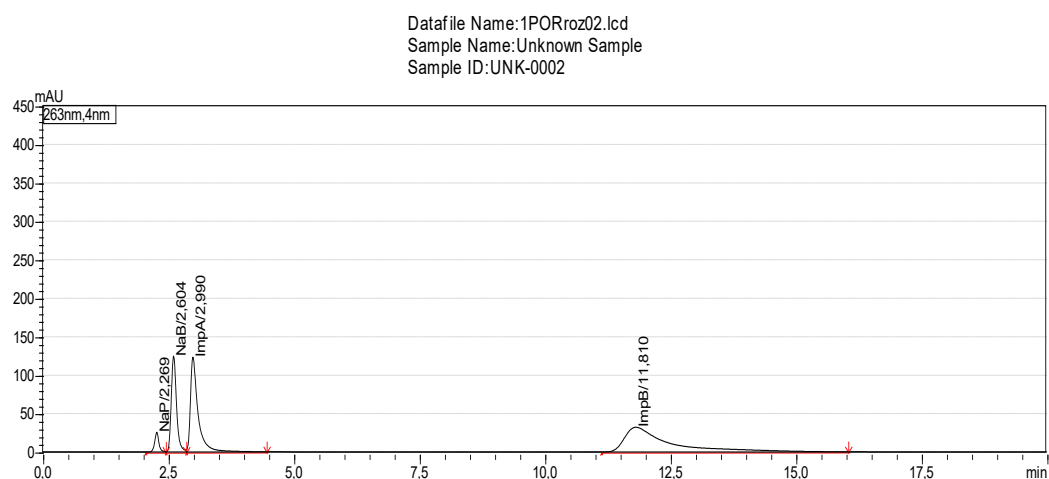
$$R = 0,999975$$

14.3.3 Vyhodnocení linearity

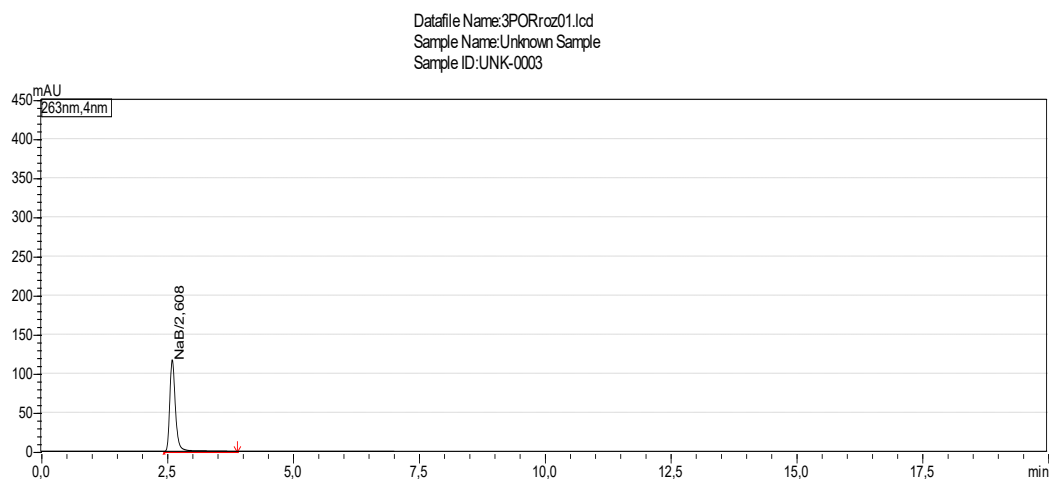
Všechny výsledné korelační faktory pro stanovení linearity splňují stanovené limitní požadavky. U účinné látky NaP je limit korelačního faktoru $\geq 0,999$, vypočítána hodnota je 0,9996. Pro konzervační látky v přípravku se obvykle uvádí limit $\geq 0,995$, nalezená hodnota se rovnala 0,99742. Zjištěný korelační faktor pro příbuzné látky je 0,999975, což taky odpovídá povolenému limitu $\geq 0,990$. Výsledky splňují stanovená kritéria, čímž linearita byla ověřena.

14.4 Selektivita

Selektivitu metody ověřují níže uvedené chromatogramy vybraných roztoků. Pro tyto chromatografické záznamy byly použité: porovnávací roztoky č. 1, 3 a 4, dále zkoušený roztok připravený z reálného vzorku přípravku Gallax, roztok placebo přípravku, roztoky **Pa** a **Pc**. Výsledné chromatogramy jsou představeny na následujících obrázcích:

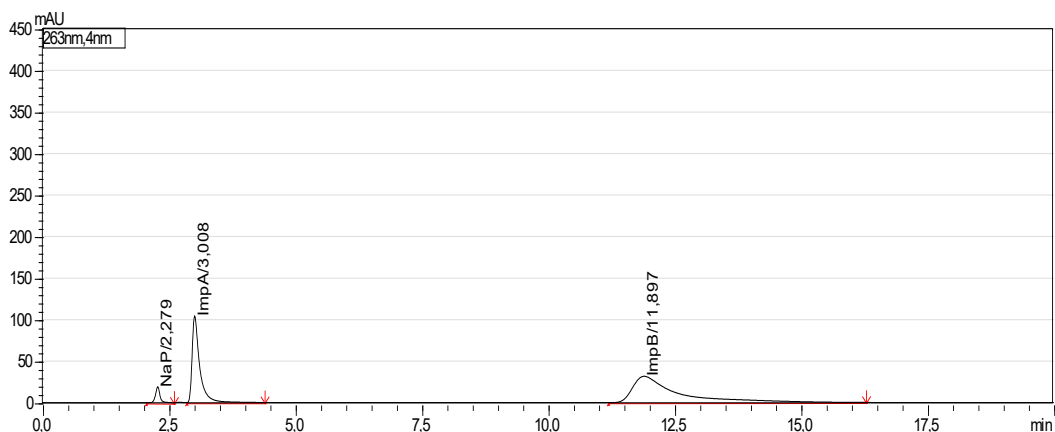


Obrázek č. 10: Chromatografický záznam porovnávacího roztoku č. 1 (roztok částečně hydrolyzovaného NaP s přidáním NaB)



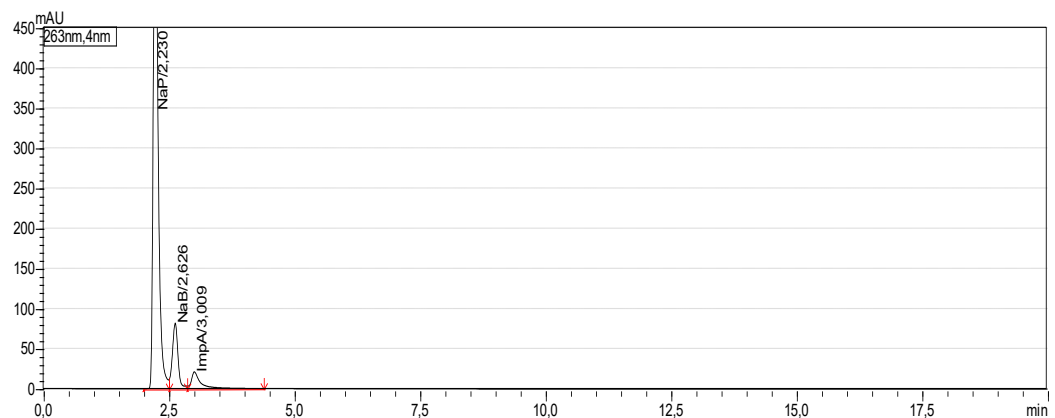
Obrázek č. 11: Chromatografický záznam zkoušeného roztoku č. 3. (Roztok standardu NaB)

Datafile Name:4PORroz01.lcd



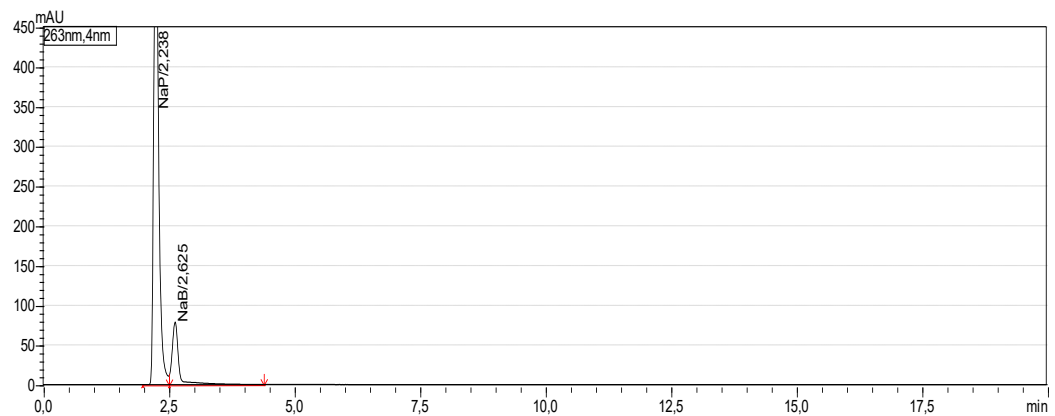
Obrázek č. 12: Chromatografický záznam zkoušeného roztoku č. 4. (Roztok částečně hydrolyzovaného NaP)

Datafile Name:Gallax01.lcd
Sample Name:Unknown Sample018
Sample ID:UNK-0021

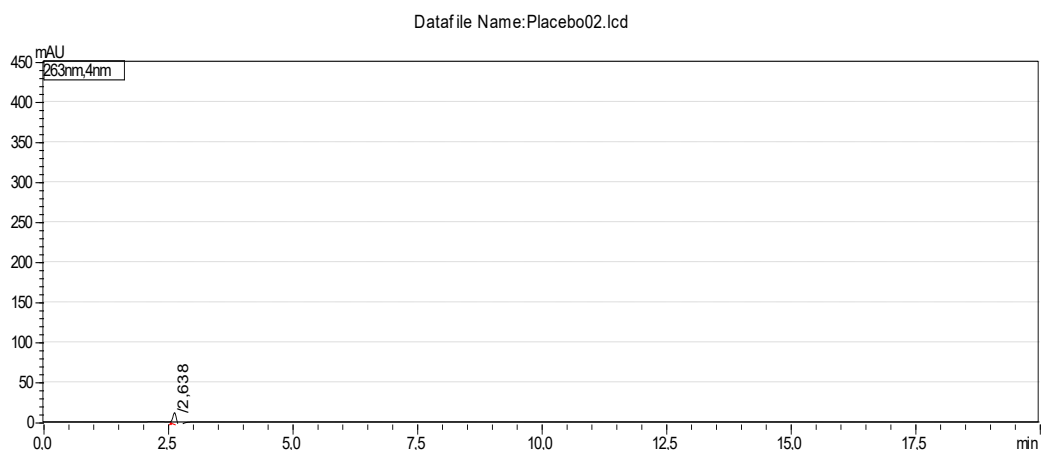


Obrázek č. 13: Chromatografický záznam zkoušeného roztoku z přípravku Gallax.

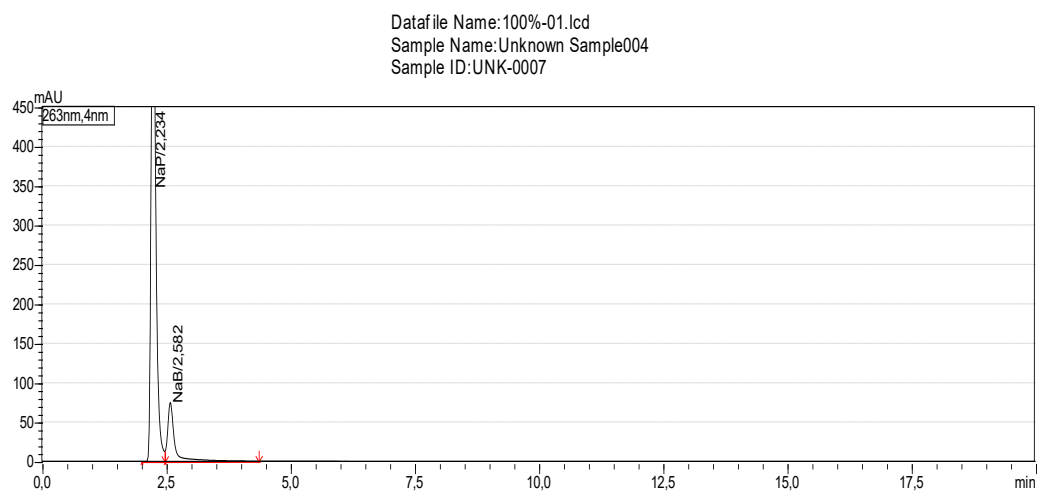
Datafile Name:Spr5-02.lcd
Sample Name:Unknown Sample037
Sample ID:UNK-0040



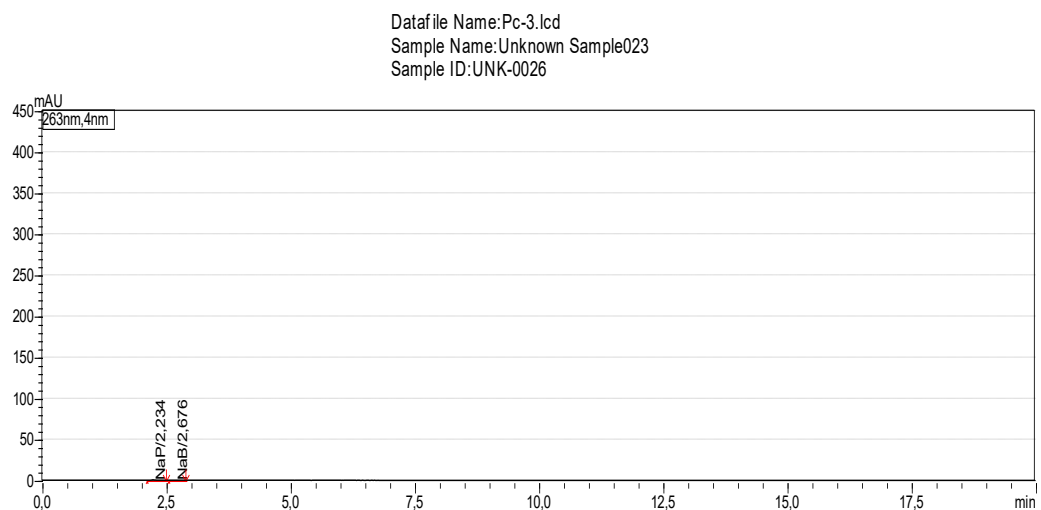
Obrázek č. 14: Chromatografický záznam roztoku pro správnost. (Zkoušený roztok připravený z modelového přípravku)



Obrázek č. 15: Chromatografický záznam placebo přípravku.



Obrázek č. 16: Chromatografický záznam porovnávacího roztoku Pa (obsahuje standardy NaP a NaB pro stanovení jejich obsahu).



Obrázek č. 17: Chromatografický záznam porovnávacího roztoku Pc (jedná se o roztok NaP a NaB naředěný na 0,1 % vzhledem ke koncentraci NaP v přípravku)

16.5 Robustnost

Podle Plackett-Burmanova plánu pro testování robustnosti bylo vybráno 7 parametrů, které by mohly ovlivnit analýzu. Hodnocených parametrů bylo několik:

- retenční časy jednotlivých složek ve zkoušeném roztoku, tedy NaP (RT1), NaB (RT2), ImpA (RT3) a ImpB (RT4)
- rozlišení mezi píky jednotlivých analytů (RS 1-2, 2-3, 3-4).
- počet teoretických pater pro pík hlavní složky NaP (ThPINo1)
- faktor symetrie pro pík hlavní složky NaP (TF1)

Hodnocení probíhalo pomocí programu TriloByte QC.Expert verze 3.3.

Dále jsou popsány nezávislé proměnné, použité pro experimenty:

- **navážka NaP** - navážka standardu NaP, která byla použita pro přípravu roztoku v rozmezí 2,5 mg a 3,5 mg
- **v(H₃PO₄)** - objem kyseliny fosforečné, který byl přidán k vodě při tvorbě MF v rozmezí 5 % nominálního objemu
- **pH** - pH pufru MF s rozmezím 0,2 od nominálního pH
- **ACN** - množství ACN přidaného do MF v procentech - v rozmezí 0,5 %
- **průtok** - průtok MF v hodnotě 90 a 110 % nominální rychlosti
- **teplota** - teplota na koloně v rozmezí 8 °C od nominální teploty
- **nástřik** - nástřik analyzovaného vzorku v rozmezí 0,5 ul od nominálního nástřiku

14.5.1 RT1 - retenční čas NaP

Na prvním příkladě bude podrobněji probrán zvolený postup statistického hodnocení. Na začátku se spočítaly odhady zvolených parametrů, poté byla určena statistická významnost proměnných. Po provedení matematických operací byla získána tato tabulka, ve které jsou znázorněny zkoumané proměnné a stanovena významnost vlivu změn daných parametrů na retenční čas NaP.

PROMĚNNÁ	Odhad	Závěr	Pravděpodobnost
Abs	2,3118	Významný	2,0920
Nav. NaP	-0,00341	Nevýznamný	0,3403
V(H₃PO₄)	0,0144	Významný	0,0103
pH	-0,0134	Významný	0,0132
ACN	-0,0015	Nevýznamný	0,6425
Průtok	-0,2258	Významný	0,00000023
Teplota	-0,0496	Významný	0,00012
nástřik	0,00075	Nevýznam	0,8239

Tabulka č.18: Závislost retenčního času NaP na jednotlivých proměnných, vypočítaná směrodatná odchylka se rovná 0,0032.

V dalším kroku byly vypuštěny nevýznamné proměnné a opět byla provedena regrese pouze s parametry, které mohou ovlivnit sledovanou hodnotu (RT1). Ze získaných hodnot s vícenásobným korelačním faktorem $R = 0,999$ byly sestaveny rovnice a tabulka:

$$RT1 = 0,0144 v(H_3PO_4) - 0,0134 (pH) - 0,225 (průtok) - 0,0469 (teplota) + 2,3118$$

Proměnná	Odhad	Závěr	Pravděpodobnost
Abs	2,3118	Významný	0
v(H₃PO₄)	0,0144	Významný	0,0013
pH	-0,0134	Významný	0,0019
průtok	-0,2256	Významný	1,18
teplota	-0,0469	Významný	6,51

Tabulka č.19: Závislost retenčního času NaP na jstatisticky významných proměnných, vypočítaná směrodatná odchylka se rovná 0,0028.

Z výsledků, hlavně z rovnice, plyne, že retenční čas hlavní složky vzorku je závislý na více proměnných. Podle příslušných koeficientů je zřejmé, že nejvíce jej v rámci testovaných odchylek od nominální hodnoty ovlivňuje průtok MF, potom teplota na koloně a přidaný objem kyseliny fosforečné při přípravě pufru a nejméně pH hodnota pufru. Můžeme tedy z toho odvodit, že zvýšení průtoku o 0,02 ml/min má za následek snížení RT1 o 0,226 min. Naopak při zpomalení průtoku například o 0,1 ml/min můžeme očekávat prodloužení RT1 o 0,113 min. Po zvýšení pH o 0,2 následuje snížení RT1 o 0,013 min, tím pádem po snížení pH o 0,1 dochází k prodloužení retenčního času o 0,008 min. Obdobně závislost na teplotě – při navýšení o 8 °C se RT1 zkrátí o 0,047 min, můžeme usoudit, že při snížení teploty o 1 °C dojde k prodloužení retenčního času o 0,006 min. V opačném směru platí závislost RT1 na objemu kyseliny fosforečné v pufru – při přidání o 5 % víc se retenční čas prodlouží o 0,0144 min, při snížení přidaného objemu o 1 % můžeme očekávat zkrácení RT1 o 0,003 min.

Navážka NaP, poměr ACN v MF ani objem nastříkovaného roztoku nevykazují významný vliv.

14.5.2 RT2 - retenční čas NaB

Na stejném principu na bázi odhadů parametrů z regrese byly určeny statisticky významné proměnné pro retenční čas NaB (RT2). Výsledné hodnoty s vícenásobným korelačním koeficientem $R = 0,965$ jsou představeny v tabulce a je z nich vytvořena rovnice závislosti:

$$\mathbf{RT2 = - 0,2505 (průtok) + 2,6635}$$

Proměnná	Odhad	Závěr	Pravděpodobno
Abs	2,6635	Významný	0
průtok	-0,2505	Významný	3,98E-07

Tabulka č. 20: Závislost retenčního času NaB na statisticky významných proměnných, vypočítaná směrodatná odchylka se rovná 0,0216.

Z výsledku je zřejmá závislost retenčního času NaB na průtoku MF – při jeho zrychlení o 0,2 ml/min se RT2 snižuje o 0,251min. Naopak, pokud snížíme rychlost průtoku o 0,1 ml/min můžeme sledovat prodloužení RT2 o 0,12525 min oproti nominální hodnotě.

Významnou závislost na ostatních parametrech retenční čas NaB nevykazuje.

14.5.3 RT3 - retenční čas ImpA

Níže je uvedena konečná rovnice s vícenásobným korelačním koeficientem $R = 0,998$ a dále v tabulce č. 21 jsou znázorněny výsledné hodnoty proměnných, získané regresí.

$$RT3 = 0,0245 (v(H_3PO_4)) - 0,0482 (pH) - 0,03833 (ACN) - 0,2795 (\text{průtok}) - 0,2185 (\text{teplota}) + 3,0693$$

Proměnná	Odhad	Závěr	Pravděpodobno
Abs	3,0693	Významný	6,59E-14
v(H₃PO₄)	0,0245	Významný	0,044410218
pH	-0,0482	Významný	0,002494852
ACN	-0,0383	Významný	0,007404839
průtok	-0,2795	Významný	1,13E-07
teplota	-0,2185	Významný	4,91E-07

Tabulka č. 21: Závislost retenčního času ImpA na statisticky významných proměnných, vypočítaná směrodatná odchylka se rovná 0,0097.

Z výsledků vyplývá, že při zvýšení pH o 0,2 dochází ke snížení RT3 o 0,048 min, při zvýšení koncentrace ACN o 0,5 % lze očekávat zrychlení eluce o 0,038 min, při zvětšení teploty o 8 °C taktéž dosáhneme zkrácení RT3. Největší vliv na retenční čas má změna rychlosti průtoku MF – jehož zrychlení o 0,02 ml/min má za následek snížení RT3 o 0,279 min. Přídavek kyseliny fosforečné o 5 % větší oproti nominální hodnotě vede k prodloužení RT3.

14.5.4 RT4 - retenční čas ImpB

Parametry, které mají významný vliv na retenční čas ImpB jsou zobrazeny v tabulce č. 22. Výsledná rovnice s vícenásobným korelačním koeficientem $R = 0,968$ pak má tvar:

$$RT4 = -0,9635 (\text{průtok}) - 2,5833 (\text{teplota}) + 12,2292$$

Proměnná	Odhad	Závěr	Pravděpodobnost
Abs	12,2292	Významný	2,01E-12
průtok	-0,9635	Významný	0,0029
teplota	-2,5833	Významný	1,80E-06

Tabulka č. 22: Závislost retenčního času ImpB na statisticky významných proměnných, vypočítaná směrodatná odchylka se rovná 0,2379.

RT4 nejvíce ovlivňuje změna teploty analýzy, její navýšení o 8 °C zrychluje eluci ImpB. Stejně tak zrychlení průtoku MF o 0,02 ml/min má za následek zrychlení eluce ImpB o 0,96 min.

14.5.5 RS1-2, RS3-4 - rozlišení mezi píky 1 – 2 a 3 – 4

Při hodnocení rozlišení mezi píky NaP – NaB a ImpA – ImpB se ukázalo, že žádný ze sledovaných parametrů v testovaných mezích významně neovlivňuje danou veličinu.

14.5.6 RS2-3 - rozlišení mezi píky 2 a 3

Rozlišení mezi píky NaB a ImpA je významně ovlivněno pouze jedním z parametrů – teplotou. Vysledná rovnice s vícenásobným korelačním koeficientem $R = 0,939$ je pak ve tvaru:

$$\text{RS2-3} = -0,70097 (\text{teplota}) + 1,80729$$

Proměnná	Odhad	Závěr	Pravděpodobnost
Abs	1,8073	Významný	7,31E-10
teplota	-0,70097	Významný	5,85E-06

Tabulka č. 23: Závislost míry rozlišení mezi píky 2 a 3 na statisticky

významných proměnných, vypočítaná směrodatná odchylka se rovná 0,0809.

Při navýšení teploty o 8 °C můžeme pozorovat poměrně významný pokles rozlišení. Tedy z tohoto důvodu není vhodné teplotu separace zvyšovat.

14.5.7 TF1 - faktor symetrie píku NaP

Pokud se jedná o hodnocení faktoru symetrie účinné látky analyzovaného roztoku, zde, stejně jak v předchozím případě významný vliv vykazuje pouze změna teploty analýzy. Z toho vyplývá rovnice s vícenásobným korelačním koeficientem $R = 0,649$:

$$\text{TF1} = -0,1332 (\text{teplota}) + 1,2659$$

Proměnná	Odhad	Závěr	Pravděpodobnost
Abs	1,2659	Významný	1,88E-10
teplota	-0,1332	Významný	0,0225

Tabulka č. 24: Závislost faktoru symetrie píku NaP na statisticky významných proměnných, vypočítaná směrodatná odchylka se rovná 0,0494.

S navýšením teploty o 8 °C sledujeme snížení hodnoty faktoru symetrie o 0,1332, tedy zlepšení symetrie píku.

14.4.8 ThPINo1 - Počet teoretických pater u píku NaP

V případě hodnocení počtu teoretických pater hlavní látky NaP pozorujeme velký vliv dvou sledovaných parametrů – pH mobilní fáze a teploty analýzy. Z hodnot získaných z regrese byla sestavena tabulka č. 25 a rovnice s vícenásobným korelačním koeficientem $R = 0,964$:

$$\text{ThPINo1} = -459,955 (\text{pH}) - 1113,4678 (\text{teplota}) + 3706,66$$

Proměnná	Odhad	Závěr	Pravděpodobnost
Abs	3706,6625	Významný	8,89E-11
pH	-459,9550	Významný	0,0024
teplota	-1113,4678	Významný	3,26E-06

Tabulka č. 25: Závislost počtu teoretických pater píku NaP na statisticky významných proměnných, vypočítaná směrodatná odchylka se rovná 110,1219.

Z rovnice vyplývá, že ThPINo1 je velice závislý na pH MF a na teplotě, zvýšení jejich hodnot o 0,2 (pH) a o 8 °C (teplota) vede ke snížení počtu teoretických pater. V situaci s pH jde o změnu v hodnotě 459,955, při změně teploty se počet teoretických pater mění o 1113,468. Stejně platí opačný vztah mezi veličinami při snížení hodnot těchto proměnných.

14.4.9 Závěry hodnocení robustnosti metody

Po provedení všech experimentů a zhodnocení všech výsledků se dá říct, že na chromatografické veličiny má nejvyšší vliv teplota, která pozitivně ovlivňuje retenční časy analyzovaných látek a symetrii píky hlavního analytu. Negativně pak ovlivňuje počet teoretických pater. Dále je ještě významný průtok, který, jak jsme očekávali, ovlivní především RT všech látek, ale i pH, na jehož veličině je závislá hodnota teoretických pater.

Podobným tématem se rovněž zabýval A. Socha ve své diplomové práci „Hodnocení vybrané účinné látky v přípravku pomocí UHPLC V“. Ve své práci použil kolonu LiChroCART® 125-4 LiChrospher® 60 RP-select B (5 µm). Mobilní fáze (MF) se skládala z acetonitrilu (ACN) s pufrům v poměru 1:9. Pufr obsahoval triethylamin (TEA) s výsledným pH 5,0 upraveným pomocí kyseliny octové. Experimenty byly provedeny za podmínek uvedených v tabulce níže. [29]

Metoda	UHPLC
Detekce	Spektrofotometrický detektor – 263 nm
Průtoková rychlost	0,4 ml/min
Nástřik	2 µl
Teplota kolony	100 °C

Tabulka č. 26: Parametry optimalizované UHPLC metody. [29]

Dle získaných výsledků lze konstatovat, že teplota a rychlost průtoku MF významně ovlivňují analýzu jak v systému HTLC, tak v systému UHPLC. Dále ve výsledcích figuruje koncentrace ACN v MF, která v našem případě neměla vliv na žádnou ze sledovaných hodnot. Navíc za podmínek UHPLC byla prokázána závislost rozlišení mezi píky na objemu přidaného TEA, pH mobilní fáze a na koncentraci ACN v MF, kdežto v situaci HTLC na rozlišení mezi píky významný vliv tyto proměnné neměly.

Závěr

V této diplomové práci byly vyzkoušeny možnosti aplikace vysokoteplotní kapalinové chromatografie (HTLC) ve farmaceutické analýze léčiv s využitím ZirChrom®-PBD kolony (100 x 4,6 mm, s částicemi velikosti 5 µm).

Pro přípravu k vypracování teoretické části a provedení praktické části práce byly prostudovány odborné literární zdroje, týkající se dané tematiky (vědecké články, odborná literatura i výukové materiály).

V experimentální části byly nejprve testovány různé chemické látky, nejslibnější po těchto experimentech se jevil natrium-pikosulfát, a proto byl vybrán jako analyzovaná látka pro další zpracování.

Poté byly provedeny analýzy, zaměřené na zkoumání vlivu teploty, pH a koncentrace organické složky v mobilní fázi na separaci natrium-pikosulfátu, jeho rozkladných produktů a natrium-benzoátu.

Na základě získaných informací byla vyvinuta analytická metoda, vhodná pro hodnocení natrium-pikosulfátu, jeho příbuzných látek a natrium-benzoátu v přípravku ©Gallax, 7,5 mg/ml, *perorální kapky, roztok*.

K analýze bylo využito výše uvedené kolony, při teplotě 80 °C v kolonovém prostoru, s průtokem 0,2 ml/min a s nástřikem 4 µl za UV detekce při vlnové délce 263 nm. Mobilní fáze byla složena z acetonitrilu a 25mM fosfátového pufru (pH 5,0) v poměru 1 : 19. Postup přípravy zkoušených roztoků je uveden v kapitole č. 10 této práce.

Vyvinutá metoda byla validována. V rámci validačního procesu byly hodnoceny: linearita, správnost a opakovatelnost natrium-pikosulfátu, natrium-benzoátu a příbuzných látek. Výsledné hodnoty získané během analýz vyhovují požadovaným limitům. Selektivita byla prokázána sérii chromatogramů.

Při testování robustností bylo zjištěno, že největší vliv na retenční časy analyzovaných látek, a tím i na rychlost celé analýzy mají teplota, rychlost průtoku mobilní fáze kolonou a pH mobilní fáze.

Na základě provedených měření a získaných výsledků lze systém HTLC považovat za vhodnou pro hodnocení stability přípravku.

15. POUŽITÉ ZKRATKY

SF – *stacionární fáze*

MF - *mobilní fáze*

NaP - *Natrium-pikosulfát monohydrát, pikosulfát sodný*

NaB - *Natrium-benzoát*

ImpA - *nečistota A, Impurity A*

ImpB - *nečistota B*

ACN - *Acetonitril*

TEA - *Triethylamin*

HPLC - *Vysokoúčinná kapalinová chromatografie*

HTLC – *Vysokoteplotní kapalinová chromatografie*

Q2A a Q2B – *Validační instrukce ICH*

PhEur - *Pharmacopoeia European, Evropský lékopis*

Spr - *roztoky pro správnost*

SprL - *roztoky pro správnost příbuzných látek*

Ln - *Linearita*

RT - *Retenční čas*

RSD - *Relativní směrodatná odchylka*

RS - *Rozlišení mezi píky*

TF - *Faktor symetrie*

ThPINo2 - *Počet teoretických pater*

LOQ - *Limit kvantifikace*

Pa - *Porovnávací roztok (a)*

Pb - *Porovnávací roztok (b)*

Pc - *Porovnávací roztok (c)*

Pd - *Porovnávací roztok (d)*

Pimp-B - *Porovnávací roztok Imp-B*

Robs - *Roztok pro stanovení obsahu*

CRL – *chemická referenční látka*

EDTPA - z angl. *ethylenediamine-N,N,N',N'-tetra(methylenephosphonic) acid*
(*ethylendiamin N, N, N', N' - tetramethylenfosfonová kyselina*)

ODS – *Oktadecylsilica – oktaedecylsilikagel*

PBD – *polybutadien*

16. POUŽITÁ LETERATURA

- [1] NOVÁKOVÁ, L., M. DOUŠA *Moderní HPLC separace v teorii a praxi I.* 1. vyd. Hradec Králové: Lucie Nováková, 2013, 235 s. ISBN 978-80-260-4243-3.
- [2] DOUŠA, Michal. *HPLC.CZ* [online]. 1999-2011 *Teorie*. [cit. 2018-04-07].
Dostupné z : <http://www.hplc.cz/teorie/uvod.html>
- [3] Český lékopis 1997 [cit. 2018-04-07].
Dostupné z: http://www.lekopis.cz/Kap_2_2_46.html
- [4] *Wikiskripta* [online]. [cit. 2018-04-07].
Dostupné z:
https://www.wikiskripta.eu/w/Chromatografie_na_tenk%C3%A9_vrstv%C4%9B
- [5] *Wikimedia Commons* [online]. 2013 [cit. 2018-04-07].
Dostupné z: http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Preparative_HPLC.svg.
- [6] DOUŠA, Michal. *HPLC.CZ* [online]. 1999-2011. *Chromatografická kolona*. [cit. 2018-04-07].
Dostupné z: http://www.hplc.cz/Teorie/hplc_column.html.
- [7] Nguyen, D.T.T., a další. *Fast analysis in liquid chromatography using small particle size and high pressure* [online]. 2006 [cit. 2018-04-07].
Dostupné z: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/jssc.200600189/epdf>.
- [8] Snyder, L. R., Kirkland, J. J. a Dolan, J. W. *Introduction to modern liquid chromatography*. John Wiley & Sons: Hoboken, 2010, s 87-146 ISBN: 978-0-470-16754-0.
- [9] NAWROCKI, J., C. DUNLAP, A. MCCORMICK a P.W. CARR. Part I. *Chromatography using ultra-stable metal oxide-based stationary phases for HPLC*. *Journal of Chromatography A* [online]. 2004, vol. 1028, issue 1, s. 1-30 [cit. 2018-05-03]. DOI: 10.1016/j.chroma.2003.11.052.
Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14969280>
- [10] GREIBROKK, Tyge Greibrokk a Thomas ANDERSEN. *High-temperature Liquid Chromatography*. *Journal of Chromatography A*. 2002, roč. 2003, č. 1000. DOI: 10.1016/S0021-9673(02)01963-5.
- [11] B. Yan, J. Zhao, J. S. Brown, J. Blackwell, P. W. Carr, *Anal. Chem.* 72 (2000) 1253

[12] ZIRCHROM SEPARATIONS, Inc. *HPLC Catalog Column Guide: 2013 - 2014* [online]. 2013 [cit. 2018-05-12].

Dostupné z: <http://www.zirchrom.com/pdf/Catalog2013to2014.pdf>

[13] ZIRCHROM SEPARATIONS, Inc. *HPLC Catalog Column Guide: 2013 - 2014* [online]. 2013 [cit. 2018-05-12].

Dostupné z: <http://www.zirchrom.com/pdf/Catalog2013to2014.pdf>

[14] YANG, X.; DAI, J.; CARR, P. W. Analysis and critical comparison of the reversed-phase and ion-exchange contributions to retention on polybutadiene coated zirconia and octadecyl silane bonded silica phases. *Journal of Chromatography A*, 2003, 996.1: 13-31.)

[15] KLIMEŠ, Jiří et al. *Kontrolně-analytické hodnocení léčiv lékopisnými metodami*. Hradec Králové: RNDr. František Skopec, CSc. Nukleus HK, 2011, 265 s. ISBN 978-80-87009-29-1.

[16] PACÁKOVÁ, Věra a Karel ŠTULÍK. *Vysokoučinná kapalinová chromatografie*, 1.vyd. Praha: Státní pedagogické nakladatelství, 1986. 144 s.

[17] CHURÁČEK, Jaroslav a Pavel JANDERA. *Separace látek: kapalinová vysokoučinná kolonová chromatografie*. 1. vyd. Praha: SNTL - Nakladatelství technické literatury, 1981. 140 s.

[18] *Český lékopis 2009*. 1. vyd. Praha: Grada Publishing, 2009, 1176 s. ISBN 978-802-4729-947.

[19] NOVÁKOVÁ, L., M. DOUŠA *Moderní HPLC separace v teorii a praxi II*. 1. vyd. Hradec Králové: Lucie Nováková, 2013, 235 s. ISBN 978-80-260-4244-0.

[20] KOVAŘÍKOVÁ P., STARIAT J. Validace chromatografických metod, [online]. [cit. 2016-0121].

Dostupné z:

http://dl1.cuni.cz/pluginfile.php/243291/mod_resource/content/5/Lekce%2011_V_alidace%20HPLC%20metody.pdf.

[21] THE INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION. Welcome to the ICH official website [online]. [cit. 2018-05-7].

Dostupné z: <http://www.ich.org/home.html>

[22] Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2 (R1). International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use. [online] 2005 [cit. 2018-05-07].

Dostupné z:

http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q2_R1/Step_4/Q2_R1_Guideline.pdf.

[23] DOUŠA, M. HPLC.CZ [online]. 1999-2011 [cit. 2018-05-15]. Validační program pro statistické zpracování dat - selektivita.

Dostupné z:

http://www.hplc.cz/Validace/program_validace.htm#_3.4_Selektivita.

[24] HOLÍK, M. *OPTIMALIZACE ANALYTICKÝCH POSTUPŮ POMOCÍ PLACKETTOVA-BURMANOVA PLÁNU*. Chemické listy. Praha: Česká společnost chemická, 2004, č. 98, s. 92-97.

[25] *Český lékopis 2017*. 1. vyd. Praha: Grada Publishing a.s., 2017. 4904s. ISBN: 859-404-924-045-6

[26] SPC přípravku Gallax, [cit.18-05-11].

Dostupné z: www.sukl.cz

[27] *Sodium benzoate*. In: *Wikipedia: the free encyclopedia* [online]. San Francisco (CA):Wikimedia Foundation, 2001- 2016 [cit. 2018-05-12]. Dostupné z: https://en.wikipedia.org/wiki/Talk:Sodium_benzoate.

[28] *European pharmacopoeia*. 8th ed. Strasbourg: Council Of Europe, 2014 ISBN 978-92-871-7525-0.

[29] SOCHA A., *Hodnocení vybrané účinné látky v přípravku pomocí UHPLC V*. Diplomová práce. Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Hradec Králové 2016,

Dostupné z: <https://is.cuni.cz/webapps/zzp/detail/156768/29046925>