

UNIVERZITA KARLOVA

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra analytické chemie

**Vývoj a validace HPLC metod pro stanovení obsahu konzervačních látek v
léčivých přípravcích**

„DIPLOMOVÁ PRÁCE“

Vedoucí práce: doc. PharmDr. Ludmila Matysová, Ph.D.

Hradec Králové, 2018

Barbora Harmáčková, DiS.

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

4. 5. 2018

.....

Ráda bych zde poděkovala vedoucí diplomové práce doc. PharmDr. Ludmile Matysové, Ph.D. za její cenné rady, trpělivost a čas, který mi věnovala v průběhu zpracování diplomové práce. Děkuji také ostatním pracovníkům katedry za vstřícnost a ochotu při práci v laboratořích.

ABSTRAKT

Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra analytické chemie

Kandidát: Barbora Harmáčková, DiS.

Školitel: doc. PharmDr. Ludmila Matysová, Ph.D.

Název diplomové práce: Vývoj a validace HPLC metod pro stanovení obsahu konzervačních látek v léčivých přípravcích

Tato diplomová práce byla zaměřena na vývoj a validaci metod pro stanovení obsahu konzervačních látek v léčivých přípravcích, zejména thiomersalu a benzalkonium-chloridu. Při vývoji se vycházelo ze 2 HPLC metod, které pro benzalkonium-chlorid používají směs methanolu a 7,5 mM roztoku fosforečnanu draselného v poměru 68 : 32 a pro thiomersal směs methanolu a fosfátového pufru v poměru 65 : 35 : 0,9. Vývoj metod pro obě zmíněné látky spočíval hlavně v optimalizaci složení mobilní fáze a teplotních podmínek analýzy. Byla přitom sledována především délka analýzy a dále rozlišení a symetrie pík stanovovaných látek. V konečné verzi HPLC metody pro benzalkonium- chlorid byla zvolena izokratická eluce s mobilní fází MetOH : K₃PO₄ (pH 3, 7,5 mM) v poměru 73 : 27 při teplotě 50°C. V konečné verzi pro thiomersal byla použita HPLC metoda se stejným složením mobilní fáze jako v předlohové studii, ale průtok byl zvýšen z 0,6 ml/min na 1 ml/min pro zrychlení analýzy a zlepšení symetrie píku. Validace prokázala, že metody poskytují přesné a správné výsledky a jsou vhodné pro stanovení obsahu těchto látek v léčivých přípravcích.

ABSTRACT

Charles University, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Analytical Chemistry

Candidate: Barbora Harmáčková, DiS.

Supervisor: doc. PharmDr. Ludmila Matysová, Ph.D.

Title of the diploma thesis: Development and validation of HPLC methods for determination volume of preservatives in pharmaceutical formulations

This diploma thesis is focused on the development and validation of methods for determination of preservative content in medicinal products, especially thiomersal and benzalkonium chloride. The development was based on the HPLC methods used for benzalkonium chloride a mixture of methanol and 7.5 mM potassium phosphate in a ratio of 68:32 and for a thiomersal mixture of methanol and phosphate buffer in a ratio of 65: 35: 0.9. The development of the methods for both mentioned substances consisted mainly in optimizing the composition of the mobile phase and the temperature conditions of the analysis. In particular, the length of the analysis and the resolution and symmetry of the peaks of the substances being determined were monitored. In the final version of the HPLC method for benzalkonium chloride an isocratic elution with the mobile phase of MetOH: K₃PO₄ (pH 3, 7.5 mM) in a ratio of 73: 27 was chosen at 50 ° C. In the final version for thiomersal, an HPLC method with the same mobile phase composition was used as in the background study, but the flow rate was increased from 0.6 ml / min to 1 ml / min to accelerate analysis and improve peak symmetry. Validation has shown that the methods provide precise and accurate results and are suitable for determining the content of these substances in medicinal products.

SEZNAM ZKRATEK

IS = vnitřní standard (internal standard)

BAC = benzalkonium-chlorid

THM = thiomersal

BP = butylparaben

EP = ethylparaben

HPLC = vysokoúčinná kapalinová chromatografie (high performance liquid chromatography)

LOD = detekční limit

LOQ = kvantitativní limit

Mr = molekulová hmotnost

RSD= relativní směrodatná odchylka

SD = směrodatná odchylka

MF = mobilní fáze

ČL= český lékopis

OBSAH

1	ÚVOD.....	10
2	CÍL A POPIS PRÁCE	11
3	TEORETICKÁ ČÁST	12
3.1	Benzalkonium-chlorid.....	12
3.1.1	Rešerše	12
3.2	Thiomersal	13
3.2.1	Rešerše	14
3.3	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie	14
3.3.1	Kapalinový chromatograf	15
3.3.2	Základní pojmy v HPLC	17
3.4	Validace analytické metody.....	17
3.4.1	Test vhodnosti chromatografického systému.....	17
3.4.2	Validace	18
4	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST – Benzalkonium-chlorid.....	20
4.1	Chemikálie, standardy, vzorky.....	20
4.1.1	Standardy	20
4.1.2	Pufry pro kalibraci pH metru	20
4.1.3	Chemikálie	20
4.2	Přístroje, podmínky separace	21
4.2.1	Kapalinový chromatograf	21
4.2.2	Analytické váhy.....	21
4.2.3	pH metr.....	21
4.3	Programové vybavení	21
4.4	Příprava vzorků, standardů a analyzovaných roztoků.....	22
4.4.1	Roztok benzalkonium-chloridu s vnitřním standardem butylparabenem.....	22
5	Výsledky a diskuze.....	23
5.1	Vývoj metody.....	23
5.1.1	Měření na koloně Chromolith Performance RP-18.....	23
5.1.2	Výběr vnitřního standardu	24
5.1.3	Optimalizace podmínek separace	24

5.1.4	Vyhodnocení optimálních podmínek	25
5.2	Validace.....	27
5.2.1	Test vhodnosti chromatografického systému.....	27
5.2.2	Opakovatelnost	28
5.2.3	Linearita.....	30
5.2.4	Přesnost (Preciznost).....	31
5.2.5	Správnost (Přesnost)	31
5.2.6	Selektivita	32
5.2.7	Robustnost	34
5.2.8	Detekční limit (LOD) a kvantitativní limit (LOQ).....	37
6	EXPERIMENTÁLÍ ČÁST – Thiomersal	39
6.1	Chemikálie, standardy, vzorky.....	39
6.1.1	Standardy	39
6.1.2	Chemikálie pro analýzu	39
6.2	Přístroje, podmínky separace	39
6.2.1	Kapalinový chromatograf	39
6.2.2	Analytické váhy.....	40
6.3	Programové vybavení	40
6.4	Příprava analyzovaných roztoků.....	40
7	VÝSLEDKY A DISKUZE.....	41
7.1	Vývoj metody.....	41
7.1.1	Měření na koloně Chromolith Performance RP-18, délka 10 cm, vnitřní průměr 3 mm	41
7.1.2	Optimalizace času analýzy.....	41
7.1.3	Výběr vnitřního standardu	41
7.1.4	Vyhodnocení optimálních podmínek	42
7.2	Validace.....	43
7.2.1	Test vhodnosti chromatografického systému.....	43
7.2.2	Opakovatelnost	45
7.2.3	Linearita.....	46
7.2.4	Přesnost (Preciznost).....	47

7.2.5	Správnost (Přesnost)	48
7.2.6	Selektivita	50
7.2.7	Robustnost	51
7.2.8	Detekční limit (LOD) a kvantitativní limit (LOQ).....	55
8	ZÁVĚR	56
9	POUŽITÁ LITERATURA	57

1 ÚVOD

Tato diplomová práce se zabývá vývojem a následnou validací metody pro analýzu vybraných protimikrobních látek používaných v léčivých přípravcích pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie, což je v dnešní době jedna z nejpoužívanějších metod farmaceutické analýzy.

Protimikrobní látky jsou běžnou součástí tekutých lékových forem, kde zajišťují jejich stabilitu a jakost. Jsou na ně kladeny vysoké požadavky jako je široké spektrum účinku, nízká toxicita a fyzikálně-chemická stabilita v širokém rozmezí pH. Právě poslední požadavek na stabilitu v roztocích byl impulzem k nalezení HPLC metody pro snadné, rychlé a přesné stanovení těchto látek v připraveném roztoku.

Benzalkonium-chlorid i thiomersal jsou hojně používané protimikrobní látky v tekutých léčivých přípravcích, kosmetice a v topických antiseptikách. Aby bylo možné sledovat jejich stabilitu, bylo nutné vyvinout vhodnou metodu ke stanovení těchto látek.

2 CÍL A POPIS PRÁCE

Cílem této diplomové práce je vývoj a následná validace HPLC metody pro analýzu léčivých přípravků s obsahem látek carbethopendecinium-bromidu, benzalkonium-chloridu a thiomersalu.

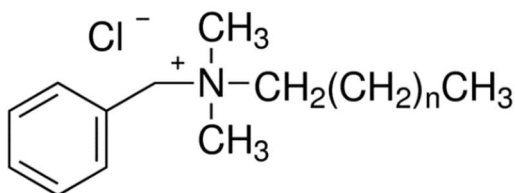
Jedním z cílů práce je vývoj metody pro stanovení carbethopendecinium-chloridu v léčivých přípravcích, který doposud nebyl pomocí HPLC stanovován.

Nejdříve budou výchozí metody optimalizovány tak, aby podávaly požadované výsledky a došlo ke zkrácení analýzy. Následovat bude výběr vhodného vnitřního standardu a poté budou metody aplikovány přímo na roztoky účinných látek.

Součástí práce bude také validace nových metod, hodnotit se bude vzhledem k požadavkům přesnost, linearita, správnost, selektivita a robustnost a dále také detekční a kvantitativní limit

3 TEORETICKÁ ČÁST

3.1 Benzalkonium-chlorid



Obrázek 1: vzorec benzalkonium-chloridu [14]

Sumární vzorec: C₂₂H₄₀ClN

Směs alkylbenzyltrimethylamonium – chloridů, jejichž alkylové skupiny mají délky řetězců C₈ až C₁₈

Mr: 354,02

Obsah: 95,0 % - 104,0 % alkylbenzyltrimethylamonium – chloridů, počítáno na bezvodou látku

Vzhled: bílý nebo nažloutlý prášek nebo nažloutlé bílé rosolovité kousky

Rozpustnost: velmi snadno rozpustný ve vodě a v ethanolu 96% [1]

Použití: Benzalkonium-chlorid je povrchově aktivní kvartérní amoniová sloučenina, která má použití jako biocid, tenzid, konzervant a látka s antiseptickým účinkem. V léčivých přípravcích se používá zejména jako konzervant očních, nosních a parenterálních přípravků a také jako místní antiseptikum.

3.1.1 Rešerše

Před vlastním vývojem metody pro stanovení benzalkonium-chloridu byla provedena rešerše zaměřená na možné metody stanovení této látky.

Roztok benzalkonium-chloridu je možné stanovit pomocí absorpční spektrofotometrie v UV-VIS oblasti. Český lékopis 2009 uvádí absorpční spektroskopii pouze u zkoušky totožnosti BAC, kde jsou absorpční maxima při 257 nm, 263 nm a 269 nm [1].

Benzalkonium-chlorid byl samostatně stanovován pomocí HPLC v 50% vodném roztoku. Byla použita mobilní fáze acetonitril a octan sodný v poměru 60 : 40 s průtokem 1

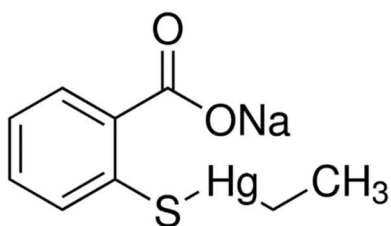
ml/min a nástřikem 20 μ l, ocelová kolona C18 s navázanými CN- skupinami a velikostí částic 5 μ m. Detekce byla nastavená na 254 nm [12].

Jako výchozí byla nakonec zvolena metoda, která pro stanovení používá kolonu C18, 75 mm x 4,6 mm s velikostí částic 3,5 μ m temperovanou na 50°C, s průtokem 1 ml/min a složením mobilní fáze methanol : fosforečnan draselný (7,5 mM) v poměru 68 : 32. Detekce byla nastavena na 208 nm. Tato metoda se optimalizovala na naše podmínky [9].

Tabulka 1: Srovnání výchozí metody a metody zvalidované

kolona a průtok	MF	UV detekce
C18, 75 x 4,6 mm, 3,5 μ m; 1ml/min 20 μ l 50°C	methanol + fosforečnan draselný (pH 3; 7,5mM) 68:32	254 nm
C18, 700 x 3 mm; 3,5 ml/min, 10 μ l 50°C	methanol + fosforečnan draselný (pH 3, 7,5mM) 73:27	208 nm

3.2 Thiomersal



Obrázek 2: vzorec thiomersalu [13]

Sumární vzorec: C₉H₉HgNaO₂S

natrium – 2 – (ethylhydrargyriosulfanyl) benzoát

Mr: 404,81

Obsah: 97,0 % - 101,0 % sloučeniny C₉H₉HgNaO₂S, počítáno na vysušenou látku

Vzhled: bílý nebo téměř bílý krystalický prášek

Rozpustnost: snadno rozpustný ve vodě, mírně rozpustný nebo dobře rozpustný v ethanolu 96%, prakticky nerozpustný v dichlormethanu [1]

Použití: Thiomersal (thimerosal) je organokovová sloučenina obsahující rtuť. Je používán jako konzervant v kosmetice, topických léčivých přípravcích, antiseptických sprejích a ve vakcínách.

3.2.1 Rešerše

Před vlastním vývojem metody pro stanovení thiomersalu byla provedena rešerše na možné metody stanovení této látky.

Český lékopis neuvádí pro stanovení thiomersalu HPLC metodu. Bylo tedy nutné hledat v elektronických ověřených zdrojích.

Jako výchozí byla nakonec vybrána ta, ze které vycházely všechny později validované. Tato metoda používá pro stanovení kolonu C18, 210 x 4,6 mm s velikostí částic 5µm při pokojové teplotě, s průtokem 0,6 ml/min a složením mobilní fáze methanol : voda : kys. fosforečná v poměru 65 : 35 : 0,9. Detekce byla nastavená na 222 nm. Tato metoda se optimalizovala na naše podmínky [11].

Tabulka 2: Srovnání výchozí metody a metody zvalidované

kolona a průtok	MF	UV detekce
C18, 210 x 4,6 mm, 5 µm; 0,6 ml/min 20µl	methanol + voda + kys. fosforečná 65 : 35 : 0,9	222 nm
C18, 700 x 3 mm; 1 ml/min 5 a 10 µl	methanol + voda + kys. fosforečná 65 : 35 : 0,9	222 nm

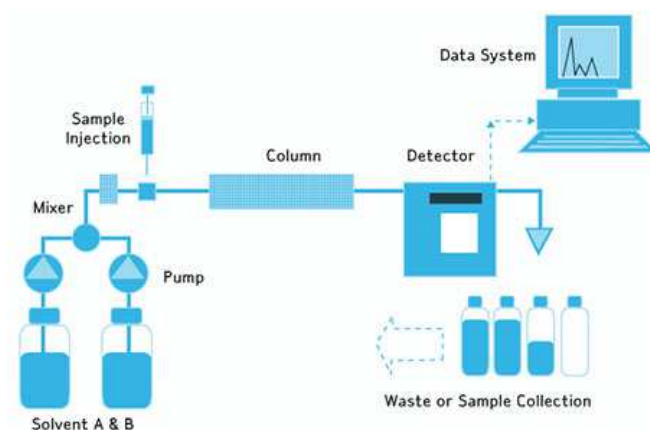
3.3 Vysokoučinná kapalinová chromatografie

High Performance Liquid Chromatography (HPLC) neboli vysokoučinná kapalinová chromatografie je druh kapalinové chromatografie sloužící k oddělení složek roztoku. V současné době je to jedna z nejpoužívanějších a nejprogressivnějších analytických metod. Jedná se o separační metodu umožňující kvalitativní i kvantitativní hodnocení složek směsi [2,3].

Principem je rozdělení látek mezi dvě fáze: mobilní (pohyblivou, kapalnou) a stacionární (nepohyblivou). Separace látek probíhá na základě odlišné rozpustnosti látek (rozdělovací chromatografie), adsorpci (adsorpční chromatografie), rozdílné iontové výměně (iontově výměnná chromatografie) nebo na velikosti molekul (gelová permeační chromatografie) [5].

3.3.1 Kapalinový chromatograf

Základní části kapalinového chromatografu jsou schématicky zobrazeny na obr.3. Mobilní fáze je čerpána přes filtr z jednoho či více zásobníků vysokotlakým čerpadlem přes směšovač, za kterým je pomocí dávkovače nadávkován objem vzorku. Dále pokračuje kolonou naplněnou stacionární fází do detektoru a pryč ze systému do sběrače frakcí. Signál z detektoru je vyhodnocen pomocí vhodného programu v počítači.



Obrázek 3: Schéma kapalinového chromatografu [15]

3.3.1.1 Chromatografické kolony

Chromatografické kolony jsou úzké trubky nebo kapiláry zhotovené nejčastěji z nerezové oceli, plastu nebo ze skla. Jejich délka se pohybuje zpravidla v rozmezí 5 až 30 cm a průměr od 2 do 8 mm. Plášť kolony musí být chemicky inertní, odolávat vysokým tlakům a vnitřní povrch by měl být dostatečně hladký [6].

Kolony jsou naplněny vhodnou **stacionární fází** (sorbentem), která je držena v koloně pomocí frit. Nejčastěji se používají tzv. chemicky vázané stacionární fáze. Vznikají modifikací hydroxylových skupin silikagelu. Podle typu navázaného radikálu se mohou rozdělit na nepolární chemicky vázané fáze (reverzní) obsahující uhlovodíkové řetězce a

na polární chemicky vázané fáze obsahující tříuhlíkatý řetězec zakončený skupinami -NH₂, -CN aj. Jako další sorbenty se také používají silikagel a oxid hlinitý [3,6].

Podle charakteru stacionární a mobilní fáze pak lze chromatografii rozdělit na normální a reverzní. Častěji využívaná reverzní chromatografie používá nepolární stacionární fázi a polární mobilní fázi (např. voda, methanol, acetonitril). U normální chromatografie je tomu opačně [5].

3.3.1.2 Detektory

Detektory jsou umístěné na konci kolony a zaznamenávají průchod čisté mobilní fáze a mobilní fáze obsahující analyzovanou složku. Detektory pro HPLC musí splňovat požadavky jako je vysoká citlivost, reprodukovatelnost a linearita odezvy, nezávislost na změně složení a tlaku mobilní fáze (robustnost), univerzálnost a detekci všech složek vzorku.

Nejčastěji používané detektory jsou spektrofotometrické, které využívají k analýze UV nebo VIS oblast spektra. Vyznačují se vysokou citlivostí (10^{-9} až 10^{-10} g/ml) a je možné je použít i při gradientové eluci. Další druhy detektorů a jejich charakteristika jsou uvedeny v tabulce 1 [3,4,5].

Tabulka 3: Charakteristika HPLC detektorů [4,6]

Typ detektoru	veličina	citlivost	selektivita	gradientová eluce
Spektrofotometrický	absorbance	10 ⁵ ng/ml	s	ano
Infračervený	absorbance	10 ⁴ µg/ml	s	ne
Fluorimetrický	fluorescence	10 ³ pg/ml	s	ano
Refraktometrický	index lomu	10 ⁴ µg/ml	u	ne
Elektrochemický	el. proud	10 ⁶ pg/ml	s	ne
Konduktometrický	vodivost	10 ⁶ ng/ml	s	ano

s – selektivní, u - univerzální

3.3.1.3 Mobilní fáze

Při výběru vhodné mobilní fáze pro systém vše závisí na povaze analyzovaných látek, použité fázi stacionární a dané metodě. Mobilní fáze by měla v detektoru dávat minimální signál a neměla by ovlivňovat výsledek měření. Velmi důležité je odplynění mobilní fáze probubláváním helia nebo působením ultrazvuku za vakua. Možná rozpouštědla jsou seřazena do eluotropní řady podle rostoucí eluční účinnosti: heptan < cyklohexan < tetrachlormethan < toluen < ether < chloroform < aceton < acetonitril <

ethanol < methanol < octová kyselina. Při analýze na reverzních fázích se nejčastěji používá jako MF voda v různých poměrech s methanolem nebo acetonitrilem[3,4,6].

3.3.2 Základní pojmy v HPLC

Kvalitativní analýza – charakterizuje jí retenční (eluční) čas t_r , což je čas od nástřiku vzorku až k maximu chromatografického píku.

Kvantitativní analýza – charakteristikou je plocha (popř. výška) chromatografického píku látky.

Eluce izokratická – složení mobilní fáze se v průběhu analýzy nemění

Eluce gradientová – složení mobilní fáze je programově měněno v průběhu analýzy

Metoda vnějšího standardu – porovnání plochy píku stanovované látky a plochy píku standardu analyzovaného za stejných podmínek

Metoda vnitřního standardu – přidání přesně známého množství standardu přímo do analyzované směsi před separací [3,4].

3.4 Validace analytické metody

Je požadováno, aby každá analytická metoda byla validována, a součástí všech chromatografických metod musí být test způsobilosti chromatografického systému. Validace je součástí kontroly kvality a dokládá vhodnost, přesnost a spolehlivost dané metody. Jedná se o sérii experimentů, kterými se zjistí nejdůležitější charakteristiky metody, potvrdí se, že dává reprodukovatelné a spolehlivé výsledky, je vhodná pro zamýšlené použití a splňuje na začátku definované požadavky. Určuje podmínky validačního procesu, která musí být splněna, aby bylo možné daný zkušební postup spolehlivě použít, a to i v různých laboratořích [7,8].

3.4.1 Test vhodnosti chromatografického systému

Test vhodnosti je hodnocení chromatografického systému s cílem prokázat, že jeho výkon splňuje standardy požadované pro danou metodu. Provádí se vždy při jakékoli změně systému, před novou sérií měření či před použitím v jiné laboratoři.

Dva základní údaje testu vhodnosti jsou požadavek na opakovatelnost a na rozlišení dvou vybraných píků. Mohou se udávat i požadavky na další parametry jako jsou: počet teoretických pater, faktor symetrie píku, minimální a maximální retenční čas, kapacitní poměr stanovované látky nebo mez detekce [7].

3.4.2 Validace

Hlavními analytickými parametry ověřovanými při validaci jsou: přesnost, linearita, správnost, selektivita, robustnost a detekční a kvantitativní limit [7].

3.4.2.1 Přesnost (preciznost)

Přesnost analytické metody vyjadřuje míru shody mezi jednotlivými výsledky metody prováděné opakovaně se stejným vzorkem. Rozlišuje se stanovení opakovatelnosti, kdy se metoda provádí jednou osobou, ve stejné laboratoři, na tomtéž přístroji, se stejnými činidly a s jedním zhomogenizovaným vzorkem, a stanovení reprodukovatelnosti, kdy se jeden zhomogenizovaný vzorek analyzuje v různých laboratořích. Přesnost je vyjádřena jako relativní směrodatná odchylka vypočítaná z ploch píků nejméně šesti měření šesti roztoků vzorku. Tato měření musí být provedené kompletním postupem, včetně přípravy vzorku. Relativní směrodatná odchylka musí být menší než 5% [7,8].

3.4.2.2 Linearita

Linearita vyjadřuje schopnost metody dávat výsledky přímo úměrné koncentraci stanovované látky ve vzorku. Doloží se buď graficky, jako závislost výsledků na koncentraci látky, nebo matematicky pomocí výsledků lineární regresní analýzy. Zde se uvádí korelační koeficient, který udává míru linearity, směrnice, y-úsek a chyby stanovení všech zmíněných hodnot. Je požadováno potvrzení linearity v rozmezí 50-150% (dle ICH 80-120%) deklarovaného obsahu, v analýzách minimálně pěti různých koncentrací standardní látky. Korelační koeficient by se v tomto případě měl co nejvíce přibližovat hodnotě 1 [7,8].

3.4.2.3 Správnost (přesnost)

Správnost je vyjádřena odchylkou výsledku metody od správné hodnoty. Zjistit správnou hodnotu lze jinou, nezávislou metodou s již ověřenou správností, analýzou placebo nebo analýzou vzorku s přídatkem standardní látky. Správnost lze vyjádřit jako výtěžnost, která by měla být v intervalu $100 \pm 5\%$ s RSD menší než 5% [7,8].

3.4.2.4 Selektivita

Selektivita udává schopnost metody změřit správně a specificky stanovovanou látku v přítomnosti dalších látek. Mohou to být další účinné složky kombinovaných přípravků, výchozí a pomocné látky, nečistoty z výroby, rozkladné a vedlejší produkty, rozpouštědla a jiné neznámé látky. Metoda pro stanovení účinné látky nemůže být výše uvedenými rušena. Selektivita se vyjadřuje jako rozdíl mezi výsledky analýzy vzorku bez nečistot a

vzorku s přidanými rozkladnými produkty, složkami placebo či různými jinými nečistotami. U této metody není nutné předložit číselné vyjádření selektivity, ale požaduje se doložení chromatogramů placebo, známých vedlejších a rozkladných produktů, nebo vzorku po rozkladu teplem, hydrolýzou atd. [7,8]

3.4.2.5 Robustnost

Jedná se o míru reprodukovatelnosti výsledků získaných analýzou jednoho homogenního vzorku v různých laboratořích, různými analytiky, na různých přístrojích a s různými činidly. Vyjadřuje schopnost metody dávat přesné a správné výsledky i při mírně změněných pracovních podmínkách, ke kterým za daných okolností nutně dochází, i když je popsán postup zachován. Robustnost udává míru vlivu těchto změn podmínek na výsledky analýzy. Uvádí se především změny pH, teploty, šarže činidel, kolony, složení mobilní fáze, atd. [7]

3.4.2.6 Detekční limit

Detekční limit je nejmenší koncentrace analytu, která ještě vyvolá odezvu měřícího systému statisticky významně odlišnou od šumu. Je to nejnižší detekovatelná koncentrace látky nestanovované kvantitativně [8].

3.4.2.7 Kvantitativní limit

Je to nejnižší koncentrace látky stanovitelná s vyhovující přesností a správností. U instrumentálních metod se tyto limity stanovují na základě šumu [8].

4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST – Benzalkonium-chlorid

4.1 Chemikálie, standardy, vzorky

4.1.1 Standardy

Benzalkonium chloride sol. Ph. Eur., DGE/003/005/2008, Dishman Pharmaceuticals & Chemicals Ltd.

Butyl-4-hydroxybenzoate, purum $\geq 99\%$, Fluka chemie

4.1.2 Pufry pro kalibraci pH metru

WTW® Technical Buffer pH 7,00, šarže 08.19.-1

WTW® Technical Buffer pH 4,01, šarže 09.19.-2

4.1.3 Chemikálie

Methanol 99,9% Chromasolv for HPLC, Sigma-Aldrich Co., Německo

Kalium dihydrogenfosfat p.a., $\geq 99,5\%$, Merck, Germany

Ultračistá voda, čištěná systémem Milli-Q (Millipore, Bedford, MA, USA)

Phosphoric acid, purum $\geq 85\%$, Sigma-Aldrich Co., Německo

4.2 Přístroje, podmínky separace

4.2.1 Kapalinový chromatograf

Sestava: Shimadzu LC – 2010C, Shimadzu®, JAP.

Kolona: Chromolith Performance RP-18, délka 10 cm, vnitřní průměr 4,6 mm

Dávkování: 10 µl

Detekce: UV 208 nm

Mobilní fáze: Methanol : fosfátový pufr o pH=3 (73 : 27)

(různé poměry, různé pH)

Před použitím se filtruje pomocí filtračního zařízení Millipore®. Filtr ze skleněných vláken, velikost pórů 0,45 µm.

Průtok: $F_m = 3,5$ ml/min

Režim: izokratický

Teplota: 50°C

4.2.2 Analytické váhy

Sartorius® CUBIS, Německo

4.2.3 pH metr

Hanna instruments® pH 212, Německo

4.3 Programové vybavení

Vyhodnocení HPLC: chromatografická stanice Class VP, verze 6.13, Shimadzu

Vyhodnocení směrodatných odchylek: MS Excel

4.4 Příprava vzorků, standardů a analyzovaných roztoků

4.4.1 Rostok benzalkonium-chloridu s vnitřním standardem butylparabenem

Do odměrné baňky o objemu 100 ml bylo odváženo odpovídající množství benzalkonium- chloridu a vnitřního standardu butylparabenu tak, aby vznikl roztok o koncentraci: BAC 10mg/100ml a BP 0,25mg/100ml; a doplněno metanolem do objemu 100 ml.

5 Výsledky a diskuze

5.1 Vývoj metody

Výchozí podmínky pro vývoj HPLC metody jsem zvolila podle Českého lékopisu 2009 a podle práce Labranche a col. [9].

5.1.1 Měření na koloně Chromolith Performance RP-18

Mobilní fáze methanol : 7,5 mM roztok hydrogenfosforečnanu draselného o pH 3 (upraveno pomocí kyseliny fosforečné R, $\geq 85\%$) 70 : 30

Detekce: UV 254 nm, 208 nm

Průtok: 1 ml/min – 2 ml/min

Měřené roztoky: roztok benzalkonium-chloridu 0,1%

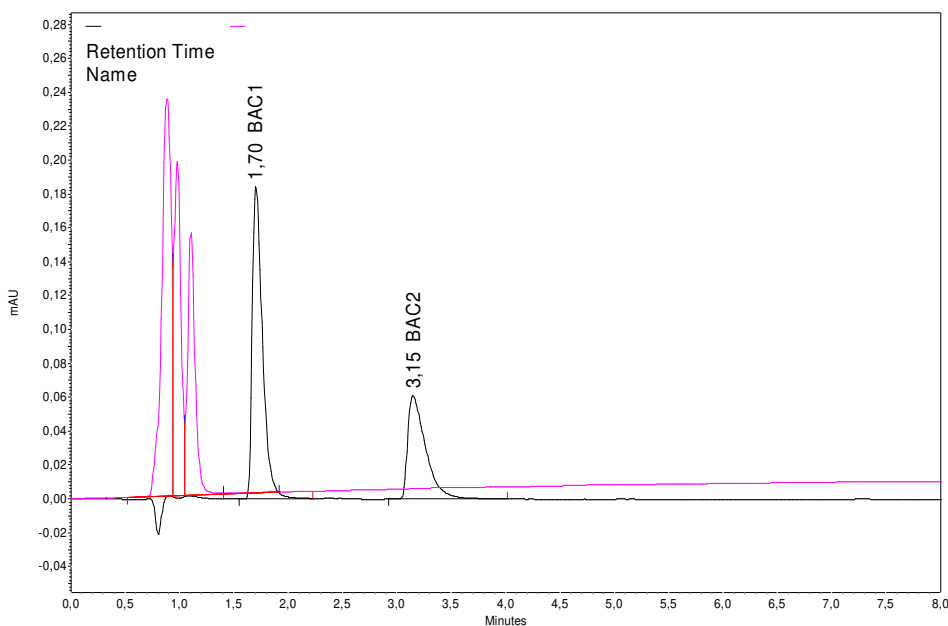
Za zvolených výchozích podmínek nedošlo k dobrému rozlišení obou píků standardu benzalkonium-chloridu. Proto bylo nutné začít upravovat podmínky chromatografické eluce tak, aby se píky oddělily.

Změnou vlnové délky na 208 nm se objevily píky v čase odpovídající stanovované látce. Změřením koncentrovanějšího roztoku BAC se potvrdilo, že se jedná o benzalkonium-chlorid.

Pro rychlejší analýzu byl zvýšen průtok na 2ml/min.

5.1.2 Výběr vnitřního standardu

Na základě retenčního času byl jako vnitřní standard vybrán butylparaben, viz obrázek č.4



Obrázek 4: Výběr vnitřního standardu pro BAC podle retenčních časů parabenů. Filalová křivka znázorňuje analýzu parabenů v pořadí ethylparaben, propylparaben a butylparaben. Černá křivka je pak analýza benzalkonium-chloridu za stejných podmínek.

Kolona: Chromolith Performance RP-18, délka 10 cm, vnitřní průměr 4,6 mm

Rychlost: 2 ml/min

Detekce: UV 208 nm

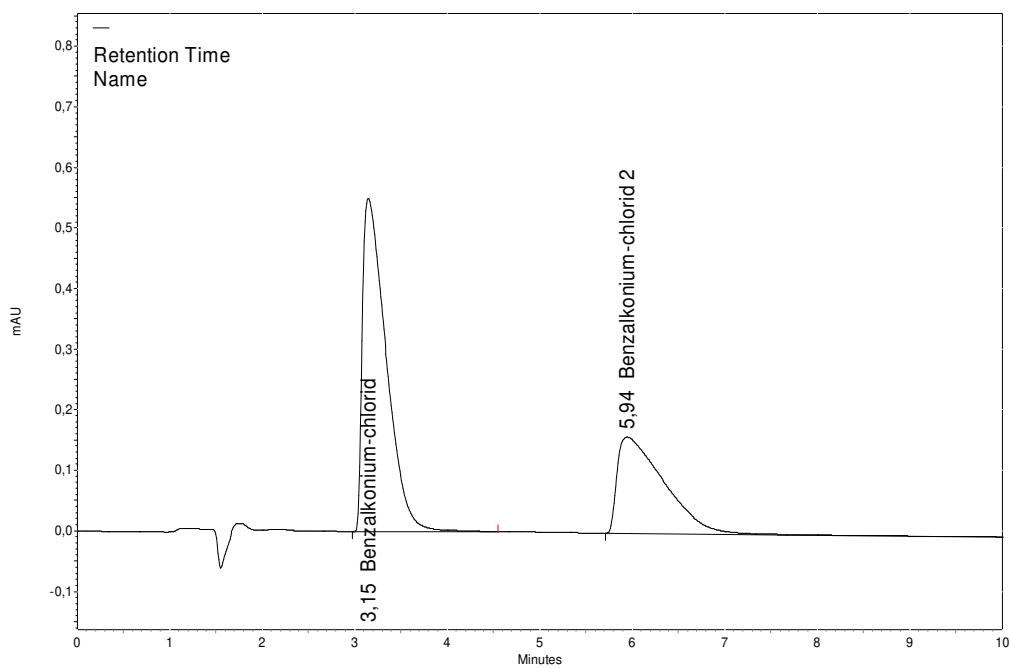
Mobilní fáze: methanol : fosfátový pufr o pH= 3 70 : 30

5.1.3 Optimalizace podmínek separace

Z důvodu nevyhovujícího faktoru symetrie píků (obrázek 5) byly měněny podmínky separace.

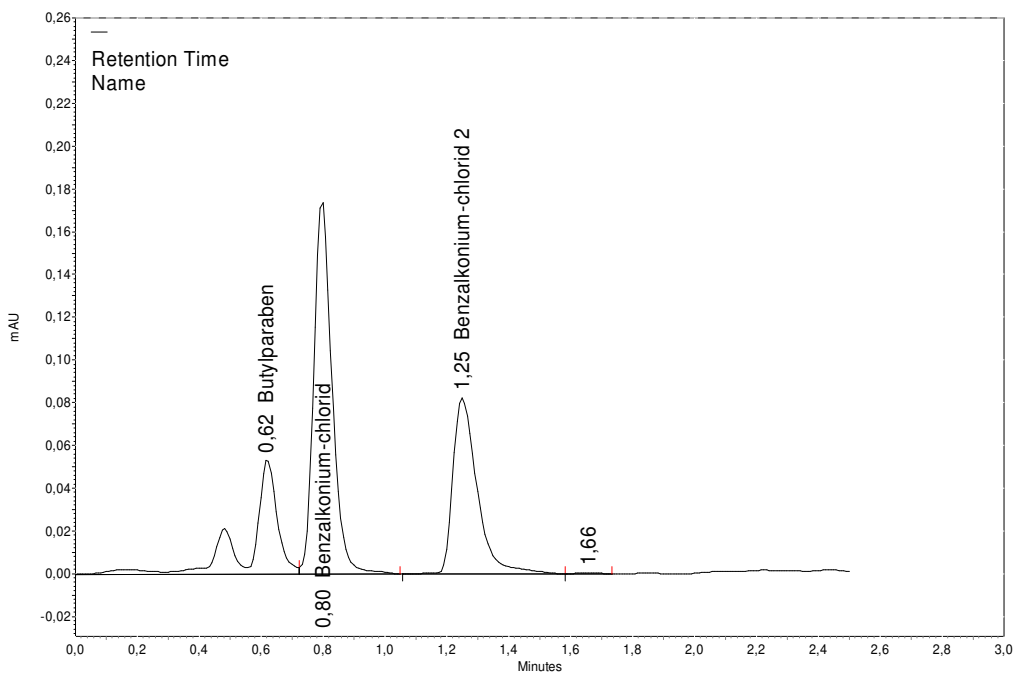
Zvýšením teploty kolony se nedosáhlo lepší symetrie píků, proto se začal upravovat poměr organické části mobilní fáze a rychlost průtoku kolonou.

Po několika měřeních při různých poměrech mobilní fáze a rychlosti průtoku byl vybrán poměr 73 : 27 a rychlost 3,5 ml/min.



Obrázek 5: Nevyhovující symetrie píků BAC

5.1.4 Vyhodnocení optimálních podmínek



Obrázek 6: Chromatogram BAC při optimálních podmínkách

Optimální chromatografické podmínky vyvinuté HPLC metody pro stanovení benzalkonium-chloridu:

Kolona: Chromolith Performance RP-18, délka 10 cm, vnitřní průměr 4,6 mm

Dávkování: 10 μ l

Detekce: UV 208 nm

Průtok: $F_m = 3,5$ ml/min

Mobilní fáze: methanol : fosfátový pufr o pH 3 73 : 27

Před použitím se filtruje pomocí filtračního zařízení Millipore®. Filtr ze skleněných vláken, velikost pórů 0,45 μ m.

Teplota: 50°C

Režim: izokratický

5.2 Validace

5.2.1 Test vhodnosti chromatografického systému

5.2.1.1 Zdánlivý počet teoretických pater (N)

$$N = 5,545 \cdot \left(\frac{t_R}{W_{0,05}} \right)^2$$

- t_R = retenční čas (min)
- $W_{0,05}$ = šířka píku v polovině výšky (min)

TABULKA 4

Analyzovaná látka	t_R (min)	$W_{0,05}$ (min)	N
Butylparaben	0,63	0,06	622
Benzalkonium- chlorid pík 1	0,82	0,06	1005
Benzalkonium- chlorid pík 2	1,3	0,07	1751

5.2.1.2 Faktor symetrie (A_s)

$$A = \frac{W_{0,01}}{2 \cdot d}$$

- $W_{0,01}$ = šířka píku v jedné dvacetině jeho výšky
- d = vzdálenost mezi kolmicí spuštěnou z vrcholu píku a vzestupnou částí píku v jedné dvacetině jeho výšky

TABULKA 5

Sloučenina	$W_{0,01}$ (min)	Faktor symetrie (T)
Butylparaben	0,11	1,29
Benzalkonium- chlorid pík 1 a 2	0,13; 0,17	1,25; 1,34

Požadavek: $A = 0,8$ až $1,5$

Závěr: **vyhovuje**

5.2.1.3 Rozlišení (R_{ij})

$$R_{ij} = \frac{1,18 \cdot (t_{R2} - t_{R1})}{w_{h1} + w_{h2}}, \text{ kdy } t_{R2} > t_{R1}$$

- t_{R1} a t_{R2} = retenční časy nebo vzdálenosti podél základní linie od bodu nástřiku ke kolmicím spuštěným z vrcholů dvou sousedních píků
- w_{h1} a w_{h2} = šířky píků v poloviční výšce (min)

TABULKA 6

Hodnocené látky	R_{ij}
Butylparaben – benzalkonium-chlorid 1	1,96
Benzalkonium-chlorid 1 – benzalkonium-chlorid 2	4,38

Požadavek: $R_{ij} > 1,5$

Závěr: **vyhovuje**

5.2.2 Opakovatelnost

Byl opakovaně dávkován roztok připravený podle kapitoly 3.5.1

TABULKA 7

Butylparaben

Číslo pokusu	Plocha píku (A)	Retenční čas t_R (min)
1	49263	0,64
2	49953	0,65
3	49902	0,66
4	50234	0,65
5	50086	0,66
6	50167	0,65

x 49934,17 0,651667

SD 351,8567 0,005428

RSD (%) 0,71 0,83

Požadavek: **RSD < 1%** **VYHOVUJE**

Tabulka 8

Benzalkonium-chlorid

Analog 1

Analog 2

Číslo pokusu	Plocha píku (A)	Retenční čas t_R (min)	Plocha píku (A)	Retenční čas t_R (min)
1	154983	0,83	70555	1,32
2	155846	0,84	69712	1,33
3	152531	0,85	69311	1,34
4	153296	0,85	71038	1,32
5	153420	0,84	70438	1,33
6	152506	0,86	69975	1,35

\bar{x} 153763,7 0,846 70171,5 1,33266

SD 1360,95 0,00839 625,96 0,01162

RSD (%) 0,88 0,99 0,89 0,87

Požadavek: RSD < 1% **VYHOVUJE**

5.2.3 Linearita

Bylo připraveno šest kalibračních roztoků benzalkonium-chloridu v methanolu v rozmezí koncentrací 2,5mg/100 ml až 25mg/100ml (jednotlivé koncentrace jsou uvedené v tabulce 9).

Plocha píku pro každou koncentraci látky nebo vnitřního standardu (IS) je pokaždé průměrem ze tří měření a pro další výpočty byl brán průměr z těchto tří hodnot.

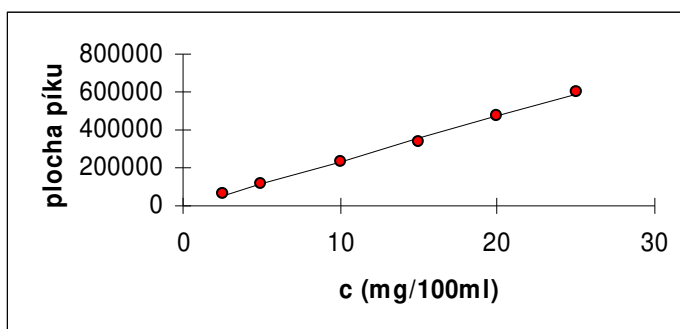
Závislost ploch píků kalibračních roztoků na jejich koncentraci byla vyhodnocena metodou lineární regrese (regresní funkce; $y = k \cdot s + q$).

Počet bodů (analyzovaných koncentrací) byl 6.

5.2.3.1 Testování linearity benzalkonium-chloridu

tabulka 9

c (mg/100ml)	Y(exper)
2,5	57916,7
5	120258,3
10	235047,7
15	337948,3
20	471915,3
25	598982



Parametry regresní přímky a odhady jejich směrodatných odchylek

- Směrnice $k = 23785,89 \pm 461,83$
- Absolutní člen $q = 3556,31 \pm 7007,19$
- Koeficient korelace $R = 0,99925$
- Reziduální odchylka $s_{rez} = 9005,21$

Závislost y na x **byla** prokázána na hladině významnosti **0,001**.

5.2.4 Přesnost (Preciznost)

Byly analyzovány roztoky látek benzalkonium-chlorid a butylparaben, které byly paralelně připravené takto: do 10 ml odměrné baňky bylo odpipetováno vždy 5ml 0,01% roztoku benzalkonia a 5ml roztoku butylparabenu o $c = 0,5\text{mg}/100\text{ml}$.

Tabulka 10

Roztok č.	Plocha píku	
	BP	BAC
1	47902	191888
2	42349	194391
3	44997	188368
4	43173,3	191779
5	46493	191109
6	43495,7	182806

x 44735,1 190056,72

SD 2138,19 3688,72

RSD (%) 4,77 1,94

Požadavek: RSD (%) < 5% VYHOVUJE

5.2.5 Správnost (Přesnost)

Pro testování správnosti byla použita metoda standardního přídávku. Byl šestkrát změřen standardní roztok: benzalkonium-chlorid 0,01%, butylparaben 0,25 mg/100 ml v methanolu. Pro následný výpočet byly použity aritmetické průměry ploch. Bylo připraveno 6 vzorků, které vznikly smícháním standardního roztoku a roztoku vzorku (benzalkonium-chlorid 0,01% ve vodě) 1 : 1. Každý roztok byl třikrát dávkován na kolonu a pro následný výpočet byly použity aritmetické průměry ploch píků.

Výtěžnost R_i byla vypočtena podle vzorce: $R_i (\%) = 100 \times c_i/c_0$.

Tabulka 11

Benzalkonium-chlorid

Vzorek č.	A_i	c_i	$R_i (\%)$
1	228258	0,01016394	101,64
2	230370,6667	0,010258013	102,58
3	228628,6667	0,010180445	101,81
4	230112	0,010246495	102,47
5	221087,6667	0,009844657	98,44
6	226394	0,010080939	100,81

$c_0 = 0,01\text{g}/100\text{ml}$

RSD = 1,53 %

$A_0 = 224576,3$

$\bar{R}_i = 101,29 \%$

Požadavek:

R v intervalu $100 \pm 5\%$

VYHOVUJE

RSD < 5%

VYHOVUJE

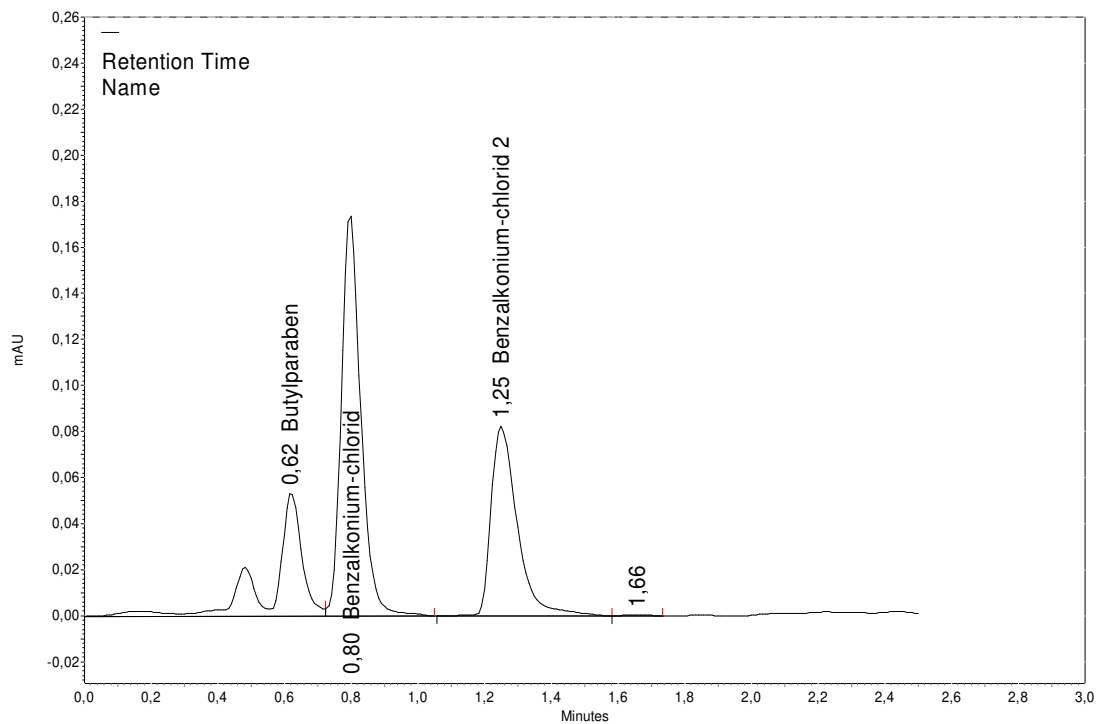
5.2.6 Selektivita

Separace benzalkonium-chloridu ($c = 0,01\text{g}/100\text{ml}$) a butylparabenu ($c = 0,25\text{mg}/100\text{ml}$) je dokumentována na chromatogramu standardů, obrázek 4.

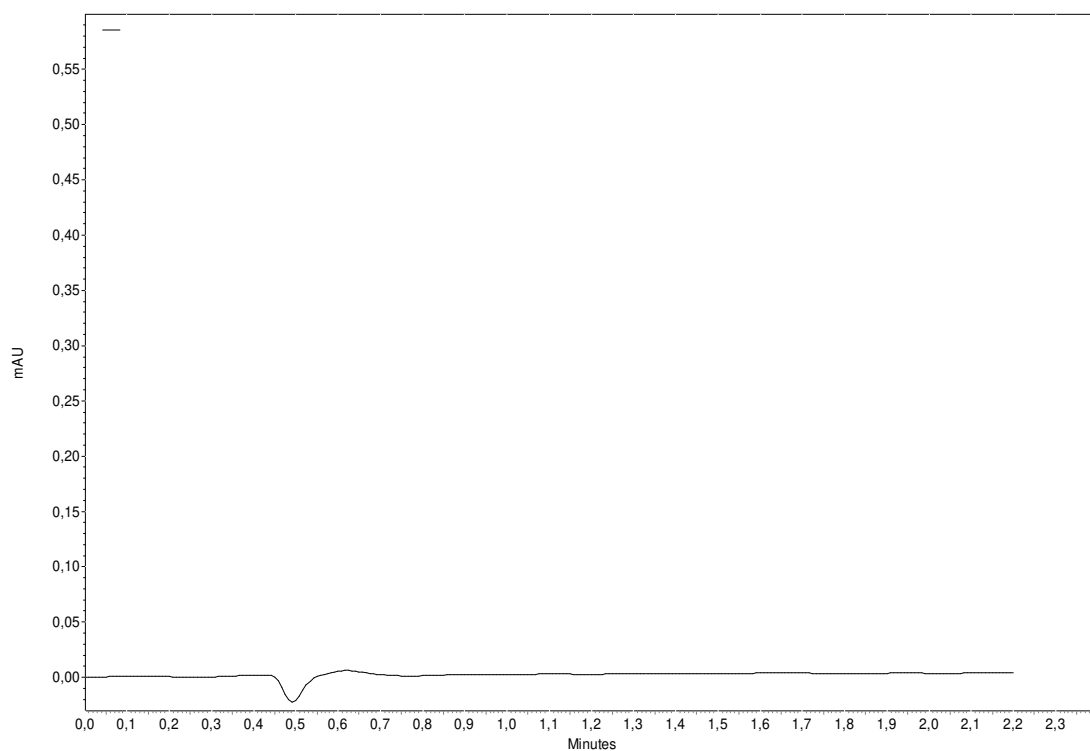
Chromatografické píky obou látek mají odlišné retenční časy.

Chromatogram placebo je na obrázku 5 a v retenčním čase odpovídajícím stanovovaným látkám není žádný pík interferující látky.

Předložená HPLC metoda umožňuje selektivně změřit plochu píků odpovídající účinné látce benzalkonium-chlorid a vnitřního standardu butylparabenu.



Obrázek 7: Chromatogram roztoku benzalkonium-chloridu s vnitřním standardem butylparabenem



Obrázek 8: Chromatogram placeba

5.2.7 Robustnost

Testování míry vlivu proměnných experimentálních podmínek na stanovení obsahu analytů bylo testováno u roztoku o koncentraci: butylparaben ($c = 0,25\text{mg}/100\text{ml}$), benzalkonium-chlorid ($0,01\text{g}/100\text{ml}$) v methanolu.

5.2.7.1 Vliv složení mobilní fáze a pH bylo testováno při poměru methanol : fosfátový pufr o pH 3 = 70 : 30, 80 : 20, 73 : 27, o pH 3,2 = 73:27 a o pH 2,8 = 73:27

a) Vliv na plochu chromatografického píku. A_i – plocha píku; $A_R = 100 \times A_i/A_{73:27}$. Byly získány výsledky uvedené v tabulce 12. Relativní plocha píků vztažená na plochu píku při optimálním složení mobilní fáze se pohybovala v rozmezí 97% až 102,1%. Z tohoto důvodu se doporučuje použití mobilní fáze MeOH- $\text{K}_2\text{HPO}_4 = 73 : 27$ při pH 3.

Tabulka 12

Vliv složení mobilní fáze na plochu píku

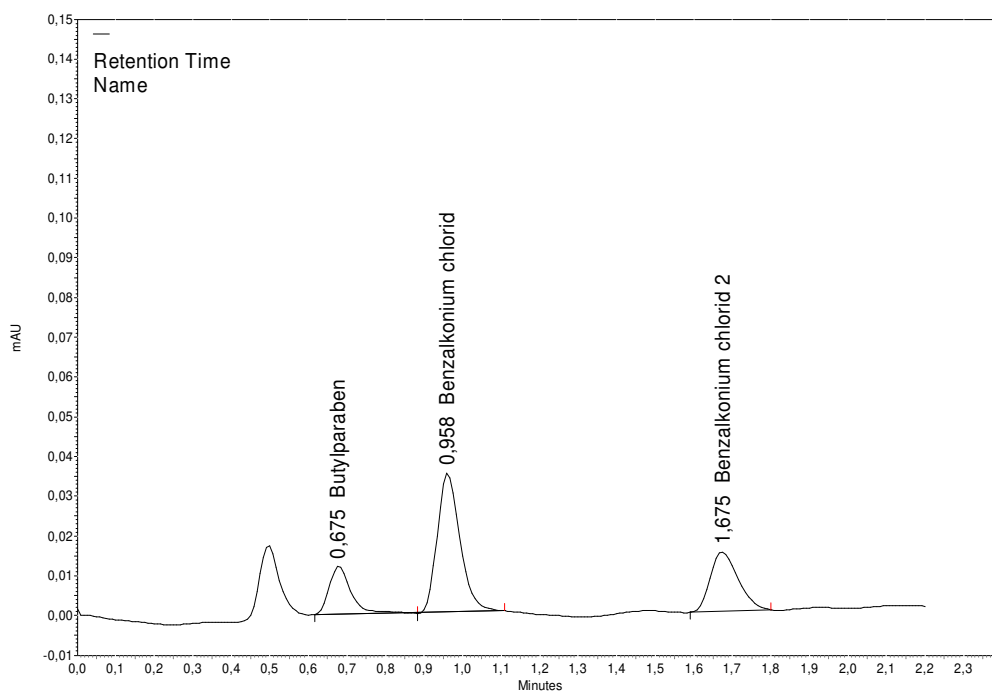
MeOH – K_2HPO_4	butylparaben		benzalkonium-chlorid	
	A_i	A_R (%)	A_i	A_R (%)
70 : 30; pH 3	45294,5	90,75	220560	90,21
80 : 20; pH 3	40949,3	82,04	229400,3	102,14
73 : 27; pH 3	49911	100,00	224576	100,00
73 : 27; pH 3,2	41560,6	83,27	223131,3	99,35
73 : 27; pH 2,8	45489	91,14	217925	97,04

b) Vliv na retenční čas, tabulka 13. V celém testovacím rozmezí dochází k dokonalé separaci všech složek, ale složení mobilní fáze ovlivňuje trvání analýzy. Z tohoto hlediska je doporučeno použití mobilní fáze MeOH – $\text{K}_2\text{HPO}_4 = 73:27$ při pH 3. Na obr. 5 je znázorněn chromatogram při poměru MeOH – $\text{K}_2\text{HPO}_4 = 70 : 30$ při pH 3 a jak je zřejmé, separace účinné látky i vnitřního standardu je až k základní linii, pouze dochází k prodloužení trvání analýzy.

Tabulka 13

Vliv složení mobilní fáze na retenční čas

MeOH – K ₂ HPO ₄	Butylparaben	Benzalkonium-Cl 1	Benzalkonium-Cl 2
	t _R (min)	t _R (min)	t _R (min)
70 : 30; pH 3	0,67	0,96	1,68
80 : 20; pH 3	0,48	0,63	0,78
73 : 27; pH 3	0,65	0,84	1,34
73 : 27; pH 3,2	0,63	0,79	1,18
73 : 27; pH 2,8	0,65	0,86	1,40



Obrázek 9: Chromatogram při složení mobilní fáze methanol – fosfátový pufr = 70 : 30 při pH 3

5.2.7.2 Stabilita roztoku benzalkonium-chloridu ($c = 10\text{mg}/100\text{ml}$) a vnitřního standardu butylparabenu ($c = 0,25\text{mg}/100\text{ml}$) byla testována za uchovávání:

- 1) za snížené teploty (4°C), chráněné před světlem
- 2) za laboratorní teploty za přístupu světla

Výsledky jsou uspořádány v tabulce 14.

Tabulka 14 : Stabilita butylparabenu a benzalkonium-chloridu v závislosti na době a způsobu uchovávání (S_T)

Bytylparaben				
t	A (4°C)	S_T (%)	A ($\sim 20^{\circ}\text{C}$)	S_T (%)
0	41154	0	41154	0
24h	41263	0,26	39458	4,13
48h	43582	5,89	42559	3,41
72h	43751	6,31	42280	2,73
Benzalkonium-chlorid				
t	A (4°C)	S_T (%)	A ($\sim 20^{\circ}\text{C}$)	S_T (%)
0	223086	0	224086	0
24h	233269	4,10	220975	1,53
48h	235865	5,25	228690	2,05
72h	237743	6,09	225622	0,68

t = čas od přípravy vzorku

A = plocha píku; S_T (%) = $100 \times |A_i - A_0| / A_0$

Požadavek: S_T (%) < 1%

Z tabulky 14 vyplývá, že roztok benzalkonium-chloridu v methanolu je nutné připravit čerstvý před každým měřením.

5.2.8 Detekční limit (LOD) a kvantitativní limit (LOQ)

Postup:

a) bylo změřeno placebo a ze záznamu šumu v okolí retenčního času stanovované látky byla změřena největší kladná (r^+) a záporná (r^-) amplituda šumu; z tohoto rozpětí šumu byla odhadnuta jeho směrodatná odchylka: $s_n = (r^+ - r^-)/5$.

b) bylo změřeno placebo s přidavkem analyzované látky ($c = 1\text{mg/l}$) pro změření plochy píku

LOD byl vypočten podle vzorce: $3 s_n K / b_1$;

LOQ byl vypočten podle vzorce: $10 s_n K / b_1$;

K = plocha píku/výška píku; b_1 = plocha píku/ koncentrace analytu

Tabulka 15

Detekční a kvantitativní limit

pro BAC 1

	LOD (mg/l)	LOQ (mg/l)
$s_n = 0,0003$	0,013	0,044
$K = 3973535$		
$b_1 = 224530,7$		

pro BAC 2

	LOD (mg/l)	LOQ (mg/l)
$s_n = 0,0004$	0,024	0,080
$K = 4284360$		
$b_1 = 224618$		

Benzalkonium-chlorid má na chromatogramu dva píky, tudíž i detekční a kvantitativní limit se počítá pro každý pík zvlášť. Při vyhodnocení výsledků, ale bereme sloučeninu jako celek, tudíž je použita vyšší hodnota z obou.

Nejnižší detekovatelná koncentrace benzalkonium-chloridu (LOD) za použití předkládané HPLC metody je 0,024 mg/l, kvantitativní limit (LOQ) představuje koncentrace 0,080mg/l.

6 EXPERIMENTÁLÍ ČÁST – Thiomersal

6.1 Chemikálie, standardy, vzorky

6.1.1 Standardy

Thiomersalum, Fagron a.s., Czech republic

Ethylparaben (Ethyl-4-hydroxybenzoate), purum, $\geq 99,0$ %, Sigma-Aldrich Co., Switzerland

6.1.2 Chemikálie pro analýzu

Methanol 99,9% Chromasolv for HPLC, Sigma-Aldrich Co., Německo

Ultračistá voda, čištěná systémem Milli-Q (Millipore, Bedford, MA, USA)

Phosphoric acid, $\geq 85\%$, Sigma-Aldrich Co., Německo

6.2 Přístroje, podmínky separace

6.2.1 Kapalinový chromatograf

Sestava: Shimadzu LC – 2010C, Shimadzu®, JAP.

Kolona: Chromolith Performance RP-18, délka 10 cm, vnitřní průměr 4,6 mm

Dávkování: 5, 10 μ l

Detekce: UV 222 nm

Mobilní fáze: Methanol – voda – kyselina fosforečná (65 : 35 : 0,9)

Před použitím se filtruje pomocí filtračního zařízení Millipore®. Filtr ze skleněných vláken, velikost pórů 0,45 μ m.

Průtok: $F_m = 0,6$ až 1 ml/min

Režim: izokratický

Teplota: pokojová

6.2.2 Analytické váhy

Sartorius® CUBIS, Německo

6.3 Programové vybavení

Vyhodnocení HPLC: chromatografická stanice Class VP, verze 6.13, Shimadzu

Vyhodnocení směrodatných odchylek: MS Excel

6.4 Příprava analyzovaných roztoků

Do odměrné baňky o objemu 100 ml bylo odváženo odpovídající množství thiomersalu a vnitřního standardu ethylparabenu tak, aby vznikly roztoky o koncentraci:

Roztok č.1 - THM 10mg/ 100ml a EP 8 mg/ 100ml; a doplněno methanolem do objemu 100 ml.

Roztok č.2 - THM 100mg/ 100ml a EP 80 mg/ 100ml; a doplněno methanolem do objemu 100 ml.

7 VÝSLEDKY A DISKUZE

7.1 Vývoj metody

Výchozí podmínky pro vývoj metody jsem zvolila podle práce Study of thimerosal degradation mechanism (Caraballo et col.) [11].

7.1.1 Měření na koloně Chromolith Performance RP-18, délka 10 cm, vnitřní průměr 3 mm

Mobilní fáze: Methanol – voda – kyselina fosforečná (65 : 35 : 0,9)

Detekce: 222 nm

Průtok: 0,6 ml/min

V úvodu byly respektovány všechny podmínky stanovení včetně složení mobilní fáze dle zmíněné metody. Za těchto podmínek se retenční čas thiomersalu pohyboval kolem 4 minut. Symetrie píku byla vyhovující. V dalším kroku byl tedy optimalizován čas analýzy, aby došlo k jejímu zkrácení.

7.1.2 Optimalizace času analýzy

Na základě dosavadních výsledků byla pro další analýzy zvýšena rychlost průtoku, čímž se docílilo kratšího času eluce a zároveň zůstala zachována dobrá symetrie píků.

Mobilní fáze: Methanol – voda – kyselina fosforečná (65 : 35 : 0,9)

Detekce: 222 nm

Průtok: 1 ml/min

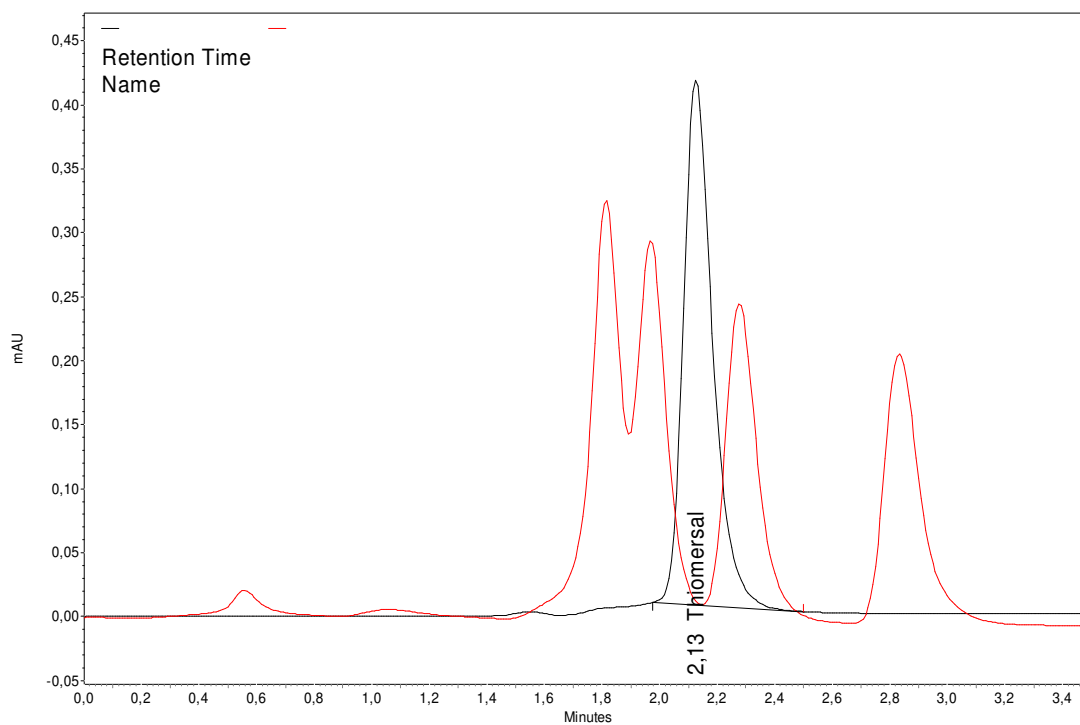
7.1.3 Výběr vnitřního standardu

Na základě retenčního času thiomersalu byl jako vnitřní standard vybrán ethylparaben, viz Obrázek 10.

Mobilní fáze: Methanol – voda – kyselina fosforečná (65 : 35 : 0,9)

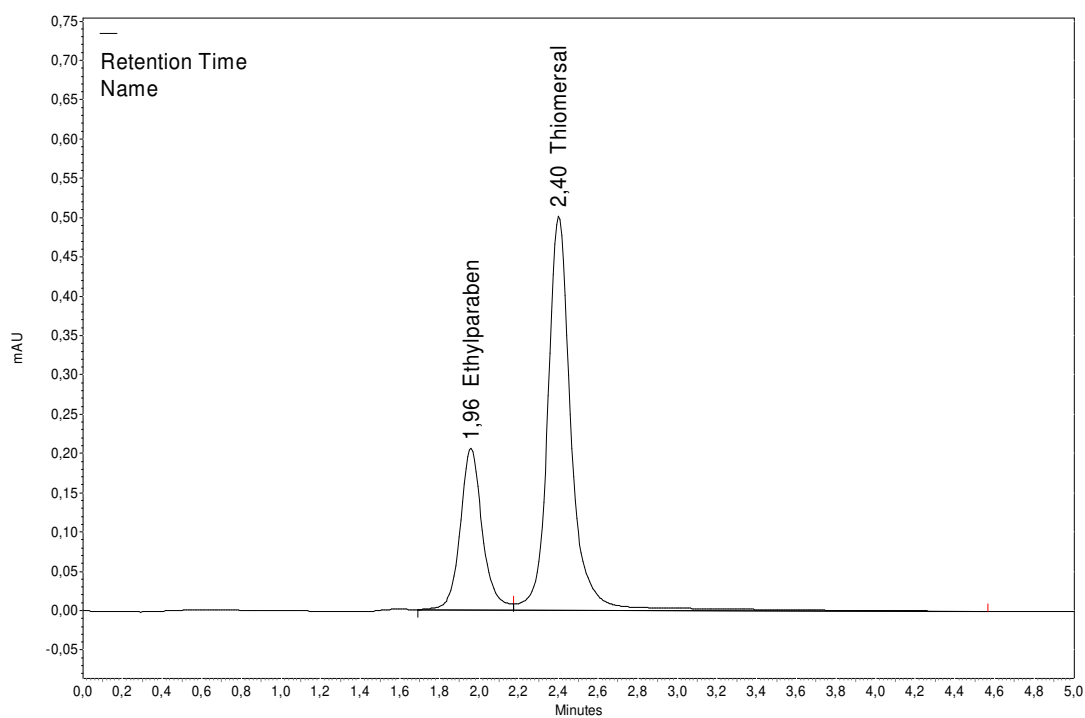
Detekce: 222 nm

Průtok: 1 ml/min



Obrázek 10: Výběr vnitřního standardu pro thiomersal podle retenčních časů parabenů. Červená křivka znázorňuje analýzu parabenů v pořadí methylparaben, ethylparaben, propylparaben a butylparaben. Černá křivka je pak analýza thiomersalu za stejných podmínek.

7.1.4 Vyhodnocení optimálních podmínek



Obrázek 11: Chromatogram THM při optimálních podmínkách

Optimální chromatografické podmínky vyvinuté HPLC metody pro stanovení thiomersalu ve vodných roztocích:

Kolona: Chromolith Performance RP-18, délka 10 cm, vnitřní průměr 4,6 mm

Dávkování: 5 µl pro roztok č.2
10 µl pro roztok č.1

Detekce: UV 222 nm

Mobilní fáze: Methanol – voda – kyselina fosforečná (65 : 35 : 0,9)

Před použitím se filtruje pomocí filtračního zařízení Millipore®. Filtr ze skleněných vláken, velikost pórů 0,45 µm.

Průtok: $F_m = 1$ ml/min

Režim: izokratický

Teplota: laboratorní

7.2 Validace

7.2.1 Test vhodnosti chromatografického systému

7.2.1.1 Zdánlivý počet teoretických pater (N)

$$N = 5,545 \cdot \left(\frac{t_R}{W_{0,05}} \right)^2$$

- t_R = retenční čas (min)
- $W_{0,05}$ = šířka píku v polovině výšky (min)

TABULKA 16

Analyzovaná látka	t_R (min)	$W_{0,05}$ (min)	N
Ethylparaben	1,975	0,11	1892
Thiomersal	2,425	0,11	2751

7.2.1.2 Faktor symetrie (A_s)

$$A = \frac{W_{0,01}}{2 \cdot d}$$

- $W_{0,01}$ = šířka píku v jedné dvacetině jeho výšky
- d = vzdálenost mezi kolmicí spuštěnou z vrcholu píku a vzestupnou částí píku v jedné dvacetině jeho výšky

TABULKA 17

Sloučenina	$W_{0,01}$ (min)	Faktor symetrie (T)
ethylparaben	0,24	1,14
thiomersal	0,28	1,21

Požadavek: A_s 0,8 - 1,5

Závěr: **vyhovuje**

7.2.1.3 Rozlišení (R_{ij})

$$R_{ij} = \frac{1,18 \cdot (t_{R2} - t_{R1})}{w_{h1} + w_{h2}}, \text{ kdy } t_{R2} > t_{R1}$$

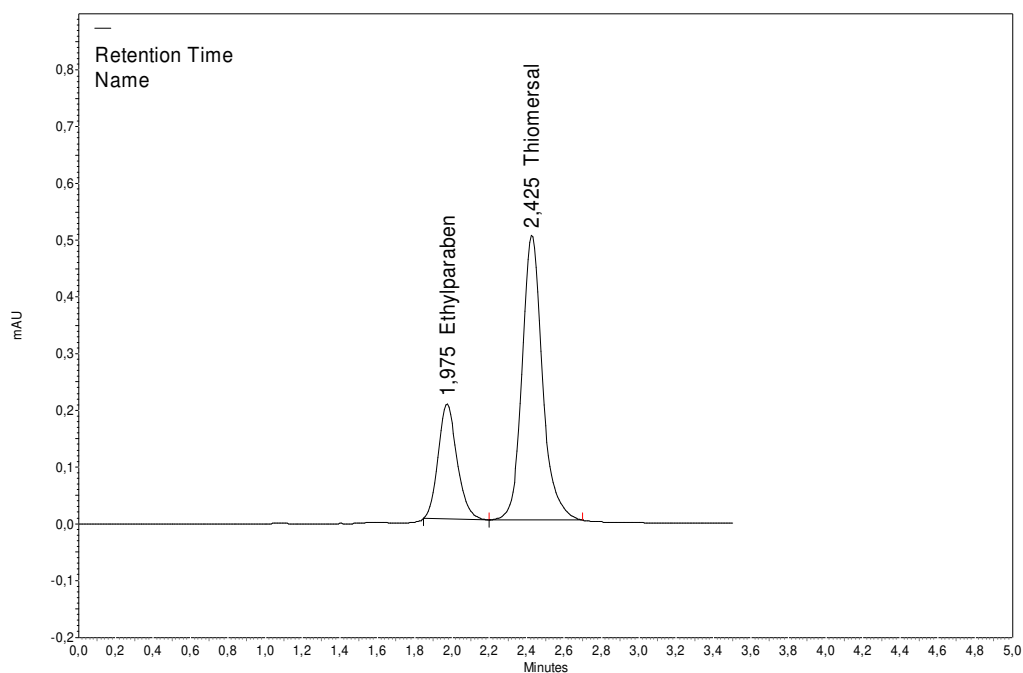
- t_{R1} a t_{R2} = retenční časy nebo vzdálenosti podél základní linie od bodu nástřiku ke kolmicím spuštěným z vrcholů dvou sousedních píků
- w_{h1} a w_{h2} = šířky píků v poloviční výšce (min)

TABULKA 18

Hodnocené látky	R_{ij}
Ethylparaben - thiomersal	2,46

Požadavek: $R_{ij} > 1,5$

Závěr: **vyhovuje**



Obrázek 12: Chromatogram hodnocené látky a vnitřního standardu

7.2.2 Opakovatelnost

Opakovaně byl dávkován roztok č.1 a roztok č.2 připravený podle kapitoly 5.4. Výsledky jsou uspořádány v tabulce 19.

TABULKA 19

	10mg / 100ml		100mg / 100ml	
Thiomersal				
Číslo pokusu	Plocha píku (A)	Retenční čas t_R (min)	Plocha píku (A)	Retenční čas t_R (min)
1	3752376	2,40	15601757	2,43
2	3768333	2,43	15607287	2,44
3	3774456	2,43	15667696	2,47
4	3791316	2,43	15609158	2,49
5	3749140	2,43	15670472	2,49
6	3746773	2,43	15744837	2,49
x	3763732	2,425	15650201	2,46
SD	15950,67	0,011	50901,74	0,0246
RSD (%)	0,42	0,48	0,33	0,99
Požadavek:		RSD < 1%		VYHOVUJE

7.2.3 Linearita

Bylo připraveno šest kalibračních roztoků thiomersalu v methanolu v rozmezí koncentrací 10mg/100 ml až 100mg/100ml (koncentrace jsou uvedené v tabulce 20).

Plocha píku pro každou koncentraci je průměrem ze tří měření a pro další výpočty byl brán průměr z těchto tří hodnot.

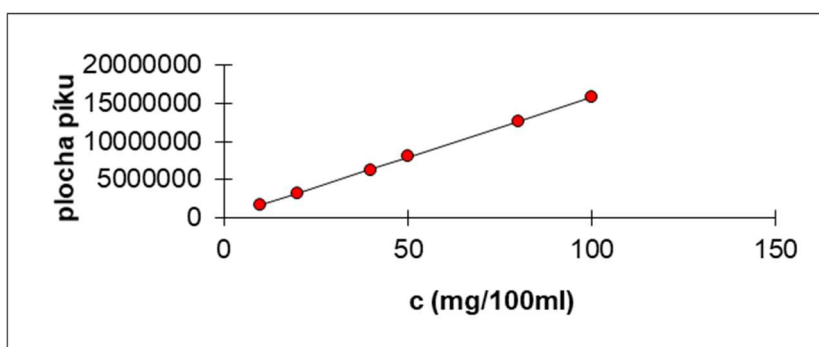
Závislost ploch píků kalibračních roztoků na jejich koncentraci byla vyhodnocena metodou lineární regrese (regresní funkce byla vždy stejná; $y = k \cdot s + q$).

Počet bodů (analyzovaných koncentrací) byl 6 bodů.

7.2.3.1 Testování linearity thiomersalu

Tabulka 20

c (mg/ 100ml)	Y(exper)
10	1639134
20	3239431
40	6250522
50	8007835
80	12626396
100	15753013



Parametry regresní přímky a odhady jejich směrodatných odchylek

- Směrnice $k = 156864,8 \pm 881,9364$
- Absolutní člen $q = 76146,67 \pm 52176,06$
- Koeficient korelace $R = 0,999937$
- Reziduální odchylka $s_{rez} = 68314,5$

Závislost y na x **byla** prokázána na hladině významnosti **0,05**.

7.2.4 Přesnost (Preciznost)

Byly analyzovány roztoky látek thiomersalu a ethylparabenu, které byly paralelně připravené takto:

1) do 10 ml odměrné baňky bylo odpipetováno vždy 1ml 0,1% roztoku thiomersalu a 10ml roztoku ethylparabenu o $c = 8\text{mg} / 100\text{ml}$.

2) do 10 ml odměrné baňky bylo odpipetováno vždy 10ml 0,1% roztoku thiomersalu a 1ml roztoku ethylparabenu o $c = 800\text{mg} / 100\text{ml}$.

Ad 1)

TABULKA 21

Roztok č.	Plocha píku ethylparaben	thiomersal
1	1269596	2874863
2	1270121	2871988
3	1264504	2870502
4	1288262	2886468
5	1282329	2872093
6	1269556	1924008

x 1274061 2883321

SD 8337,96 18954,6

RSD (%) 0,65 0,66

Požadavek: RSD (%) < 5% VYHOVUJE

Ad 2)

TABULKA 22

Roztok č.	Plocha píku ethylparaben	thiomersal
1	4850342	13955493
2	4850822	14020448
3	4868359	14107894
4	4863168	14007020
5	4969344	13998436
6	4928146	13980635

x 4888363 14011654

SD 44778,3 47700,15

RSD (%) 0,92 0,34

Požadavek: RSD (%) < 5% VYHOVUJE

7.2.5 Správnost (Přesnost)

Pro testování správnosti byla použita metoda standartního přídávku. Byl šestkrát změřen standartní roztok 1 a 2 připravený podle kapitoly 5.4. Pro následný výpočet byly použity aritmetické průměry ploch. Bylo připraveno 6 vzorků, které vznikly smícháním standartního roztoku a roztoku vzorku (thiomersal 0,1% a 0,01% ve vodě) 1 : 1. Každý roztok byl třikrát dávkován na kolonu a pro následný výpočet byly použity aritmetické průměry ploch píků.

Výtěžnost R_i byla vypočtena podle vzorce: $R_i (\%) = 100 \times c_i/c_0$.

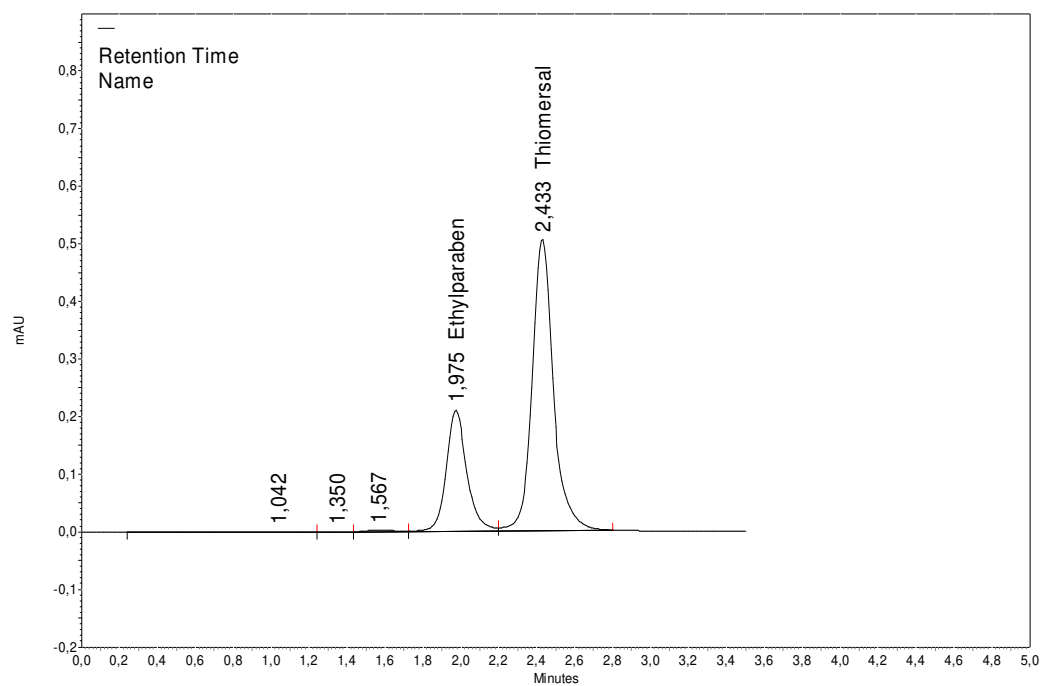
7.2.6 Selektivita

Separace thiomersalu ($c = / 100\text{ml}$) a ethylparabenu ($c = \text{mg}/ 100\text{ml}$) je dokumentována na chromatogramu standardů, obrázek 13.

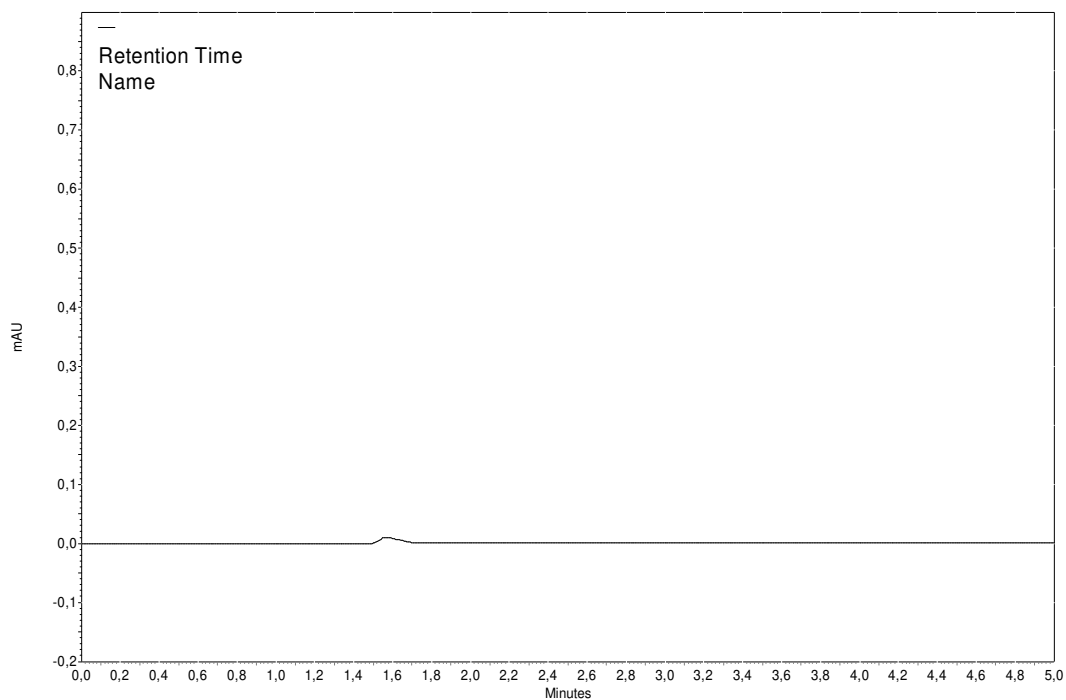
Chromatografické píky obou látek mají odlišné retenční časy.

Chromatogram placebo je na obrázku 14 a v retenčním čase odpovídajícím stanovovaným látkám není žádný pík interferující látky.

Předložená HPLC metoda umožňuje selektivně změřit plochu píků odpovídající účinné látce benzalkonium-chloridu a vnitřního standardu butylparabenu.



Obrázek 13: Chromatogram roztoku thiomersalu s vnitřním standardem ethylparabenem



Obrázek 14: Chromatogram placeba

7.2.7 Robustnost

Testování míry vlivu proměnných experimentálních podmínek na stanovení obsahu analytů bylo testováno u roztoku o koncentraci: ethylparaben ($c = 80\text{mg}/100\text{ml}$), thiomersal ($100\text{mg}/100\text{ml}$) v methanolu.

7.2.7.1 1 Vliv složení mobilní fáze a pH bylo testováno při poměru methanol : voda s kyselinou fosforečnou (35:0,9) = 70 : 30, 68 : 32, 65 : 35, 63 : 37, 60 : 40

a) Vliv na plochu chromatografického píku. A_i – plocha píku; $A_R = 100 \times A_i/A_{65:35}$. Byly získány výsledky uvedené v tabulce 25. Relativní plocha píků vztažená na plochu píku při optimálním složení mobilní fáze se pohybovala v rozmezí % až %. Z tohoto důvodu se doporučuje použití mobilní fáze MeOH-H₂O-H₃PO₄ = 65 : 35 : 0,9 , i přesto že na stanovení thiomersalu samotného neměla změna poměru fáze velký vliv.

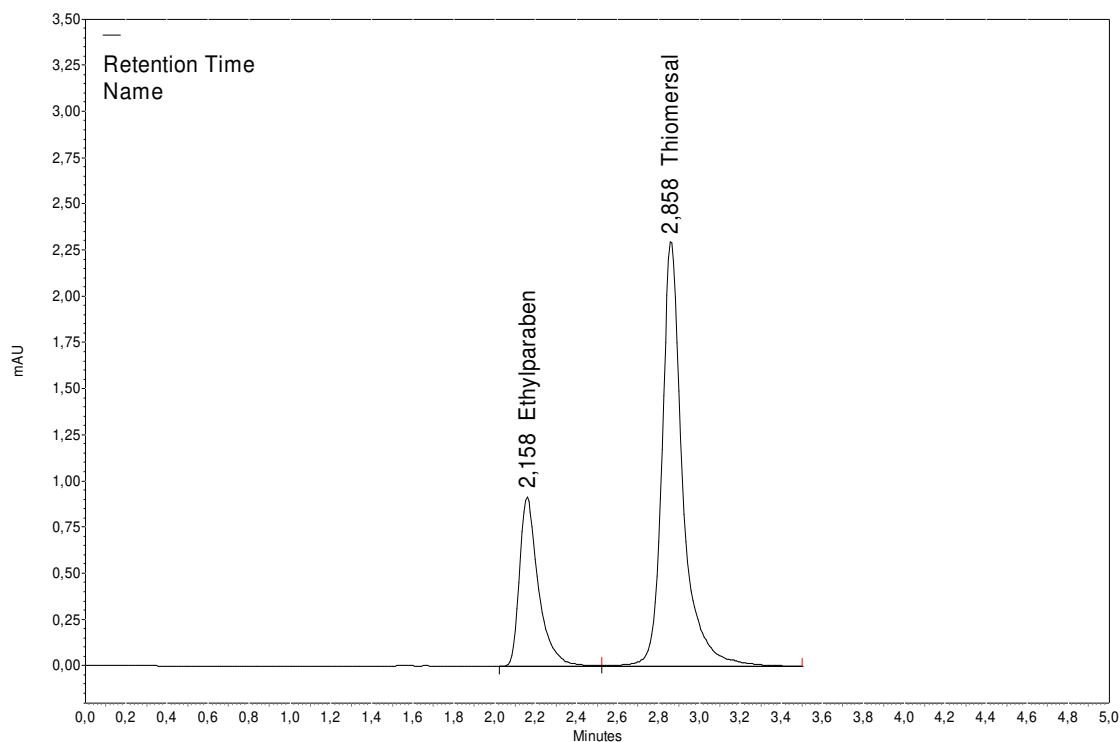
TABULKA 25 Vliv složení mobilní fáze na plochu píku

MeOH- H ₂ O+H ₃ PO ₄	ethylparaben		thiomersal	
	A _i	A _R (%)	A _i	A _R (%)
70 : 30	5474354	99,16	15560473	98,78
68 : 32	5558778	102,40	15618750	99,15
65 : 35	5428284	100,00	15753013	100,00
63 : 37	5693880	104,89	15792941	100,25
60 : 40	5818342	107,18	15695349	99,63

b) Vliv na retenční čas, Tabulka 26. V celém testovacím rozmezí dochází k dokonalé separaci všech složek, ale složení mobilní fáze ovlivňuje trvání analýzy. Z tohoto hlediska je doporučeno použití mobilní fáze MeOH-H₂O-H₃PO₄ = 65 : 35 : 0,9. Na obr. 11 je znázorněn chromatogram při poměru MeOH-H₂O-H₃PO₄ 60 : 40a jak je zřejmé, separace účinné látky i vnitřního standardu je až k základní linii, pouze dochází k prodloužení trvání analýzy.

TABULKA 26 Vliv složení mobilní fáze na retenční čas

MeOH-H ₂ O+H ₃ PO ₄	Ethylparaben	Thiomersal
	t _R (min)	t _R (min)
70 : 30	1,85	2,16
68 : 32	1,9	2,26
65 : 35	1,845	2,14
63 : 37	2,04	2,58
60 : 40	2,17	2,88



Obrázek 15: Chromatogram při složení mobilní fáze methanol – voda s kyselinou fosforečnou = 60 : 40

7.2.7.2 *Stabilita roztoku thiomersalu ($c = 100\text{mg} / 100\text{ml}$; $c = 10\text{mg} / 100\text{ml}$) a vnitřního standardu ethylparabenu ($c = 80\text{mg} / 100\text{ml}$; $c = 8\text{mg} / 100\text{ml}$) byla testována za uchovávání:*

- 1) za snížené teploty (4°C), chráněné před světlem
- 2) za laboratorní teploty za přítupu světla

Výsledky jsou uspořádány v tabulce 27.

TABULKA 27

Stabilita thiomersalu v závislosti na době a způsobu uchování (S_T)

thiomersal 100mg / 100ml				
t	A (4°C)	S_T (%)	A (~20°C)	S_T (%)
0	15965727,3	0	15965727,3	0
24h	15817863	0,93	15927077	0,25
48h	16095781	0,81	16331771	2,29
72h	16015814	0,31	16541425	3,61
thiomersal 10mg / 100ml				
t	A (4°C)	S_T (%)	A(~20°C)	S_T (%)
0	3782515,6	0	3782515,6	0
24h	3832988	1,33	3944639	4,29
48h	3809998	0,73	4049154	7,05
72h	3837789	1,46	4193796	10,87

t = čas od přípravy vzorku

A = plocha píku; S_T (%) = $100 \times |A_i - A_0| / A_0$

Požadavek: S_T (%) <1%

Z tabulky 27 vyplývá, že roztok thiomersalu v methanolu je nutné připravit čerstvý před každým měřením.

7.2.8 Detekční limit (LOD) a kvantitativní limit (LOQ)

Postup:

a) bylo změřeno placebo a ze záznamu šumu v okolí retenčního času stanovované látky byla změřena největší kladná (r^+) a záporná (r^-) amplituda šumu; z tohoto rozpětí šumu byla odhadnuta jeho směrodatná odchylka: $s_n = (r^+ - r^-)/5$.

b) bylo změřeno placebo s přidavkem analyzované látky ($c = 1\text{mg/l}$) pro změření plochy píku

LOD byl vypočten podle vzorce: $3 s_n K / b_1$;

LOQ byl vypočten podle vzorce: $10 s_n K / b_1$;

$K = \text{plocha píku/výška píku}$; $b_1 = \text{plocha píku/ koncentrace analytu}$

TABULKA 28 Detekční a kvantitativní limit

thiomersal

	LOD (mg/l)	LOQ (mg/l)
$s_n = 0,00003$	0,025	0,084
$K = 7511562,4$		
$b_1 = 33348,1$		

Nejnižší detekovatelná koncentrace thiomersalu (LOD) za použití předkládané HPLC metody je 0,025 mg/l, kvantitativní limit (LOQ) představuje koncentrace 0,084 mg/l.

8 ZÁVĚR

Cílem této práce bylo vyvinout a validovat metodu pro stanovení benzalkonium-chloridu a thiomersalu v léčivých přípravcích pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie.

Pro zvolené metody byla použita kolona Chromolith Performance RP-18, délka 10 cm, vnitřní průměr 4,6 mm. Měření benzalkonium-chloridu probíhalo za zvýšené teploty při 50°C. Jako nejvýhodnější mobilní fáze se ukázala směs methanolu a fosfátového pufru o pH 3 v poměru 73 : 27, která měla průtok 3,5ml/min. Zkoušený vzorek byl rozpuštěn v methanolu a dávkován na kolonu nástřikem 10 µl. Thiomersal byl měřen za laboratorní teploty. Jako nejvýhodnější mobilní fáze se v tomto případě ukázala směs methanolu, vody a kyseliny fosforečné v poměru 65 : 35 : 0,9 s průtokem 1 ml/min. Vzorek thiomersalu byl rozpuštěn v methanolu a dávkován na kolonu nástřikem 5 a 10 µl.

Byl proveden test účinnosti chromatografického systému a validace metody, čímž bylo dokázáno, že poskytuje přesné a správné výsledky a je tak vhodná pro zamýšlené použití.

Bohužel se nepodařilo vyvinout metodu pro carbethopendecinium-bromid. Český lékopis neuvádí možnost stanovení pomocí HPLC, ani nebyla nalezena žádná HPLC metoda v odborné literatuře. Vzhledem k chemické struktuře látky byla vyzkoušena analýza pomocí negativní detekce, ani tato možnost se ale neprokázala jako účinná. Nebyl nalezen dostatek informací o chování látky v chromatografickém systému. Jedinou možností stanovení septonexu pomocí instrumentálních metod tak zůstává analýza pomocí kapilární elektroforézy [16], vyvinutá na Katedře analytické chemie.

9 POUŽITÁ LITERATURA

[1] Český lékopis 2009. 1. vyd. Praha: Grada Publishing, 2009, s. 1450,1451,3284. ISBN 978-802-4729-947

[2] TISSUE, Brian M. *High-Performance Liquid Chromatography (HPLC)* [online]. 1996 [cit. 2018-04-09]. Dostupné z: <http://elchem.kaist.ac.kr/vt/chem-ed/sep/lc/hplc.htm>

[3] KLIMEŠ, Jiří. *Kontrola léčiv I.* 1. vyd. Praha: Karolinum, 2002, 141 s. ISBN 80-246-0419-1

[4] KARLÍČEK, Rolf. *Analytická chemie pro farmaceuty.* 2. vyd. Praha: Karolinum, 2001, 281 s. ISBN 80-246-0348-9

[5] COUFAL, Pavel. *High Performance Liquid Chromatography, HPLC.* [online]. 2004 [cit. 2013-03-31]. Dostupné z: <http://web.natur.cuni.cz/~pcoufal/hplc.html>

[6] DOUŠA, Michal. *HPLC.cz.* [online]. 1999, 2011 [cit. 2013-03-31]. Dostupné z: <http://www.hplc.cz/>

[7] ŠABARTOVÁ, Jitka. *Validace analytických metod v kontrole léčiv.* Věstník SÚKL. Praha: Státní ústav pro kontrolu léčiv, 1993, roč. 1994, č. 1.

[8] *Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology.* The International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use [online]. 1994, 2005 [cit. 2014-04-19]. Dostupné z: http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q2_R1/Step4/Q2_R1__Guideline.pdf

[9] LABRANCHE, Louis-Philippe, Suzanne N. DUMONT, Suzanne LEVESQUE a Alain CARRIER. Rapid determination of total benzalkonium chloride content in ophthalmic formulation. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* [online]. Elsevier, 2007, 19 February 2007, **43**(3), 989-993 [cit. 2018-04-09]. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0731708506006510>

[10] GEIER, David A., Paul G. KING, Brian S. HOOKER, José G. DÓREA, Janet K. KERN, Lisa K. SYKES a Mark R. GEIER. Thimerosal: Clinical, epidemiologic and biochemical studies. *Clinica chimica acta* [online]. Elsevier, 2015, 15 April 2015, **2015**(444), 212-220 [cit. 2018-04-09]. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0009898115001023?via%3Dihub>

[11] CARABALLO, I., A.M. RABASCO a M. FERNÁNDEZ-ARÉVALO. Study of thimerosal degradation mechanism. *International Journal of Pharmaceutics* [online]. 1993, 5 February 1993, **3**(89), 213-221 [cit. 2018-04-09]. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/037851739390246C>

- [12] PRINCEA, Shelly J., Hei-Jen MCLAURYB, Lloyd ALLENC a Phil MCLAURYD. Analysis of benzalkonium chloride and its homologs: HPLC versus HPCE. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*[online]. 1999, 1 May 1999, **6**(19), 877-882 [cit. 2018-04-09]. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0731708598001873>
- [13] Thimerosal. In: *Sigmaaldrich* [online]. [cit. 2018-04-09]. Dostupné z: <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/substance/thimerosal404815464811?lang=en&ion=CZ&attrlist=Brand|Activity%20Spectrum>
- [14] Benzalkonium chloride. In: *Sigmaaldrich* [online]. [cit. 2018-04-09]. Dostupné z: <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/substance/benzalkoniumchloride123456344941211?lang=en&ion=CZ>
- [15] Block diagram of an HPLC system. In: *Merckmillipore.com* [online]. [cit. 2018-04-09]. Dostupné z: <https://www.merckmillipore.com/CZ/cs/water-purification/learning-centers/applications/organic-analysis/hplc/.u6b.qB.UnwAAAFUs.ESsxWy,nav?ReferrerURL=https%3A%2F%2F>
- [16] JÁČ, Pavel, Klára PETRŮ, Martina ŠINDELKOVÁ a Miroslav POLÁŠEK. Determination of carbethopendecinium bromide in eye drops by capillary electrophoresis with capacitively coupled contactless conductivity detection. *Journal of separation science* [online]. 2011, 18 March 2011, **2011**(34), 1174-1179 [cit. 2018-04-30]. Dostupné z: http://apps.webofknowledge.com/full_record.do?product=WOS&search_mode=GeneralSearch&qid=18&SID=C1rDPPgQ2FJtvxX9jai&page=1&doc=2