

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ
KATEDRA ANALYTICKÉ CHEMIE



**Vývoj a validace HPLC metody pro separaci a stanovení účinných
látek v léčivém přípravku Valetol**

Vedoucí diplomové práce: RNDr. Dalibor Šatínský, Ph.D.

Vedoucí katedry: Doc. RNDr. Petr Solich, CSc.

Hradec Králové, 2007

Jana Ullrichová

*Děkuji RNDr. Daliborovi Šatínskému, Ph.D.,
mému trpělivému školiteli.*

1 Obsah

1	Obsah	1
2	Použité zkratky	3
3	Úvod	4
4	Cíl práce	5
5	Teoretická část	6
5.1	Valetol	6
5.1.1	Kompletní složení přípravku	6
5.1.2	Paracetamol	7
5.1.3	Kofein	8
5.1.4	Propyfenazon	9
5.2	Chromatografie	11
5.2.1	Základní principy chromatografických metod ^{/3,4,5/}	11
5.2.2	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie – HPLC ^{/3,4/}	12
5.2.3	Schéma kapalinového chromatografu ^{/3/}	13
5.2.4	Chromatografické kolony ^{/2,3,4,5/}	14
5.2.5	Detektory v HPLC ^{/3,4/}	15
5.3	Validace analytických metod	16
5.3.1	Testování vhodnosti chromatografického systému ^{/2,9,10,11,12/}	17
5.3.1.1	Opakovatelnost analýzy	17
5.3.1.2	Účinnost chromatografické kolony	17
5.3.1.3	Asymetrie chromatografických píků	17
5.3.1.4	Rozlišení chromatografických píků	18
5.3.2	Validace analytické metody	18
5.3.2.1	Přesnost	18
5.3.2.2	Správnost	18
5.3.2.3	Selektivita	19
5.3.2.4	Detekční limit	19
5.3.2.5	Kvantitativní limit	19
5.3.2.6	Linearita	19
5.3.2.7	Robustnost	20
5.4	Metody současného stanovení paracetamolu, kofeinu a propyfenazonu ^{/13/}	21

6	Experimentální část	22
6.1	Materiály a pomůcky	22
6.1.1	Chemikálie, standardy, vzorky	22
6.1.2	Přístroje, podmínky separace.....	22
6.2	Příprava vzorku	23
6.3	Příprava roztoku standardů.....	23
6.4	Optimalizace chromatografických podmínek.....	23
6.4.1	Volba vlnové délky detektoru.....	24
6.4.2	Optimalizace složení mobilní fáze	24
6.4.3	Volba dávkovaného objemu vzorku a rychlosti průtoku mobilní fáze.....	24
6.5	Izolace účinných látek – paracetamolu, propyfenazonu a kofeinu.....	25
6.5.1	Stanovení obsahu paracetamolu, propyfenazonu a kofeinu	25
7	Výsledky a diskuze	26
7.1	Optimalizace chromatografických podmínek.....	26
7.1.1	Volba vlnové délky detektoru.....	26
7.1.2	Optimalizace složení mobilní fáze	27
7.1.3	Souhrn optimálních podmínek HPLC	27
7.2	Validace metody	28
7.2.1	Test vhodnosti chromatografického systému	28
7.2.1.1	Účinnost chromatografického systému – počet teoretických pater (N)	28
7.2.1.2	Asymetrie chromatografických píků (T)	28
7.2.1.3	Rozlišení chromatografických píků <i>R</i>	29
7.2.1.4	Opakovatelnost analýzy.....	30
7.2.2	Validace analytické metody.....	32
7.2.2.1	Přesnost.....	32
7.2.2.2	Linearita.....	32
7.2.2.3	Správnost	36
7.2.2.4	Selektivita	38
7.2.2.5	Robustnost	39
7.2.2.6	Stabilita.....	42
8	Závěr	44
9	Seznam použité literatury	46

2 Použité zkratky

ČL	Český lékopis
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
PVC	polyvinylchlorid
GABA	kys. gamaaminomáselná
cAMP	cyklický adenosinmonofosfát
ICH	International Conference on Harmonization
SÚKL	Státní ústav pro kontrolu léčiv
MF	mobilní fáze
UV	ultrafialová oblast spektra záření
MeOH	methanol
PAR	paracetamol
KOF	kofein
PRO	propyfenazon
4AF	4-aminofenol

3 Úvod

Valetol s obsahem paracetamolu, kofeinu a propyfenazonu je přípravek určený ke krátkodobé léčbě bolesti hlavy, zubů, migrény, bolesti při nachlazení a chřipce, pooperační a revmatické bolesti, ischias, neuralgie, bolestivé menstruace.

Účinné látky přípravku – paracetamol, kofein a propyfenazon – se obvykle stanovují chemickou metodou. Dle ČL 2002 paracetamol cerimetrickou titrací ve vodném prostředí s vizuální indikací ekvivalenčního bodu na barevný indikátor – ferroin; kofein a propyfenazon acidimetrickou titrací v nevodném prostředí s potenciometrickou indikací ekvivalenčního bodu.

K analýze léčiv jsou však dnes široce využívány metody separační, které umožňují analýzu směsí s možností jak kvalitativního, tak kvantitativního hodnocení separovaných složek směsí. Pro stanovení látek v tabletovině je vhodnou analytickou metodou vysokoúčinná kapalinová chromatografie – HPLC, která umožňuje provést identifikaci, kontrolu čistoty a stanovení obsahu několika látek během jedné analýzy. Další výhodou této metody je vysoká rychlost měření, citlivost stanovení (v závislosti na použité detekci), selektivita, možnost automatizace a využití minimálního množství vzorku.

4 Cíl práce

Tato diplomová práce se zabývá optimalizací a následnou validací podmínek stanovení paracetamolu, kofeinu a propyfenazonu v hromadně vyráběném léčivém přípravku Valetol. Jako analytická metoda byla zvolena HPLC s UV detekcí hlavně z těchto důvodů:

- tablety obsahují mnoho dalších pomocných látek, které jsou během analýzy ze vzorku separovány a neznemožňují stanovení samotných účinných látek
- možnost sledování stability léčivých látek

Při práci budu vycházet z metody dostupné na katedře analytické chemie v Hradci Králové FaF, která se problematikou stanovení kofeinu, paracetamolu a propyfenazonu podrobně zabývá. Použitá metoda bude upravena a podmínky stanovení budou optimalizovány pro uplatnění v rutinní analýze léčivého přípravku. Proto musím klást důraz na co možná největší jednoduchost a časovou nenáročnost při zachování vysoké přesnosti a spolehlivosti dané metody. V konečné fázi budu řešit validaci metody podle doporučení Státního ústavu pro kontrolu léčiv a dalších autorit.

Literární rešerše bude zaměřena na vytvoření přehledu nalezených metod, používaných pro současné stanovení paracetamolu, kofeinu a propyfenazonu pomocí HPLC.

5 Teoretická část

5.1 Valetol

Přípravek se používá ke krátkodobé léčbě bolesti (bolesti hlavy, zubů, migréna, bolesti při nachlazení a chřipce, postoperační a revmatické bolesti, ischias, neuralgie, bolestivá menstruace).

Při užívání se může občas vyskytnout kožní alergie, nauzea, tlak v epigastriu, nechutenství, průjem, vzácně poruchy krvetvorby, trombocytopenie, leukopenie, pancytopenie, neutropenie, agranulocytóza, hemolytická anémie a žloutenka, velmi zřídka palpitace, nespavost, neschopnost koncentrace, zvýšená dráždivost, hyperreflexie nebo závratě a malátnost.

Riziko výskytu nežádoucích účinků se zvyšuje při dlouhodobém podávání a při vyšších dávkách.

Přípravek je balen v blistru z PVC nebo hliníku po 10 tabletách.

Tablety jsou téměř bílé, nepotahované, 13 mm v průměru s půlicí rýhou uprostřed.

Přípravek patří k vícesložkovým kombinovaným analgetikům s účinnými látkami paracetamol v množství 150 mg, kofein v množství 50 mg a propyfenazon v množství 300 mg. ^{/1/}

5.1.1 **Kompletní složení přípravku**

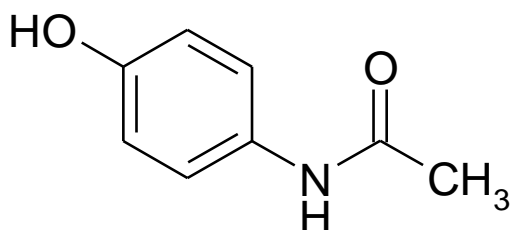
Paracetamol	150 mg
Kofein	50 mg
Propyfenazon	300 mg

Pomocné látky:	Maydis amyllum praegelatum
	Povidonum
	Croscarmellosum natricum
	Talcum
	Stearinum
	Magnesii stearas
	Maydis amyllum
	Carboxymethylamyllum natricum
	Cellulosum microcrystallinum

5.1.2 Paracetamol

Paracetamol je bílý krystalický prášek. Je mírně rozpustný ve vodě, snadno rozpustný v lihu 96%, velmi těžce rozpustný v etheru a v dichlormethanu. Chemicky je to N-(4-hydroxyfenyl)acetamid. ^{/2/}

Struktura:



Sumární vzorec:	C ₈ H ₉ NO ₂
M_r:	151,16
Teplota tání:	168 °C až 172 °C.

Paracetamol se svou chemickou strukturou řadí mezi deriváty anilínu. Je vůbec nejužívanější látkou v této skupině. Z hlediska fyzikálně chemických vlastností je paracetamol látkou spíše amfoterní a polární. Díky těmto vlastnostem se rychle a téměř úplně vstřebává z trávicího traktu po perorálním podání. ^{/7/}

Paracetamol patří do farmakoterapeutické skupiny neopioidních analgetik s antipyretickým účinkem. Antipyretický účinek spočívá v inhibici cyklooxygenázy v hypotalamu; centrální mechanismus se podílí rovněž na jeho analgetickém působení – nepřímé působení na serotoninové 5-HT₃-receptory v míše. Na periférii paracetamol urychluje přeměnu prostaglandinu G₂ na PGH₂, a tím snižuje protizánětlivé působení nestabilního endoperoxidu PGG₂.

Paracetamol má relativně dobrou gastrointestinální snášenlivost a neovlivňuje krevní srážlivost. Je proto vhodný i pro podání dětem a osobám se špatnou gastrointestinální tolerancí.

Paracetamol je doporučován v terapii horečky zejména při akutních bakteriálních a virových infekcích, bolesti zubů, hlavy, neuralgie, bolesti svalů nebo kloubů neznámé etiologie, bolesti vertebrogenního původu a bolestivá menstruace. Perorálně aplikovaný paracetamol se rychle a téměř úplně vstřebává z gastrointestinálního traktu. Rychle se distribuuje do všech tkání a tělesných tekutin. Maximální plazmatické hladiny je dosaženo za 10-60 minut po p.o.

podání. Prochází hematoencefalickou bariérou, do slin a do mateřského mléka. Intenzivně se biotransformuje, vedle konjugačních reakcí dochází k oxidativním pochodům, přičemž vznikají toxické metabolity. Při podání terapeutických dávek dochází k rychlé biotransformaci těchto hepatotoxických intermediálních metabolitů za spolupůsobení glutathionu a za vzniku merkapturových kyselin, které se vylučují močí převážně ve formě konjugátů, méně než 5% paracetamolu se vyloučí v nezměněné formě.

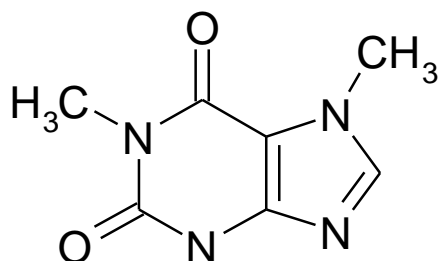
Biologický poločas se pohybuje mezi 1-3 hodinami, u závažné jaterní insuficience dochází k jeho prodloužení až na 5 hodin. U insuficience ledvin nedochází k jeho prodloužení, ale protože se převážně vylučuje ledvinami, je nutno dávku paracetamolu redukovat.

Nežádoucí účinky se při systémovém podání v terapeutických dávkách vyskytují jen zřídka a s mírným klinickým průběhem kožní alergie, jen zcela ojediněle bronchospasmus. Jen zcela vzácně se vyskytují poruchy krvetvorby.^{/1,6/}

5.1.3 Kofein

Kofein je bílý krystalický prášek nebo jemné bílé krystalky, snadno sublimující. Je mírně rozpustný ve vodě, snadno rozpustný ve vroucí vodě, těžce rozpustný v ethanolu a v etheru. Rozpouští se v koncentrovaných roztocích alkalických benzoanů a salicylanů. Chemicky je to 1,3,7-trimethyl-3,7-dihydro-1H-purin-2,6-dion.^{/2/}

Struktura:



Sumární vzorec:	C ₈ H ₁₀ N ₄ O ₂
M_r:	194,19
Teplota tání:	234 °C až 239 °C.

Chemicky patří kofein k derivátům xantinu (2,6-dioxopurin), které lze odvodit náhradou vodíku v NH skupinách methyly. Kofein je dusíkatá base – purinový alkaloid. Vyskytuje se v semenech kávovníku, listech čajovníku a některých jiných rostlinných drogách.^{/6,7/}

Z hlediska fyzikálně chemických vlastností je kofein látkou slabě bazickou a lipofilní.

Kofein patří do farmakoterapeutické skupiny psychostimulancií, resp. deriváty methylxantinů. Tato skupina se vyznačuje vedle psychostimulačních účinků, také účinky bronchodilatačními, kardiostimulačními a nepříliš silnými účinky diuretickými, v žaludku stimuluje sekreci HCl. Při pravidelném užívání vzniká tolerance.

Methylxantiny se z trávicího traktu vstřebávají nepravidelně. Distribuují se do všech tkání, přecházejí do slin, placentární bariérou a do mléka. V organismu se demethylují a oxidují, poločas eliminace kofeinu je 3-5 hodin.

Účinky kofeinu spočívají v tom, že blokuje fosfodiesterázu, čímž snižuje inaktivaci cAMP a je také antagonistou adenosinových receptorů. Adenosin tlumí respiraci, psychomotoriku, má antikonvulzní, hypnotické, anxiolytické a analgetické účinky, dilatuje mozkové cévy, má antidiuretický účinek a inhibuje uvolňování reninu a žaludeční sekreci. Je tedy vedle GABA druhým hlavním inhibičním neurotransmiterem. Kofein má tedy naopak účinek stimulační – stimuluje CNS, má anxiogenní účinky, snižuje průtok krve mozkem, podporuje diurézu, v žaludku podporuje sekreci HCl, stimuluje respirační a vazomotorické centrum a má pozitivně ionotropní vliv na myokard.

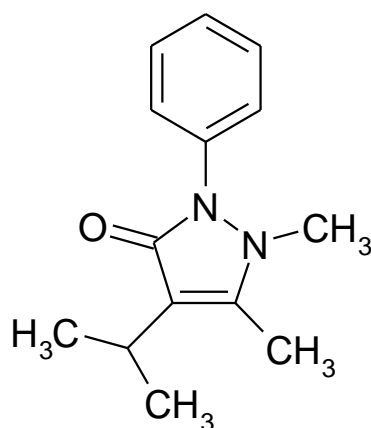
U nemocných s úzkostnou panickou poruchou může kofein vyvolat epizodu paniky.

Přerušeni pravidelného užívání vede k bolestem hlavy, únavě, ospalosti, depresi a převáží příznaky vysoké aktivity adenosinu – dilatace cerebrálních cév, útlum, snížení diurézy aj.^{/6/}

5.1.4 Propyfenazon

Propyfenazon je bílý nebo slabě nažloutlý krystalický prášek. Je těžce rozpustný ve vodě, snadno rozpustný v dichlormethanu a v lihu 96%, dobře rozpustný v etheru. Chemicky je to 2-fenyl-4-isopropyl-1,5-dimethyl-1,2-dihydro-3H-pyrazol-3-on.^{/2/}

Struktura:



Sumární vzorec:	C ₁₄ H ₁₈ N ₂ O
M_r:	230,31
Teplota tání:	102 °C až 106 °C.

Propyfenazon se svou chemickou strukturou řadí mezi deriváty pyrazolonu. Pro nízkou toxicitu je nejpoužívanější látkou této skupiny. Z hlediska fyzikálně chemických vlastností se řadí ke slabým bazím a látkám spíše polárního charakteru.^{/7/}

Propyfenazon patří do farmakoterapeutické skupiny neopioidních analgetik – antipyretik. Tato skupina látek vyniká výrazným protizánětlivým, analgetickým, antipyretickým a urikosurickým účinkem. Po jejich podání však často dochází ke vzniku gastroduodenálních vředů s krvácením nebo dokonce perforací. Další život ohrožující komplikací může být porucha hemopoezy.^{/1,6/}

Propyfenazon je po perorálním podání rychle resorbován (v průběhu 30 minut) a z převážné části rychle vylučován ledvinami. Prostupuje také placentární bariérou. Eliminační poločas je 1-1,5 hodiny, ostatní údaje nejsou bohužel známy.^{/1,6/}

5.2 Chromatografie

5.2.1 **Základní principy chromatografických metod** ^{/3,4,5/}

Chromatografické metody jsou vysoce účinné separační metody, které slouží k oddělení analyzovaných látek ze směsi a zároveň k jejich kvalitativní a kvantitativní analýze.

Principem chromatografického procesu je postupné, mnohokrát opakované vytváření rovnovážných stavů dělených látek mezi dvěma vzájemně nemísitelnými fázemi. Nepohyblivá, stacionární fáze má schopnost různou měrou zadržovat jednotlivé součásti analyzované směsi; pohyblivá, mobilní fáze vymývá jednotlivé součásti směsi z fáze stacionární a odnáší je ve směru toku různou rychlostí na základě rozdílné afinity dělených látek ke stacionární fázi. Hybnou silou chromatografického systému je mobilní fáze, která může být buď kapalná (eluent) nebo plynná (inertní nosný plyn). Vlastní dělení látek závisí na retenci, brzdící síle stacionární fáze, kterou tvoří látka v tuhém skupenství (sorbent) nebo kapalina umístěna na inertním nosiči.

Chromatografických metod je v dnešní době značné množství a vzhledem k velké různorodosti se dělí podle několika hledisek:

- **Podle skupenství mobilní fáze**
 - Kapalinová (Liquid Chromatography – LC)
 - Plynná (Gas Chromatography – GC)
- **Podle uspořádání stacionární fáze**
 - Kolonová
 - Papírová (Paper Chromatography – PC)
 - Tenkovrstvá (Thin Layer Chromatography – TLC)
- **Podle podstaty separačního procesu**
 - Rozdělovací
 - Adsorpční
 - Iontově – výměnná
 - Gelová
 - Afinitní

Mezi nejpoužívanější separační metody ve všech oblastech analýzy léčiv patří plynová a kapalinová chromatografie.

Metoda plynové chromatografie se využívá především pro analýzu plynných látek a také pro analýzu těkavých látek, které za vyšší teploty přechází do plynného stavu, aniž by docházelo k jejich rozkladu. Je vysoce citlivá a umožňuje kvantitativní i kvalitativní hodnocení separovaných složek směsi, ovšem většina léčiv jsou látky termostabilní, proto je stále více využívána chromatografie kapalinová. Ta umožňuje dělení všech méně těkavých i tuhých látek rozpustných ve vodě, organických rozpouštědlech nebo zředěných kyselinách. Dnes je prováděna hlavně v kolonovém uspořádání.

5.2.2 Vysokoučinná kapalinová chromatografie – HPLC ^{/3,4/}

V současné době je HPLC jednou z nejprogresivnějších analytických metod, která je široce uplatňována ve všech moderních lékopisných monografiích. Dělení látek probíhá mezi stacionární fází naplněnou v koloně a mobilní fází procházející kolonou za vysokého tlaku.

Zmenšením částic stacionární fáze je dosaženo větší účinné plochy a vysoké separační účinnosti. Pro dostatečně rychlý průtok mobilní fáze je však zapotřebí protlačit ji kolonou působením čerpadla pod vysokým tlakem (až 40 MPa). Pro oddělení látek jsou využívány všechny výše jmenované separační mechanismy, což umožňuje nalezení dostatečně selektivního chromatografického systému.

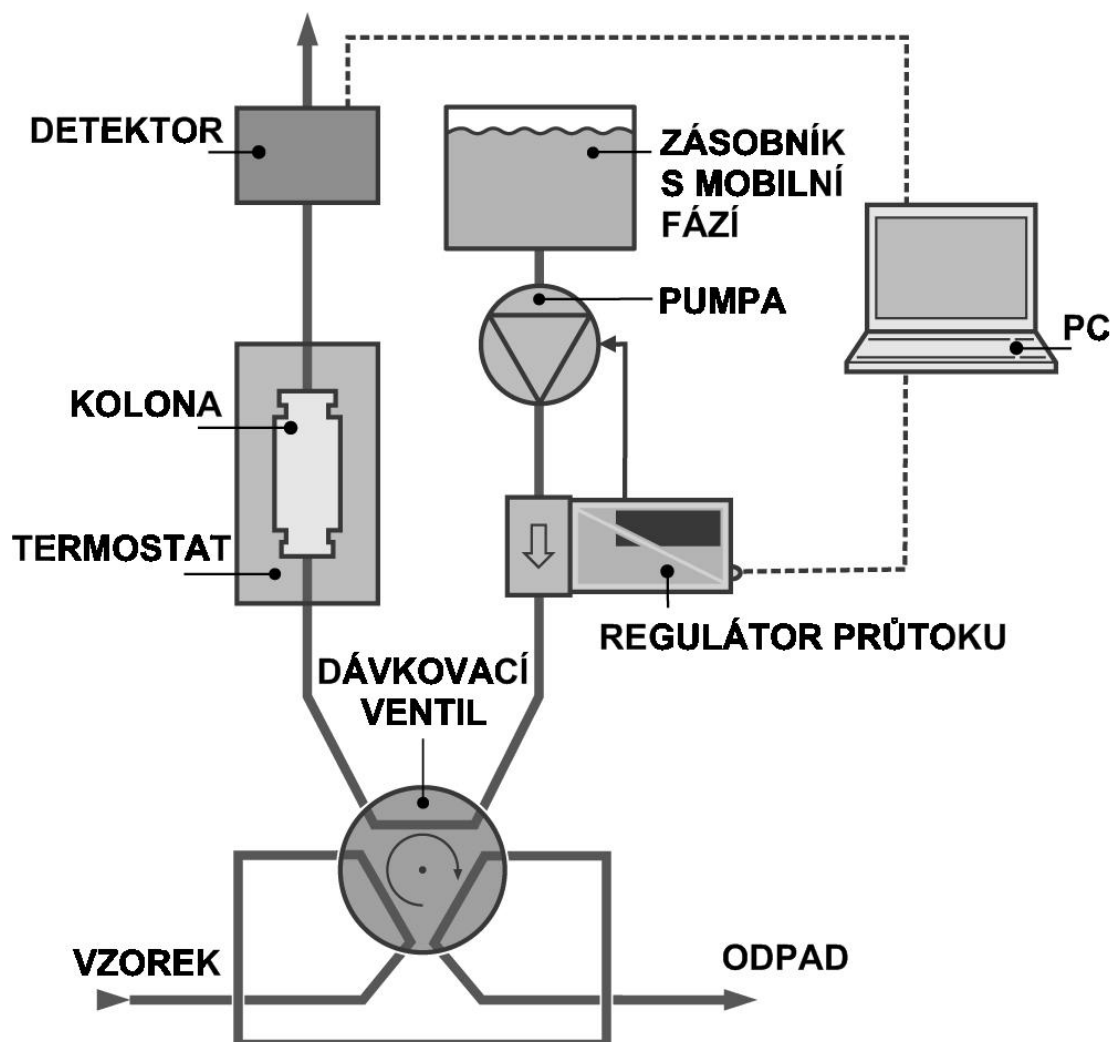
Jako mobilní fáze se volí běžná rozpouštědla nebo jejich směsi, které postupují kolonou. Vyvíjení se realizuje buď za konstantního složení mobilní fáze v průběhu celé analýzy – isokratická eluce; nebo se mění složení mobilní fáze s časem – gradientová eluce. Roztok vzorku obsahující dělené látky je dávkován na kolonu, kde je unášen proudem mobilní fáze. Poté dochází k mnohonásobné sorpci těchto látek na stacionární fázi a následně k desorpci fází mobilní. Látky vystupují postupně z kolony do detektoru, kde se registruje jejich přítomnost a jako odezva na tento signál je zakreslen pík na chromatografickém záznamu – chromatogramu. Separace je uskutečňována na základě různé afinity jednotlivých složek dělené směsi k oběma fázím v koloně.

Předpokladem úspěšné HPLC analýzy je optimalizace podmínek chromatografie tak, aby separované látky poskytovaly ostré a symetrické chromatografické píky. Kvalitativní charakteristikou analýzy je retenční čas nebo retenční objem, kvantitativní údaj udává plocha píku stanovované látky s plochou píku standardu, který je analyzován za stejných podmínek.

Přesnější je metoda vnitřního standardu, kdy se analyzuje standard i sledovaná látka v jednom vzorku za zcela stejných podmínek.

5.2.3 Schéma kapalinového chromatografu ^{13/}

Kapalinový chromatograf je složen z jednotlivých komponent, které umožňují dávkování směsi látek, tok mobilní fáze, separaci látek a následnou detekci se záznamem píků a tzv. data-stanice (většinou PC), které provádějí sběr, zpracování a vyhodnocování dat. Pro účinnou separaci látek je rozhodující správný výběr kolony a složení mobilní fáze, citlivost a selektivita analýzy je závislá na použitém detektoru.



Obrázek 1: Schéma kapalinového chromatografu

Některé novější chromatografy obsahují vakuový degasser, který je určený k odplynování mobilní fáze.

5.2.4 Chromatografické kolony ^{/2,3,4,5/}

Kolona má rozhodující vliv na kvalitu chromatografie a její volba významně ovlivňuje i dobu analýzy. Mnoho rozličných aplikací HPLC podmiňuje existenci velkého množství kolon různé délky, vnitřního průměru a náplně.

Pro většinu rutinních analytických metod jsou kolony vyrobeny z nerezové oceli, nejčastěji o délce 10, 15 nebo 25 cm a o vnitřním průměru 4,6 nebo 5 mm. Běžný průtok eluentu se pohybuje od 1 do 2 ml/min. Krátké kolony o délce 3 – 5 cm dovolují dosáhnout rychlých separací a snížit významně spotřebu mobilní fáze a současně zvýšit hmotnostní citlivost detekce, což má význam hlavně pro analýzu malých objemů vzorku. Materiál, který naplňuje analytické kolony má průměr v rozmezí 1,7 - 10 μ m. Kolony s velmi malým vnitřním průměrem – mikrokolony – mají délku 25 – 50 mm a vnitřní průměr 1 – 2 mm. Vynikají vysokou účinností a nízkou spotřebou rozpouštědla (100 - 1000 μ l). Jako ochrana hlavní kolony před nečistotami a nerozpustnými materiály jsou často využívány předkolony umístěné mezi čerpadlo a dávkovací zařízení, častěji jsou však zabudovány přímo před kolonou.

HPLC kolony musí být mechanicky stabilní při pracovních tlacích do 30 – 40MPa, musí mít vysokou účinnost a poskytovat symetrické píky i při separaci polárních, kyselých, bazických či vysokomolárních látek. Dále se vyžaduje stabilita a dostatečná permeabilita, malý odpor i při vysokých průtocích mobilní fáze). Pro účinné dělení látek je rozhodující nejen náplň kolony, zvláště velikost a stejnoměrnost částic, ale i tvar, porozita a struktura. Náplň musí být rovnoměrná a homogenní.

Nejvíce používaným sorbentem pro většinu HPLC aplikací jsou nemoifikované či chemicky modifikované mikročástice silikagelu (velikosti 3 - 10 μ m), vzácněji oxid hlinitý. Poslední dobou se objevují také stacionární fáze na podkladu oxidu zirkoničitého, případně také dalších makromolekulárních materiálů. Silikagel je polární adsorbent amorfní struktury. Jeho povrch je pokryt hydroxylovými skupinami, které jsou schopny tvořit vodíkové můstky a tak dochází k interakci se separovanými látkami. Jeho kyselé vlastnosti způsobují silné zadržování bazických látek.

Většina HPLC separací je založena na mechanismu rozdělování a využívá chemicky modifikované stacionární fáze, u nichž se na bázi silikagelu silylací připravují fáze s různými koncovými skupinami, které ovlivňují polaritu stacionární fáze. Nejčastěji se jedná o uhlovodíkové řetězce C₁₈ a C₈, což jsou tzv. reverzní fáze – nepolární. Dále tříuhlíkaté řetězce zakončené skupinami -NH₂, -CN a další. Tyto stacionární fáze je ale možné využít pro

analýzy prováděné jen v rozmezí pH 2 – 8, což částečně omezuje jejich využití. V poslední době nabývá na významu stabilita kolon i při vyšších pracovních teplotách, kdy lze zpravidla dosáhnout vyšší účinnosti a rychlejší analýzy. Doporučuje se však, aby nebyly kolony zahřívány na teplotu nad 60°C, kdy se zvyšuje nebezpečí degradace stacionární fáze.

5.2.5 Detektory v HPLC ^{/3,4/}

Základní funkcí detektoru je převádění výsledků separace v koloně na registrovatelnou formu. Detektor reaguje na přítomnost analyzované složky a vysílá signál, který je zaznamenáván v závislosti na čase.

Detektory by měly být vysoce selektivní pro stanovované složky směsi, musí mít dostatečnou citlivost (nízký detekční limit) a jeho odezva by měla být lineární funkcí obsahu sledované látky. Průtoková cela detektoru musí vydržet nápor mobilní fáze a udržet těsnost. Důležitá je také univerzálnost – možnost detekce všech oddělených složek vzorku a nezávislost odezvy detektoru na změně mobilní fáze při gradientové eluci.

Přehled nejběžnějších detektorů.^{/4/}

- spektrofotometrické (hlavně v UV/VIS oblasti)
- refraktometrické
- fluorimetrické
- elektrochemické
- hmotnostně spektrometrický

5.3 Validace analytických metod

Validace je potvrzení získané zkoumáním a poskytnutím objektivních důkazů, že požadavky na specifické zamýšlené použití nebo specifickou aplikaci byly splněny. ^{/9/} Validační program slouží ke statistickému prokázání spolehlivosti analytické metody včetně celého obslužného analytického systému. Zjednodušeně řečeno je validace ověření platnosti a spolehlivosti zvoleného analytického systému (metody). ^{/10/}

Předmětem validace je vždy určitá vlastnost (např. koncentrace účinné látky, koncentrace nečistoty, fyzikálně chemický parametr). Validační postup se používá vždy při vývoji nové metody, při převodu analytické metody (např. z publikované validované metody), při kontrole způsobilosti systému a při revalidaci metody. ^{/10/}

Proces validace řeší ICH (International Conference on Harmonization of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use), která usiluje o vytvoření jednotné metodiky a terminologie validačního programu na území EU, Japonska a USA. ^{/9/} V České republice je nejvyšší autoritou pro kontrolní laboratoře SÚKL.

Hlavní validační parametry, které mají být hodnoceny jsou: ^{/9/}

- správnost
- přesnost
 - opakovatelnost
 - intermediární přesnost
- selektivita
- detekční limit
- kvantitativní limit
- linearita
- rozsah
- robustnost

Celý proces zahrnuje testování vhodnosti chromatografického procesu i testování validačních charakteristik, které ověřují kvalitu analytické metody. ^{/9/}

5.3.1 Testování vhodnosti chromatografického systému^{/2,9,10,11,12/}

Test způsobilosti systému představuje nedílnou součást metody a slouží k zajištění přiměřené účinnosti zvoleného chromatografického systému.

5.3.1.1 Opakovatelnost analýzy

Je definována jako těsnost shody výsledků získaných nezávislým měřením standardního roztoku opakovaným použitím téže zkušební metody na identickém materiálu, v téže laboratoři, týmž pracovníkem, za použití týchž přístrojů a zařízení, během krátkého časového rozmezí. Získává se ze šesti až deseti měření standardního roztoku a vyjadřuje se jako odhad relativní směrodatné odchylky s_R (%).^{/9/}

5.3.1.2 Účinnost chromatografické kolony

Účinnost kolony charakterizuje její schopnost separovat složky směsi a vyjadřuje se počtem teoretických pater (N). Čím bude hodnota N vyšší, tím bude kolona účinnější. Použije se následující vzorec, v němž veličiny t_R a $W_{0,05}$ musí být vyjádřeny ve stejných jednotkách:

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

kde t_R je retenční čas (min.) a $W_{0,05}$ je šířka píku v polovině výšky (min.)

5.3.1.3 Asymetrie chromatografických píků

Zvyšováním asymetrie píku roste možnost chyby při výpočtu plochy píku. Faktor symetrie píku (faktor chvostování píku) se vypočítá podle následujícího vzorce:

$$T = \frac{W_{0,01}}{2 \cdot f},$$

kde $W_{0,01}$ je šířka píku ve vzdálenosti 5% výšky píku a f je menší část úsečky $W_{0,01}$, která vznikne protnutím úsečky kolmicí spuštěnou z vrcholu píku

5.3.1.4 Rozlišení chromatografických píků

Rozlišení udává vzdálenost mezi píky dvou složek. Pro výpočet použijeme následující vzorec:

$$R_{ij} = \frac{2 \cdot |t_{Ri} - t_{Rj}|}{W_i + W_j},$$

kde t_R je retenční čas (min.) a W je šířka píku v základně (min.)

Rozlišení větší než 1,5 odpovídá rozdělení píků na základní linii.

5.3.2 Validace analytické metody

5.3.2.1 Přesnost

Přesnost analytické metody určuje blízkost shody (stupeň rozptylu) mezi množstvím výsledků získaných opakovaným měřením homogenního vzorku za předepsaných podmínek. Je obvykle určena jako rozdíl, standardní odchylka či relativní směrodatná odchylka při sérii měření. Přesnost může být hodnocena pomocí opakovatelnosti, intermediální přesnosti a reprodukovatelnosti.

Opakovatelnost vyjadřuje přesnost za zcela stejných operačních podmínek v krátkém časovém intervalu. *Intermediální přesnost* vyjadřuje kolísání v rámci laboratoře (jiný vzorek, přístroj, pracovník). *Reprodukovatelnost* pak vyjadřuje přesnost mezilaboratorní (srovnání výsledků metody z více laboratoří), využívá se ke standardizaci analytické metody.^{/9/}

5.3.2.2 Správnost

Správnost vyjadřuje těsnost shody výsledků měření a skutečné hodnoty měřené veličiny. Jedná se tedy o statisticky významnou rozdílnost mezi získanou a skutečnou hodnotou dané veličiny.

Hodnocením správnosti metody se určuje přítomnost či nepřítomnost náhodné chyby, nejčastěji otestováním odchylky výsledků od správné hodnoty a to buď porovnáním se standardem, s již zavedenou a ověřenou metodou nebo srovnáním s referenčním materiálem (placebem).^{/10/}

Stanovuje se měřením šesti různých vzorků a vyjadřuje se jako rozdíl hodnot nebo jako výtěžnost (recovery), která udává poměr koncentrace analytu získaného danou analytickou metodou k přijaté referenční hodnotě (v %):

$$R_i = 100 \cdot \frac{c_i}{c_0},$$

kde c_0 je vložená koncentrace a c_i je koncentrace stanovená HPLC.

5.3.2.3 Selektivita

Selektivita analytické metody je definována jako schopnost přesného a správného určení analytu i v přítomnosti interferujících látek. Je to tedy schopnost analytické metody jednoznačně stanovit analyzované látky. Metoda stanovení nesmí být rušena pomocnými látkami a dalšími složkami přípravku.

5.3.2.4 Detekční limit

Detekční limit prováděné analyzované metody je vyjádřen jako nejnižší detekovatelné množství analyzované látky ve vzorku, ale neznamená nutné stanovení přesné hodnoty. Odpovídá koncentraci, pro kterou je analytický signál statisticky významně odlišný od šumu na základní linii.

5.3.2.5 Kvantitativní limit

Kvantitativní limit analýzy je parametr kvantitativního rozboru využívaný pro stanovení nejnižší hladiny analytu ve vzorku, které může být určeno s vhodnou přesností a správností. Je využíván zejména pro stanovení nečistot a degradačních produktů.

5.3.2.6 Linearita

Linearita je chápána jako přímková závislost mezi dvěma náhodnými proměnnými, tj. odezvou instrumentace (analytickým signálem) a koncentrací analytu. Je to schopnost analytické metody uvnitř stanoveného rozmezí získat testováním výsledky, které jsou přímo úměrné koncentraci sledované látky ve vzorku.

Pro provedení testu linearit je doporučeno proměřit minimálně 5-6 koncentrací modelového vzorku v rozmezí 80 – 120 % koncentrace deklarovaného obsahu látky. Je vyjádřena grafickými parametry lineární regrese (korelační koeficient, směrnice kalibrační křivky – regresní koeficient).

5.3.2.7 Robustnost

Robustnost analytické metody je míra její kapacity zůstat nedotčený při malé, ale záměrné změně parametrů analytické metody. Poskytuje náznak spolehlivosti analýzy během jejího používání za normálních podmínek. Typická změna parametrů kapalinové chromatografie je změna pH, změna složení MF, změna kolony, rychlosti průtoku MF a teploty.

5.4 Metody současného stanovení paracetamolu, kofeinu a propyfenazonu ^{/13/}

V dostupné literatuře byla nalezena pouze jedna metoda zabývající se současným stanovením paracetamolu, kofeinu a propyfenazonu.

Souhrn parametrů nalezené metody:

Kolona – Nucleosil 100-5 C₁₈, 5μm, 250 x 4,5 mm

Detekce – UV 254nm

Složení mobilní fáze – voda : methanol (20 : 80)

Vnitřní standard - cetrimid

Dávkovaný objem - 10μl

Rychlost průtoku mobilní fáze – 1 ml/min.

Teplota – laboratorní

Příprava vzorku: 20 tablet rozdrtit a zhomogenizovat, množství odpovídající 1 tabletě rozpustit v 0,1 M HCl a doplnit do 100 ml, 30 min. třepat, zfiltrvat a zbytek 3krát promýt 10 ml methanolu a pak doplnit do 100 ml methanolem a tento roztok zředit 1 : 125 methanolem

Izokratický režim

Souhrn parametrů metody, ze které bylo vycházeno:

Kolona – Spherisorb 5 ODS1, 250 x 4,6 mm

Detekce – UV 273 nm

Složení mobilní fáze – fosfátový pufr (1,3g (NH₄)₂HPO₄ v 1000ml vody) : 2-propanol : diethylamin : methanol (50 + 15 + 3 + 32 (v/v))

Dávkovaný objem – 5 μl

Rychlost průtoku mobilní fáze – 0,5 ml/min.

Teplota – 25°C

Příprava vzorku: tablety dobře rozdrtit a zhomogenizovat; navážit 50 mg směsi do 50 ml odměrné baňky a naředit MF po rysku, umístit na 30 min. do ultrazvukové lázně, poté centrifugovat po dobu 30 min., supernatant přímo nadávkovat na kolonu.

Izokratický režim

6 Experimentální část

6.1 Materiály a pomůcky

6.1.1 Chemikálie, standardy, vzorky

Paracetamol, š. 0440713, vz. 78496, Anqiu Pharmaceutical Co Ltd, Čína

Coffeinum anhydricum, š. 200411057, vz. 73854, Jilin Shulan Synt. Pharm. Factory, Čína

Propyphenazonum, š. PPE2391204, vz. 79387, Vani Chemicals, Hyderabad, Indie.

Valetol tabletovina placebo, Zentiva a.s., Praha

4-aminofenol, Riedel de Haën

Valetol tablety š. č. 2230905, Herbacos-Bofarma s.r.o., Pardubice

2-propanol p.a., Penta a.s., Chrudim

Diethylamín p.a., Merck, Darmstadt, SRN

Kyselina fosforečná 85% p.a., š.26-36/37/39-45, Merck, Darmstadt, SRN

Methanol 99.9%, Chromasolv, Sigma Aldrich GmbH, SRN

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

Ether R ČL 2002, č.š. 200705/564, Penta, divize Praha

Chloroform R, LACH-NER, s.r.o., Neratovice

Ledová kyselina octová 98%, LACH-NER, s.r.o., Neratovice

6.1.2 Přístroje, podmínky separace

Kapalinový chromatograf - sestava:

Čerpadlo: LCP 4100, ECOM Praha

Autosampler: Waters 717 plus

UV detektor: Waters 486

Kolona: Hypersil ODS (250 mm x 4.6 mm, 5 µm) kondicionovaná mobilní fází

Dávkování: 5 µl

Detekce: UV 273 nm

Mobilní fáze: Roztok ultračistá voda pro HPLC – 2-propanol – diethylamín – methanol (50 : 15 : 3 : 32, v/v) upraveno kys. fosforečnou na pH 7,5, před použitím se filtruje pomocí filtračního zařízení na mobilní fáze, Millipore, filtr ze skleněných vláken o velikosti pórů 0,45µm.

Průtok: $F_m = 0,5$ ml/min

Izokratický režim

Teplota: laboratorní

Vyhodnocení: chromatografická stanice CSW společnosti DataApex

Ultrazvuková lázeň: Tescon 1, Tesla, ČR

Centrifuga: EBA 21, Hettich Zentrifugen, Germany

Analytické váhy: Sartorius GENIUS, SRN

6.2 Příprava vzorku

Dobře rozdrťme a zhomogenizujeme 10 tablet Valetolu v třecí misce a z této směsi odvážíme přesně 50,00 mg do 50 ml odměrné baňky a doplníme mobilní fází po rysku. Baňku s roztokem umístíme na 30 minut do ultrazvukové lázně a poté je roztok centrifugován po dobu 15 min. při rychlosti 6000 otáček/min. Supernatant je dávkován přímo na kolonu.

6.3 Příprava roztoku standardů

Navážíme přesně 46,00 mg propyfenazonu, 23,00 mg paracetamolu a 7,60 mg kofeinu do 100 ml odměrné baňky a doplníme mobilní fází po rysku.

6.4 Optimalizace chromatografických podmínek

Podstatou optimalizace je volba vhodných podmínek pro analýzu paracetamolu, propyfenazonu a kofeinu v přípravku Valetol tablety.

Při měření se vycházelo z validované metody ke stanovení paracetamolu, propyfenazonu a kofeinu v tabletách využívané v průmyslu (Interní předpis Zentiva Praha a.s.). Metoda je uvedena v literární rešerši. Pro stanovení vhodných podmínek separace byl používán roztok standardních látek.

Po získání optimálních podmínek chromatografie byl proměřen vzorek placebo za stejných podmínek, aby bylo ověřeno, zda se píky tabletového základu nekryjí s píky měřených látek.

6.4.1 Volba vlnové délky detektoru

Optimální vlnová délka byla určena podle proměřených UV spekter paracetamolu, kofeinu a propyfenazonu. Měřeny byly methanolické roztoky těchto látek za použití methanolu jako slepého vzorku. Koncentrace měřených roztoků byla upravena tak, aby se absorbance maximálně pohybovala kolem hodnoty 1,0.

6.4.2 Optimalizace složení mobilní fáze

Jako výchozí mobilní fáze byla testována směs fosfátového pufru, 2-propanolu, diethylaminu a methanolu (50 + 15 + 3 + 32), kterou uváděla výchozí metoda používaná v průmyslu. Použití této metody však bylo po vyzkoušení zamítnuto, protože pH této směsi bylo 13,5, což výrazně převyšuje pH rozmezí povolené pro použitou kolonu.

Proto tedy byla snaha upravit složení MF tak, aby pH bylo vhodné pro použitou kolonu a zároveň byla zachována separační schopnost. Toho bylo dosaženo tak, že místo fosfátového pufru v původní metodě byla použita voda a pH MF se nadále upravilo pomocí kyseliny fosforečné na 7,5.

Použití této MF umožňuje dělení píků na základní linii při zachování vhodných podmínek pro použitou kolonu a při zachování ucházejícího času jedné analýzy. Navíc odpadá problém s používáním anorganických pufrů a s tím související složitě promývání kolony.

6.4.3 Volba dávkovaného objemu vzorku a rychlosti průtoku mobilní fáze

Na základě metody používané v průmyslu byl dávkován vzorek o objemu 5 μ l, který byl shledán optimální. Změna průtoku z 0,5 ml/min. na 1 ml/min. sice přinesla očekávané zkrácení doby jedné analýzy, ale také se snížila účinnost separace projevující se nerozdělením píků paracetamolu a kofeinu na základní linii. Takže optimální průtoková rychlost byla ponechána na 0,5 ml/min.

6.5 Izolace účinných látek – paracetamolu, propyfenazonu a kofeinu

Pro izolaci paracetamolu, propyfenazonu a kofeinu z daného přípravku byl vybrán extrakční postup používaný na katedře analytické chemie FaF, určený pro lékové přípravky ve formě tablet. Účinnost izolace byla dostatečná i pro analyzovaný léčivý přípravek (Valetol).

Při přípravě vzorku se postupuje takto:

K navážené rozdrčené tabletovině umístěné do 50 ml odměrné baňky se přidá MF a doplní se jí po značku. Směs se ponoří na 30 minut do ultrazvukové lázně. Poté se 15 min. centrifuguje při 6000 otáčkách/min. Po nastříknutí do HPLC se analyzuje s MF voda : 2-propanol : diethylamin : methanol (50 + 15 + 3 + 32) pH upraveno kys. fosforečnou na pH 7,5.

6.5.1 Stanovení obsahu paracetamolu, propyfenazonu a kofeinu

1. Připraví se směsný roztok standardů v methanolu s obsahem 23,00 mg paracetamolu, 46,00 mg propyfenazonu a 7,60 mg kofeinu ve 100 ml odměrné baňce. Každý roztok se proměří třikrát.
2. Provedou se 2 nezávislé analýzy vzorku podle kompletního postupu uvedeném v kapitole 6.2. Supernatant odpovídající příslušné navážce vzorku se změří třikrát.
3. Výpočet obsahu paracetamolu, propyfenazonu a kofeinu (%) se provede podle následujícího vzorce:

$$x = \frac{P_{smp} \cdot n_{st} \cdot m}{P_{st} \cdot n_{smp} \cdot 2},$$

kde P_{smp} je plocha pod píkem paracetamolu (kofeinu, propyfenazonu) ve vzorku

P_{st} je plocha pod píkem paracetamolu (kofeinu, propyfenazonu) ve standardu

n_{st} je hmotnost standardu v mg

n_{smp} je hmotnost paracetamolu (kofeinu, propyfenazonu) ve vzorku v mg

m je průměrná hmotnost jedné tablety

x je obsah paracetamolu (kofeinu, propyfenazonu) v jedné tabletě v mg

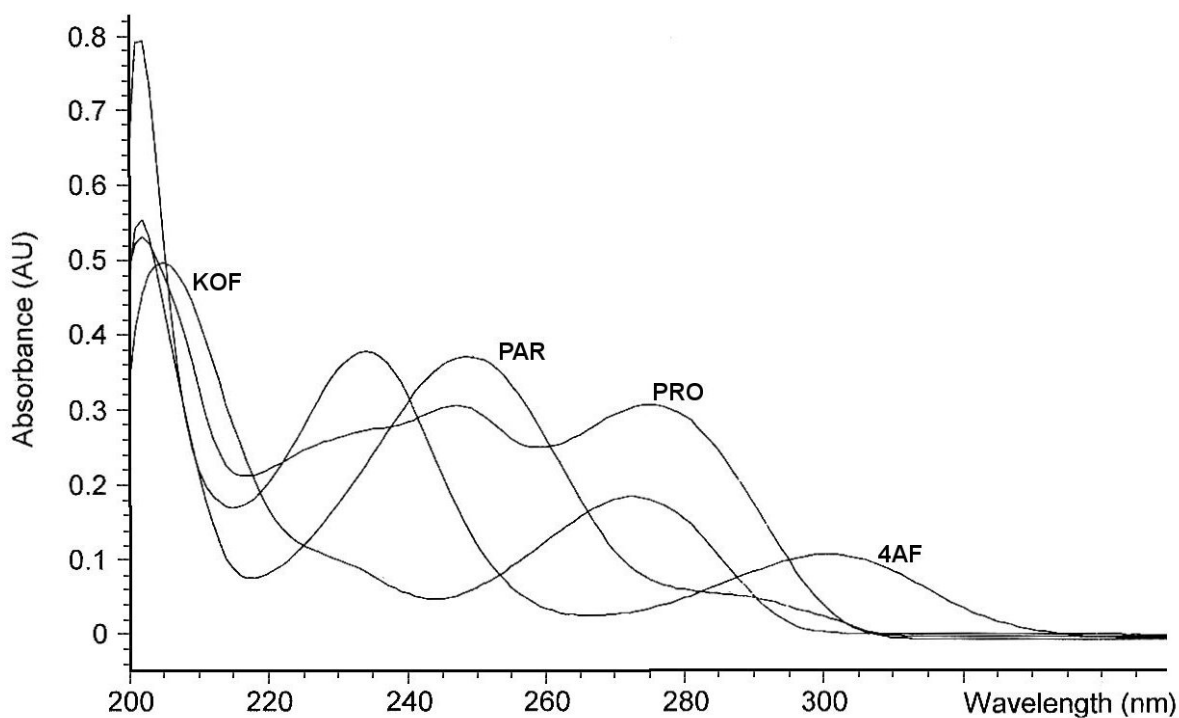
7 Výsledky a diskuze

7.1 Optimalizace chromatografických podmínek

7.1.1 Volba vlnové délky detektoru

Byly proměřeny UV spektra roztoků paracetamolu, propyfenazonu a kofeinu v methanolu, přičemž koncentrace roztoků nebyla přesně definována, jelikož se jednalo zejména o zjištění absorpčních maxim a minim všech látek.

Na obrázku je patrné také čtvrté spektrum, které náleží 4-aminofenolu, což je degradační produkt paracetamolu. To bylo přidáno s ohledem na budoucí práci.



Obrázek 2: UV spektrum paracetamolu, kofeinu, propyfenazonu a 4-aminofenolu v MeOH, nedefinovaná koncentrace

Na základě literární rešerše a proměření absorpčních spekter těchto látek byla zvolena vlnová délka pro HPLC detekci 273 nm. Tato hodnota je kompromisem mezi vlnovými délkami absorpčních maxim paracetamolu (249 nm), propyfenazonu (275 nm) a kofeinu (273 nm).

7.1.2 Optimalizace složení mobilní fáze

Jako výchozí mobilní fáze byla testována směs fosfátového pufru, 2-propanolu, diethylaminu a methanolu (50 + 15 + 3 + 32), kterou uváděla výchozí metoda používaná v průmyslu.

Použití této metody však bylo po vyzkoušení zamítnuto, protože pH této směsi bylo 13,5, což výrazně převyšuje pH rozmezí povolené pro použitou kolonu.

Proto tedy byla snaha upravit složení MF tak, aby pH bylo vhodné pro použitou kolonu a zároveň byla zachována separační schopnost. Toho bylo dosaženo tak, že místo fosfátového pufru v původní metodě byla použita voda a pH MF se nadále upravilo pomocí kyseliny fosforečné na 7,5.

Použití této MF umožňuje dělení píků na základní linii při zachování vhodných podmínek pro použitou kolonu a při zachování ucházejícího času jedné analýzy.

7.1.3 Souhrn optimálních podmínek HPLC

Kolona – ODS Hypersil, 250x4,6mm, velikost částic 5 μ m

Detekce – UV 273 nm

Složení mobilní fáze – voda : 2-propanol : diethylamin : methanol (50 + 15 + 3 + 32)

upraveno kys. fosforečnou na pH 7,5

Dávkovaný objem - 5 μ l

Rychlost průtoku mobilní fáze – 0,5 ml/min.

Teplota – laboratorní

Izokratický režim

7.2 Validace metody

7.2.1 Test vhodnosti chromatografického systému

7.2.1.1 Účinnost chromatografického systému – počet teoretických pater (N)

Účinnost kolony byla ověřena proměřením roztoku standardů v testu na opakovatelnost a výpočet byl proveden z průměrů tří měření podle vzorce:

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

t_R je retenční čas (min.)

$W_{0,05}$ je šířka v polovině výšky (min.)

tabulka 1

Analyzovaná látka	t_R (min)	$w_{0,05}$	N
Paracetamol	5,91	0,15	8278
Kofein	6,79	0,17	8490
Propyfenazon	14,15	0,33	9871

Požadavek – $N > 1500$, je splněn pro všechny tři látky.

7.2.1.2 Asymetrie chromatografických píků (T)

Hodnoty pro ověření asymetrie chromatografických píků byly získány z analýz roztoků standardů pro opakovatelnost. Výpočet byl proveden z průměrů tří měření podle vzorce:

$$T = \frac{W_{0,01}}{2 \cdot f}, \text{ kde}$$

$W_{0,01}$ je šířka píku ve vzdálenosti 5% výšky píku

f je menší část úsečky $W_{0,01}$, která vznikne protnutím úsečky kolmicí spuštěnou z vrcholu píku

tabulka 2

Sloučenina	w _{0,01}	f	Asymetrie (T)
Paracetamol	0,33	0,12	1,39
Kofein	0,38	0,13	1,45
Propyfenazon	0,75	0,27	1,39

Požadavek – asymetrie píků T < 2 byl splněn pro všechny tři látky.

7.2.1.3 Rozlišení chromatografických píků R

Rozlišení bylo vypočítáno z průměru tří hodnot získaných proměřením roztoků standardů při zkoušce opakovatelnosti pomocí tohoto vzorce:

$$R_{ij} = \frac{2 \cdot |t_{Ri} - t_{Rj}|}{W_i + W_j}, \text{ kde}$$

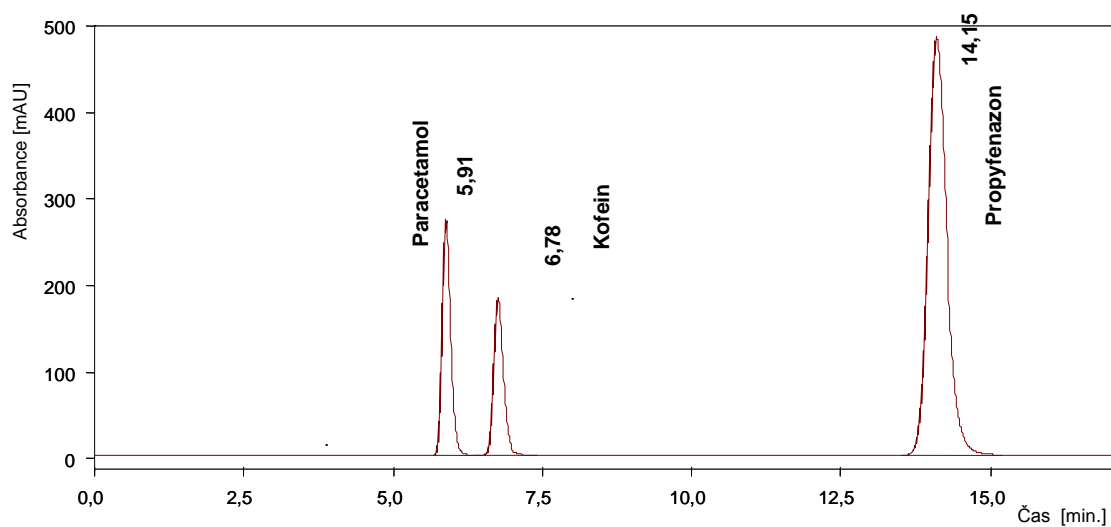
t_R je retenční čas složek (min.)

W je šířka píků na základně (min.)

tabulka 3

Hodnocené látky	R _{ij}
Paracetamol - Kofein	3,13
Kofein - Propyfenazon	17,06

Požadavek – rozlišení píků R_{ij} > 1,5 byl splněn u všech hodnocených chromatografických píků.



Obrázek 3: Rozlišení standardů - rozlišení píků

7.2.1.4 Opakovatelnost analýzy

Byl opakovaně dávkován roztok analyzovaných látek v mobilní fázi o koncentraci:

Paracetamol	23,04 mg/100 ml
Kofein	7,64 mg/100 ml
Propyfenazon	46,04 mg/100 ml

tabulka 4

PARACETAMOL		
Číslo pokusu	Plocha píkú (A)	Retenční čas (t_R) (min)
1	2627	5,91
2	2637	5,91
3	2635	5,91
4	2646	5,91
5	2659	5,92
6	2679	5,92

N	6	6
\bar{x}	2647,2	5,91
S	19,04	0,00
s_R (%)	0,72	0,00

Požadavek – relativní směrodatná odchylka $s_R < 1$ % byla vyhovující.

tabulka 5:

KOFEIN		
Číslo pokusu	Plocha píku (A)	Retenční čas (t_R) (min)
1	2021	6,78
2	2037	6,78
3	2036	6,79
4	2039	6,79
5	2035	6,79
6	2034	6,79

N	6	6
\bar{x}	2033,7	6,79
S	6,44	0,00
s_R (%)	0,32	0,00

Požadavek – relativní směrodatná odchylka $s_R < 1$ % byla vyhovující.

tabulka 6

PROPYFENAZON		
Číslo pokusu	Plocha píku (A)	Retenční čas (t_R) (min)
1	10553	14,15
2	10614	14,15
3	10595	14,17
4	10612	14,18
5	10606	14,18
6	10649	14,18

N	6	6
\bar{x}	10604,8	14,17
S	31,21	0,00
s_R (%)	0,29	0,00

Požadavek – relativní směrodatná odchylka $s_R < 1$ % byla vyhovující.

7.2.2 Validace analytické metody

7.2.2.1 Přesnost

Byly analyzovány roztoky vzorku Valetol HERBACOS-BOFARMA š. č. 2230905, které byly paralelně připravené samostatným postupem uvedeným v kap.6.2. Plochy píků jsou přepočtené na navážku 50,00 mg tabletoviny.

tabulka 7

Roztok č.	Plocha píku (m = 50 mg)		
	Paracetamol	Kofein	Propyfenazon
1	2902	2185	11463
2	3088	2423	11459
3	2889	2267	11315
4	2846	2251	11808
5	2991	2344	11812
6	2793	2323	11063

n	6	6	6
\bar{x}	2918	2299	11487
s	105,96	82,83	289,61
s_R (%)	3,63	3,60	2,52

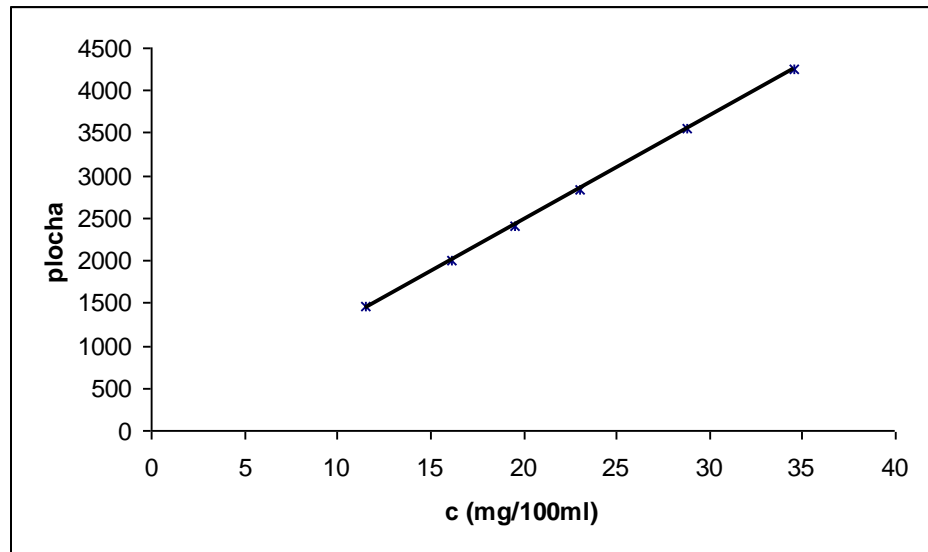
Požadavek – relativní směrodatná odchylka $s_R < 5\%$ byl splněn.

7.2.2.2 Linearita

Byla použita metoda absolutní kalibrace. Bylo připraveno 6 kalibračních roztoků pracovních standardů paracetamolu, kofeinu a propyfenazonu (koncentrace pro každou látku jsou uvedeny v následujících tabulkách – obr. 3, 4, a 5). Plochy píků látek pro každou koncentraci jsou průměrem ze 3 měření a pro další výpočty byl brán průměr z těchto tří hodnot. Závislost absorpance kalibračních roztoků na jejich koncentraci byla vyhodnocena metodou lineární regrese.

PARACETAMOL

c (mg/100 ml)	plocha píku
11,52	1456
16,13	1996
19,58	2406
23,04	2834
28,80	3560
34,56	4244



Obrázek 4: Testování linearity - paracetamol

Regresní funkce : $y = kx + q$

počet: bodů $n =$ 6	počet stupňů volnosti: $\square\square\square v\square = 4$
---------------------	---

Parametry regresní přímky a odhady jejich směrodatných odchylek

směrnice		$k = 121,7118$	$\pm 0,780872$
absolutní člen		$q = 38,56858$	$\pm 18,39897$

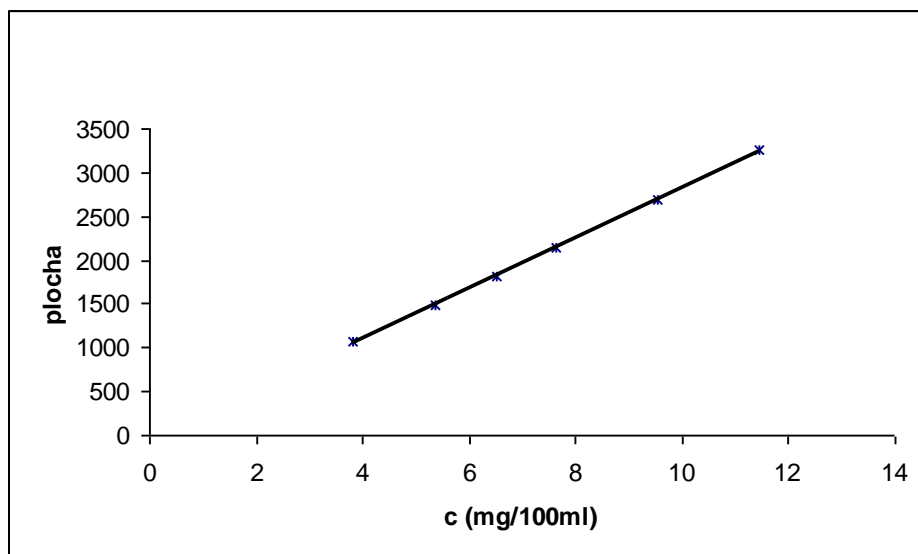
koeficient korelace	$R = 0,999918$
reziduální odchylka	$s_{rez} = 14,70818$

hodnota F-statistiky	$F = 5,48E+4$
Závislost y na x byla prokázána se spolehlivostí 99.9 % .	

Požadavek na linearitu – korelační koeficient $r > 0,9990$ byl splněn.

KOFEIN

c (mg/100 ml)	plocha píku
3,82	1070
5,35	1494
6,50	1819
7,64	2135
9,55	2687
11,46	3251



Obrázek 5: Testování linearity - kofein

Regresní funkce : $y = kx + q$

počet: bodů $n = 6$ počet stupňů volnosti: $\square\square\square v = 4$

Parametry regresní přímky a odhady jejich směrodatných odchylek

směrnice	$k = 285,2976$	$\pm 1,846094$
absolutní člen	$q = -31,39811$	$\pm 14,42571$

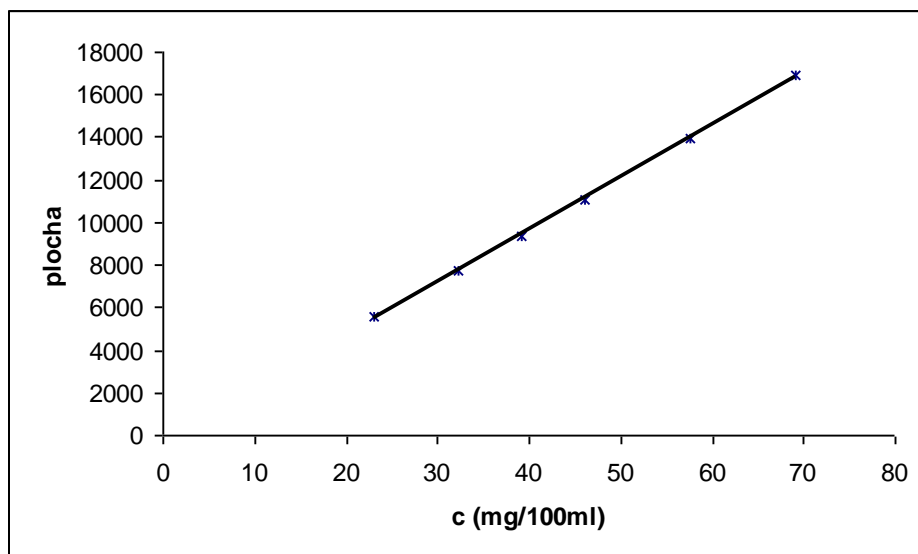
koeficient korelace	$R = 0,999916$
reziduální odchylka	$s_{rez} = 11,5276$

hodnota F-statistiky	$F = 5,48E+4$
Závislost y na x byla prokázána se spolehlivostí 99.9 % .	

Požadavek na linearitu – korelační koeficient $r > 0,9990$ byl splněn.

PROPYFENAZON

c (mg/100 ml)	plocha píku
23,02	5536
32,23	7726
39,13	9381
46,04	11046
57,55	13978
69,06	16914



Obrázek 6: Testování linearity - propyfenazon

Regresní funkce : $y = kx + q$

počet: bodů $n =$	6	počet stupňů volnosti: $\square\square\square$ v $\square =$	4
-------------------	---	--	---

Parametry regresní přímky a odhady jejich směrodatných odchylek

směrnice		$k = 247,3589$	$\pm 2,139786$
absolutní člen		$q = -245,2905$	$\pm 100,7481$

koeficient korelace	$R = 0,99985$
reziduální odchylka	$S_{rez} = 80,53824$

hodnota F-statistiky	$F = 5,48E+4$
Závislost y na x byla prokázána se spolehlivostí 99.9 % .	

Požadavek na linearitu – korelační koeficient $r > 0,9990$ byl splněn.

Kalibrační křivky jsou lineární v rozsahu 11,52 – 34,56 mg/100ml pro paracetamol, 3,82 – 11,46 mg/100ml pro kofein a 23,02 – 69,06 mg/100ml pro propyfenazon.

7.2.2.3 Správnost

Byly změřeny roztoky standardů: $c_o = 23,04$ mg/100 ml (paracetamol), 7,64 mg/100 ml (kofein), 46,04 mg/100 ml (propyfenazon), $n = 3$.

Byly analyzovány modelové vzorky (placebo tabletoviny + paracetamol + kofein + propyfenazon), které byly paralelně připravené samostatným postupem uvedeným v kap.6.2. s přidavkem roztoku standardů o koncentraci c_o .

Výtěžnost R_i byla vypočtena podle vzorce:

$$R_i = 100 \cdot \frac{c_i}{c_o}, \text{ kde}$$

c_o je koncentrace vložená

c_i je koncentrace stanovená HPLC

tabulka 8

Vzorek č. (paracetamol)	C_0 (mg/100 ml) $n=3$	C_i (mg/ 100 ml)	R_i (%)
1	23,04	23,38	101,49
2		23,14	100,46
3		23,55	102,23
4		22,51	97,70
5		22,81	99,01
6		23,29	101,10

$$n = 6$$

$$\bar{x} = 100,33 \%$$

$$s = 1,69$$

$$s_R = 1,68 \%$$

tabulka 9

Vzorek č. (kofein)	C ₀ (mg/100 ml) n= 6	C _i (mg/ 100 ml)	R _i (%)
1	7,64	7,71	100,97
2		7,62	99,77
3		7,80	102,07
4		7,48	97,93
5		7,60	99,45
6		7,74	101,29

$$n = 6$$

$$\bar{x} = 100,25 \%$$

$$s = 1,49$$

$$s_R = 1,49 \%$$

tabulka 10

Vzorek č. (propyfenazon)	C ₀ (mg/100 ml) n= 6	C _i (mg/ 100 ml)	R _i (%)
1	46,04	46,61	101,23
2		45,94	99,79
3		47,10	102,31
4		45,11	97,98
5		45,78	99,44
6		46,64	101,30

$$n = 6$$

$$\bar{x} = 100,34 \%$$

$$s = 1,57$$

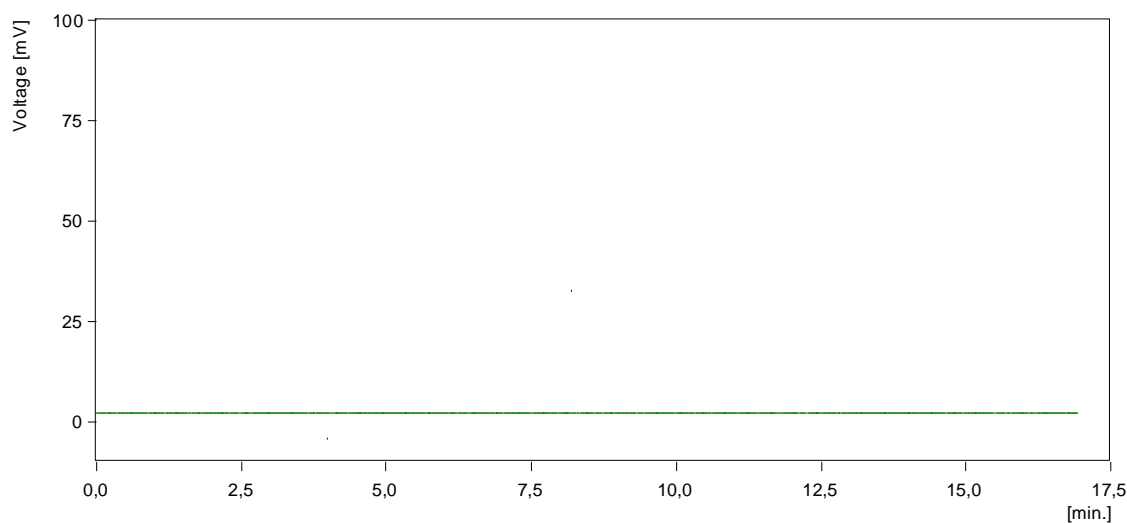
$$s_R = 1,56 \%$$

Požadavek – výtěžnost R v intervalu $100 \pm 5 \%$ vyhovuje. Relativní směrodatná odchylka $s_R < 5 \%$ je splněna u všech tří látek.

7.2.2.4 Selektivita

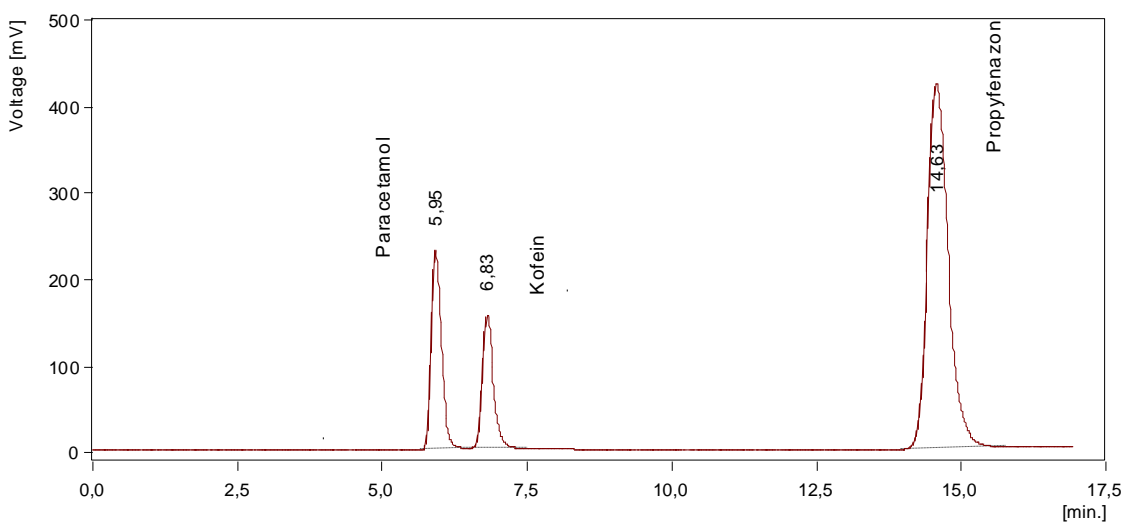
Separace standardních látek paracetamolu ($c = 23,04 \text{ mg}/100 \text{ ml}$), kofeinu ($c = 7,64 \text{ mg}/100 \text{ ml}$) a propyfenazonu ($c = 46,04 \text{ mg}/100 \text{ ml}$) je dokumentována na chromatogramu standardních látek. (viz. obrázek 2, str. 30)

Placebo a přípravek Valetol byly zpracovány dle postupu 6.2. Na chromatogramu placebo (obrázek 7) je patrné, že v retenčních časech odpovídajících sledovaným látkám nejsou přítomny žádné píky interferujících látek.



Obrázek 7: Chromatogram placebo

Na chromatogramu přípravku Valetol (obrázek 8) je patrná dokonalá separace sledovaných látek.



Obrázek 8: Chromatogram přípravku Valetol

Předložená HPLC metoda umožňuje selektivně změřit plochy píků odpovídající účinným látkám paracetamolu, kofeinu a propyfenazonu.

7.2.2.5 Robustnost

Testování míry vlivu proměnných experimentálních podmínek na stanovení obsahu analytů bylo testováno u roztoku o složení:

- paracetamol ($c = 23,04 \text{ mg}/100 \text{ ml}$)
- kofein ($c = 7,64 \text{ mg}/100 \text{ ml}$)
- propyfenazon ($c = 46,04 \text{ mg}/100 \text{ ml}$)

Vliv složení mobilní fáze byl testován při změnách poměru dvou nejvíce zastoupených složek – vodné složky a methanolu a to v poměrech: **60:22, 55:27, 45:37, 40:42**. Ostatní složky byly ponechány beze změny. Každá mobilní fáze byla proměřena třikrát.

- Vliv na plochu chromatografických píků.**

$$A_R = 100 \cdot \frac{A_i}{A_{50:32}}, \text{ kde}$$

A_i - plocha píku za testovaných podmínek

$A_{50:32}$ – plocha píku za standardních podmínek

Byly získány výsledky uvedené v tabulce 11. Relativní plocha píku vztažená na plochu píku při optimálním složení mobilní fáze se pohybovala v rozmezí 97,31% až 104,36%, a proto v uvedeném rozmezí změny v poměru složek mobilní fáze neovlivňují stanovení paracetamolu, kofeinu, ani propyfenazonu.

tabulka 11: Vliv složení mobilní fáze na plochu píku (paracetamol)

Voda pH 7,5 - Me-OH	Paracetamol	
	A_i	$A_R(\%)$
60:22	2680	97,31
55:27	2734	99,27
50:32	2754	100,00
45:37	2758	100,15
40:42	2874	104,36

n = 3; Me-OH – methanol

tabulka 12: Vliv složení mobilní fáze na plochu píku (kofein)

Voda pH 7,5 - Me-OH	Kofein	
	A_i	$A_R(\%)$
60:22	2124	99,86
55:27	2121	99,72
50:32	2127	100,00
45:37	2089	98,21
40:42	2143	100,75

n = 3; Me-OH – methanol

tabulka 13: Vliv složení mobilní fáze na plochu píku (propyfenazon)

Voda pH 7,5 - Me-OH	Propyfenazon	
	A_i	$A_R(\%)$
60:22	10838	98,55
55:27	10944	99,52
50:32	10997	100,00
45:37	10888	99,01
40:42	11181	101,67

n = 3; Me-OH – methanol

b) Vliv na retenční čas, tabulka 14.

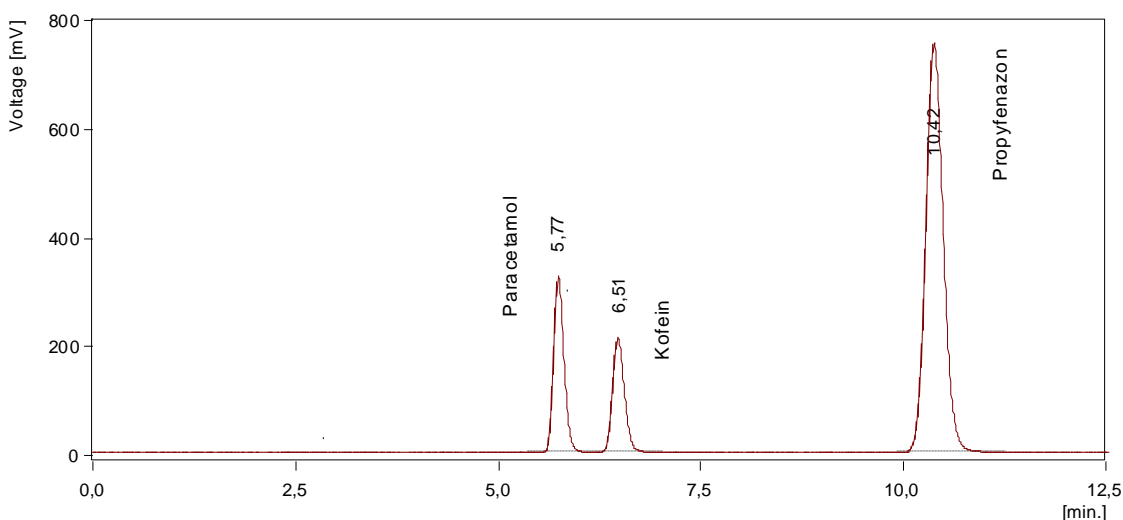
V celém testovacím rozmezí dochází k dokonalé separaci všech složek, ale složení mobilní fáze ovlivňuje trvání analýzy. Z tohoto hlediska je doporučeno použití mobilní fáze voda pH upraveno na 7,5 – 2-propanol – diethylamín – methanol (50 : 15 : 3 : 32, v/v). Na obrázku 9 je znázorněn chromatogram při poměru vodné složky pH 7,5 a methanolu 40 : 42 (krajní hranice testovacího rozmezí, ostatní složky zůstávají konstantní) a jak je zřejmé, separace paracetamolu, kofeinu a propyfenazonu je až k základní linii, pouze dochází ke zkrácení doby analýzy.

Na obrázku 10 je znázorněn chromatogram při poměru vodné složky pH 7,5 a methanolu 60 : 22 (krajní hranice testovacího rozmezí, ostatní složky zůstávají konstantní). Separace paracetamolu, kofeinu a propyfenazonu je až k základní linii, pouze dochází k prodloužení doby analýzy.

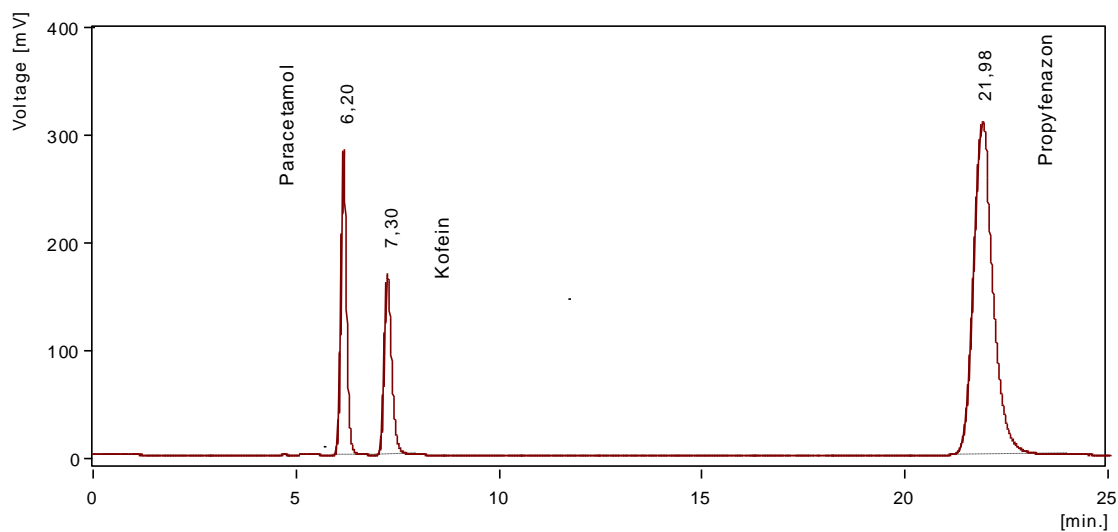
tabulka 14: Vliv složení mobilní fáze na retenční čas (paracetamol, kofein, propyfenazon)

Voda pH 7,5 - Me-OH	t_R (min)		
	Paracetamol	Kofein	Propyfenazon
60:22	6,19	7,27	21,87
55:27	6,09	7,09	17,81
50:32	5,94	6,81	14,31
45:37	5,88	6,69	12,51
40:42	5,76	6,50	10,42

n = 3; Me-OH - methanol



Obrázek 9: Chromatogram separace za podmínky: voda pH 7,5 – 2-propanol – diethylamín – methanol (40 : 15 : 3 : 42, v/v)



Obrázek 10: Chromatogram separace za podmínek: voda pH 7,5 – 2-propanol – diethylamin – methanol (60 : 15 : 3 : 22, v/v)

7.2.2.6 Stabilita

Stabilita roztoku standardních látek v mobilní fázi o koncentraci $c = 22,84 \text{ mg}/100 \text{ ml}$ paracetamolu, $c = 7,54 \text{ mg}/100 \text{ ml}$ kofeinu a $c = 45,74 \text{ mg}/100 \text{ ml}$ propyfenazonu byla testována za uchovávání:

- 1) za snížené teploty ($4 \text{ }^\circ\text{C}$), chráněné před světlem
- 2) za laboratorní teploty, chráněné před světlem

Výsledky uspořádané v tabulce 15, 16 a 17 jsou průměrem ze tří měření.

$$S_T(\%) = \frac{100 \cdot |A_i - A_0|}{A_0}, \text{ kde}$$

t je čas od přípravy roztoku vzorku

A je plocha píku

tabulka 15: Stabilita paracetamolu v roztoku v závislosti na době a způsobu uchovávání (ST)

Paracetamol				
t	A ($4 \text{ }^\circ\text{C}$)	S_T (%)	A ($\approx 20 \text{ }^\circ\text{C}$)	S_T (%)
0	2805	0,00	2805	0,00
24 h	2809	0,14	2807	0,07
48 h	2785	0,71	2796	0,32
72 h	2825	0,71	2799	0,21

$n = 3$

Požadavek S_T (%) < 1 % je splněn a roztok paracetamolu v mobilní fázi je možné používat při uchovávání za snížené teploty nebo laboratorní teploty po dobu 72 hod od jeho přípravy.

tabulka 16: Stabilita kofeinu v roztoku v závislosti na době a způsobu uchovávání (ST)

Kofein				
T	A (4 °C)	S_T (%)	A (≈ 20 °C)	S_T (%)
0	2386	0,00	2386	0,00
24 h	2407	0,88	2408	0,92
48 h	2375	0,46	2391	0,21
72 h	2367	0,80	2364	0,92

n = 3

Požadavek S_T (%) < 1 % je splněn a roztok kofeinu v mobilní fázi je možné používat při uchovávání za snížené teploty nebo laboratorní teploty po dobu 72 hod od jeho přípravy.

tabulka 17: Stabilita propyfenazonu v roztoku v závislosti na době a způsobu uchovávání (ST)

Propyfenazon				
T	A (4 °C)	S_T (%)	A (≈ 20 °C)	S_T (%)
0	11311	0,00	11311	0,00
24 h	11357	0,41	11335	0,21
48 h	11206	0,93	11266	0,40
72 h	11279	0,28	11315	0,03

n = 3

Požadavek S_T (%) < 1 % je splněn a roztok propyfenazonu v mobilní fázi je možné používat při uchovávání za snížené teploty nebo laboratorní teploty po dobu 72 hod od jeho přípravy.

8 Závěr

Byly zpracovány nalezené literární údaje týkající se stanovení paracetamolu, kofeinu a propyfenazonu pomocí metody HPLC.

Byla upravena a validována metoda HPLC určená pro stanovení paracetamolu, kofeinu a propyfenazonu v perorálním přípravku Valetol.

Byly nalezeny tyto optimální chromatografické podmínky metody HPLC s UV detekcí pro stanovení paracetamolu, kofeinu a propyfenazonu:

- *Kolona* – ODS Hypersil, 250x4,6mm, velikost částic 5 μ m
- *Detekce* – UV 273 nm
- *Složení mobilní fáze* – voda : 2-propanol : diethylamin : methanol (50 + 15 + 3 + 32) upraveno kys. fosforečnou na pH 7,5
- *Dávkovaný objem* - 5 μ l
- *Rychlost průtoku mobilní fáze* – 0,5 ml/min.
- *Teplota* – laboratorní
- *Izokratický režim*

Byla testována vhodnost chromatografického systému. Opakovatelnost vyjádřená jako relativní směrodatná odchylka s_R byla nižší než 1%. Účinnost kolony vyjádřená počtem teoretických pater N byla splněna pro všechny tři analyzované látky ($N > 1500$). Asymetrie chromatografických píků vyjádřena faktorem T byla menší než 2. Rozlišení chromatografických píků bylo větší než 1,5.

Byla hodnocena přesnost metody a požadavek na relativní směrodatnou odchylku $s_R < 5\%$ byl splněn.

U testování parametru linearit bylo vyhověno požadavku na hodnotu korelačního koeficientu $R > 0,9990$ pro paracetamol ($R = 0,999918$), pro kofein ($R = 0,999916$) i pro propyfenazon ($R = 0,99985$).

Správnost stanovení je vyjádřena veličinou výtěžnost (R_i). Požadavek, aby se hodnota výtěžnosti R_i pohybovala v rozmezí $100 \pm 5\%$ byl splněn pro všechny tři látky. Její hodnoty

se pohybovaly v intervalu od 97,70 do 102,23% pro paracetamol, od 97,93 do 102,07% pro kofein a od 97,98 do 102,31% pro propyfenazon.

Parametr selektivity byl ověřen porovnáním chromatogramů roztoku standardů, placeba a přípravku Valetol. Separace všech píků je až k základní linii, na chromatogramu placeba nebyl nalezen žádný pík, který by interferoval s píky standardních látek.

Testování robustnosti prokázalo vhodnost mobilní fáze, složené z vody, 2-propanolu, diethylaminu a methanolu (50 + 15 + 3 + 32), která je upravená kys. fosforečnou na pH 7,5. V celém testovacím rozmezí dochází k dokonalé separaci všech složek, ale složení mobilní fáze pouze ovlivňuje trvání analýzy.

Roztoky standardu paracetamolu, kofeinu i propyfenazonu jsou stabilní po 72 hodin od jejich přípravy.

Všechny sledované parametry validace metody vyhovují požadavkům na ně kladeným. Tato metoda může být používána při rutinní kontrole a hodnocení kvality přípravku Valetol.

9 Seznam použité literatury

- 1 Databáze AISLP, mikroverze 2004.3
- 2 Kol. autorů: Český lékopis 2002, Grada, Praha, 2003
- 3 Karlíček R. a kol.: Analytická chemie pro farmaceuty, Karolinum, Praha, 2001
- 4 Klimeš J. a kol.: Kontrola léčiv I., Karolinum, Praha, 2002
- 5 Klouda P.: Moderní analytické metody, nakladatelství Pavel Klouda, Ostrava, 2003
- 6 Lincová D., Farghali H. a kol.: Základní a aplikovaná farmakologie, Galén, Praha, 2002
- 7 Hartl J., Palát K. a kol.: Farmaceutická chemie II., Karolinum, Praha, 1994
- 8 Hartl J., Palát K. a kol.: Farmaceutická chemie III., Karolinum, Praha, 2004
- 9 International Conference on Harmonization (ICH), Q2A: Text on Validation of Analytical Procedures, US FDA Federal Register, Vol. 60, March 1995,
- 10 Douša M.: <http://sweb.cz/HPLC/Suma/Validace.htm>, (cit. 2005-04-22)
- 11 International Conference on Harmonization (ICH), Q2B: Text on Validation of Analytical Procedures, US FDA Federal Register, Vol. 62, March 1997
- 12 Věstník SÚKL 1/1994, SÚKL, Praha, 1994
- 13 Dinç E., Kökdil G., Onur F.: Derivative ratio spectra–zero crossing spectrophotometry and LC method applied to the quantitative determination of paracetamol, propyphenazone and caffeine in ternary mixtures, Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis; Vol. 26, Issues 5 – 6, December 2001, 769-778.