

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



***HPLC stanovení betamethasonu a chloramfenikolu
s využitím alternativních stacionárních fází***

Vedoucí rigorózní práce: RNDr. Dalibor Šatínský, Ph.D.
Vedoucí katedry: Doc. RNDr. Petr Solich, CSc.

Hradec Králové, 2007

Mgr. Markéta Salabová

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

1. OBSAH

1. OBSAH	1
2. ÚVOD	3
3. CÍL	4
4. ZKRATKY	5
5. TEORETICKÁ ČÁST	6
5.1 STANOVOVANÉ LÁTKY.....	7
5.2 METODY STANOVENÍ.....	11
5.3 CHROMATOGRRAFIE.....	12
5.3.1 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie.....	13
5.3.2 Instrumentální vybavení kapalinového chromatografu.....	14
5.3.3 Chromatografické kolony.....	16
5.3.4 Detektory v HPLC.....	19
5.4 VALIDACE ANALYTICKÝCH METOD.....	20
6. PRAKTICKÁ ČÁST	24
6.1 MATERIÁLY A POMŮCKY.....	25
6.1.1 Chemikálie, standardy, vzorky.....	25
6.1.2 Přístroje, podmínky separace.....	25
6.2 PŘÍPRAVA VZORKU.....	26
6.3 PŘÍPRAVA ROZTOKU VNITŘNÍHO STANDARDU	26
6.4 PŘÍPRAVA ZÁSOBNÍHO ROZTOKU STANDARDŮ BE + CL A VNITŘNÍHO STANDARDU PP.....	26
6.5 OPTIMALIZACE CHROMATOGRAFICKÝCH PODMÍNEK.....	27
6.5.1 Volba vlnové délky detektoru.....	27
6.5.2 Výběr vhodné chromatografické kolony.....	28
6.5.3 Optimalizace složení mobilní fáze.....	29
6.5.4 Volba dávkovaného objemu vzorku a rychlosti průtoku mobilní fáze.....	30
6.5.5 Souhrn optimálních podmínek HPLC.....	30
6.6 VALIDACE METODY.....	31
6.6.1 Test vhodnosti chromatografického systému.....	31
6.6.1.1 Účinnost chromatografického systému – počet teoretických pater.....	31
6.6.1.2 Asymetrie chromatografických píků (T).....	31
6.6.1.3 Rozlišení chromatografických píků R_s	32
6.6.1.4 Opakovatelnost analýzy.....	33

6.6.2 Přesnost.....	38
6.6.3 Linearita.....	39
6.6.4 Správnost.....	42
6.6.5 Selektivita.....	44
6.6.6 Robustnost.....	45
6.6.7 Stabilita.....	48
7. ZÁVĚR.....	50
8. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....	53

2. ÚVOD

Farmaceutický přípravek BETABIOPTAL[®] s obsahem účinných látek betamethasonu a chloramfenikolu je užíván jako oftalmologikum k léčbě očních onemocnění vyvolaných mikroby. Betamethason patří ke skupině hormonů tzv. kortikosteroidů. Rychle mírní zánětlivou složku. Chloramfenikol je látka ze skupiny antibiotik, účinkuje proti mikroorganismům.

Účinné látky přípravku BE, CL je možné stanovit, jednou z dominantních analytických separačních metod, kapalinovou chromatografií, jež je využívána ve všech typech analytických laboratoří. Tato metoda je velice vhodnou analytickou metodou pro hodnocení léčivých přípravků pro svoje schopnosti v jednom kroku provést separaci, identifikaci i kvantifikaci všech složek ve směsi. Další výhodou HPLC je vysoká citlivost, univerzálnost analýzy, automatizace a možnost použití, jak pro co nejselektivnější, tak i naopak pro co nejuniverzálnější stanovení. Stejně jako v řadě dalších oborů, i u HPLC vše směřuje ke zkrácení doby analýzy za současného zachování separačních a rozlišovacích vlastností a k snížení spotřeby mobilních fází.

Nejdůležitějším článkem tohoto systému je chromatografická kolona, jichž je nepřeberné množství typů různé délky, velikosti částic či materiálů, odolnosti vůči změnám pH, i vůči změnám teplotním.

3.CÍL

Cílem mojí práce bylo nejprve optimalizovat a následně validovat podmínky pro separaci a stanovení účinných látek (betamethasonu a chloramfenikolu) ve farmaceutickém přípravku (očních kapkách BETABIOPTAL[®]) jednou ze současných nejvíce využívaných analytických technik Vysokouúčinnou kapalinovou chromatografií (HPLC) s UV detektorem. Protože katedra analytické chemie Faf v Hradci Králové mi umožnila ověřit vlastnosti nejrůznějších částicových i monolitních chromatografických kolon, mohla jsem vybrat kolonu s velice výhodnými vlastnostmi pro požadovanou analýzu a tou se stala mikročásticová kolona s velikostí částic 2 μm , původně určená pro MS aplikace.

4. ZKRATKY

BE – betamethason

CL – chloramfenikol

MP – methylparaben

EP – ethylparaben

PP – propylparaben

HPLC – Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (High Performance Liquid Chromatography)

GC – Plynová chromatografie (Gas Chromatography)

CE – Kapilární elektroforéza (Capillary Electrophoresis)

RSD – Relativní směrodatná odchylka

ATB – Antibiotika

A – Absorbance

c – Koncentrace

ČL - Český lékopis

MF – Mobilní fáze

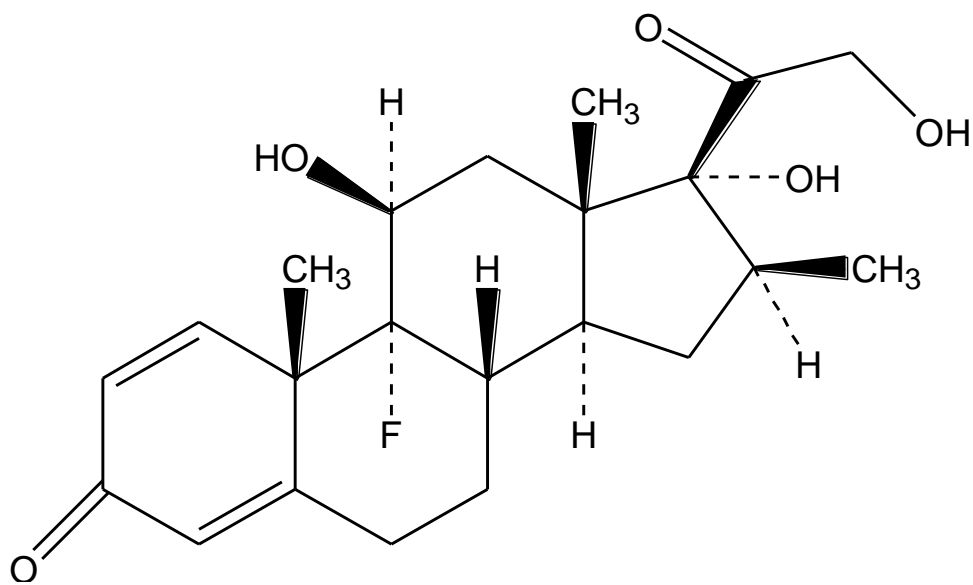
SF - Stacionární fáze

MS – hmotnostní spektrometrie

5. TEORETICKÁ ČÁST

5.1 STANOVOVANÉ LÁTKY ^{1,2,3,4}

BETAMETHASON (9-fluor-11 β ,17,21-trihydroxy-16 β -methylpregna-1,4-dien-3,20-dion)



Obrázek 1 – Vzorec betamethasonu

Sumární vzorec: C₂₂H₂₉FO₅

Molekulová hmotnost: Mr = 392,47

Fyzikálně - chemické vlastnosti: Bílý krystalický prášek. Prakticky nerozpustný ve vodě, mírně rozpustný v ethanolu.

Charakteristika: Betamethason je fluorovaný glukokortikoid prakticky bez mineralokortikoidního efektu. Při lokálním použití působí antiflogisticky, antipruriginózně, antialergicky, vazokonstrikčně a potlačuje tvorbu autoprotiláték.

Farmakokinetika: Korové steroidy jsou malé lipofilní molekuly pronikající přes membrány cílových buněk jednoduchou difúzí. Snadno se vstřebávají z trávicího traktu i z jiných míst aplikace.

Mechanismem účinku je tvorba komplexů se specifickými receptory v cytoplasmě, proniknutí do buněčného jádra, navázání se na DNK (chromatin), stimulace transkripce mRNA a tím syntéza různých enzymů odpovědných za protizánětlivé působení místně aplikovaných glukokortikoidů, které se projevuje inhibicí různých projevů zánětu, jako jsou edémy, odbourávání fibrinu, dilatace kapilár, shromažďování fagocytů v poškozené tkáni a jejich aktivaci. Glukokortikoidy inhibují i pozdější projevy zánětu, jako jsou zmnožení kapilár, depozice kolagenu a vytváření keloidů.

Asi 64 % betamethasonu se váže na plazmatické bílkoviny. Betamethason je metabolizován primárně v játrech a metabolity jsou z větší části vylučovány ledvinami a z menší části žlučí.

Indikace: Je podáván při autoimunitních poruchách, v revmatologii, u dermatóz, u konjunktivitid.

Aplikační způsoby: Perorální i parenterální.

Kontraindikace: Nesmí být použit při nitrooční hypertenzi, virové infekci rohovky, vředové chorobě, artritidě, Cushingově syndromu. O používání přípravků těhotnými a kojícími ženami rozhoduje lékař.

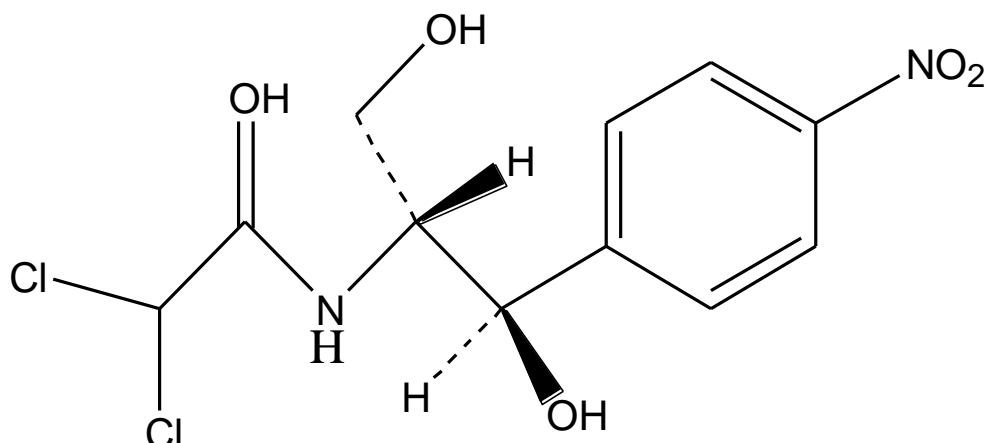
Nežádoucí účinky: Mohou se objevit celkové nežádoucí účinky, jako jsou hyperglykemie, glykosurie a suprese osy hypotalamus – hypofýza - nadledviny, která je reverzibilní a odezní po vysazení léčby přípravkem. Dále se může vyskytnout Cushingův syndrom (kulatý obličej, neobvyklá únava a malátnost, mentální deprese, nepravidelnosti v menstruačním cyklu, pokles libida), retardace růstu, edémy, hypertenze, hypokalemie, deplece bílkovin.

CHLORAMFENIKOL

(2,2-dichlor-N/(1R,2R)-2-hydroxy-1-

(hydroxymethyl) -2- (4-mitrofenyl)ethyl/acetamid

Produkovány určitými kmeny mikroorganismu *Streptomyces Venezuela*, vyrábí se převážně synteticky.



Obrázek 2 – Vzorec chloramfenikolu

Sumární vzorec: $C_{11}H_{12}Cl_2N_2O_5$

Molekulová hmotnost: $M_r = 323,13$

Fyzikálně-chemické vlastnosti: Bílý, našedle nebo nažloutle bílý jemný krystalický prášek nebo jemné krystalky. Je těžce rozpustný ve vodě a v etheru, snadno rozpustný v lihu 96% a v propylenglykolu.

Charakteristika: Širokospektré antibiotikum, tlumící syntézu bakteriálních proteinů, jehož použití je vyhrazeno pouze pro infekce vyvolané citlivými mikroby. G+ (stafylokoky, streptokoky, pneumokoky, enterokoky), G- (meningokoky, gonokoky, hemofily) a některými anaerobními mikroorganismy, které nelze léčit jinými antibiotiky.

Farmakokinetika: Distribuce je dobrá, proniká i do CNS. Metabolizován je v játrech, vylučován ledvinami. Biologický poločas činí asi 4 hod.

Indikace: Je podáván při břišním tyfu a paratyfu, salmonelóze se septickým průběhem, meningitidě, epiglotitidě, při pertussi a parapertussi, závažné infekci s výskytem aerobní a anaerobní flóry (plicní, abdominální,

gynekologické ap.) a u ostatních infekcí, jejichž původce je citlivý pouze na chloramfenikol.

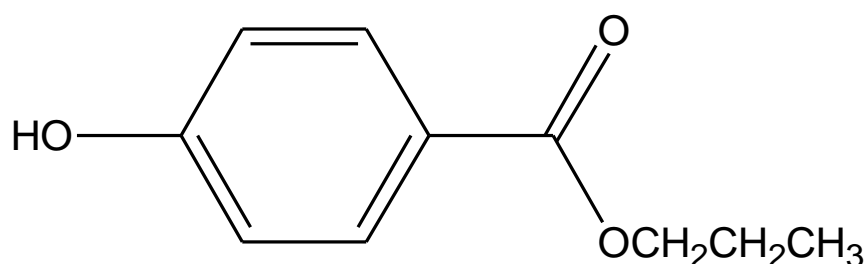
Aplikační způsoby: Perorální i parenterální.

Mechanismus účinku: Inhibuje syntézu proteinů vazbou na 50S ribosomální podjednotku.

Kontraindikace: Nesmí být podán při jaterní nedostatečnosti, při útlumu krvetvorby, po předchozí léčbě ozařováním či cytostatiky. Relativní kontraindikace: současné podávání léků, které mohou poškozovat kostní dřeň (aminofenazon, thiouracil), dále současné podávání tolbutamidu, phenytoinu bez úpravy jejich dávkování.

Nežádoucí účinky: Plastická anemie, útlum kostní dřeně, útlum střevní flóry produkující vitamín K.

PROPYLPARABEN (Propyl-4-hydroxybenzoat)



Obrázek 3 – Vzorec propylparabenu

Sumární vzorec: $C_{10}H_{12}O_3$

Molekulová hmotnost: $M_r = 180,20$

Charakteristika: Bílý krystalický prášek. Je velmi těžce rozpustný ve vodě, snadno rozpustný v lihu 96% a v metanolu. Teplota tání je 96 - 99°C. Protože mají antibakteriální a antifungální účinky, přidávají se jako konzervans do potravin, nápojů, kosmetiky a farmaceutických produktů.

5.2 METODY STANOVENÍ^{1,9,10,11,12,13,14,15,16}

BETAMETHASON

- ⇒ Lékopisné stanovení obsahu dle ČL 2002
0,100 g se rozpustí v lihu 96% R a zředí se jím na 100,0 ml. 2,0 ml tohoto roztoku se zředí lihem 96% R na 100,0 ml. Měří se absorbance (2.2.25) v maximu při 238,5 nm.
Vypočítá se obsah $C_{22}H_{29}FO_5$ za použití specifické absorbance, která má hodnotu 395.
- ⇒ Betamethason může být stanovován pomocí TLC.

CHLORAMFENIKOL

- ⇒ Lékopisné stanovení obsahu dle ČL 2002
0,100 g se rozpustí ve vodě R a zředí se jí na 500,0 ml. 10,0 ml tohoto roztoku se zředí vodou R na 100,0 ml. Měří se absorbance (2.2.25) v maximu při 278 nm.
Vypočítá se obsah $C_{11}H_{12}Cl_2N_2O_5$ za použití specifické absorbance, která má hodnotu 297.
- ⇒ Chloramfenikol může být stanovován potenciometrickou titrací s použitím iontově selektivní elektrody, kapilární elektroforézou, plynovou chromatografií, chemiluminiscencí, imunologickou metodou jako je test ELISA nebo průtokovou metodou FIA.

PROPYLPARABEN

- ⇒ Lékopisné stanovení obsahu dle ČL 2002
K 1,000 g se přidá 20,0 ml hydroxidu sodného 1 mol/l VS, zahřívá se 1 h při asi 70°C a pak se rychle ochladí v ledové lázni. Stejným způsobem se připraví kontrolní roztok. Nadbytek hydroxidu sodného se titruje při pokojové teplotě kyselinou sírovou 0,5 mol/l VS do druhého inflexního bodu za potenciometrické indikace bodu ekvivalence (2.2.20).
1 ml hydroxidu sodného 1 mol/l VS odpovídá 180,2 mg $C_{10}H_{12}O_3$.

Chloramfenikol, betamethason a propylparaben byli současně stanoveny jen pomocí metody SIA ¹⁶.

5.3 CHROMATOGRAFIE ^{5,6,7}

Je separační (dělicí) a současně i analytická metoda, která umožňuje kvalitativní a kvantitativní hodnocení separovaných složek vzorku. V průběhu chromatografického procesu dochází k postupnému, mnohokrát opakovanému vytváření rovnovážných stavů (interakcí) dělených látek mezi stacionární fází (nepohyblivý materiál naplněný v chromatografické koloně nebo tenké vrstvě) a mobilní fází (unáší separované látky). K dělení dochází na základě různé afinity dělených látek k SF a MF.

Objev [chromatografie](#) je připisován M.S. Cvetovi, který v roce 1903 v uspořádání kapalina - adsorbent první rozdělil na sloupci sorbentu listová barviva (chlorofyly a karotenoidy).

Obdobně D.T. Day rozdělil na sloupci některé složky ropy.

Různá hlediska rozdělení chromatografických metod

a/ způsob provedení – kolonové (HPLC, GC), plošné (TLC, PC)

b/ charakter mobilní fáze – chromatografie kapalinová, chromatografie plynová

c/ mechanismus separace –

chromatografie adsorpční - využívá rozdílné adsorpce molekul analytů na povrchu tuhé fáze s aktivními centry

chromatografie rozdělovací - využívá rozdílné rozpustnosti (a tudíž i rozdílné distribuce) molekul analytů mezi dvěma zcela nemísitelnými kapalinami

chromatografie iontově výměnná - využívá rozdílné výměnné adsorpce analytů (iontů) na povrchu iontového měniče

chromatografie gelová - využívá mechanického dělení molekul analytů v pórech gelu na základě jejich rozdílné velikosti.

chromatografie afinitní - využívá činidla kovalentně vázaného na pevném povrchu nosného materiálu

5.3.1 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie ^{5,6,7}

Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (High Performance Liquid Chromatography – HPLC) je dnes jednou z nejvíce využívaných analytických technik. Objevuje se ve všech moderních lékopisných monografiích. Dělení látek probíhá mezi stacionární fází naplněnou v koloně a mobilní fází procházející kolonou určitým průtokem a pod určitým tlakem.

Analyty jsou nejprve rozpuštěny ve vhodném rozpouštědle a poté nadávkovány do chromatografického systému. Ten je velice variabilní díky možnosti ovlivňování jak složení MF tak použití různých typů SF. Pro svoje vlastnosti umožňuje separovat široké množství chemických vzorků různého koncentračního rozmezí, polarit i těkavosti během jedné analýzy.

Rozdílné analyty mají rozdílnou afinitu ke SF, jsou rozdílně distribuovány mezi MF a SF a jsou rozdílně rychle vymývány MF.

Mezi pozitivní vlastnosti HPLC patří rychlost analýzy, citlivost stanovení, minimální množství vzorku, možnost automatizace.

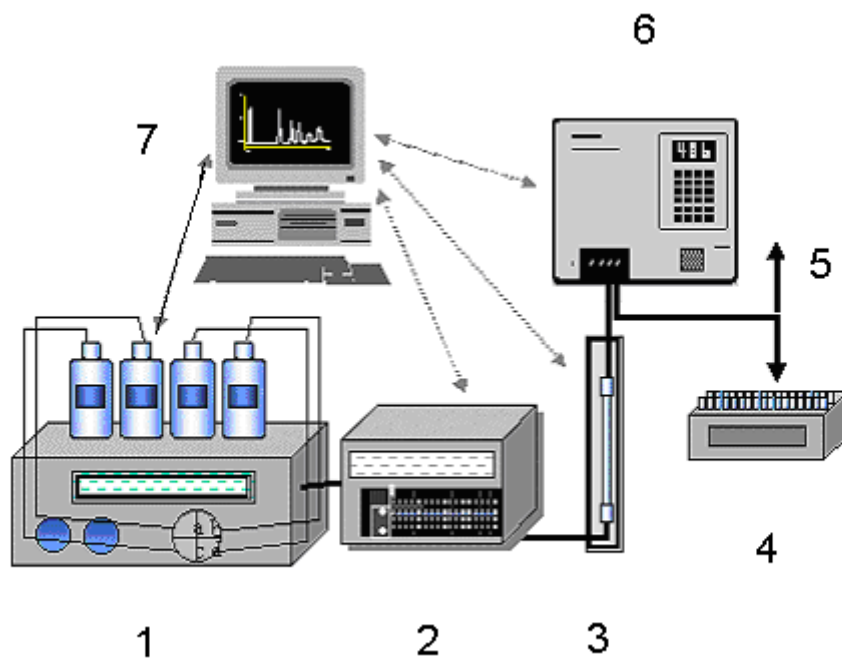
Jako MF se volí běžná rozpouštědla nebo jejich směsi, které postupují kolonou. Vyvíjení se realizuje buď za konstantního složení MF v průběhu celé analýzy – isokratická eluce; nebo se mění složení MF s časem – gradientová eluce. Předpokladem úspěšné HPLC analýzy je optimalizace podmínek chromatografie tak, aby separované látky poskytovaly ostré a symetrické chromatografické píky. Kvalitativní charakteristikou analýzy je retenční čas, kvantitativní údaj udává plocha chromatografického píku stanovované látky porovnávána s plochou píku standardu, který je analyzován za stejných podmínek. Přesnější je metoda

vnitřního standardu (obdobné vlastnosti se vzorkem), kdy se analyzuje standard i sledovaná látka v jednom vzorku za zcela stejných podmínek. Při postupu vzorku kolonou se jednotlivé složky vzorku (analyty) dělí = dospějí do detektoru v různých retenčních časech. Odezva na tento signál je zakreslena jako pík na chromatografickém záznamu – chromatogramu.

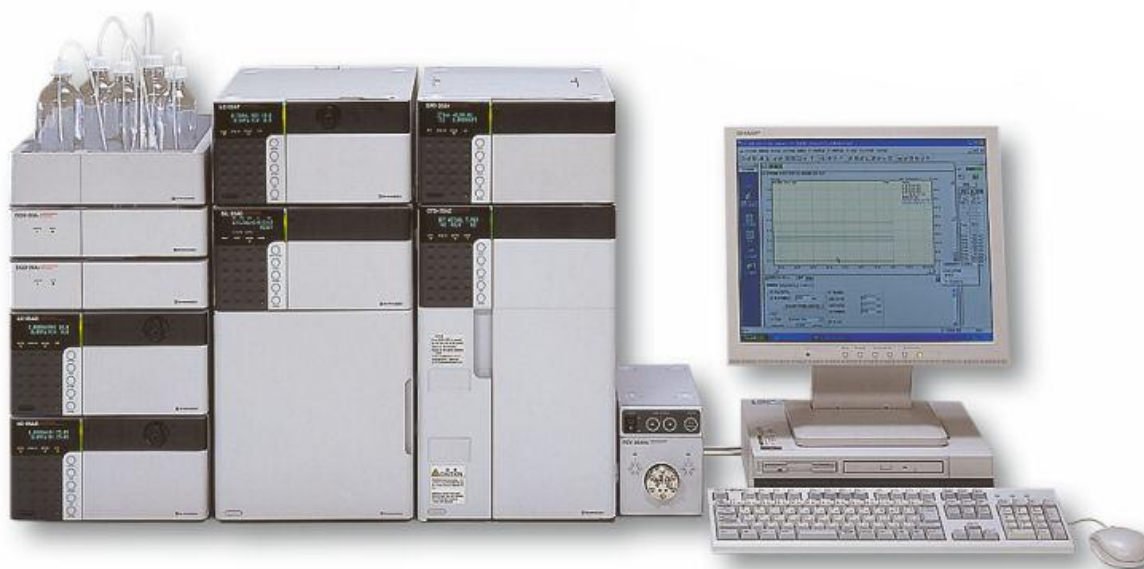
5.3.2 Instrumentální vybavení kapalinového chromatografu ^{5,6,7}

HPLC sestava pro chromatografickou analýzu se obecně skládá z rezervoárů mobilní fáze (ze skla, kovu nebo plastu počet 1 – 3, odplyňovacího zařízení (dříve pomocí ultrazvuku, vakua, He, dnes je přímou součástí přístroje degasser), pumpy (vysokotlaká, bezpulzní, schopná pracovat pod tlakem do 40 MPa a v průtokovém rozmezí 0,1-10 ml/min), dávkovacího zařízení (dnes dávkovací kohout se smyčkou nahrazen autosamplery), předkolony (ochrana hlavní kolony před nečistotami a nerozpustnými materiály), chromatografické kolony (viz.kapitola 5.3.3), detektoru (viz kapitola 5.3.4) a počítače (zpracuje příchozí signál z detektoru + řídí chod celého chromatografu). Toto vybavení umožní nadávkování směsi látek, průtok mobilní fáze, separaci vzorku a následnou detekci se záznamem píků a vyhodnocením dat.

Pro účinnou separaci látek je rozhodující správný výběr kolony a složení mobilní fáze, citlivost a selektivita analýzy je závislá na použitém detektoru.



Obrázek 4 - Schéma HPLC systému - 1. zásobníky mobilní fáze + odplyňovací zařízení, 2. pumpa + dávkovací zařízení, 3. chromatografická kolona, 4. sběrač frakcí, 5. odpad, 6. detektor, 7. PC



Obrázek 5 - Schimadzu LC - 20 AD Prominence Liquid Chromatograph

5.3.3 Chromatografické kolony^{5,6,7,8}

Výběr kolony má rozhodující vliv na kvalitu i délku separace. Variabilitu HPLC systému dohání variabilita chromatografických kolon různé délky, vnitřního průměru a stacionární fáze. Požadavky jsou kladeny na vysokou účinnost, na symetrické píky při separaci polárních, kyselých, bazických či vysokomolárních látek. Dále se vyžaduje stabilita a malý odpor i při vyšších průtocích mobilní fáze.

MONOLITICKÉ KOLONY

Vyvinuté na základě nové sol - gel technologie, což je postup během kterého dochází k polymerizaci nebo polykondenzaci tetraalkylsiloxanů v případě silikagelu. Unikátní dvojí porézní struktura = kombinace makropórů a mezopórů umožňuje rychlý postup mobilní fáze a současně poskytuje dostatečně velký povrch pro adsorpci. Umožňují průtok od 1 ml/min do 9 ml/min při zachování separační účinnosti v co nejkratším čase a s velmi nízkým zpětným tlakem.

Makropóry : Průměrná velikost makropórů je 2 μm . Jejich hustá síť je dobře prostupná pro mobilní fázi. Tím se zvýší průtok a urychlí separace.

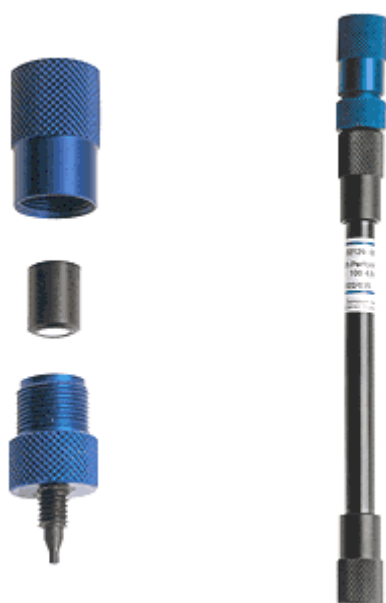


Obrázek 6 – Monolitní silikagel - Makropóry

Mezopóry: Jemná porézní struktura, kde na ploše 13 nm dochází k adsorpci molekul analyzované látky.



Obrázek 6 – Monolitní silikagel - Mezopóry



Obrázek 7 - Monolitní kolona Chromolith™ Flash (100 mm délka) + Předkolony

Přes veškeré výhody monolitických kolon jsou stále ještě vhodnější klasické částicové kolony. Tento jev je zčásti způsoben tím, že monolitní kolony jsou zatím dostupné jen s klasickou náplní reverzní fáze C - 8 a C - 18, která nebývá pro některé aplikace nejvhodnější.

ČÁSTICOVÉ KOLONY

Moderní kolony obsahují malé rigidní porézní částice, čímž je dosaženo větší účinné plochy a vysoké separační účinnosti. Důležitá je přesnost a dobrá reprodukovatelnost průtoků v celém rozsahu pracovních tlaků. Náplň musí být rovnoměrná a homogenní.

Náplně kolon:

- silikagel, oxid hlinitý, oxid zirkoničitý, aktivní uhlí, organické polymery

→ **viz. níže - vázané na povrchu nosiče, jímž je nejčastěji silikagel** (Jedná se o nejpoužívanější materiál pro přípravu stacionárních fází u HPLC. 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. Jeho hlavním omezením je rozpustnost při $\text{pH} > 8$ a hydrolyza při $\text{pH} < 3$. Při vyšší teplotě $> 60^\circ\text{C}$ dochází k jeho degradaci.)

- iontoměniče - NH_4^+ aniontový iontoměnič nebo COO^- kationtový iontoměnič
- chirální stacionární fáze - separace opticky aktivních léčiv
- chemicky vázané stacionární fáze

NORMÁLNÍ FÁZE

- polární SF -OH -NH₂ -CN -NO₂ -(CH₂-CH₂-O)_n-H₂
- nutné použít nepolární MF (chloroform, methylenchlorid, hexan, heptan)

REVERZNÍ FÁZE

- nepolární SF -C₁₈H₃₇ -C₈H₁₇ -C₆H₅
nutné použít polární MF (methanol, H₂O, acetonitril)

Kolony jsou dnes zpravidla zhotoveny nejčastěji z nerezové oceli. Velikost částic stacionární fáze uvnitř kolony se pohybuje od 1,8 μm do 10 μm. Vnitřní průměr kolon od 1 mm (jedná se o mikrokolonu) do 7 mm. Délka kolony se pohybuje od 25 mm (u mikrokolony) do 50 cm a více (preparativní kolona). S rozměrem kolon souvisí i její celková kapacita (se čtvercem průměru kolony roste i množství vzorku, jímž je možno kolonu zatížit).

5.3.4 Detektory v HPLC ^{5,6,7}

Funkcí detektoru je indikovat průtok separované složky detekční celou v závislosti na čase a přenést vhodně upravený signál do počítače. V kapalinové chromatografii existuje široká nabídka detektorů. Podmínkou k použití je splnění požadavků na citlivost (souvisí s mezí detekce) detektoru, na stabilitu, reprodukovatelnost a rychlost odezvy, na lineární závislost odezvy detektoru na koncentraci v širokém koncentračním rozmezí. Detektory mohou být univerzální či selektivní. Níže je uveden přehled nejčastěji používaných detektorů.

1. spektrofotometrické (především UV detektory event. UV/VIS detektory)
2. fluorimetrické
3. elektrochemické
4. refraktometrické
5. hmotnostně spektrometrické

5.4 VALIDACE ANALYTICKÝCH METOD

Účelem validace je demonstrovat, že vypracovaná analytická metoda je pro daný účel vhodná a určit podmínky, při kterých je postup použitelný a zajistit stejnou spolehlivost při opakovaném použití v jedné nebo v různých laboratořích. Validace se provádí při vývoji nové metody, jestliže byla metoda změněna, přenesena do jiné laboratoře nebo při průkazu rovnocennosti dvou metod. V České republice je nejvyšší autoritou pro kontrolní laboratoře SÚKL, který schvaluje validační zprávu.

Test způsobilosti (System Suitability Test)

Nedílnou součástí vývoje analytické metody je ověření vhodnosti systému neboli System Suitability Test. Při něm se zjišťují parametry vhodnosti analytického systému jako celku (přístrojové vybavení, analytické operace a analyzovaný vzorek) ověřením odpovídajících chromatografických parametrů :

- Účinnost chromatografického systému – počet teoretických pater (N)
- Asymetrie chromatografických píků (T)
- Rozlišení chromatografických píků R
- Opakovatelnost (Repeatability) analýzy - je ověření přesnosti metody za stejných podmínek, během jednoho dne, ve stejné laboratoři a stejným pracovníkem. Měla by být určena ve třech koncentracích vždy šesti nástřiky.
 - Intermediární přesnost (Intermediate precision)
Metoda je prováděna jiným analytikem, na jiném přístroji a v jiný den, ale v jedné laboratoři.
 - Reprodukovatelnost (Reproducibility) pak vyjadřuje přesnost mezilaboratorní (srovnání výsledků metody z více laboratoří), využívá se ke standardizaci analytické metody.

Pro hodnocení System Suitability Test se používají roztoky standardních látek, obvykle o koncentraci blízké koncentraci očekávané ve vzorku.

V průběhu validace se obvykle stanovují tyto validační parametry:

Přesnost (Precision)

Přesnost je míra shody mezi jednotlivými výsledky metody opakovaně získanými s jedním homogenním vzorkem. Měla by být určována na třech úrovních: opakovatelnost, intermediární přesnost, reprodukovatelnost. Míra přesnosti je vyjádřena pomocí RSD vždy šesti stanovení.

Linearita (Linearity)

Je to schopnost dávat výsledky přímo úměrné koncentraci stanovované látky ve vzorku. Obvykle se stanovuje pět různých koncentrací v rozmezí 50 - 150 % deklarovaného obsahu. Může se pracovat s roztoky standardů. Popisuje se rovnicí přímky a korelačním koeficientem.

Rozsah (Range)

Představuje koncentrační hranice, v kterých může být metoda používána.

Správnost (Accuracy)

Správnost analytické metody vyjadřuje těsnost shody mezi změřenou hodnotou analytického parametru a referenční hodnotou. Ta je získaná jako přídavek přesného množství standardní látky k placebo. Nebo se výsledek porovnává s dobře charakterizovanou metodou, u které už byla správnost definována. Správnost se obvykle zjistí analýzou šesti vzorků a vyjádří se jako rozdíl správné a získané hodnoty nebo jako výtěžnost.

$$R = 100 \frac{c_i}{c_0}, \text{ kde}$$

c_0 je referenční koncentrace a c_i je koncentrace změřená HPLC.

Selektivita (Specificity)

Selektivita metody je vlastnost změřit správně a specificky danou látku v přítomnosti jiných látek, jež lze očekávat. To mohou být další účinné látky, pomocné látky, nečistoty, rozkladné produkty. Tento parametr se doloží analýzou standardu a též analýzou placebo bez účinné látky.

Limit detekce (LOD)

LOD je nejnižší detekovatelná koncentrace látky, pro kterou je analytický signál statisticky významně odlišný od šumu na základní linii. Zpravidla je definován jako koncentrace látky, jejíž pík je trojnásobně vyšší než šum základní linie (**3 S/N**).

Limit kvantifikace (LOQ)

LOQ je nejnižší stanovitelná koncentrace látky, která může být určena s vhodnou přesností a správností. Zpravidla je definován jako desetinásobek šumu základní linie (**10 S/N**).

Robustnost (Robustness)

Vyjadřuje míru vlivu proměnných podmínek na výsledky analýzy. Cílem je, aby metoda zůstala neovlivněna záměrnou změnou parametrů metody jako je : složení MF, pH vodné složky MF, teplota kolony, rychlost průtoku, rozdíl mezi kolonami různých šarží (výrobců). Důležité je znát stabilitu standardů a analyzovaných vzorků. Vyhodnocení robustnosti nám dává představu o spolehlivosti metody při normálním praktickém používání.

Stabilita (Stability)

Slouží ke zjištění stability pracovních roztoků standardů. Dva zásobní roztoky standardů 100% koncentrace jsou proměřeny v časovém intervalu 0 - 72 hod po 24 hodinách. Jeden je uchováván za pokojové teploty, druhý za snížené teploty.

6.PRAKTICKÁ ČÁST

6.1 MATERIÁLY A POMŮCKY

6.1.1 Chemikálie, standardy, vzorky

- betamethason (BE) 98,0 % (Sigma-Aldrich)
- chloramfenikol (CL) 98,0 % (Sigma-Aldrich)
- propylparaben (PP) 99,0 % (Galena a.s., Opava),
- methanol Chromasolv, for LC (čistota pro gradientovou eluci) (Sigma-Aldrich, Praha)
- acetonitril Chromasolv, for LC (čistota pro gradientovou eluci) (Sigma-Aldrich, Praha)
- kyselina fosforečná 85 % (Merck, Praha)
- deionizovaná voda čištěná Milli - Q systém (Millipore Corp., Bedford, MA)
- oční kapky Betabioptal[®]

6.1.2 Přístroje, podmínky separace

- **Kapalinový chromatograf - sestava:**

Chromatograf : Schimadzu 20AD Prominence Liquid Chromatograph

UV detektor : Schimadzu M 20A Prominence Diode Array Detector

Kolona : Synergi RP Fusion MS (2,00 cm x 2,00 mm, 2 μm)

Dávkování: 5 μl

Detekce : UV 241 nm

Mobilní fáze : Acetonitril/voda (25:75, v/v), před použitím se filtruje pomocí filtračního zařízení na mobilní fáze, Millipore, filtr ze skleněných vláken o velikosti pórů 0,45μm.

Průtok : $F_m = 0,75$ ml/min

Izokratický režim

Teplota : 30° C

- **Ultrazvuková lázeň** : Tescon 1, Tesla, ČR
- **Analytické váhy** : Sartorius GENIUS, SRN

6.2 PŘÍPRAVA VZORKU

Farmaceutický přípravek - oční kapky BETABIOPTAL[®] obsahuje

200 mg betamethasonu a 500 mg chloramfenikolu ve 100 ml. Nejprve bylo převedeno 400 µl vzorku spolu s 2 ml tetrahydrofuranu, s 2 ml methanolu, s 100 µl koncentrované kyseliny fosforečné a s 2 ml roztoku vnitřního standardu PP (c = 800 mg/l) v methanolu do kalibrované 10 ml baňky. Směs byla homogenizována a rozpuštěna 15 min ultrazvukovou vibrací, po rysku doplněna mobilní fází a znovu promíchána. Porovnávací roztok standardů byl připraven stejným postupem, jen místo počátečních 400 µl (vzorku) bylo použito již připravených zásobních roztoků standardů BE (c = 400 mg/l), CL (c = 1000 mg/l) v methanolu a to v objemu 2 ml. Konečná koncentrace analyzovaného vzorku a porovnávacích roztoků standardů byla u BE (c = 80 mg/l), u CL (c = 200 mg/l) a u PP (c = 160 mg/l). Pomocí HPLC byl vždy měřen objem 5 µl vzorku i porovnávacích standardů a byly porovnány plochy jejich píků.

6.3 PŘÍPRAVA ROZTOKU VNITŘNÍHO STANDARDU

Vnitřní standard PP byl připraven rozpuštěním navážky 80 mg látky do 100 ml methanolu.

6.4 PŘÍPRAVA ZÁSOBNÍHO ROZTOKU STANDARDŮ BE + CL A VNITŘNÍHO STANDARDU PP

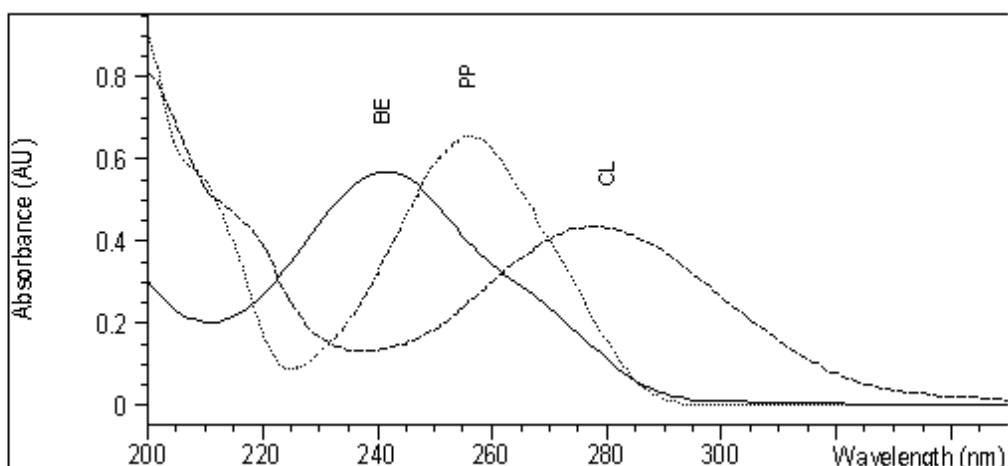
Bylo naváženo 10 mg betamethasonu, 25 mg chloramfenikolu a 20 mg propylparabenu a převedeno do 25 ml baňky. Poté doplněno methanolem po rysku. Pracovní roztoky pro optimalizaci a validaci metody byly připravovány ředěním zásobního roztoku mobilní fází na požadované koncentrace.

6.5 OPTIMALIZACE CHROMATOGRAFICKÝCH PODMÍNEK

Podstatou optimalizace je volba vhodných podmínek pro analýzu chloramfenikolu, betamethasonu ve farmaceutickém přípravku očních kapkách Betabioptalu[®], aby látky ve směsi byly dokonale separovány a detekovány v co nejkratším čase a při splnění podmínek validace. Optimalizace je převážně experimentální proces. Pro stanovení vhodných podmínek separace byl používán roztok standardních látek.

6.5.1 Volba vlnové délky detektoru

Vhodná vlnová délka detekce, která byla následně zvolena jako měřící vlnová délka detektoru na HPLC, při které byl stanoven obsah chloramfenikolu a betamethasonu s pomocí vnitřního standardu propylparabenu ve vzorku, byla zjištěna změřením jejich absorpčních spekter v UV oblasti na spektrofotometru. Měření spekter jednotlivých látek se testovalo při použití mobilní fáze acetonitril/voda (30:80, v/v). Na spektrofotometru byly zjištěny vlnové délky absorpčních maxim jednotlivých látek, tedy vlnové délky, při kterých je měření jejich absorbance nejcitlivější. Po proměření absorpčních spekter těchto látek byla zvolena vlnová délka pro HPLC detekci 241 nm. Tato hodnota je kompromisem mezi vlnovými délkami absorpčních maxim pro roztok betamethasonu při 241nm, pro roztok chloramfenikolu při 278nm, a pro roztok propylparabenu při 256nm.



Obrázek 8 – UV - spektra CL, BE, PP s absorpčními maximy v mobilní fázi acetonitril/voda (30:80, v/v)

6.5.2 Výběr vhodné chromatografické kolony

Byly testovány vlastnosti 5 kolon, kdy za nejvhodnější byla vybrána kolona SYNERGI RP Fusion MS 2 cm × 2 mm, 2 μm.

Přehled testovaných kolon:

DISCOVERY HS F5 10 cm × 4 mm

velikost částic 3 μm - při užití vhodné MF, aby píky neinterferovaly s mrtvým objemem, došlo k nežádoucímu prodloužení analýzy.

Tady bych vždy za každou kolonou doplnil obrázek separace. Pod obrázkem by byl konkrétní popis podmínek mobilní fáze a průtok.....

ZORBAX SB - CN 4,6 cm × 150 mm

velikost částic 5 μm trvala analýza do 4 min, píky symetrického tvaru, dostatečného rozlišení, první pík začínal až za mrtvým objemem, pořadí píků CL, PP, BE.

ZORBAX SB - PHENYL 4,6 cm × 75 mm

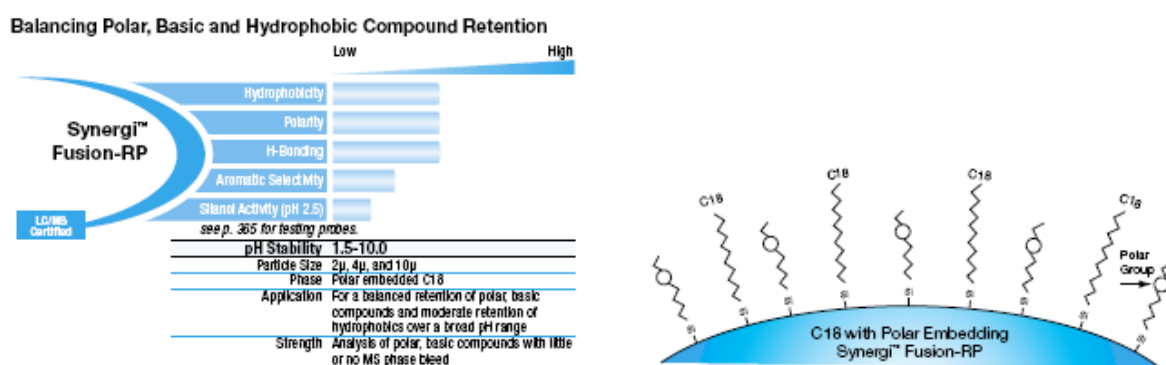
velikost částic 3,5 μm - analýza se prodloužila až k 8 min.

SYNERGI RP Fusion 7,5 cm × 3 mm

velikost částic 4 μm - trvala analýza do 3 min, píky symetrického tvaru, dostatečného rozlišení, první pík začínal až za mrtvým objemem, pořadí píků CL, BE, PP.

SYNERGI RP Fusion MS 2 cm \times 2 mm

velikost částic 2 μm - trvala analýza do 2 min, píky symetrického tvaru, dostatečného rozlišení, první pík začínal až za mrtvým objemem, pořadí píků CL, BE, PP. Pro vlastnosti této kolony, které plně vyhovovaly požadavkům naší analýzy byla pro další měření vybrána tato kolona. Velikou výhodou bylo zkrácení analýzy při zachování kvality měření.



Obrázek 9 – Struktura stacionární fáze kolony Synergi Fusion - RP

6.5.3 Optimalizace složení mobilní fáze

Mobilní fáze je pohyblivou složkou chromatografického systému. Po nástřiku na chromatografickou kolonu unáší analyty a ty jsou podle své afinity buď zadržovány stacionární fází nebo eluovány z chromatografické kolony. Byla vytvořena eluotropická řada rozpouštědel, kde jsou jednotlivá rozpouštědla seřazena podle polarita : pentan, hexan, cyklohexan, ethylether, chloroform, dioxan, tetrahydrofuran, ethylacetát, acetonitril, isopropylalkohol, ethanol, methanol, ethylenglykol, voda. (polarita stoupá od pentanu k vodě).

MF následně použita byla acetonitril/voda (25 : 75, v/v).

6.5.4 Volba dávkovaného objemu vzorku a rychlosti průtoku mobilní fáze

Dávkovaným objemem vzorku byl sledován optimální, vzhledem k rozměrům kolony, objem 5 μ l. Rychlost průtoku MF byla zvolena 0,75 ml/min. Vyzkoušená rychlost 0,5 ml/min a vyzkoušená rychlost 1 ml/min nebyly optimální z důvodu neuspokojivého rozlišení či z důvodu zbytečného prodloužení času analýzy.

6.5.5 Souhrn optimálních podmínek HPLC

Kolona – Synergi RP Fusion MS 2 cm x 2 mm, velikost částic 2 μ m

Detekce – UV 241 nm

Složení mobilní fáze – acetonitril/voda (25:75, v/v)

Dávkovaný objem - 5 μ l

Rychlost průtoku mobilní fáze – 0,75 ml/min.

Teplota – 30° C

Izokratický režim

6.6 VALIDACE METODY

6.6.1 Test vhodnosti chromatografického systému

6.6.1.1 Účinnost chromatografického systému – počet teoretických pater (N)

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

$$N = 5,54 \left(\frac{t_R}{W_{0,05}} \right)^2, \text{ kde}$$

t_R je retenční čas (min.)

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

Požadavek na minimální hodnotu N nebyl pro kolonu těchto rozměrů nalezen

Analyzovaná látka	t_R (min)	$W_{0,05}$	N
Chloramfenikol	0,60	0,08	242
Betamethason	1,13	0,10	798
Propylparaben	1,79	0,12	1107

Tabulka 1 - počet teoretických pater (N)

6.6.1.2 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

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

Sloučenina	$W_{0,01}$	Asymetrie (T)
Chloramfenikol	0,18	1,50
Betametason	0,22	1,34
Propylparaben	0,28	1,38

Tabulka 2 - Asymetrie chromatografických píků (T)

6.6.1.3 Rozlišení chromatografických píků R

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

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

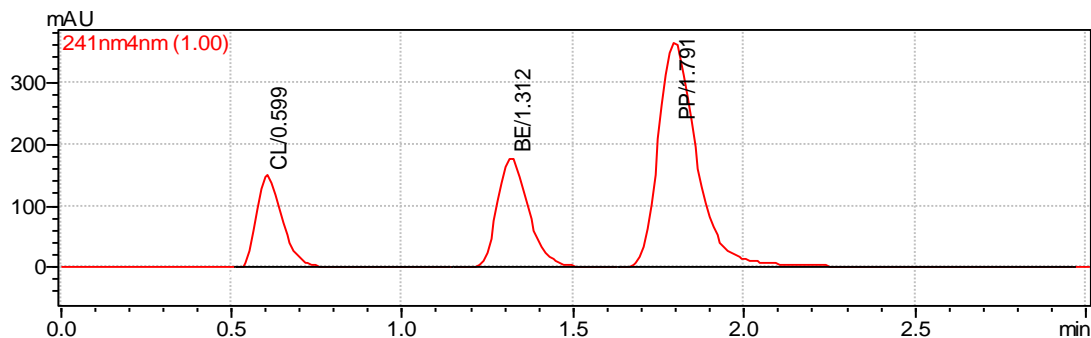
t_R je retenční čas složek (min.)

W je šířka píků na základně (min.)

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

Hodnocené látky	R_{ij}
Chloramfenikol - Betamethason	4,20
Betamethason - Propylparaben	2,39

Tabulka 2 - Rozlišení chromatografických píků R



Obrázek 10 - Rozlišení standardů - rozlišení píků. Kolona SYNERGI RP FUSION 2 cm x 2 mm, velikost částic 2µm, λ = 241nm, MF = acetonitril/voda (25:75, v/v), průtok 0,75ml/min, nástřik 5µl, teplota 30 °C

6.6.1.4 Opakovatelnost analýzy

Byl opakovaně dávkován roztok analyzovaných látek v mobilní fázi o různých koncentracích:

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

CHLORAMFENIKOL koncentrace 80,00 mg/l		
Číslo pokusu	Plocha píku (A)	Retenční čas (t_R) (min)
1	315379	0,59
2	314434	0,59
3	313037	0,60
4	314937	0,59
5	314704	0,60
6	314393	0,60

n =	6	6
\bar{x} =	314480	0,60
s =	795	0,00
s_R (%) =	0,25	0,00

Tabulka 4 - opakovatelnost CL 80,00 mg/l

CHLORAMFENIKOL koncentrace 200,00 mg/l		
Číslo pokusu	Plocha píku (A)	Retenční čas (t_R) (min)
1	792763	0,60
2	793661	0,60
3	793432	0,59
4	793298	0,60
5	793132	0,59
6	793433	0,60

n =	6	6
\bar{x} =	793286	0,60
s =	310	0,00
S_R (%) =	0,04	0,00

Tabulka 5 - opakovatelnost CL 200,00 mg/l

CHLORAMFENIKOL koncentrace 320,00 mg/l		
Číslo pokusu	Plocha píku (A)	Retenční čas (t_R) (min)
1	1260464	0,60
2	1260268	0,60
3	1259802	0,59
4	1259787	0,59
5	1260069	0,59
6	1259201	0,59

n =	6	6
\bar{x} =	1259932	0,59
s =	444	0,00
S_R (%) =	0,04	0,00

Tabulka 6 - opakovatelnost CL 320,00 mg/l

BETAMETHASON koncentrace 32,00 mg/l		
Číslo pokusu	Plocha píku (A)	Retenční čas (t_R) (min)
1	452253	1,30
2	450860	1,29
3	450843	1,30
4	451457	1,30
5	451284	1,30
6	449982	1,30

n =	6	6
\bar{x} =	451113	1,30
s =	757	0,00
S_R (%) =	0,17	0,00

Tabulka 7 - opakovatelnost BE 32,00 mg/l

BETAMETHASON koncentrace 80,00 mg/l		
Číslo pokusu	Plocha píku (A)	Retenční čas (t_R) (min)
1	1142524	1,31
2	1144187	1,30
3	1143730	1,30
4	1142837	1,31
5	1142697	1,31
6	1142778	1,31

n =	6	6
\bar{x} =	1143126	1,31
s =	670	0,00
S_R (%) =	0,06	0,00

Tabulka 8 - opakovatelnost BE 80,00 mg/l

BETAMETHASON koncentrace 128,00 mg/l		
Číslo pokusu	Plocha píku (A)	Retenční čas (t_R) (min)
1	1827300	1,31
2	1825918	1,31
3	1824661	1,30
4	1825423	1,30
5	1825654	1,30
6	1824784	1,30

n =	6	6
\bar{x} =	1825623	1,30
s =	956	0,00
S _R (%) =	0,05	0,00

Tabulka 9 - opakovatelnost BE 128,00 mg/l

PROPYLPARABEN koncentrace 64,00 mg/l		
Číslo pokusu	Plocha píku (A)	Retenční čas (t_R) (min)
1	1166463	1,78
2	1163699	1,78
3	1162467	1,78
4	1165215	1,78
5	1165130	1,78
6	1160226	1,79

n =	6	6
\bar{x} =	1163866	1,78
s =	2254	0,00
S _R (%) =	0,19	0,00

Tabulka 10 - opakovatelnost PP 64,00 mg/l

PROPYLPARABEN koncentrace 160,00 mg/l		
Číslo pokusu	Plocha píku (A)	Retenční čas (t_R) (min)
1	2925641	1,79
2	2932833	1,78

3	2932498	1,79
4	2928142	1,79
5	2929250	1,79
6	2928441	1,79

n =	6	6
\bar{x} =	2929468	1,79
s =	2757	0,00
S _R (%) =	0,09	0,00

Tabulka 11 - opakovatelnost BE 160,00 mg/l

PROPYLPARABEN koncentrace 256,00 mg/l		
Číslo pokusu	Plocha píku (A)	Retenční čas (t_R) (min)
1	4650330	1,78
2	4647739	1,79
3	4649514	1,78
4	4651330	1,77
5	4651454	1,77
6	4645798	1,77

n =	6	6
\bar{x} =	4649361	1,78
s =	2216	0,00
S _R (%) =	0,05	0,00

Tabulka 12 - opakovatelnost BE 256,00 mg/l

6.6.2 Přesnost

Byly analyzovány roztoky vzorku očních kapek BETABIOPTAL[®], které byly paralelně připraveny samostatným postupem uvedeným v kapitole 6.2.

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

Roztok č.	Plocha píku		
	Chloramfenikol	Betamethason	Propylparaben
1	819143	1288186	3097724
2	813065	1290031	3086605
3	811263	1290178	3097983
4	808870	1286739	3062700
5	811250	1284164	3080696
6	807943	1279108	3078581

n =	6	6	6
\bar{x} =	811922	1286401	3084048
s =	3987	4217	13301
s_R (%) =	0,49	0,33	0,43

Tabulka 13 - přesnost

6.6.3 Linearita

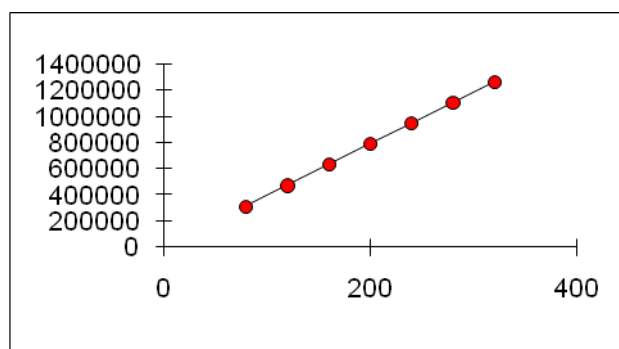
Byla použita metoda absolutní kalibrace. Bylo připraveno 6 kalibračních roztoků pracovních standardů chloramfenikolu, betamethasonu a propylparabenu (koncentrace pro každou látku jsou uvedeny v následujících tabulkách – obr 10,11,12.). Plochy píků látek pro každou koncentraci jsou průměrem ze 3 měření a pro další výpočty byl brán průměr z těchto tří hodnot. Závislost absorbancí kalibračních roztoků na jejich koncentraci byla vyhodnocena metodou lineární regrese.

CHLORAMFENIKOL

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

Osa x-c (mg/l)	Osa y-Plocha píku
80,00	314283
120,00	471903
160,00	637029
200,00	793285
240,00	948171
280,00	1105216
320,00	1260178

Tabulka 14 - Linearita CL



Obrázek 11 - Graf -Testování linearity – chloramfenikol

Statistické parametry pro regresi : $y = kx + q$		
Počet bodů	n = 7	Odhad chyby
Směrnice	k = 3942,369	□ 15,82121
Abs. člen	q = 1535,536	□ 3407,992
Korelační koef.	r = 0,99996	
Reziduální odch.	s = 3348,718	

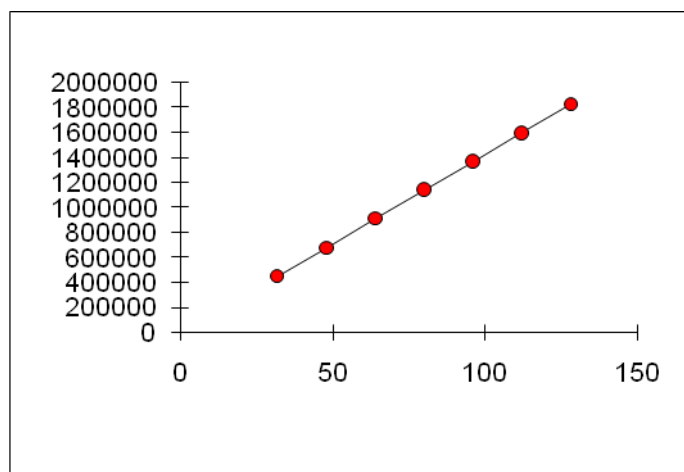
Tabulka 15 - Linearita CL

BETAMETHASON

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

Osa x-c (mg/l)	Osa y- Plocha píku
32,00	451319
48,00	677798
64,00	915411
80,00	1143480
96,00	1368655
112,00	1597617
128,00	1825960

Tabulka 16 - Linearita BE



Obrázek 12 - Graf - Testování linearity – betamethason

Statistické parametry pro regresi : $y = kx + q$		
Počet bodů	$n = 7$	Odhad chyby
Směrnice	$k = 14323,23$	$\square 38,29674$
Abs. člen	$q = -5823,75$	$\square 3299,748$
Korelační koef.	$r = 0,999982$	
Reziduální odch.	$s = 3242,357$	

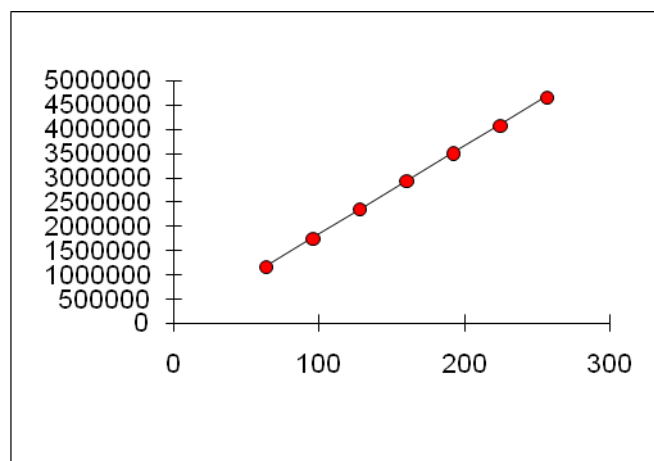
Tabulka 17 - Linearita BE

PROPYLPARABEN

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

Osa x-c (mg/l)	Osa y- Plocha píku
64,00	1164210
96,00	1746098
128,00	2352092
160,00	2930324
192,00	3501109
224,00	4071109
256,00	4649194

Tabulka 18 - Linearita PP



Obrázek 13 - Graf - Testování linearity – propylparaben

Statistické parametry pro regresi : $y = kx + q$		
Počet bodů	n = 7	Odhad chyby
Směrnice	k = 18156,75	□ 71,73106
Abs. člen	q = 12257,46	□ 12361,07
Korelační koef.	r = 0,999961	
Reziduální odch.	s = 12146,08	

Tabulka 18 - Linearita PP

Kalibrační křivky jsou lineární v rozsahu 80,00 mg/l – 320,00 mg/l pro chloramfenikol, 32,00 mg/l – 128,00 mg/l pro betamethason a 64,00 mg/l – 256,00 mg/l pro propylparaben.

6.6.4 Správnost

Byly změřeny roztoky standardů: $c_0 = 200,00$ mg/l (chloramfenikol), $c_0 = 80,00$ mg/l (betamethason), $c_0 = 160,00$ mg/l (propylparaben), $n = 3$.

Byly analyzovány modelové vzorky (placebo očních kapek), které byly paralelně připraveny samostatným postupem kapitola 6.2. s přidavkem roztoku standardů o koncentraci c_0 kapitola 6.4.

Výtěžnost R_i byla vypočtena podle vzorce:

$$R = 100 \frac{c_i}{c_0}, \text{ kde}$$

c_0 je koncentrace vložená

c_i je koncentrace stanovená HPLC

Požadavek – výtěžnost R v intervalu 100 ± 5 % vyhovuje. Relativní směrodatná odchylka $s_R < 5$ % byl splněn u všech tří látek.

Vzorek č. (chloramfenikol)	C ₀ (mg/l)	C _i (mg/ l)	R _i (%)
1	200,00	199,18	99,59
2		199,17	99,58
3		198,75	99,37
4		197,58	98,79
5		198,18	99,09
6		196,90	98,45

$$n = 6$$

$$\bar{x} = 99,15 \%$$

$$s = 0,46$$

$$S_R = 0,46 \%$$

Tabulka 19 - Správnost CL

Vzorek č. (betamethason)	C ₀ (mg/l)	C _i (mg/l)	R _i (%)
1	80,00	79,84	99,80
2		79,96	99,95
3		79,84	99,81
4		79,38	99,22
5		79,59	99,49
6		79,22	99,03

$$n = 6$$

$$\bar{x} = 99,55 \%$$

$$s = 0,37$$

$$S_R = 0,37 \%$$

Tabulka 20 - Správnost BE

Vzorek č. (propylparaben)	C ₀ (mg/l)	C _i (mg/ l)	R _i (%)
1	160,00	159,70	99,81
2		160,08	100,05
3		159,57	99,73
4		158,92	99,33
5		159,33	99,58
6		159,01	99,38

$$n = 6$$

$$\bar{x} = 99,65 \%$$

$$s = 0,27$$

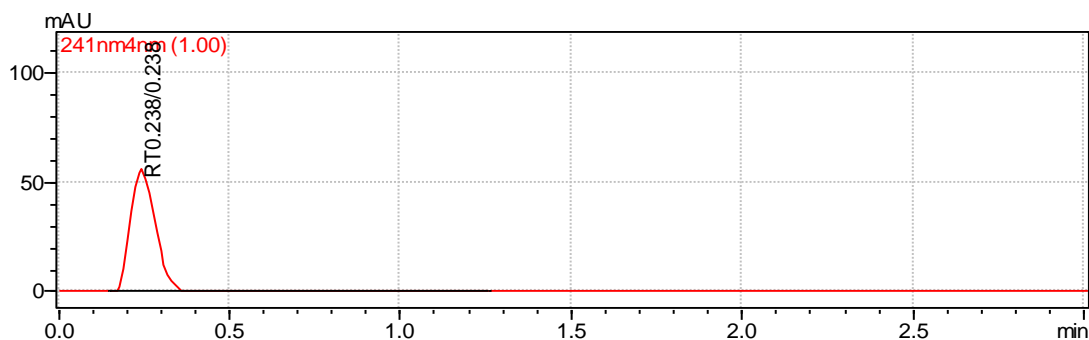
$$s_R = 0,27 \%$$

Tabulka 21 - Správnost PP

6.6.5 Selektivita

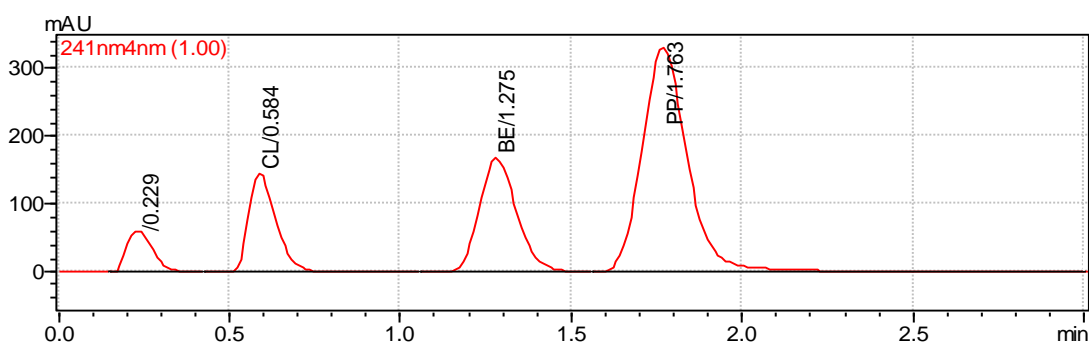
Separace standardních látek chloramfenikolu ($c = 200 \text{ mg/l}$), betamethasonu ($c = 80 \text{ mg/l}$) a propylparabenu ($c = 160 \text{ mg/l}$) je dokumentována na chromatogramu standardních látek. (viz. Obrázek 9 str. 31)

Placebo a přípravek BETABIOPTAL[®] byly zpracovány dle postupu 6.2. Na chromatogramu placebo (obrázek 13) je patrné, že v retenčních časech odpovídajících sledovaným látkám nejsou přítomny žádné píky interferujících látek.



Obrázek 14 - Chromatogram placeba. Kolona SYNERGI RP FUSION 2 cm × 2 mm, velikost částic 2 μm, λ = 241 nm, MF = acetonitril/voda (25:75, v/v), průtok 0,75 ml/min, nástřik 5 μl, teplota 30 °C

Na chromatogramu přípravku BETABIOPTAL[®] (obrázek 14) je patrná dokonalá separace sledovaných látek.



Obrázek 15 - Chromatogram přípravku očních kapek BETABIOPTAL[®]. Kolona SYNERGI RP FUSION 2 cm × 2 mm, velikost částic 2 μm, λ = 241 nm, MF = acetonitril/voda (25:75, v/v), průtok 0,75 ml/min, nástřik 5 μl, teplota 30 °C

6.6.6 Robustnost

Testování míry vlivu proměnných experimentálních podmínek na stanovení obsahu analytů bylo testováno u roztoku o složení chloramfenikol (c = 200 mg/l), betamethason (c = 80 mg/l), propylparaben (c = 160 mg/l).

Vliv složení mobilní fáze byl testován při změnách poměru acetonitrilu a vodné složky **15:85, 22:78, 30:70, 33:67**. Každá mobilní fáze byla proměřena třikrát.

a) Vliv na plochu chromatografických píků.

$$A_R = 100 \frac{A_i}{A_{25:75}}, \text{ kde}$$

A_i - plocha píku za testovaných podmínek

$A_{25:75}$ – plocha píku za standardních podmínek

Byly získány výsledky uvedené v tabulkách 22, 23, 24. Plocha píku vztažená na plochu píku při optimálním složení mobilní fáze se pohybovala v rozmezí 96,84 % až 104,84 %, a proto v uvedeném rozmezí změny v poměru složek mobilní fáze neovlivňují stanovení chloramfenikolu, betamethasonu ani propylparabenu.

acetonitril/voda	chloramfenikol	
	A_i	$A_R(\%)$
15:85	782777	98,98
22:78	791995	100,14
30:70	789065	99,77
33:67	774170	97,85

n = 3 **Tabulka 22 - Vliv složení mobilní fáze na plochu píku - CL**

acetonitril/voda	betamethason	
	A_i	$A_R(\%)$

15:85	1104483	96,84
22:78	1115979	97,85
30:70	1159092	101,63
33:67	1195886	104,85

n = 3 **Tabulka 23 - Vliv složení mobilní fáze na plochu píku - BE**

acetonitril/voda	propylparaben	
	A_i	A_R(%)
15:85	2852703	98,45
22:78	2855294	98,54
30:70	2958212	102,09
33:67	3019079	104,19

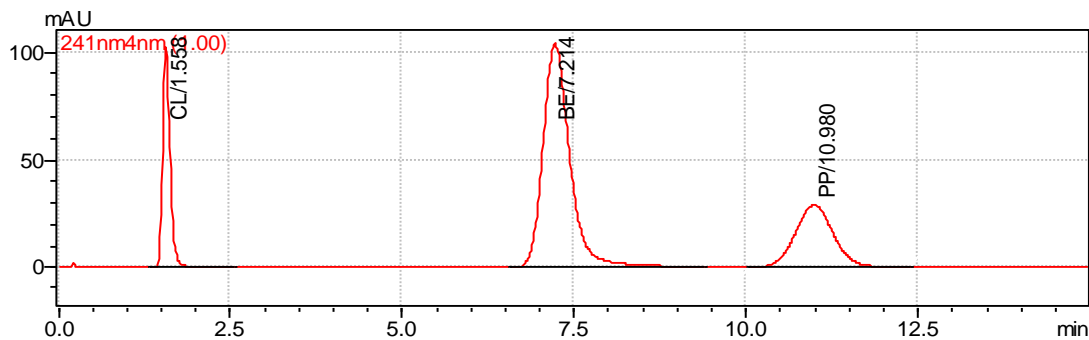
n = 3; **Tabulka 24 - Vliv složení mobilní fáze na plochu píku - PP**

b) Vliv na retenční čas, tabulka 25

Acetonitril/voda	t_R (min)		
	chloramfenikol	betamethason	propylparaben
15:85	1,55	10,98	7,21
22:78	0,74	2,17	5,26
30:70	0,44	0,70	1,07
33:67	0,39	0,55	0,83

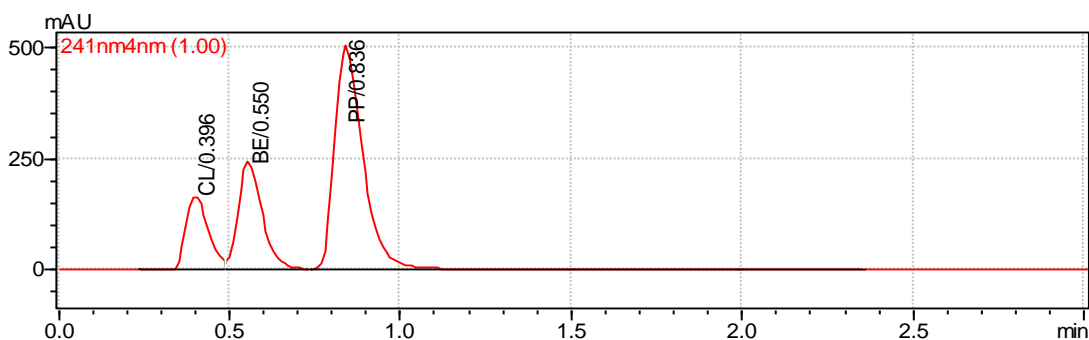
n = 3; **Tabulka 25 - Vliv složení mobilní fáze na plochu píku - CL, BE, PP**

Při použití mobilní fáze acetonitril/voda (15:85, v/v) došlo k dokonalé separaci jednotlivých složek, pouze doba analýzy se prodloužila (obrázek 15)



Obrázek 16 - Chromatogram separace za podmínek Kolona SYNERGI RP FUSION 2 cm × 2 mm, velikost částic 2 μm, λ = 241 nm, MF = acetonitril/voda (15:85, v/v), průtok 0,75 ml/min, nástřik 5 μl, teplota 30 °C

Na obrázku 16 je znázorněn chromatogram při použití mobilní fáze acetonitril/voda (33:67, v/v). Analýza se značně urychlila. Separace CL a BE neproběhla až na základní linii, píky však vykazovaly rozlišení větší než 1,5 a mohly být kvantifikovány s chybou menší než ± 5%.



Obrázek 17 - Chromatogram separace za podmínek Kolona SYNERGI RP FUSION 2 cm × 2 mm, velikost částic 2 μm, λ = 241 nm, MF = acetonitril/voda (33:67, v/v), průtok 0,75 ml/min, nástřik 5 μl, teplota 30 °C

6.6.7 Stabilita

Stabilita roztoku standardních látek v mobilní fázi o koncentraci $c = 200,00$ mg/l chloramfenikolu, $c = 80,00$ mg/l betamethasonu a $c = 160,00$ mg/l propylparabenu byla testována za:

- 1) za snížené teploty (4 °C)
- 2) za laboratorní teploty,

Výsledky uspořádané v tabulkách 26, 27, 28 jsou vždy průměrem ze tří měření.

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

t je čas od přípravy roztoku vzorku

A je plocha píku

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

Chloramfenikol				
T	A (4 °C)	S_T (%)	A (≈ 20 °C)	S_T (%)
0 h	793285	0,00	793285	0,00
24 h	785517	0,98	790883	0,30
48 h	791387	0,24	793322	0,01
72 h	785435	0,99	791679	0,20

n = 3 Tabulka 26 - Stabilita CL v roztoku v závislosti na době a způsobu uchovávání (ST)

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

Betamethason				
T	A (4 °C)	S_T (%)	A (≈ 20 °C)	S_T (%)
0 h	1143480	0,00	1143480	0,00
24 h	1140783	0,24	1140545	0,26
48 h	1145444	0,17	1152388	0,78
72 h	1141152	0,20	1152851	0,82

n = 3 Tabulka 27 - Stabilita BE v roztoku v závislosti na době a způsobu uchovávání (ST)

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

Propylparaben				
T	A (4 °C)	S_T (%)	A (≈ 20 °C)	S_T (%)
0 h	2930324	0,00	2930324	0,00
24 h	2919447	0,37	2932090	0,06
48 h	2909272	0,72	2922807	0,26
72 h	2916082	0,49	2947335	0,58

n = 3. Tabulka 27 - Stabilita PP v roztoku v závislosti na době a způsobu uchovávání (ST)

7.ZÁVĚR

Byl vypracován postup separace a následného stanovení betamethasonu a chloramfenikolu ve farmaceutickém přípravku v očních kapkách BETABIOPTAL[®]. Analýza probíhala za použití mobilní fáze acetonitril/voda (25:70, v/v), s nastavenou rychlostí průtoku 0,75 ml/min, za teploty 30° C, s nástřikem 5 µl v isokratickém režimu a vlnovou délkou detekce 241 nm. Vnitřním standardem s podobnými vlastnostmi jako obě účinné látky byl zvolen propylparaben. Po ověření vlastností kolon

DISCOVERY HS F5 10 cm × 4 mm, s velikostí částic 3 µm

ZORBAX SB - CN 4,6 cm × 150 mm, s velikostí částic 5 µm

ZORBAX SB - PHENYL 4,6 cm × 75 mm, s velikostí částic 3,5 µm

SYNERGI RP Fusion 7,5 cm × 3 mm, s velikostí částic 4 µm

SYNERGI RP Fusion MS 2 cm × 2 mm, s velikostí částic 2 µm,

byla vybrána pro požadovanou analýzu kolona **SYNERGI RP Fusion MS 2 cm × 2 mm**, s velikostí částic 2 µm, jež rozseparovala CL, BE, PP. Píky měly dostatečné rozlišení i symetrický tvar a jedna analýza trvala do 2 min při zachování kvality měření (přesnosti a spolehlivosti). Tento výsledek předčil naše očekávání.

Optimalizovaná metoda byla před vlastním měřením validována, což dokládají následující údaje.

Nejprve byla testována vhodnost chromatografického systému.

Účinnost kolony byla vyjádřena počtem teoretických pater N.

Asymetrie chromatografických píků vyjádřena faktorem T byla menší než 2. Požadavek byl splněn.

Rozlišení chromatografických píků bylo větší než 1,5. Požadavek byl splněn.

Opakovatelnost měření byla zkoumána u šesti nástřiků každé látky při koncentracích 40 %, 100 % a 160 %. Z odezvy signálu píků jednotlivých látek byla vypočítána relativní směrodatná odchylka (RSD) stanovení

jednotlivých látek pro jednotlivé koncentrace, která nepřesáhla 0,25 % u CL, 0,17 % u BE a 0,19 % u PP a tím splnila požadavek = relativní směrodatná odchylka $s_R < 1 \%$ a tedy byla vyhovující.

Opakovatelnost měření pro retenční časy za stejných podmínek vykazovala relativní směrodatnou odchylku (RSD) 0,00 %.

Přesnost systému pro stanovení šesti vzorků vykazovala relativní směrodatnou odchylku 0,49 % u CL, 0,33 % u BE a 0,43 % u PP. Požadavek – relativní směrodatná odchylka $s_R < 5\%$ byl splněn.

Lineární odezvu absorbance u koncentrací 32 mg/l – 128 mg/l pro betamethason, 80 mg/l - 320 mg/l pro chloramfenikol a 64 mg/l -256 mg/l pro propylparaben charakterizuje korelační koeficient větší než 0,999. Požadavek na linearitu – korelační koeficient $r > 0,9990$ byl splněn.

Správnost stanovení je vyjádřena veličinou **výtěžnost** (R_i). Požadavek na výtěžnost R v intervalu $100 \pm 5 \%$ a relativní směrodatná odchylka $s_R < 5 \%$ byla splněna u všech tří látek. Průměrná výtěžnost pro CL byla 99,15 %, pro BE 99,55 % a pro PP 99,65 %.

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

Testování **robustnosti** prokázalo vhodnost mobilní fáze acetonitril/voda (25:70, v/v).

Při použití mobilní fáze acetonitril/voda (15:85, v/v) došlo k dokonalé separaci jednotlivých složek, pouze doba analýzy se prodloužila.

Při použití mobilní fáze acetonitril/voda (33:67, v/v) nebyla dosažena separace až na základní linii, píky však vykazovaly rozlišení větší než 1,5.

Stabilita - roztoky standardu CL, BE, PP jsou stabilní po dobu 72 hodin od jejich přípravy. Požadavek $S_T (\%) < 1 \%$ byl splněn.

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

8. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- ¹ Databáze AISLP, mikroverze 2004.3
- ² Kol. autorů: Český lékopis 2002 nebo 2005 ?????? jak je to teď s platností???, Grada, Praha, 2003
- ³ Lincová D., Farghali H. a kol.: Základní a aplikovaná farmakologie, (2002), Galén, Praha
- ⁴ Kolektiv autorů.: Pharmindex Kompendium (2001), MediMedia Information, 314

- ⁵ Karlíček R. a kol.: Analytická chemie pro farmaceuty, (2001), Karolinum, Praha
- ⁶ Klimeš J. a kol.: Kontrola léčiv I., (2002), Karolinum, Praha
- ⁷ Nováková, L., Vývoj a validace HPLC metod pro analýzu biologicky aktivních látek s využitím nových stacionárních fází, (2005), Katedra analytické chemie, Hradec Králové
- ⁸ <http://www.flowinjection.com>, listopad 2006
- ⁹ Santosa Sérgio, M., Henriquesa, M., C. Duartea, A., Esteves, V.: Development and application of a capillary electrophoresis based method for the simultaneous screening of six antibiotics in spiked milk samples (2007), Talanta, 71, 731-737
- ¹⁰ Saad Hassan S. M., Eldesouki M. H.: Determination of chloramphenicol
in pharmaceutical preparations by the cadmium ion-selective electrode, spectrophotometry and atomic-absorption spectrometry
(1979), Talanta, 26, 531-536
- ¹¹ [Henion, J.](#), [Maylin, GA.](#), [Thomson BA.](#): Determination of drugs in biological samples by thin - layer chromatography - tandem mass spektrometry (1983), Journal of Chromatography, 271, 107-124
- ¹² Santos, L., Barbosa, J., Castilho M., Ramos, F., Ribeiro, C.A.F.: Determination of chloramfenikol residues in rainbow tronts by gas chromatography – mass spectrometry and liquid chromatography tandem mass spectrometry (2005), Analitica Chimica Acta, 529, 249 - 256
- ¹³ Catala Icarda, M., Miscewicz, M., Cincu, A., García Mateo, J.V., Calatayud, M.: Photochemical reaction for direct chemiluminescence determination of photodegradable chloramfenikol (2003), Talanta, 60, 404 - 414
- ¹⁴ Shen, H – Y., Liang, H – L.: Screening, determination and confirmation of chloramfenikol in seafood, meat and honey using ELISA, HPLC –

- UVD, GC – ECD (2005), *Analitica Chimica Acta*, 535, 33 - 41
- ¹⁵ Bautista, J.A.G., Metco, J.V.G., Calatayud, J.M.: Flow injection biamprometric determination of chloramfenikol and related nitro compound by on – line chemical photodegradation (2000), *Analytica Chimica Acta*, 404, 141 – 150
- ¹⁶ Šatínský, D., Chocholouš, P., M. Salabová, Solich, P.: Simple determination of betamethasone and chloramphenicol in a pharmaceutical preparation using a short monolithic column coupled to a sequential injection system (2006), *Journal of Separation Science*, 29, 2494 - 2499