



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

Mgr. Voříšková Michaela

Hodnocení kafru v masti s využitím monolitické kolony

Rigorózní práce

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

Hradec Králové 2010

Prohlašuji, že jsem svou rigorózní práci vypracovala samostatně. Veškerá literatura a podkladové materiály, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány.

V Hradci Králové 1. dubna 2010

Mgr. Michaela Voříšková

Ráda bych na tomto místě poděkovala vedoucímu rigorózní práce PharmDr. Petru Kastnerovi, Ph.D. za odborné vedení, cenné rady a trpělivost při vypracování rigorózní práce. Nadále děkuji Mgr. Pavle Pilařové a všem pracovníkům katedry farmaceutické chemie a kontroly léčiv za ochotu pomoci i mimo rámec své vlastní práce.

OBSAH

1. ÚVOD.....	8
2. CÍL PRÁCE.....	10
3. TEORETICKÁ ČÁST	12
3.1. <i>KAPALINOVÁ CHROMATOGRAFIE.....</i>	<i>13</i>
3.1.1. CHROMATOGRAF	14
3.1.2. ZÁSOBNÍKY MOBILNÍ FÁZE	15
3.1.3. ČERPADLA	15
3.1.4. DÁVKOVACÍ ZAŘÍZENÍ.....	16
3.1.5. CHROMATOGRAFICKÉ KOLONY	16
3.1.6. NASTAVENÍ TEPLoty	18
3.1.7. DETEKTORY V KAPALINOVÉ CHROMATOGRAFII.....	18
3.1.8. ZAŘÍZENÍ PRO ZÁZNAM A ZPRACOVÁNÍ DAT	20
3.2. <i>KAFR A JEHO VLASTNOSTI.....</i>	<i>21</i>
3.2.1. FARMAKOLOGICKÉ VLASTNOSTI	21
3.2.2. INDIKACE A KONTRAINDIKACE	22
3.2.3. NEŽÁDOUCÍ ÚČINKY A INTERAKCE	22
3.2.4. DALŠÍ POUŽITÍ KAFRU.....	22
3.3. <i>ŽLUTÁ VAZELÍNA A JEJÍ VLASTNOSTI.....</i>	<i>23</i>
3.3.1. POUŽITÍ.....	23
3.4. <i>VALIDACE ANALYTICKÝCH METOD.....</i>	<i>24</i>
3.4.1. PARAMETRY VALIDACE	24
3.4.2. VALIDACE INSTRUMENTÁLNÍ.....	27
3.4.3. REVALIDACE SYSTÉMU	27
3.4.4. VALIDAČNÍ PROTOKOL.....	27
4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	28
4.1. <i>MATERIÁL A POMŮCKY.....</i>	<i>29</i>
4.1.1. CHEMIKÁLIE.....	29
4.1.2. SESTAVA PRO HPLC.....	29
4.1.3. PŘÍSTROJE	29
4.1.4. POMŮCKY.....	30
4.2. <i>CHROMATOGRAFICKÉ PODMÍNKY.....</i>	<i>30</i>
4.2.1. POSTUP STANOVENÍ.....	30
4.2.2. PŘÍPRAVA STANDARDNÍHO ROZTOKU	31
4.2.3. SPRÁVNOST	31

4.2.4.	PŘESNOST.....	32
4.2.5.	LINEARITA	33
4.2.6.	SELEKTIVITA.....	33
4.2.7.	STANOVENÍ OBSAHU KAFRU V DALŠÍCH PŘÍPRAVCÍCH	34
5.	VÝSLEDKY A DISKUSE.....	35
5.1.	<i>CHROMATOGRAFICKÉ PODMÍNKY.....</i>	36
5.2.	<i>VALIDACE METODY.....</i>	36
5.2.1.	SPRÁVNOST	36
5.2.2.	PŘESNOST.....	39
5.2.3.	LINEARITA	42
5.2.4.	SELEKTIVITA.....	45
5.2.5.	ROBUSTNOST	47
5.2.6.	TEST ZPŮSOBILOSTI CHROMATOGRAFICKÉHO SYSTÉMU.....	47
6.	ZÁVĚR.....	50
7.	LITERATURA.....	52
	SOUHRN	56
	ABSTRACT.....	57

1. ÚVOD

Jedním ze základních cílů farmacie je zajistit pacientovi kvalitní, bezpečný a účinný lék v požadovaném množství a v požadované kvalitě. Hodnocení kvality, bezpečnosti a účinnosti léku, resp. léčivého přípravku, se ve většině případů opírá o různé analytické metody.

Vysokouúčinná kapalinová chromatografie (HPLC) je v současné době jedna z nejprogresivnějších analytických metodik, která nachází stále větší uplatnění ve všech oblastech analýzy léčiv. Umožňuje analyzovat od anorganických iontů až po polymerní sloučeniny včetně termolabilních a netěkavých sloučenin (výhoda oproti GC – plynové chromatografii). Všechny moderní lékopisy využívají HPLC pro identifikaci, pro kontrolu čistoty a pro stanovení obsahu. HPLC je vhodná i pro monitorování hladin léků a metabolitů v tělních tekutinách (1, 3).

Pro práci byla použita kafrová mast 10%. Účinnou látkou v této masti je kafr, který se používá jako derivans a je součástí řady přípravků používaných v terapii bolestí svalů a kloubů. Pomocnou látkou je žlutá vazelína, která se pro svou stálost, nedráždivost a dobré rheologické vlastnosti často využívá jako masťový základ.

Ve své diplomové práci jsem se zabývala optimalizací HPLC metody pro hodnocení obsahu kafru v kafrové masti s použitím konvenční HPLC kolony. Na tuto problematiku navazuji v této rigorózní práci, kde jsem pro analýzu kafru využila moderní monolitickou kolonu, umožňující zkrátit dobu analýzy.

2. CÍL PRÁCE

Tato práce navazuje na diplomovou práci, ve které byla optimalizována metoda pro stanovení obsahu kafru v léčivém přípravku Unguentum camphoratum 10%. Cílem této práce je vyvinout analytickou metodu využívající monolitickou kolonu pro separace, která umožní zrychlit vlastní analýzu. Optimalizovaná metoda bude validována z hlediska správnosti, přesnosti, linearity a selektivity. Dále bude navržen test způsobilosti pro analytickou metodu a bude testováno použití metody i u dalších léčivých přípravků s obsahem kafru.

3. TEORETICKÁ ČÁST

3.1. KAPALINOVÁ CHROMATOGRAFIE

V kapalinové chromatografii je mobilní fází kapalina. Na rozdíl od plynové chromatografie rozhodují o separaci složek vzorku nejen jejich interakce se stacionární fází, ale velmi výrazně i použitá mobilní fáze. Během separace se analyt rozděluje mezi mobilní a stacionární fázi. Čas, který stráví v jedné nebo druhé fázi, závisí na afinitě analytu ke každé z nich. Jsou využitelné všechny možné mechanismy separace – adsorpce, rozdělování na základě různé rozpustnosti, iontová výměna, molekulově síťový efekt nebo specifické interakce v afinitní chromatografii. Podle uspořádání stacionární fáze rozlišujeme kolonovou a tenkovrstvou či papírovou kapalinovou chromatografii (6).

HPLC - je zkratka pro vysokoúčinnou kapalinovou chromatografii (High Performance Liquid Chromatography). Jedná se o analytickou fyzikálně-chemickou separační metodu. Objev chromatografie je připisován M. S. Cvětovi, který v roce 1903 v uspořádání kapalina - adsorbent první rozdělil na sloupci sorbentu listová barviva. Obdobně D. T. Day rozdělil na sloupci některé složky ropy (4).

Hlavní přednosti HPLC:

- a) Svou podstatou se jedná o separační metodu, která umožňuje kvalitativní i kvantitativní hodnocení separovaných složek směsi.
- b) Rychlost analýzy, citlivost stanovení (v závislosti na použitém detektoru).
- c) Pro analýzu postačuje minimální množství vzorku.
- d) Možnost automatizace.
- e) Prakticky ve všech uvedených ukazatelích je HPLC srovnatelná s plynovou chromatografií (GC); avšak vzhledem k tomu, že většina léčiv není těkavá, je právě v analýze léčiv HPLC mnohem použitelnější technikou než GC (1).

Základní kvalitativní charakteristikou v HPLC je retenční (eluční) čas t_R , což je čas od nástřiku na kolonu k maximu chromatografického píku. Nejčastějším důkazem totožnosti je shoda retenčních časů chromatografického píku léčiva v analyzovaném vzorku s retenčním časem píku standardu. Kvantitativní charakteristikou v HPLC je plocha (event. výška) chromatografického píku. Pro kvantifikaci, tj. stanovení jednotlivých složek ve směsi se nejčastěji používá metoda vnějšího nebo vnitřního standardu. Vnější standard se používá zcela nezávisle na analyzovaném vzorku a v podstatě představuje samostatný vzorek se známým obsahem stanovované složky,

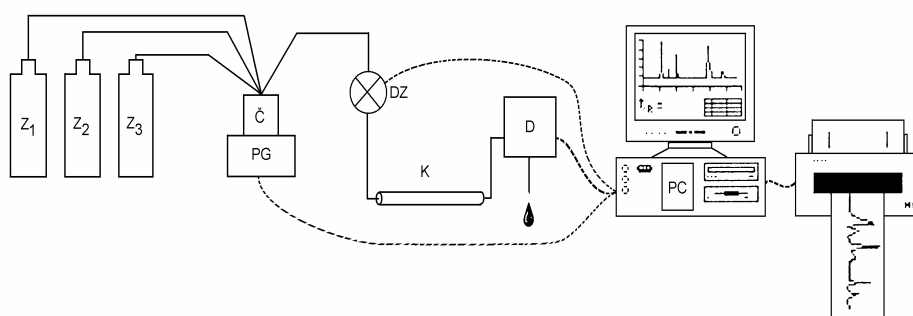
který se analyzuje současně se vzorky o neznámém obsahu. Vnitřní standard se přidává přímo do analyzovaného vzorku. Metoda vnitřního standardu je méně časově náročná a hlavně přesnější, protože není zatížena chybou dvojího nástřiku.

HPLC analýzu lze realizovat za konstantního složení mobilní fáze v průběhu celé analýzy, tzv. isokratická eluce (pro analytické účely se používá nejčastěji). Je-li v průběhu analýzy programově měněno složení mobilní fáze, jedná se o tzv. gradientovou eluci např. pokud je třeba analyzovat složky směsi, které se velmi liší ve své retenci – po eluci méně zadržované složky se zvyšuje eluční síla mobilní fáze. Lze užít i gradient průtoku (hlavně u monolitických kolon). Naproti tomu v plynové chromatografii GC se zase běžně využívá teplotní gradient (1, 2, 21).

3.1.1. CHROMATOGRAF

Základní technické vybavení kapalinového chromatografu sestává z čerpadla, zařízení na dávkování vzorku, kolony, detektoru a vyhodnocovacího zařízení. Kvalita jednotlivých prvků může výrazně ovlivnit účinnost celého chromatografického systému (8).

Jednotlivé součásti kapalinového chromatografu jsou znázorněny na obrázku (obr. č. 1) (1).



obr.č.1: Schéma chromatografu

Z₁, Z₂, Z₃ – zásobníky mobilní fáze, Č – vysokotlaké čerpadlo, které konstantní průtokovou rychlostí tlačí mobilní fázi nastaveného složení přes kolonu do detektoru, PG – programovací jednotka, pomocí které se nastavuje požadované složení mobilní fáze, DZ – dávkovací zařízení, umožňující nadávkovat roztok vzorku na kolonu, K – chromatografická kolona, kde dojde k rozdělení směsi na jednotlivé složky, které jsou unášeny mobilní fází do detektoru, D – detektor, který indikuje průtok separované složky

detekční celou a přenáší vhodně upravený signál do počítače, PC – počítač, který zpracuje daný signál a umožní výstup na tiskárnu a mimoto řídí chod celého chromatografu

(Plnou čarou je znázorněn tok mobilní fáze, přerušovanou čarou elektrický signál.) (1).

3.1.2. ZÁSObNÍKY MOBILNÍ FÁZE

Mobilní fáze je (při isokratické eluci) vedena buď z jednoho ze zásobníků do vysokotlakého čerpadla, anebo (při gradientové eluci) se přiváděné proudy z obou (nebo i většího počtu) zásobníků mísí podle programu ve směšovači zařazeném buď před nebo za vysokotlakým čerpadlem. Naprogramované směšovací zařízení může s využitím zásobníků různých kapalin připravovat směs kapalin stálého složení nebo řídit změny ve složení výsledné mobilní fáze v průběhu separace. Zásobníky mobilní fáze jsou skleněné nebo nerezové nádoby. Spoje zásobníků mobilní fáze s odplyňovačem, směšovačem a vysokotlakým čerpadlem mohou být zhotoveny jak z plastu, tak i z trubiček z nerezové oceli. Mobilní fáze se před použitím filtrují (odstranění nečistot) a odplyňují (např. s použitím ultrazvukové lázně). Jinou alternativou odplyňování je použití membránového degasseru (6, 7, 9).

3.1.3. ČERPADLA

Čerpadla jsou potřebná pro přivádění mobilní fáze konstantní průtokovou rychlostí. Musí být vysokotlaká (kolony s velikostí částic okolo 10 μ m a menší kladou velký odpor a k dosažení optimálních průtoků jsou nutné vysoké vstupní tlaky, až desítky MPa), musí zajišťovat konstantní průtok mobilní fáze (tento průtok má být regulovatelný v rozsahu 0,1 až 10 ml/min), průtok mobilní fáze musí být reprodukovatelný a bezpulsní. Materiál čerpadla (nerezová ocel, keramika, plast) nesmí být narušován mobilní fází a nesmí do ní uvolňovat žádné látky. Používají se čerpadla pístová, kdy při každém pohybu pístu vpřed dochází k vytlačení malého objemu mobilní fáze do chromatografického systému a při pohybu zpět se komora naplní. Výhodou těchto čerpadel je nepřetržitá dodávka mobilní fáze a snadná změna mobilní fáze. Pulsaci lze značně omezit použitím dvou nebo více čerpadel současně, zařazením tlumiče pulzů a programovaným pohybem pístů. Dále se používají membránová čerpadla, kde je prostor

s pístem naplněný hydraulickou pracovní kapalinou, který je oddělen od pracovního prostoru pro mobilní fázi membránou (6, 8, 27).

3.1.4. DÁVKOVACÍ ZAŘÍZENÍ

Dávkovací zařízení používající nástřiku injekční stříkačkou přes septum již byla prakticky nahrazena buď manuálními smyčkovými dávkovači nebo automatickými dávkovači, které umožňují dávkovat vzorek do kolony bez přerušení toku mobilní fáze. Dávkovací smyčka má obvykle objem 10 nebo 20 μl . Smyčka je připojena na kohout a plněna pomocí injekční stříkačky. Použití automatického dávkovače představuje optimální zajištění konstantní aplikace vzorku na analytickou kolonu. Automatické dávkovače jsou spojené se zásobníkem vzorku, ve kterém jsou umístěny mikronádobky (vialky) uzavřené silikonovým septem s teflonovou membránou nebo perforovanou zátkou z polypropylenu. Technické principy vlastního dávkování vzorku jsou poněkud odlišné. Buď je vzorek dávkován pomocí vícecestných (většinou šesticestných) ventilů nebo pomocí několika třicestných ventilů. Při dávkování by neměl být přerušen tok mobilní fáze kolonou, této podmínce více vyhovuje druhé zmiňované řešení. Dávkovací smyčky umožňují vpravení konstantního objemu do kolony, a tak není nutné odměřovat přesné množství vzorku. K zamezení kontaminace vzorků se používá oplach jehly a to jak vnitřní tak vnější oplach (6, 12).

3.1.5. CHROMATOGRAFICKÉ KOLONY

Chromatografická kolona je v podstatě trubka nebo kapilára rovnoměrně naplněná nebo pokrytá stacionární fází. Plášť kolony (hardware) má za úkol udržet pohromadě stacionární fázi, přičemž na hardware kolony jsou kladeny určité požadavky: musí být chemicky inertní, musí odolávat poměrně vysokým tlakům, vnitřní povrch pláště kolony musí být dostatečně hladký. Nejpoužívanější materiál k výrobě kolon je nerezová ocel, plasty nebo sklo (12).

Pro analytické účely jsou HPLC kolony nejčastěji dlouhé 10 - 25 cm o vnitřním průměru 3 - 5 mm. Kolony jsou naplněny vhodnými sorbenty. V HPLC se nejčastěji používají tzv. chemicky vázané stacionární fáze (1).

Pokrokem v analýze léčiv je zavedení zirkoniových a monolitických kolon do praxe. Zirkoniové kolony jsou tvořeny částicemi oxidu zirkoničitého, jejichž povrch může být také modifikován. Jejich předností je překonání omezení pH hodnot pro silikagel (13). Monolitické kolony tvoří na rozdíl od konvenčních stacionárních fází jediný kus pórovitého materiálu, který zcela zaplňuje vnitřek separační kolony. Monolit vzniká jednokrokovou radikálovou polymerací směsi monomerů v přítomnosti porogenního roztoku. Největší výhodou monolitických kolon jsou jejich hydrodynamické vlastnosti. Monolitické kolony mají 2 typy pórů: a) *velké póry (makropóry)*, které zajišťují rychlý tok mobilní fáze skrz monolit a významně zrychlují přenos hmoty mezi mobilní a stacionární fází, b) *středně velké póry (mesopóry)*, které poskytují monolitu dostatečně velký povrch, a tím vysokou separační kapacitu. Tato struktura umožňuje provozování monolitů při značně vysokých rychlostech mobilních fází bez přílišného zvýšení tlaku a zároveň bez ztráty separační účinnosti. Podle chemické podstaty a způsobu přípravy se mohou monolitické stacionární fáze rozdělit na fáze s modifikovaným silikagelem a na fáze na bázi organických polymerů. Monolitické stacionární fáze s chemicky modifikovaným silikagelem jsou v současné době dostupné pod značkou Chromolith od firmy Merck. Tyto kolony vykazují ve srovnání se standardní kolonou vynikající separace ve velmi krátkém časovém intervalu. Je to z toho důvodu, že jsou vyrobeny z vysoce porézních monolitických tyčí z oxidu křemičitého s bimodální strukturou pórů. Tyto kolony již nejsou plněné malými částicemi, ale namísto toho obsahují jednotlivé kusy vysoce čistého silikagelu. Vlastní monolitický sloupec silikagelu je poměrně hodně křehký, mechanickou ochranu mu zajišťuje plastový materiál pláště kolony. Mezi jejich další výhody patří dlouhá doba použitelnosti a nižší citlivost matrice, pokud jde o biologické vzorky. K monolitickým HPLC stacionárním fázím na bázi organických polymerů se používají polymerní gely na bázi polyakrylamidu, akrylamidu nebo polystyrenu (23, 24).

Moderní přístroje umožňují použít při dělení látek i několik kolon najednou. Jde o techniku přepínání spřažených kolon (column switching). Kolony jsou řazeny za sebou a mohou se navzájem lišit náplní i délkou atd. Výhodou je lepší separace látek a zkrácení času analýzy.

Někdy se používá tzv. předkolonka (krátká kolona, často plněná stejným sorbentem jako hlavní kolona). Zapojuje se do systému před hlavní kolonu a slouží k zachycení větší části nečistot při analýze vzorků, kde je veliké riziko zanesení kolony nečistotami (např. z neúplně přečištěného biologického materiálu), a prodlužuje tak životnost

kolony, navíc je její cena ve srovnání s kolonou nízká a znehodnocenou lze snadno obměnit (14).

3.1.6. NASTAVENÍ TEPLoty

Většina separací HPLC probíhá při laboratorní teplotě a nevyžaduje termostatování. Některé separace se významně zlepší zvýšením teploty, což většina nových chromatogramů umožňuje. Programová změna teploty se však v HPLC nevyužívá (6).

3.1.7. DETEKTORY V KAPALINOVÉ CHROMATOGRAFII

Funkcí detektorů je monitorovat eluované látky z kolony a převést kvantitativní hodnoty detekovaných látek na proporcionálně závislý elektrický signál, který je registrován zapisovačem nebo vyhodnocen počítačovým systémem (8).

K detekci separovaných látek se zpravidla využívá určitých jejich vlastností, jimiž se tyto látky liší od mobilní fáze. V podstatě rozlišujeme 2 typy detektorů - *univerzální*, kde je signál úměrný určité celkové vlastnosti eluátu, tj. jak solutu, tak i složek mobilní fáze a *selektivní*, kde je signál úměrný koncentraci samotné detekované látky v eluátu.

Na detektory pro HPLC jsou kladeny mimořádné požadavky:

- vysoká citlivost - detekce látek v roztoku v koncentracích ng až $\mu\text{g/ml}$
- reprodukovatelnost a linearita odezvy
- nezávislost odezvy na změně složení mobilní fáze při gradientové eluci
- univerzálnost - detekce všech oddělených složek vzorku
- dostatečně velký poměr mezi šumem a měřenou hodnotou (3, 5, 13)

SPEKTROFOTOMETRICKÉ DETEKTORY

Spektrofotometrické detektory jsou v analýze léčiv používány nejčastěji. Jejich předností je vysoká univerzálnost, dobrá odezva mnoha významných organických látek, značná citlivost (10^{-9} až 10^{-10} g/ml) a použitelnost při gradientové eluci. Spektrofotometry řadíme mezi tzv. nedestrukční detektory, to znamená, že při detekci nedochází k žádné změně vzorku (1, 11).

Měří absorbanci eluátu vycházejícího z kolony. Pro optimální citlivost detektoru musí být zajištěna dostatečná absorpční dráha průtočné kyvety, jíž prochází paprsek. K detekci léčiv se využívá především UV oblast spektra, mnohem méně oblast viditelná a minimálně infračervená oblast spektra - v praxi se uplatňují především UV detektory, event. UV-VIS detektory (6).

Nejužívanější UV detektory:

- UV detektor s fixní vlnovou délkou (nejčastěji 254 nm anebo 280 nm, při nichž absorbuje většina léčiv)
- UV-VIS detektor s proměnnou vlnovou délkou (libovolně měnitelná dle potřeb)
- scanning UV detektor (snímající během několika sekund absorpční spektrum v maximu píku hodnoceného léčiva)
- diode array detektor (řízený počítačem, trojrozměrná projekce, snímá absorpční spektrum, hodnotí léčivo současně při několika vlnových délkách, porovnává poměry absorbancí) (1)

FLUORIMETRICKÉ DETEKTORY

Tyto detektory jsou použitelné v případech, kdy analyzované léčivo (rozkladný produkt nebo metabolit) vykazuje fluorescenci - schopnost látek absorbovat ultrafialové záření a pak vysílat záření o vyšší vlnové délce, které se měří fotonásobičem kolmo na směr s fotometrickým detektorem. Látky, které nefluoreskují, lze mnohdy předkolonovou nebo postkolonovou derivatizací s vhodnými činidly převést na fluoreskující deriváty. Jednoduché fluorimetry pracují s jednou excitační vlnovou délkou a s jednou detekční vlnovou délkou. Jsou ovšem nabízeny i fluorimetrické detektory s volitelným nastavením excitační i emisní vlnové délky. Fluorimetrické detektory jsou méně univerzální než UV detektory, ale citlivější (10^{-9} až 10^{-12} g/ml), selektivnější a jsou rovněž použitelné při gradientové eluci (1, 6, 11).

ELEKTROCHEMICKÉ DETEKTORY

Patří mezi detektory selektivní a slouží k detekci látek schopných elektrochemické reakce (oxidace nebo redukce). Schopnost elektrochemické redukovatelnosti a oxidovatelnosti léčiv využívá voltmetrický, amperometrický a polarografický detektor.

Měří se elektrický proud procházející mezi polarizovatelnou a pomocnou elektrodou v závislosti na vloženém elektrickém napětí. Dosahují vysoké citlivosti, řádově 10^{-10} g/ml. Podmínkou pro jejich funkčnost je vodivá, dokonale odplyněná mobilní fáze (13).

HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETR

Spojení HPLC s hmotnostní spektrometrií je v poslední době často využíváno pro detekci léčiv. Přímé spojení kapalinové chromatografie s hmotnostním spektrometrem nejen umožňuje principiálně nový, univerzální, vysoce citlivý způsob detekce, ale současně také poskytuje řadu údajů potřebných pro identifikaci jednotlivých složek vycházejících z kolony. Po výstupu z HPLC kolony je nutno z eluentu odstranit mobilní fázi a molekuly léčiva v plynném stavu jsou v hmotnostním spektrometru ionizovány nárazy elektronů, termoionizací či elektroionizací. Nabité částice jsou v magnetickém nebo vysokofrekvenčním poli separovány podle hmotnosti a náboje a zaznamenáno hmotnostní spektrum. Spojení HPLC - MS je vysokce selektivní, vysoce citlivé a poskytuje řadu údajů potřebných pro identifikaci léčiv (1, 7).

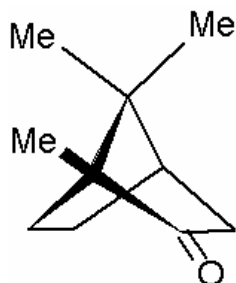
Pro speciální účely lze použít i další typy detektorů např. vodivostní, permitivní nebo radiometrický.

3.1.8. ZAŘÍZENÍ PRO ZÁZNAM A ZPRACOVÁNÍ DAT

Dnes se k vyhodnocování a dalšímu zpracování chromatografických dat používají v naprosté většině případů počítače vybavené speciálním softwarem. Ten navíc přímo ovládá i pracovní parametry chromatografu (složení a průtok mobilní fáze, teplota na koloně, nastavení detektoru, objem a sekvence vzorků dávkovaných na kolonu apod.) (13).

3.2. KAFR A JEHO VLASTNOSTI

Strukturní vzorec:



Sumární vzorec: $C_{10}H_{16}O$

Chemický název: (1*RS*, 4*RS*) - 1,7,7-trimethylbicyclo[2.2.1]heptan-2-on

MR: 152.233440 g/mol (15, 16)

Lékopisný název: Camphora racemica (kafr racemický) (17)

Kafr je bílý krystalický prášek nebo drobná krystalická hmota, vysoce těkavá i při pokojové teplotě. Je těžce rozpustný ve vodě, velmi snadno rozpustný v ethanolu 96% a v etheru petrolejovém, snadno rozpustný v mastných olejích, velmi těžce rozpustný v glycerolu (17).

Původně se získával ze dřeva stromu *Cinnamomum camphora* (kafrovník lékařský). K získávání se používá dřevo kmenů a kořenů stromů 50-60 letých. Dřevo se destiluje s vodní parou, při čemž se část kafru hned odděluje jako pevná látka, další část je rozpuštěna v nadestilované silici a získá se pak z ní frakcionovanou destilací. Většina kafru se dnes připravuje synteticky z pinenu, hlavní součásti terpentýnové silice (18).

3.2.1. FARMAKOLOGICKÉ VLASTNOSTI

Kafr patří mezi dermatologika. Mechanismus účinku při lokální aplikaci není znám. Působí mírně hyperemicky, čímž lehce tlumí vnímání bolesti, má mírný lokálně anestetický účinek, působí mírně chladivě. Zvláště výhodné je antiseptické působení kafru (19).

3.2.2. INDIKACE A KONTRAINDIKACE

Mezi terapeutické indikace kafru patří reflexní terapie algických stavů dermatických a subdermatických oblastí, paliativní terapie algických stavů kloubů při artritidě, periartritidě a jiných revmatických bolestech, včetně bolestivých stavů měkkých tkání, doplňková léčba dny, algické stavy s omezením hybnosti při vertebrogenních syndromech, fibrozitidy, zejména při současném omezení hybnosti, pomocné léčivo při terapii proleženin a otlaků. Mast se nanáší 1 - 3 krát denně v tenké vrstvě na postižená místa (19, 26).

Kafr by neměl být používán při přecitlivělosti na kafr, při akutním kožním onemocnění a na otevřené rány. Při běžném způsobu použití nemá vliv na průběh těhotenství, neproniká do mateřského mléka (19).

3.2.3. NEŽÁDOUCÍ ÚČINKY A INTERAKCE

Při běžném způsobu použití se nežádoucí účinky prakticky nevyskytují. U zvláště citlivých pacientů může být pozorována přecitlivělost ve smyslu alergie nebo hyperemické reakce. V literárních zdrojích nejsou žádné informace o předávkování. Nejsou udávány ani žádné interakce s jinými léčivými přípravky ani jiné formy interakce (19).

3.2.4. DALŠÍ POUŽITÍ KAFRU

Kromě farmacie je kafr používán také jako změkčovač pro nitrocelulózu, odpuzující prostředek proti hmyzu, při výrobě plastických hmot, ingredience v kuchyni (hlavně v Indii), balzamující tekutina, při výrobě střelného prachu (15, 18, 22).

3.3. ŽLUTÁ VAZELÍNA A JEJÍ VLASTNOSTI

Lékopisný název: Vaselinum flavum

Je to čištěná směs polotuhých uhlovodíků získaných z ropy. Může obsahovat vhodnou antioxidační látku. Je to žlutá průsvitná roztíratelná hmota, která po roztavení slabě fluoreskuje v denním světle. Je prakticky nerozpustná ve vodě, dobře rozpustná v dichlormethanu, prakticky nerozpustná v lihu 96% a v glycerolu (10).

3.3.1. POUŽITÍ

Používá se jako konstitutivní složka masťových a krémových základů. Jako směs uhlovodíků s minimální polaritou je nekompatibilní s kožními lipidy. Penetraci léčiva do kůže podporuje okluzivním efektem, protože brání respiraci kůže a zvětšuje tak propustnost její rohové vrstvy (20).

3.4. VALIDACE ANALYTICKÝCH METOD

Validaci můžeme definovat jako proceduru, jejímž cílem je demonstrovat a dokumentovat kvalitu analytické metody ustanovením definovaných kritérií a měřeními hodnot těchto kritérií. Cílem validace je určit podmínky, za kterých je zkušební postup použitelný, a zjistit stejnou spolehlivost při opakovaném použití v jedné nebo i v různých laboratořích. Vlastnost, která je předmětem validace se nazývá validovaná vlastnost (koncentrace hlavní látky, koncentrace nečistoty, fyzikálně chemický parametr) (2, 12).

Validace se provádí při vývoji nové metody, jestliže byla metoda změněna, má-li být přenesena do jiné laboratoře, nebo při průkazu rovnocennosti dvou metod (2).

3.4.1. PARAMETRY VALIDACE

1.) PŘESNOST (precision)

Přesnost je míra shody mezi jednotlivými výsledky metody opakovaně získanými s jedním homogenním vzorkem. Obvykle se tento vzorek nezávisle šestkrát analyzuje kompletním postupem včetně přípravy vzorku. Přesnost se vyjádří jako relativní směrodatná odchylka těchto šesti stanovení. Podle podmínek se rozlišují tři úrovně přesnosti:

opakovatelnost (repeatability) - metoda se opakuje stejným způsobem jedním pracovníkem se stejnými činidly na tomtéž přístroji.

mezilehlá přesnost (intermediate precision) - metoda se provádí s různými činidly, analytiky i přístroji, v různý den, ale v jedné laboratoři a se stejným zhomogenizovaným vzorkem.

reprodukovatelnost (reproducibility) - provedení je stejné jako u mezilehlé přesnosti s tím rozdílem, že probíhá v různých laboratořích (2).

2.) SPRÁVNOST (accuracy)

Vyjadřuje shodu mezi získaným výsledkem a správnou hodnotu. Zjistit správnou hodnotu může být problém. Správnou hodnotu lze zjistit buď jinou nezávislou metodou s ověřenou správností, nebo se připraví modelový vzorek ze všech složek přípravku a přesně přidaného standardu. Nejsou-li k dispozici všechny složky přípravku, analyzuje

se přípravek se známým přídatkem standardu. Správnost se obvykle zjistí analýzou nejméně šesti vzorků a vyjádří se jako rozdíl správné a získané hodnoty nebo jako výtěžnost:

$$\text{výtěžnost (recovery)} = \frac{100 * \text{nalezená hodnota}}{\text{skutečná hodnota}} \quad (2)$$

3.) SELEKTIVITA, SPECIFITA (specificity)

Selektivita metody je vlastnost změřit správně a specificky danou látku v přítomnosti jiných látek, jež lze očekávat. To mohou být další účinné látky u složených přípravků, pomocné látky, nečistoty z výroby, rozkladné produkty, zbytková rozpouštědla. Tento parametr se doloží výsledky analýzy standardu, a dále např. vzorků bez analyzované látky obsahujících všechny složky přípravku, rozkladné produkty, nečistoty (2).

4.) LINEARITA (linearity)

Je to schopnost dávat výsledky přímo úměrné koncentraci stanovované látky. Obvykle se stanovuje minimálně pět různých koncentrací v rozmezí 50 - 150 % deklarovaného obsahu účinné látky. Pokud se testuje pro příbuzné látky nebo konzervační látky, užívá se jiný rozsah. Může se pracovat s roztoky standardů, neboť rušivé vlivy u reálných vzorků jsou hodnoceny jinými parametry validace. Pokud je metoda lineární, lze s výhodou určit směrnici z jednoho kalibračního bodu. Pokud není, je třeba výsledky vyhodnocovat z celé kalibrační křivky (2).

5.) DETEKČNÍ LIMIT (limit of detection, LOD)

Vyjadřuje citlivost metody. Je to nejnižší detekovatelná koncentrace látky, nestanovované kvantitativně. U neinstrumentálních metod se detekční limit hledá experimentálně. U instrumentálních metod se může určit jako koncentrace analyzované látky s poměrem signálu k šumu s hodnotou 3. Nalezený detekční limit se ověří analýzou příslušné koncentrace vzorku. U metody stanovení účinné látky se obvykle nevyžaduje určení LOD (2).

6.) KVANTITATIVNÍ LIMIT (limit of quantification, LOQ)

Je též parametrem citlivosti metody. Je to nejnižší koncentrace látky, stanovitelná s přijatelnou přesností a správností. Za limitující relativní směrodatnou odchylku se považuje 10 %, proto je možné kvantitativní limit vyjádřit jako koncentraci, při jejíž analýze se dosáhne této relativní směrodatné odchylky. Obvykle to bývá trojnásobek detekčního limitu. Často se vyjadřuje jako koncentrace s poměrem signálu k šumu s hodnotou 10. U metody stanovení účinné látky se obvykle nevyžaduje učení LOQ (2).

7.) ROZSAH (range)

Tento parametr se obvykle odvozuje z linearitě metody a rozumí se jím koncentrační hranice, v kterých může být metoda používána. Dolním limitem může být například detekční limit a horní může být určen maximální odezvou, při jejímž překročení už přístroj nepracuje přesně (2).

8.) ROBUSTNOST (robustness)

Vyjadřuje míru vlivu proměnných podmínek na výsledky analýzy. Sbírají se poznatky z vývoje metody a cílem je upozornit na podmínky, které mohou ovlivnit výsledky. Například u metody využívající vysokoúčinnou kapalinovou chromatografii se sledují vlivy: složení mobilní fáze, pH vodné složky mobilní fáze, teplota na koloně, rychlost průtoku, stabilita analyzovaných vzorků, rozdíl mezi kolonami různých šarží případně i výrobců... (2).

9.) TEST ZPŮSOBILOSTI (system suitability test)

Je nedílnou součástí validace analytické metody. U instrumentálních fyzikálně-chemických metod (především separačních) není v podstatě možné definovat všechny podmínky, za kterých má být metoda použita, aby poskytovala spolehlivé výsledky. Při každém novém použití metody se neopakuje celá validace, ale jsou definována určitá kritéria, která musí být splněna a která se obecně nazývají test způsobilosti analytického systému. Při splnění požadavků testu způsobilosti se předpokládá, že dříve provedená validace platí. Pomocí porovnávacích roztoků se nejčastěji zjišťují následující parametry: účinnost, kapacitní faktor, rozlišení, retence a faktor symetrie a testuje se též opakovatelnost nástřiku, které musí odpovídat předepsaným lékopisným hodnotám. V případě, že některý parametr nebo více parametrů neodpovídá, upraví se chromatografické podmínky v rozsahu, aby byla splněna kritéria způsobilosti

chromatografického systému, aniž by přitom došlo k podstatnému pozměnění metody. Lze upravit např. poměr jednotlivých složek mobilní fáze, koncentraci pufru nebo její průtokovou rychlost kolonou v povoleném rozsahu, např. podle PhEur. Jestliže podmínky stanovení odpovídají požadavkům, provede se stanovení obsahu opakovanými nástřiky porovnávacího a zkoušeného roztoku (2).

3.4.2. VALIDACE INSTRUMENTÁLNÍ

Validace jednotlivých komponent systému (hardware) je zjednodušena v případě, že použitá technika je certifikována podle norem řady ISO (International Organization for Standardization) 9000 - 9004. V tomto případě je testování celého systému zaručena výrobcem. V opačném případě je testování specifickou záležitostí jednotlivých komponent systému a pro ně musí být zpracován individuální validační program instrumentace (12).

3.4.3. REVALIDACE SYSTÉMU

Podmínky revalidace systému nejsou obecně definovatelné, protože každá změna v celém analytickém systému vede zákonitě k jeho revalidaci. Každá změna musí být však posouzena individuálně, zda má prokazatelný vliv na konečný výsledek. V kladném případě je nutné provést revalidaci, avšak tato revalidace nemusí být komplexní, ale pouze jako dílčí krok validačního programu (12).

3.4.4. VALIDAČNÍ PROTOKOL

Zjištěné hodnoty validačních parametrů se zpracovávají do validačního protokolu. Validační protokol se odvolává na validační program. Do validačního protokolu se zaznamenávají všechna měření, výpočty i pomocné výpočty. Výsledky a závěry jsou zřetelně definované. Do validačního protokolu se uvádí datum jednotlivých zkoušek, jméno zodpovědného pracovníka a jména dalších pracovníků, kteří se podíleli na validačním programu (12).

4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1. MATERIÁL A POMŮCKY

4.1.1. CHEMIKÁLIE

Camphor racemic, Riedel- de Haen, Německo

Vaselinum flavum, Penta, Chrudim, Česká republika

Methanol gradient grade pro kapalinovou chromatografii, Merck, Německo

Acetonitril gradient grade pro kapalinovou chromatografii, Merck, Německo

Voda čištěná

Léčivé přípravky použité pro analýzu:

Unguentum camphoratum vaselinatum 10%, Medicamenta, Vysoké Mýto, Česká republika

Emspoma speciál Z, Jutta

Mucoplant Eukalyptový balzám drm. ung., Dr. Theiss

4.1.2. SESTAVA PRO HPLC

Kontrolní jednotka: CTO-20AC VP Shimadzu

Čerpadlo: LC-20AD VP Shimadzu

Termostat kolony: CTO-20AS VP Shimadzu

PC program: Shimadzu-CLASS-VP 5

UV-VIS detektor: SPD-20A VP Shimadzu

Autosampler: SIL-20AC VP Shimadzu

Řídící jednotka: CBM-20A Shimadzu

Chromatografická kolona: Chromolith Speed Rod, RP-18e 50-4,6 mm, Merck, Německo

Chromatografická předkolonka: Chromolith, RP-18e 10-4,6 mm, Merck, Německo

4.1.3. PŘÍSTROJE

Digitální váhy

Vaříč, ETA, Česká republika

Magnetická míchačka

Mrazící box

Vodní lázeň

4.1.4. POMŮCKY

kádinky, odměrné baňky, varné baňky, odsávací baňka, fritra, odměrné válce
nedělené pipety, balónek k pipetě, zkumavky se zábrusem, zátky se zábrusem, stojan na
zkumavky

lodičky, laboratorní lžičky, kopistky, třenka s těrkou

membránový filtr - Chromafil AO - 45/25, injekční stříkačky, teploměr, alobal

4.2. CHROMATOGRAFICKÉ PODMÍNKY

Kolona 50 mm dlouhá a vnitřního průměru 4,6 mm (Chromolith Speed rod, RP-18e).

Předkolonka 10 mm dlouhá a vnitřního průměru 4,6 mm (Chromolith, RP-18e).

Mobilní fáze: směs vody a methanolu (35 : 65, v/v).

Průtoková rychlost mobilní fáze: 2,5 ml/min.

Vlnová délka detektoru: 289 nm.

Nástřík: 20 µl.

4.2.1. POSTUP STANOVENÍ

Příprava zkoušeného roztoku:

Do 100 ml varné baňky se naváží asi 0,5000 g masti přesně a po přidání 25,00 ml acetonitrilu se baňka rychle zahřeje na vařiči do dosažení teploty varu acetonitrilu, tj. 70°C a poté se nechá 1 min míchat na magnetické míchačce při 800 ot/min. Acetonitrilová vrstva se za horka odlije od masťového základu a vloží se v uzavřené zábrusové zkumavce na 15 min do mrazícího boxu. Následně se zfiltruje pomocí injekční stříkačky a membránového filtru do vialky (25).

Příprava porovnávacího roztoku:

Naváží se asi 50 mg pracovního roztoku standardu kafry přesně, rozpustí se v acetonitrilu a zředí se jím na 25,0 ml.

Postup stanovení:

Odděleně se nastříknou stejné objemy porovnávacího roztoku a roztoku vzorku. Na základě HPLC záznamů se z velikosti odezvy hlavních píků vypočítá procentuální obsah kafru v masti podle vzorce: $25C(Arv/Ars)100/n$

C.....koncentrace standardu v mg/ml

Arv.....plocha píku kafru u vzorku

Ars.....plocha píku kafru u standardu

n.....navážka vzorku v mg

4.2.2. PŘÍPRAVA STANDARDNÍHO ROZTOKU

Do odměrné baňky na 25 ml bylo naváženo 0,0514 g kafru a doplněno acetonitrem po rysku. Koncentrace standardního roztoku je tedy 2,056 mg/ml.

4.2.3. SPRÁVNOST

Pro hodnocení správnosti metody bylo připraveno 6 modelových vzorků kafrové masti se známým obsahem kafru 10% a to tak, že se navázilo asi 0,500 g kafru přesně a asi 4,500 g žluté vazelíny přesně a v třence se připravila homogenní mast. Konkrétní navážky viz tab. č. 1.

Příprava pracovních roztoků pro správnost:

Z každého modelového vzorku byl připraven zkoušený roztok přesně podle postupu v kapitole 4.2.1. Konkrétní navážky viz tab. č. 1

tab. č 1: Přehled navážek a skutečný obsah kafru v masti

Modelový vzorek č.	Navážky pro modelový vzorek		Skutečný obsah kafru v %	Navážka pro analýzu v g
	Kafr v g	Vaselineum flavum v g		
1	0,5096	4,6104	9,95	0,5184
2	0,5076	4,8388	9,49	0,5087
3	0,5051	4,4396	10,21	0,5032
4	0,501	4,3745	10,28	0,5158
5	0,5141	4,2993	10,68	0,5150
6	0,5204	4,3394	10,71	0,5043

4.2.4. PŘESNOST

Pro hodnocení přesnosti metody byla použita mast Unguentum camphoratum vaselinatum 10% šarže 020908. Z ní byl šestkrát připraven zkoušený roztok přesně podle postupu v kapitole 4.2.1. Konkrétní navážky viz tab. č. 2

tab č. 2: Příprava pracovních roztoků pro přesnost

Vzorek č.	Navážka kafrové masti 10% v g
1	0,4997
2	0,4964
3	0,5266
4	0,5102
5	0,5383
6	0,5472

4.2.5. LINEARITA

Pro hodnocení linearity bylo připraveno 5 pracovních roztoků o koncentracích odpovídajících 80, 90, 100, 110 a 120 % očekávaného obsahu kafru v masti.

Příprava pracovních roztoků pro linearitu:

Do pěti 25 ml odměrných baněk bylo naváženo takové množství kafru, které odpovídalo požadované koncentraci pracovního roztoku pro linearitu (viz. tab. č. 3), bylo přidáno asi 20 ml acetonitrilu. Obsah baňky se promíchal a po rozpuštění kafru byla baňka doplněna acetonitrilem po značku. Poté se roztoky naplnily do vialek.

tab č. 3: Příprava pracovních roztoků pro linearitu

vzorek č.	navážka kafru v mg	koncentrace kafru v mg/ml
1	40,1	1,604
2	44,6	1,784
3	50,0	2,000
4	54,7	2,188
5	59,5	2,380

4.2.6. SELEKTIVITA

Pro hodnocení selektivity se připravil 1 pracovní roztok.

Příprava pracovního roztoku pro selektivitu:

Do 100 ml varné baňky bylo naváženo asi 0,5000 g přesně Vaselinum flavum, z této navážky byl připraven zkoušený roztok přesně podle postupu v kapitole 4.2.1.

4.2.7. STANOVENÍ OBSAHU KAFRU V DALŠÍCH PŘÍPRAVCÍCH

Příprava pracovního roztoku z přípravku Emspoma speciál Z a Mucoplant eukalyptový balzám:

Do 100 ml varné baňky bylo naváženo asi 0,5000 g přípravku přesně a po přidání 25,00 ml acetonitrilu se vzorek rychle zahřál na vařiči do dosažení teploty varu acetonitrilu, tj. 70°C a poté se nechal 1 min míchat na magnetické míchačce při 800 ot/min. Acetonitrilová vrstva se za horka odlila od masťového základu a vzorek se vložil na 15 min do mrazícího boxu a následně se zfiltraval pomocí injekční stříkačky a membránového filtru do vialky.

5. VÝSLEDKY A DISKUSE

5.1. CHROMATOGRAFICKÉ PODMÍNKY

Pro každou analýzu byla použita výše uvedená chromatografická sestava, kolona Chromolith Speed Rod, RP-18e, 50-4,6 mm a předkolonka Chromolith, RP-18e, 10-4,6 mm. Mísení jednotlivých složek mobilní fáze jsem prováděla manuálně. Před použitím byla mobilní fáze přefiltrována pomocí frity. Průtok mobilní fáze byl po vyhodnocení závislostí plochy píku, počtu teoretických pater, tailing faktoru a tlaku na průtoku nastaven na 2,5 ml/min pro všechny analýzy. Nástřik byl 20 μ l.

Vlnová délka

Vlnová délka detektoru byla nastavena na 289 nm.

Mobilní fáze

Mobilní fází byla směs vody a methanolu (35 : 65, v/v).

5.2. VALIDACE METODY

5.2.1. SPRÁVNOST

Pro zjištění správnosti metody bylo proměřeno 6 pracovních roztoků pro správnost a standardní roztok. Sekvence nástřiků na kolonu byla následující: 5×nástřik standardního roztoku, 3×nástřik vzorku č. 1, 3×nástřik vzorku č. 2, 3×nástřik standardu, 3×nástřik vzorku č. 3, 3×nástřik vzorku č. 4, 3×nástřik standardu, 3×nástřik vzorku č. 5, 3×nástřik vzorku č.6, 5×nástřik standardu.

tab. č. 4: Správnost, naměřené hodnoty kafru

navážka vzorku (g)	vzorek číslo / měření číslo	plocha píku kafru	průměr ploch píků kafru
0,5184	1/1	239708	239395
	1/2	239906	
	1/3	238571	
0,5087	2/1	220835	221247
	2/2	221433	
	2/3	221474	
0,5032	3/1	236687	236418
	3/2	237178	
	3/3	235388	
0,5158	4/1	242968	243134
	4/2	243117	
	4/3	243316	
0,515	5/1	252774	252223
	5/2	252456	
	5/3	251440	
0,5043	6/1	249109	249633
	6/2	250166	
	6/3	249624	

tab. č. 5: Správnost, naměřené hodnoty standardu

koncentrace kafru mg/ml	číslo měření standardu	plocha píku standardu	průměr ploch píků standardu
2,056	1/1	243816	240447
	1/2	242879	
	1/3	237348	
	1/4	238758	
	1/5	239432	
	2/1	236998	237642
	2/2	238717	
	2/3	237210	
	3/1	238733	239406
	3/2	237691	
	3/3	241794	
	4/1	238221	239027
	4/2	243020	
	4/3	237769	
	4/4	237374	
	4/5	238750	

Množství kafru v Unguentum camphoratum vaselinatum 10%:

$$\% \text{ KAFRU} = 25 \times C \times (\bar{\emptyset} \text{ plocha píku vz} / \bar{\emptyset} \text{ plocha píku st.}) \times 100 / n$$

$\bar{\emptyset}$ plocha píku vz, průměrná plocha píku kafru ve vzorku, $\bar{\emptyset}$ plocha píku st - průměrná plocha píku kafru ve standardu, n - navážka, C – koncentrace standardu

tab. č. 6: Množství kafru v masti

vzorek č.	naměřený obsah kafru (%)	skutečný obsah kafru (%)	recovery (%)
1.	9,88	9,95	99,30
2.	9,41	9,49	99,16
3.	10,16	10,21	99,51
4.	10,12	10,28	98,44
5.	10,51	10,68	98,41
6.	10,64	10,71	99,35
		průměr	99,03
		RSD (%)	0,49

Recovery (výtěžnost) = 99,03%

Zjištěná hodnota vyhovuje požadavku, který udává recovery v rozmezí 98,0 – 102,0 %.

5.2.2. PŘESNOST

Pro stanovení přesnosti metody bylo proměřeno 6 pracovních roztoků pro přesnost a standardní roztok. Sekvence nástřiků byla stejná jako při stanovení správnosti.

tab. č. 7: Přesnost, naměřené hodnoty kafru

navážka vzorku (g)	vzorek číslo / měření číslo	plocha píku kafru	průměr ploch píků kafru
0,4997	1/1	248147	248023
	1/2	247893	
	1/3	248030	
0,4964	2/1	244014	242908
	2/2	242946	
	2/3	241763	
0,5266	3/1	257950	256765
	3/2	255889	
	3/3	256455	
0,5102	4/1	251394	251605
	4/2	251575	
	4/3	251847	
0,5383	5/1	262401	262169
	5/2	262185	
	5/3	261921	
0,5472	6/1	265159	264992
	6/2	265700	
	6/3	264118	

tab. č. 8: Přesnost, naměřené hodnoty standardu

koncentrace kafru mg/ml	číslo měření standardu	plocha píku standardu	průměr ploch píků standardu
2,056	1/1	246487	246607
	1/2	246750	
	1/3	247453	
	1/4	247046	
	1/5	245299	
	2/1	244414	245033
	2/2	245167	
	2/3	245519	
	3/1	245046	245669
	3/2	245182	
	3/3	246779	
	4/1	245159	246138
	4/2	245701	
	4/3	246907	
	4/4	246052	
	4/5	246871	

Množství kafru v Unguentum camphoratum vaselinatum 10%:

$$\% \text{ KAFRU} = 25 \times C \times (\text{\textcircled{Ø}} \text{ plocha píku vz} / \text{\textcircled{Ø}} \text{ plocha píku st.}) \times 100 / n$$

vysvětlivky – viz. výše

tab. č. 9: Množství kafru v masti

vzorek číslo	obsah kafru ve vzorku (%)
1.	10,35
2.	10,26
3.	10,23
4.	10,32
5.	10,19
6.	10,11

RSD = 0,83%

Relativní směrodatná odchylka RSD 0,83% vyhovuje požadavkům, které uvádí, že RSD nesmí být větší než 2 %.

5.2.3. LINEARITA

Pro zjištění linearity bylo změřeno 5 pracovních roztoků s odstupňovanou koncentrací kafru v rozmezí 80-120 %.

tab. č. 10: linearita, vzorek č. 1

koncentrace kafru (mg/ml)	vzorek číslo / měření číslo	plocha píku kafru	průměr ploch píků kafru
1,604	1/1	190269	189959
	1/2	189598	
	1/3	190009	

tab. č. 11: linearita, vzorek č. 2

koncentrace kafru (mg/ml)	vzorek číslo / měření číslo	plocha píku kafru	průměr ploch píků kafru
1,784	1/1	210504	210025
	1/2	210034	
	1/3	209538	

tab. č. 12: linearita, vzorek č. 3

koncentrace kafru (mg/ml)	vzorek číslo / měření číslo	plocha píku kafru	průměr ploch píků kafru
2,000	1/1	233674	233721
	1/2	233936	
	1/3	233552	

tab. č. 13: linearita, vzorek č. 4

koncentrace kafru (mg/ml)	vzorek číslo / měření číslo	plocha píku kafru	průměr ploch píků kafru
2,188	1/1	257517	257696
	1/2	257878	
	1/3	257693	

tab. č. 14: linearita, vzorek č. 5

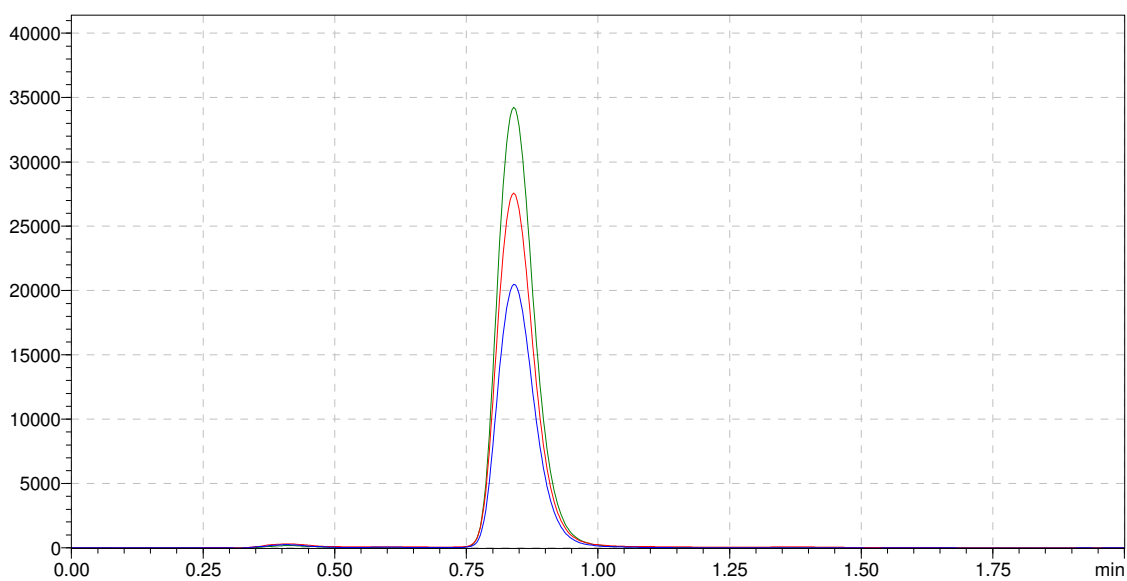
koncentrace kafru (mg/ml)	vzorek číslo / měření číslo	plocha píku kafru	průměr ploch píků kafru
2,380	1/1	281351	280742
	1/2	280729	
	1/3	280145	

obr.č. 2: Vybrané chromatogramy pracovních roztoků kafru pro linearitu

modrý chromatogram: koncentrace kafru 1,604 mg/ml

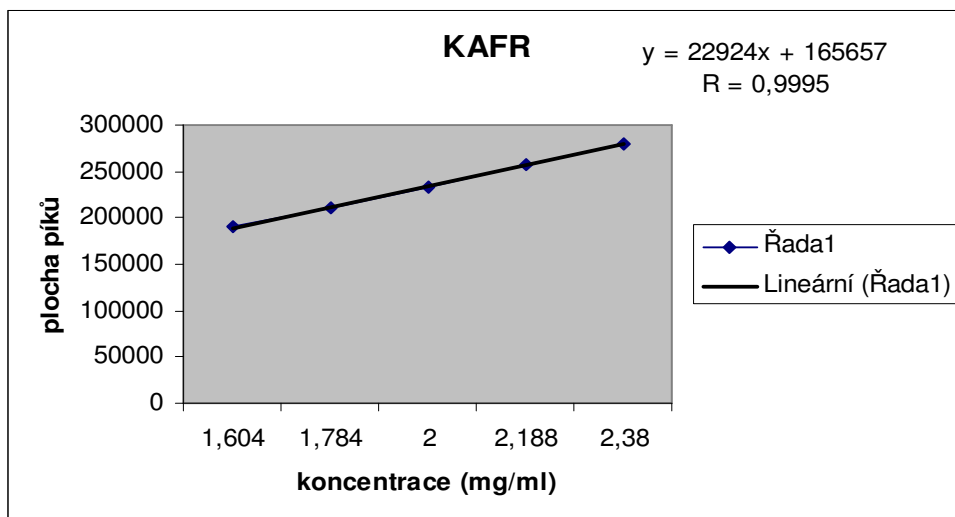
červený chromatogram: koncentrace kafru 1,784 mg/ml

zelený chromatogram: koncentrace kafru 2,380 mg/ml



Po vyhodnocení chromatografických záznamů byla sestrojena kalibrační křivka (závislost ploch píku stanovované látky na rostoucí koncentraci stanovované látky), která je v rozmezí stanovovaných koncentrací lineární.

graf č. 1: Graf lineární regrese

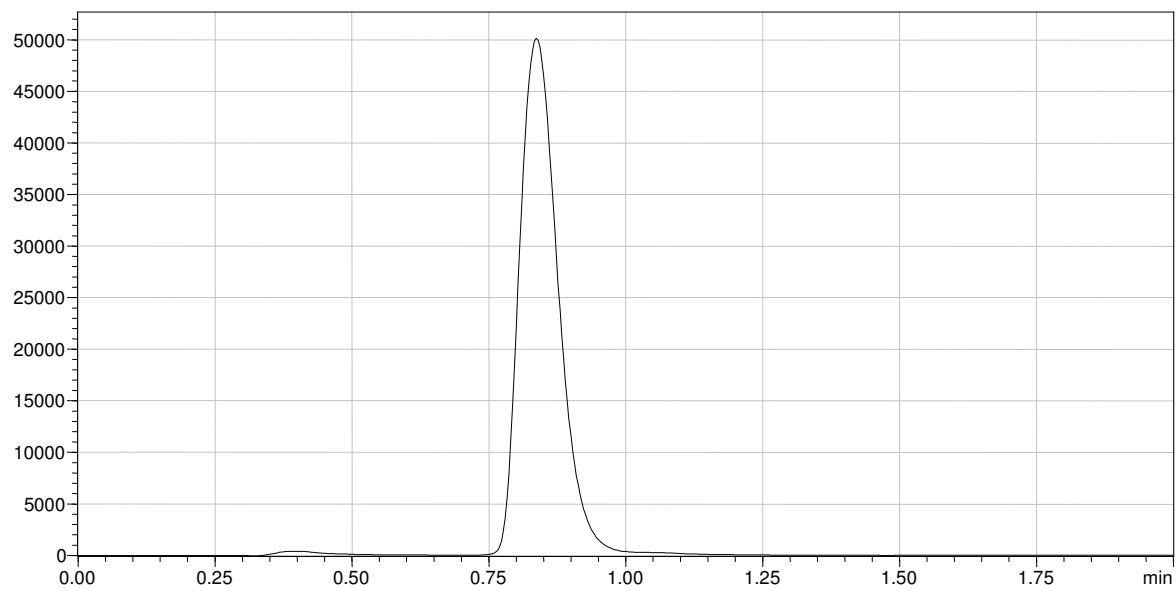


Naměřený korelační faktor linearity (0,9995) vyhovuje požadavku, který udává, že hodnota nesmí klesnout pod 0,999.

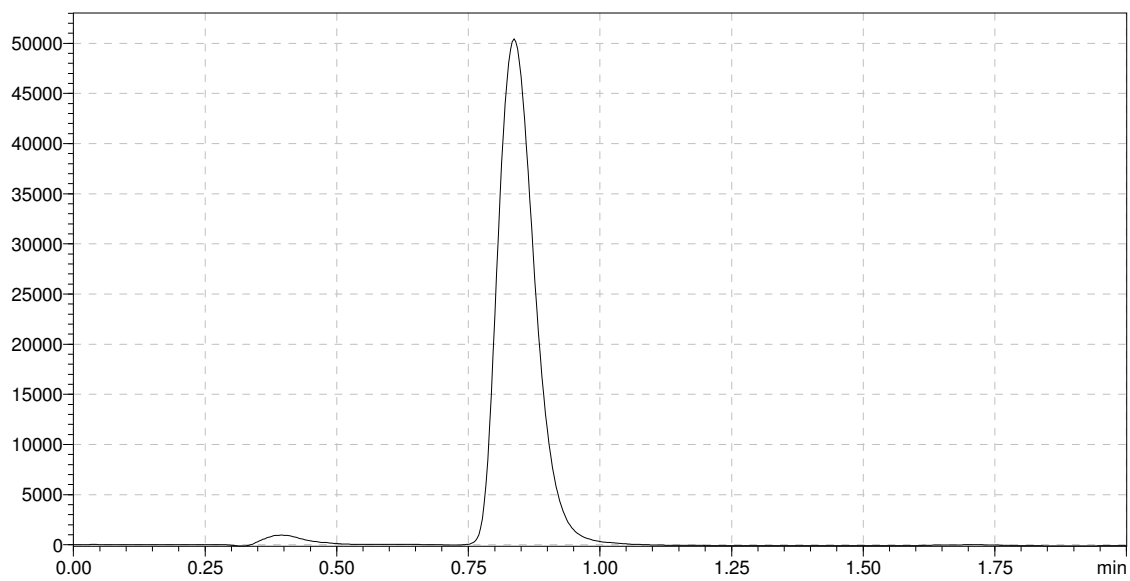
5.2.4. SELEKTIVITA

Pro zjištění selektivity byly porovnány chromatogramy standardu, vzorku a placebo. Z níže uvedených chromatogramů je patrné, že s píkem kafru neinterferuje žádná jiná látka.

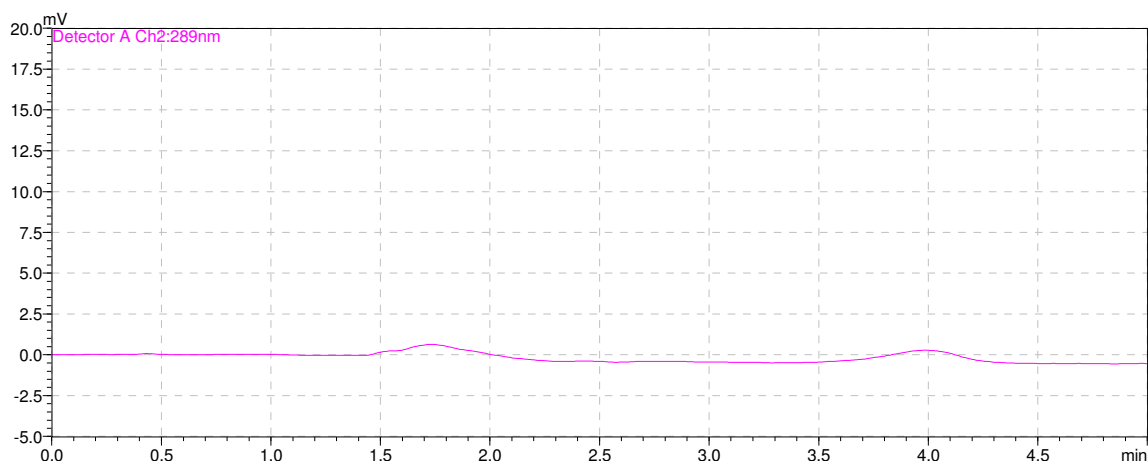
obr. č. 3: Chromatogram standardu kafru



obr. č. 4: Chromatogram vzorku



obr. č. 5: Chromatogram placebo (žluté vazeliny)



5.2.5. ROBUSTNOST

Po vyhodnocení závislosti retenčního času, velikosti píku, počtu teoretických pater, tailing faktoru a tlaku na průtoku byl průtok mobilní fáze zvýšen z původních 0,6 ml/min na 2,5 ml/min. Podle předpokladů se zvýšením průtoku došlo zároveň ke zvýšení tlaku na koloně. Toto zvýšení ale nebylo tak veliké, aby ovlivňovalo negativně analýzu či životnost kolony. Z výše vyjmenovaných závislostí vyplývá, že je metoda robustní vzhledem ke změnám v průtoku mobilní fáze a lze konstatovat, že změna průtoku v rozmezí od 2 ml do 3 ml neovlivní výsledky. Složení mobilní fáze nebylo nutné měnit. Při přípravě vzorku je důležité dodržet interval chlazení v mrazícím boxu.

LOD a LOQ nebylo zjišťováno vzhledem k tomu, že se jedná o stanovení účinné látky a obsah kofeinu se nemůže k tak nízkým hodnotám přiblížit.

5.2.6. TEST ZPŮSOBILOSTI CHROMATOGRFICKÉHO SYSTÉMU

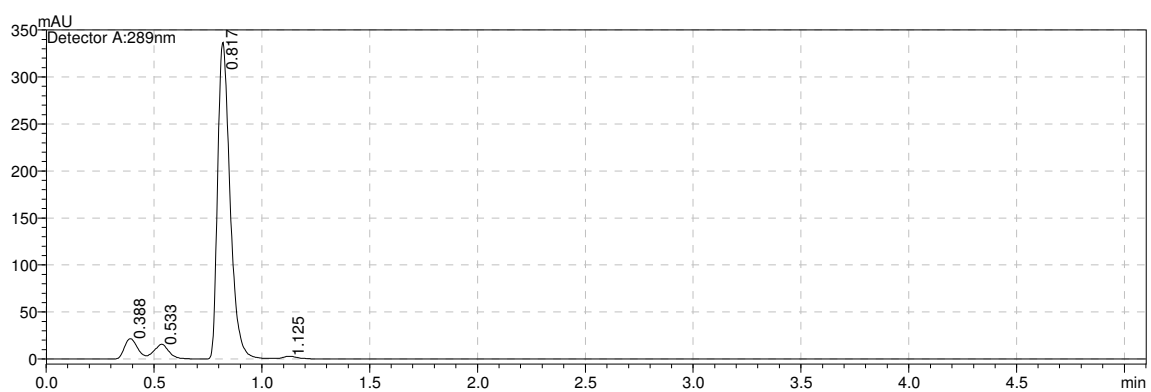
Pro test způsobilosti chromatografického systému byly vybrány parametry: počet teoretických pater, faktor symetrie píku a přesnost nástřiku vyjádřená jako RSD z pěti nástřiků porovnávacího roztoku. Běžně užívané rozlišení se pro tento případ nehodí, protože se analyzuje jen jedna složka přípravku. U počtu teoretických pater se vycházelo z reálných výsledků analýz prováděných během této práce. Návrh testu způsobilosti chromatografického systému je v následujícím odstavci.

Na kolonu se pětkrát nastříkne porovnávací roztok kafru. Počet teoretických pater nesmí být nižší než 550. Faktor symetrie píku musí být v rozmezí 0,8-1,5 a RSD nesmí být větší než 2,0 %.

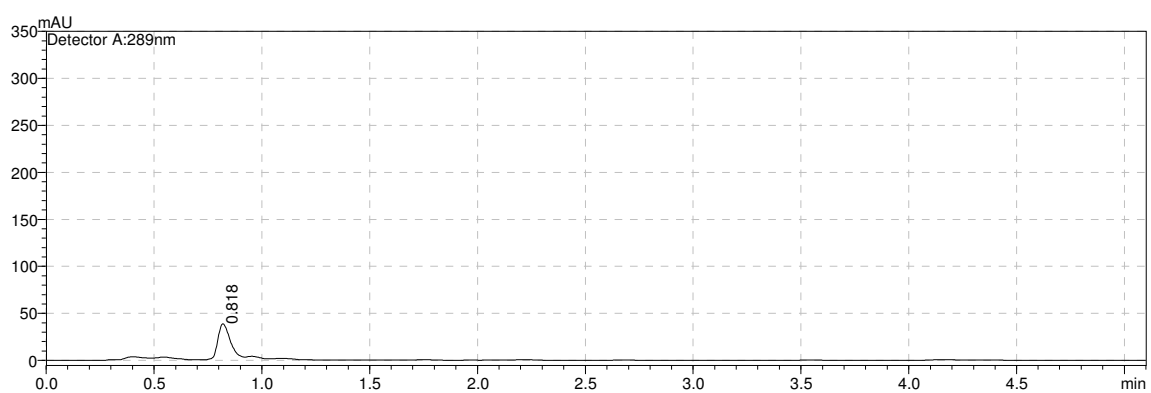
Použití HPLC systému s moderní monolitickou kolonou umožnilo zkrácení doby analýzy na cca 1/4, tj 1,3 min, z původních 5 min ve srovnání s metodou užívající klasickou kolonu. Změnou rychlosti průtoku mobilní fáze nedošlo podle předpokladů k výrazné úspoře mobilní fáze.

Tato metoda byla zkoušena i u dalších přípravků obsahujících kafr - Emspoma speciál Z, Mucoplant Eukalyptový balzám drm. ung. Z následujících chromatogramů vyplývá, že by metoda zřejmě byla použitelná zejména u prvně jmenovaného přípravku. Nicméně před případným použitím by metoda měla být validována. Validace pro tyto přípravky nemohla být provedena, protože nebylo k dispozici placebo. Pravděpodobně by bylo vhodné upravit navážku a možná i způsob úpravy vzorku před analýzou. Z validačních parametrů bude klíčové otestovat selektivitu stanovení. Samozřejmě nelze podcenit i parametry správnosti a přesnosti. Linearita by měla bez problémů vyhovovat.

obr. č. 6: Chromatogram přípravku Emspoma speciál Z



obr. č. 7: Chromatogram přípravku Mucoplant Eukalyptový balzám drm. ung.



6. ZÁVĚR

1. Byly zpracovány literární zdroje týkající se vysokoučinné kapalinové chromatografie, kafru a žluté vazelíny, validace analytických metod.
2. Byla zkrácena doba vlastní analýzy na cca 1,3 min. Analýza probíhala na chromatografické koloně Chromolith Speed rod, RP-18e 50-4,6 mm, opatřené chromatografickou předkolonkou Chromolith, RP-18e 10-4,6 mm. Mobilní fáze byla směs vody a methanolu (35:65), průtok 2,6 ml/min.
3. Byla zkoušena správnost metody. Průměrná recovery odpovídá hodnotě 99,03 %, RSD je rovna 0,49 %.
4. Byla ověřena přesnost metody. RSD je rovna hodnotě 0,83 %, uvedená hodnota vyhovuje normě ≤ 2 .
5. Byla zkoušena linearita metody. Byla prokázána lineární závislost pro kafr v koncentracích od 1,6040 mg/ml do 2,380 mg/ml. Korelační faktor je 0,9995.
6. Byla potvrzena selektivita metody, žádný pík neinterferuje s píkem stanovované látky.
7. Metoda byla pilotně otestována na 2 dalších přípravcích s obsahem kafru.

7. LITERATURA

1. Klimeš, J. a kol. *Kontrola léčiv I.*. Karolinum, Praha, 2006
2. Klimeš, J. a kol. *Kontrola léčiv II.*. Karolinum, Praha, 2004
3. Karlíček, R. a kol. *Analytická chemie pro farmaceuty*. Karolinum, Praha, 2001
4. *Wikipedia*, poslední revize 25.11. 2008, Dostupné z <http://cs.wikipedia.org/wiki/HPLC>
5. Churáček, J., Jandera, P. *Separace látek: Kapalinová vysokoúčinná kolonová chromatografie*, SNTL, Praha 1981
6. Klouda, P. *Moderní analytické metody*, Pavel Klouda, Ostrava 2003
7. Churáček, J., Jandera, P. *Úvod do vysokoúčinné kolonové chromatografie*, SNTL, Praha 1984
8. Volka, K. a kol. *Analytická chemie II.*, Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Praha, 1995
9. *Datový standard MZ ČR-verze 4*, platný od 1.1. 2009, Dostupný z http://ciselniky.dasta.mzcr.cz/CD_DS4/hypertext/AJAOF.htm
10. Český lékopis 2002 (ČL 2002). Grada, Praha, 2002
11. Krejčí, M., Pajurek, J., Kometa, R. a kol. *Výpočty a veličiny v sorpční kolonové chromatografii*, SNTL, Praha 1990
12. Douša, M. *hplc.cz*, poslední revize 3. 2. 2009, Dostupné z <http://www.hplc.cz/>
13. Churáček J. a kol. *Nové trendy v teorii a instrumentaci vybraných analytických metod*. Academia, Praha, 1993

14. Jandera, P. *Pokroky v instrumentaci kapalinové chromatografie*. Academia, Praha, 1993
15. *Wikipedia*, poslední revize 15.2. 2009, Dostupná z <http://cs.wikipedia.org/wiki/Kafr>
16. *PubChem Public Chemical Database*, PubChem Substance, Dostupné z <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez>
17. Český lékopis 2005 (ČL 2005). Grada, Praha 2005
18. Hubík, J., Dušek, J., Řezáčová, A., Štarhová, H. *Obecná farmakognosie II. Sekundární látky*, Státní pedagogické nakladatelství, Praha 1978
19. Souhrn SPC: Unguentum camphoratum 10%, AISLP WIN ČR
20. Komárek, P., Rabišková, M. *Technologie léků*, Galen, Praha 2006
21. Eckschlager, K., Horsák, I., Kodejš, Z. *Vyhodnocování analytických výsledků a metod*, SNTL, Praha 1980
22. Kučera M., Minařík, J. *Přírodní léčiva; Farmakognosie*, Avicenum, Praha 1971
23. *Merck chemicals*, Dostupné z http://www.merck-chemicals.com/chromolith-hplc-kolony/czech/c_oUeb.s1LrkgAAAEWq.AfVhTl
24. Douša, M. *hplc.cz*, poslední revize 3. 2. 2009, Dostupné z http://hplc.sweb.cz/Faq/monolithic_columns.htm
25. Voříšková, Michaela. *Diplomová práce: Hodnocení vybrané účinné látky v přípravku II (Stanovení obsahu kafru pomocí HPLC)*, Hradec Králové 2009
26. *Remedia Compendium*, čtvrté vydání, Praha, 2009

27. Štulík, K. a kol. *Analytické separační metody*, Karolinum, Praha, 2004

SOUHRN

Hodnocení kafru v masti s využitím monolitické kolony
Rigorózní práce

Mgr. Michaela Voříšková

Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové,
Katedra farmaceutické chemie a kontroly léčiv

Byla vyvinuta HPLC metoda pro stanovení kafru v léčivém přípravku Unguentum camphoratum 10% s použitím monolitické stacionární fáze. Oproti metodě na klasické náplňové koloně došlo ke zkrácení doby analýzy na cca 1,3 minut. Byla použita chromatografická kolona Chromolith Speed rod, RP-18e 50-4,6 mm a chromatografická předkolonka Chromolith, RP-18e 10-4,6 mm s mobilní fází voda a methanol v poměru 35 : 65. K detekci byl použit UV detektor s nastavenou vlnovou délkou 289 nm. Metoda byla validována z hlediska správnosti (recovery = 99,03 %), přesnosti (RSD = 0,83 %), linearity ($R = 0,9995$) a selektivity. Na závěr byla vyvinutá metoda otestována při analýze kafru v dalších přípravcích.

ABSTRACT

Determination of Camphor content in the ointment using monolithic column
Thesis

Mgr. Michaela Voříšková

Charles University in Prague, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové,
Department of Pharmaceutical Chemistry and Drug Control

The HPLC method for determination of camphor content in pharmaceutical preparation Unguentum camphoratum vaselinatum 10% using monolithic column was developed. The time of analysis was shortened to 1,3 min. The chromatographic column Chromolith Speed rod, RP-18e 50-4,6 mm and chromatographic precolumn Chromolith, RP-18e 10-4,6 mm with mobile phase water : methanol 35 : 65 were used. UV detector for the determination with the setting wave length 289 nm was used. The method was validated for accuracy (recovery = 99,03 %), precision (RSD = 0,83 %), linearity (R = 0,9995) and for specificity. The method was also tested in other pharmaceutical preparations containing camphor.