UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

KATEDRA ANALYTICKÉ CHEMIE

Vývoj a validace HPLC metody pro stanovení účinných látek a nečistoty v přípravku Valetol

Vedoucí rigorózní práce: Doc. RNDr. Dalibor Šatínský, Ph.D.

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

Hradec Králové, 2009

Mgr. Alena Maroušková

Děkuji svému školiteli Doc. RNDr. Daliborovi Šatínskému, Ph.D.

Prohlášení

Prohlašuji, že tato práce vznikla jako originální autorské dílo, že uvedené informace jsou pravdivé, použité zdroje jsou citované a naměřená data byla získána na základě mého praktického měření.

Abstrakt

Tato práce navazuje na diplomovou práci [1], ve které byly nalezeny optimální chromatografické podmínky pro stanovení účinných látek léčivého přípravku Valetol, paracetamolu, kofeinu a propyfenazonu, a nečistoty p-aminofenolu, metodou HPLC.

Součástí rigorózní práce bylo nalezení vhodného vnitřního standardu pro přesnou kvantifikaci účinných látek a nečistoty, kyseliny benzoové. Následně byla provedena validace analytické metody, včetně testu vhodnosti chromatografického systému.

V rámci testu vhodnosti chromatografického systému byla testována:

• účinnost kolony vyjádřená počtem teoretických pater N
• asymetrie chromatografických píků vyjádřená faktorem T
• rozlišení chromatografických píků
• opakovatelnost vyjádřená relativní směrodatnou odchylkou

V rámci validace analytické metody byla testována:

• přesnost
• linearita
• správnost
• selektivita
• robustnost
• stabilita

Test robustnosti prokázal citlivost analýzy na změnu složení mobilní fáze. Byly testovány dva parametry mobilní fáze: pH a změna obsahu triethylaminu. Bylo dokázáno, že změna pH mobilní fáze má vliv především na retenční časy p-aminofenolu a kyseliny benzoové. Změna obsahu triethylaminu v mobilní fázi má výrazný vliv jak na retenční čas p-aminofenolu, tak na velikost plochy píku p-aminofenolu (na jeho kvantifikaci).

Požadavek na stabilitu roztoku p-aminofenolu v methanolu nebyl splněn pro žádnou z testovaných podmínek uchovávání, což je důkazem jeho výrazné nestability *(viz teoretická část)*. Je proto nutné připravovat jeho roztok každý den čerstvý.

Z validace analytické metody vyplývá, že kladeným požadavkům nevyhovuje parametr robustnosti a stability. Metoda tedy může být použita v praxi, ale pouze s ohledem na výše uvedené skutečnosti.

Abstract

This work extends the graduation thesis which found optimal chromatographic conditions for a separation of paracetamol, caffeine and propyphenazon, and the impurity p-aminophenol in the pharmaceutical preparation Valetol by HPLC method.

At first, the benzoic acid was found as a suitable internal standard for the quantification. Next, the analytical method validation was carried out, including the suitability test of the chromatographic system.

Within the suitability test of the chromatographic system the following attributes were tested:

• column efficiency expressed as a number of theoretic plates N
• assymetry of chromatographic peaks expressed as factor T
• resolution of chromatographic peaks
• reproducibility expressed as a relative standard error

Within the analytic method validation were tested:

• precision
• linearity
• accuracy
• selectivity
• robustness
• stability

The robustness test confirmed the analysis sensitivity to the change in the character of the mobil phase. As a part of the robustness test two parameters of mobile phase were tested: pH and triethylamine concentration changes. It was confirmed that the change of pH of the mobile phase influences mostly the retention times of p-aminophenol and benzoic acid. The change of triethylamine amount in the mobile phase influences mostly the retention time of p-aminophenol and the area under the peak (its quantification).

Demands for p-aminophenol in methanol-solution stability were not fulfilled for any of the tested storage conditions, and its considerable unstability was proved. It is essential that fresh p-aminophenol methanol-solution should be prepared every day.

The analytic method validation shows that it does not fulfil the robustness and stability attributes. Thereafter the method can be used in everyday routine, but a special attention must be paid to the facts shown above.

Obsah

Obsah 1
1 Použité zkratky 4
2 Úvod 5
3 Cíl práce 6
4 Teoretická část 7
4.1 Valetol 7
4.1.1 Kompletní složení přípravku 8
4.1.2 Paracetamol 8
4.1.3 Kofein 9
4.1.4 Propyfenazon 11
4.2 p-Aminofenol 12
4.3 Kyselina benzoová 15
4.4 Toxicita paracetamolu 16
4.4.1 Mechanismus účinku 16
4.4.2 Paracetamol – hepatotoxicita 16
4.4.3 Akutní jaterní selhání po předávkování paracetamolem 18
4.4.4 Paracetamolem vyvolaná nefrotoxicita 20
4.5 Chromatografické separační metody 23
4.5.1 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie 24
4.5.2 Separace paracetamolu, kofeinu, propyfenazonu a p-aminofenolu metodou HPLC 25
4.5.3 Separace paracetamolu, kofeinu a propyfenazonu metodou HPLC 25
4.5.4 PEG kolona v systému reverzních fází 26
4.6 Validace analytických metod 27
4.6.1 Validace analytické metody 28
4.6.1.1 Správnost 28
4.6.1.2 Přesnost 29
4.6.1.3 Selektivita 30
4.6.1.4 Detekční limit 30
4.6.1.5 Kvantitativní limit 31
4.6.1.6 Linearita 31
4.6.1.7 Rozsah 31

4.6.1.8 Robustnost 31
4.6.2 Test způsobilosti chromatografického systému 32
4.6.2.1 Účinnost chromatografické kolony 32
4.6.2.2 Rozlišení chromatografických píků 32
4.6.2.3 Relativní retence 32
4.6.2.4 Faktor symetrie 33
4.6.2.5 Opakovatelnost analýzy 33
5 Experimentální část 34
5.1 Materiály a pomůcky 34
5.1.1 Chemikálie, standardy, vzorky 34
5.1.2 Přístroje, podmínky separace 35
5.2 Příprava vzorku 35
5.3 Příprava roztoku standardů 36
5.4 Příprava směsného roztoku standardů 36
5.5 Izolace účinných látek – paracetamolu, propyphenazonu a kofeinu 36
6 Výsledky a diskuze 37
6.1 Optimalizace chromatografických podmínek 37
6.1.1 Optimalizace složení mobilní fáze 37
6.1.2 Volba vnitřního standardu 37
6.1.3 Volba vlnové délky detektoru 38
6.1.4 Volba dávkovaného objemu a rychlosti průtoku mobilní fáze 39
6.1.5 Souhrn optimálních chromatografických podmínek 40
6.2 Validace metody 41
6.2.1 Test vhodnosti chromatografického systému 41
6.2.1.1 Účinnost chromatografického systému – počet teoretických pater (N) 41
6.2.1.2 Asymetrie chromatografických píků (T) 41
6.2.1.3 Rozlišení chromatografických píků (*R*) 42
6.2.1.4 Opakovatelnost analýzy 43
6.2.2 Validace analytické metody 47
6.2.2.1 Přesnost 47
6.2.2.2 Linearita 47
6.2.2.3 Správnost 53
6.2.2.4 Selektivita 56

6.2.2.5 Robustnost 57
6.2.2.6 Stabilita.....60
7 Závěr 63
8 Citovaná literatura 65

1 Použité zkratky

HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
PAR	paracetamol
KOF	kofein
PRO	propyfenazon
4AF	p-aminofenol
k.BENZ	kyselina benzoová
ACN	acetonitril
TEA	triethanolamin
PVC	polyvinylchlorid
FIA	průtoková injekční analýza
COX-3	cyklooxygenasa 3
PGG_2, PGH_2	prostaglandiny G_2, H_2
NAPQI	N-acetyl-p-benzochinonimin
PGES	prostaglandin endoperoxid-syntetáza
FDA	Food and Drug Administration
cGMPs	Facts About Current Good Manufactuting Practices
ISO/IEC	International Ogranization for Standardization/International Electrotechnical Committee
ICH	The International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use
EPA	Enviromental Protection Agency
SÚKL	Státní ústav pro kontrolu léčiv
FaF	Farmaceutická fakulta
MF	mobilní fáze
PEG	polyethylenglykol

2 Úvod

Valetol je léčivý přípravek určený ke krátkodobé léčbě bolesti. Jeho součástí je propyfenazon, paracetamol a kofein. Přestože je paracetamol považován za poměrně bezpečné analgetikum-antipyretikum, které je lékem první volby ke snížení horečky a bolestí u dětí do 12ti let, těhotných žen i starších pacientů, dochází při jeho předávkování ke zvýšené tvorbě toxického meziproduktu, který může způsobit závažné poškození jater. Tento meziprodukt vzniká z p-aminofenolu, metabolitu a současně hlavního rozkladného produktu paracetamolu. S ohledem na riziko spojené s jeho přítomností v léčivých přípravcích je v současné době zaměřena pozornost na stanovení p-aminofenolu ve velmi nízkých koncentracích.

Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC) je dnes v oblasti analýzy léčiv nejpoužívanější analytickou metodou. Její předností je možnost současného kvalitativního i kvantitativního stanovení separovaných složek směsi, dále rychlost a citlivost stanovení.

V diplomové práci [1] byly nalezeny optimální chromatografické podmínky pro HPLC separaci p-aminofenolu, paracetamolu, kofeinu a propyfenazonu.

V této práci byla provedena volba vnitřního standardu pro kvantifikaci všech účinných látek a nečistoty a validace metody.

3 Cíl práce

Cílem práce bylo validovat HPLC metodu optimalizovanou v diplomové práci [1] se současně stanoveným vnitřním standardem pro kvantifikaci účinných látek – kyselinou benzoovou. Ta za daných podmínek neovlivňuje separaci látek a její retenční čas je blízký retenčnímu času p-aminofenolu.

Validaci můžeme definovat jako proces, jejímž cílem je demonstrovat a dokumentovat kvalitu analytické metody ustanovením definovaných kritérií a měřením jejich hodnot. Smyslem validace je tedy ověřit platnost zvoleného analytického postupu (metody).

Paracetamol, propyfenazon, kofein a p-aminofenol jsou látky s výrazně rozdílnými vlastnostmi (polarita, acidobazicita). Nejoptimálnější podmínky pro jejich separaci byly nalezeny na polyethylenglykolové koloně v systému reverzních fázích. Při optimalizaci metody byla pozorována výrazná nestabilita p-aminofenolu v roztoku a závislost retence p-aminofenolu na množství triethylaminu v mobilní fázi.

4 Teoretická část

4.1 Valetol [2]

Valetol je kompozitní přípravek s analgetickými vlastnostmi. Jeho hlavními účinnými látkami jsou paracetamol (150 mg), propyfenazon (300 mg) a kofein (50 mg). Je vhodný pro krátkodobou léčbu bolesti.

Propyfenazon a paracetamol blokují periferní receptory bolesti, kofein potencuje účinnost obou analgetik. Svými psychostimulačními účinky tlumí únavu a ospalost a působí jako centrální analeptikum dýchání a oběhu především při hořečnatých stavech a infekčních onemocněních. Propyfenazon je derivát pyrazolonu, působí analgeticky, antipyreticky a antiflogisticky. Paracetamol je rychle působící, účinné a relativně bezpečné analgetikum-antipyretikum, bez antiflogistické aktivity s dobrou gastrointestinální snášenlivosti.

Analgetický účinek Valetolu nastupuje za 30 minut po podání a trvá několik hodin.

Z nežádoucích reakcí se může objevit rash, kožní alergie a jen zcela ojediněle bronchospasmus. Dále tlak v epigastriu, nechutenství, vomitus, průjem, vzácně poruchy krvetvorby, velmi zřídka palpitace, nespavost a zvýšená dráždivost.

Zvláštní opatrnosti je zapotřebí u pacientů s vředovou chorobou gastroduodena v anamnéze a chronickou pankreatitidou, tyreotoxikózou, hypertenzí, srdeční arytmií, při závažných onemocněních kardiovaskulárního systému, u pacientů s krevní dyskrazií, dále při úzkostných stavech a u nespavosti.

Během léčby není vhodné pití alkoholických nápojů.

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

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

4.1.1 Kompletní složení přípravku [1]

Paracetamol	150 mg
Kofein	50 mg
Propyfenazon	300 mg

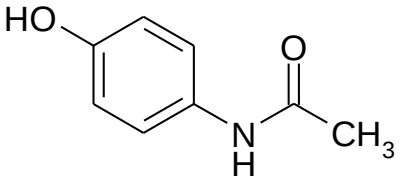
Pomocné látky: Maydis amylum praegelatum
Povidonum
Croscarmellosum natricum,
Talcum
Stearinum,
Magnesii stearas
Maydis amylum
Carboxymethylamylum natricum
Cellulosum micocrystallinum

4.1.2 Paracetamol

Fyzikální a chemické vlastnosti: [3] [4]

Paracetamol je bílý krystalický prášek. Je mírně rozpustný ve vodě, snadno rozpustný v lihu 96%, velmi těžce rozpustný v etheru a v dichlormethanu. Chemicky je to N-(4-hydroxyfenyl)acetamid, patří mezi deriváty anilinu. Dnes je nejvýznamnějším analgetikem této řady.
Souhrn acidobazických a lipofilních vlastností paracetamolu je uveden v tabulce č.1.

Struktura:



Sumární vzorec: $C_8H_9NO_2$

M_r: 151,16

Teplota tání: 168 °C až 172 °C

Hlavním rozkladným procesem probíhajícím u léčiv se strukturou amidu je hydrolýza.

Pro důkaz paracetamolu se využívá jeho kyselé hydrolýzy na p-aminofenol a následné oxidace na intenzivně zbarvený fialový produkt. [5]

Paracetamol je citlivý na světlo, a pokud obsahuje stopy p-aminofenolu, oxiduje se, což se projeví barevnými změnami. [6] p-Aminofenol, jeho metabolit a zároveň hlavní rozkladný produkt, je současně hlavní příčinou jeho toxicity. [7]

Farmakodynamické účinky: [2] [8]

Paracetamol je analgetikum-antipyretikum bez antiflogistické aktivity, s dobrou gastrointestinální snášenlivostí, vhodné v pediatrii i u dospělých pacientů. Jeho analgeticko-antipyretické účinky jsou srovnatelné s kyselinou acetylsalicylovou, proti které však má mnohem lepší snášenlivost. Neovlivňuje glykémii a je tedy vhodný i u diabetiků. Dále nepůsobí na krevní srážlivost, proto ho lze použít u pacientů užívajících perorální antikoagulancia a u hemofiliků. Nemá vliv na hladinu kyseliny močové a její vylučování do moči. Lze jej použít všude tam, kde jsou kontraindikovány salicyláty. [2]

Paracetamol patří do skupiny analgetik-antipyretik s mírným analgetickým účinkem. Tyto látky nedosahují aktivity silných analgetik morfinového typu, proto se často nazývají neopioidní (nenarkotická) analgetika. Kromě toho mají vlastnosti antipyretické, tj. schopnost snižovat nemocí zvýšenou tělesnou teplotu inhibicí cyklooxygenasy v hypotalamu, centrální mechanismus se podílí rovněž na analgetickém účinku.

Od klasických nesteroidních antiflogistik se liší absencí protizánětlivého účinku. Slabá analgetika se často používají ve směsích, obsahujících ještě další léčiva jako je např. kofein, která jejich analgetický účinek potencují. Výsledná analgetická aktivita je vyšší než suma účinků jednotlivých součástí.

Použití: [8]

Paracetamol je lékem první volby ke snížení horečky a bolestí u dětí do 12ti let, těhotných žen i starších pacientů. U dospělých se podává hlavně v situacích, kdy je na závadu antiagregační účinek a některé další nežádoucí účinky kyseliny acetylsalicylové. Po terapeutických dávkách je výskyt jeho nežádoucích účinků malý.

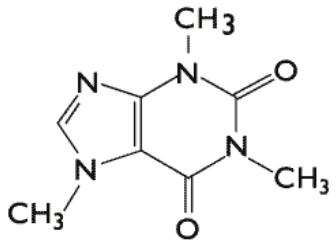
4.1.3 Kofein

Fyzikální a chemické vlastnosti: [3] [9]

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

Souhrn acidobazických a lipofilních vlastností kofeinu je uveden v tabulce č. 1.

Struktura:



Sumární vzorec: $C_8H_{10}N_4O_2$

M_r: 194,19

Teplota tání: 234 °C až 239 °C

Kofein patří mezi purinové alkaloidy odvozené od xantinu (2,6-dioxopurin) náhradou vodíků v NH skupinách methyly. Bazicitu kofeinu způsobuje volný elektronový pár na dusíku v poloze 9. Jeho nízká rozpustnost ve vodě se řeší přípravou rozpustných solí se slabými organickými kyselinami, např. s kyselinou citronovou.

Výskyt a výroba: [1]

Mezi farmaceuticky významné purinové alkaloidy patří kromě kofeinu teofylin (1,3-dimethylxantin) a teobromin (3,7-dimethylxantin). Vyskytují se v drogách *Semen coffeae, Folium theae, Folium maté, Semen colae, Guarana a Semen cacao,* které jsou spíše poživatinami než léčivy a slouží jako zdroje těchto alkaloidů. Kofein se získává také polosynteticky z teobrominu z kakaových odsevů nebo zcela synteticky.

Farmakodynamické vlastnosti: [8]

Kofein patří do skupiny methylxantinů, převážně se však užívá jako adjuvans v některých analgeticko-antipyretických a dalších směsích. Má centrálně stimulační účinky a mírné účinky kardiostimulační a diuretické. Při předávkování může vyvolat nespavost, bolesti hlavy, nauzeu až zvracení, tachyarytmie, iritabilitu a svalový třes. Zvyšuje žaludeční sekreci HCl. Mechanismus účinku methylxantinů spočívá v inhibici fosfodiesterasy I-IV a v antagonistickém působení na adenosinové receptory.

Farmakokinetické vlastnosti: [8]

Methylxantiny se vcelku dobře resorbují z trávicího ústrojí (potrava resorpci zpomaluje), distribuují se do všech tkání, biotransformují se v játrech a vylučují se močí. Procházejí placentární bariérou a do mateřského mléka.

Použití: [1]

Kofein se u nás dnes používá jako adjuvans v analgeticko-antipyretických směsích, pro prevenci kinetóz v kombinaci s H_1-antihistaminiky (především s moxastinem), ve směsi s efedrinem může potencovat anorektický účinek dalších látek (Elsinorské prášky).

Kofein a teobromin jsou také obsaženy v řadě nápojů s psychostimulačními účinky (káva, čaj, kakao aj.). Retardované lékové formy methylxantinů se užívají při léčbě středně těžkých a především těžkých forem perzistujícího astmatu. Jako analeptikum dechového a oběhového systému se u nás kofein užívá ve veterinární medicíně i parenterálně.

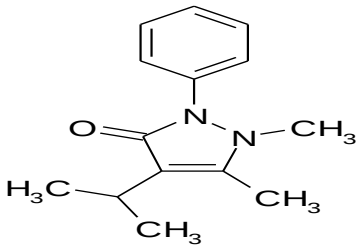
4.1.4 Propyfenazon [1]

Fyzikální a chemické vlasnosti:

Propyfenazon je bílý nebo slabě nažloutlý krystalický prášek. Je těžce rozpustný ve vodě, snadno rozpustný v dichlormethanu a v lihu 96%, dobře rozpustný v etheru. Propyfenazon je slabou bazí, je řazen k látkám spíše polárního charakteru. Chemicky je to 2-fenyl-4-isopropyl-1,5-dimethyl-1,2-dihydro-3H-pyrazol-3-on.

Souhrn acidobazických a lipofilních vlastností propyfenazonu je uveden v tabulce č. 1.

Struktura:



Sumární vzorec: $C_{14}H_{18}N_2O$

M_r: 230,31

Teplota tání: 102 °C až 106 °C.

Propyfenazon je řazen společně s paracetamolem do skupiny neopioidních (nenarkotických) analgetik-antipyretik (*viz výše).* Jde o 4-substituční derivát pyrazolonu. Propyfenazon se stal vhodnou náhradou za aminofenazon, ze kterého v kyselém prostředí a v přítomnosti dusitanů vzniká potenciální kancerogen dimethylnitrosamin.

Farmakodynamické vlastnosti:

Celá skupina pyrazolonových analgetik se vyznačuje výraznými analgetickými a antipyretickými účinky, které doprovázejí účinky antirevmatické a spasmolytické.
V minulosti patřily tyto látky k velmi oblíbeným látkám. Po jejich podání však často docházelo ke vzniku gastroduodenálních vředů s krvácením nebo dokonce perforací. Život ohrožující komplikací byly poruchy hemopoézy (především po fenylbutazonu). Aminofenazon byl podezírán z kancerogenity. Pro značnou toxicitu se od derivátů pyrazolonu upouští.

Farmakokinetické vlastnosti:

Po perorálním podání je propyfenazon rychle resorbován (v průběhu 30 minut) a z převážné části rychle vylučován ledvinami. Prostupuje placentární bariérou, eliminační poločas je 1-1,5 hodiny.

Použití:

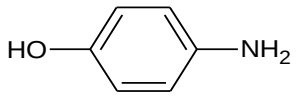
Propyfenazon se nejčastěji používá do vícesložkových kombinovaných analgetik, resp. antiflogistik. Výskyt závažných nežádoucích účinků se s prodlužováním doby podávání zvyšuje, proto není pro dlouhodobé rutinní použití doporučován.

4.2 p-Aminofenol[1]

Fyzikální a chemické vlastnosti:

p-Aminofenol je bílý nebo slabě zbarvený krystalický prášek. Vlivem světla a vzduchu tmavne. Je rozpustný v horké vodě, alkoholu a etheru.
Jde o látku amfoterní, spíše polárního charakteru. Aminoskupina v *para* poloze snižuje kyselost fenolického hydroxylu.
Souhrn acidobazických a lipofilních vlastností p-aminofenolu je uveden v tabulce č. 1.

Struktura:



Sumární vzorec: C_6H_7NO

M_r: 109,1

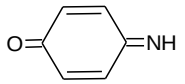
Teplota tání: 184 °C až 186 °C

Charakteristika a použití p-aminofenolu:p-Aminofenol je metabolit a zároveň primární hydrolytický rozkladný produkt paracetamolu. Je hlavní příčinou jeho toxicity, proto je množství této hlavní nečistoty Evropským lékopisem limitováno na nízké hodnotě 50 ppm (0,005% w/w).
p-Aminofenol je dále důležitým chemickým meziproduktem používaným při výrobě několika léčiv s analgetickým a antipyretickým účinkem, např. paracetamolu, acetanilidu, fenacetinu aj. Vedle farmaceutického průmyslu je používán při výrobě různých průmyslových barviv, jako fotografická vývojka a to buď sám, nebo v kombinaci s hydrochinony. Je silným redukčním činidlem.
Oxalátová sůl p-aminofenolu se používá jako inhibitor koroze v nátěrových lacích a jako antikorozivní mazání do dvoufázových spalovacích motorů.

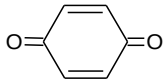
Průmyslově je p-aminofenol vyráběn hydrogenací nitrobenzenu a p-nitrofenolu.

Stabilita p-aminofenolu:

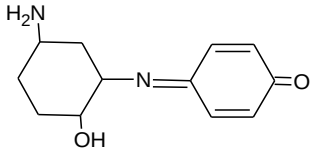
Aminofenoly obecně, zvláště orto a para-aminofenoly, jsou dlouhodobým působením vzduchu a světla velmi ochotně oxidovány. V prvním stupni oxidace vznikají chinoniminy, ve druhém stupni chinony. Zpětnou reakcí chinoniminů s p-aminofenoly vznikají semi-chinoniminy. Všechny výše uvedené reakce se vyznačují barevnými změnami.



chinoniminy



chinony



semichinoniminy

p-Aminofenoly ochotně reagují s chinony za vzniku červeně zbarveného roztoku. Ten je nerozpustný v kyselém prostředí, zato poměrně dobře rozpustný v prostředí zásaditém za vzniku modrého zbarvení. Semi-chinoniminy jsou rozpustné v kyselém i v zásaditém prostředí za vzniku modrého a žlutého zbarvení. Redukcí se semi-chinoniminy odbarvují. Všechny výše uvedené sloučeniny vykazují v redukované formě výrazné kyselé vlastnosti, díky kterým mohou být od p-aminofenolu separovány.

Nestabilita aminofenolů v roztoku je způsobena právě jejich výraznými oxidačními vlastnostmi. V nepřítomnosti slunečního světla jsou mnohem stabilnější. Dalšími faktory, které příznivě ovlivňují jejich schopnost se oxidovat, je právě přítomnost chinonů a chinoniminů a alkalické prostředí.

Chinony nejsou rozpustné ve vodě, zato se ochotně rozpouštějí téměř ve všech organických rozpouštědlech. Hydrochinony, redukční produkty chinonů, jsou na rozdíl od chinonů rozpustné ve vodných roztocích, zvláště pak v bazických. Jejich rozpustnost v bazických vodných roztocích je natolik výrazná, že z nich nejsou extrahovatelné pomocí organického rozpouštědla. Červeně zbarvený komplex vznikající reakcí chinonů s p-aminofenoly je nerozpustný v kyselém prostředí, ale rozpustný v organických rozpouštědlech.

Těchto vlastností lze využít k získání čistého p-aminofenolu. Lze ho získat rozpuštěním znečištěného p-aminofenolu ve zředěném kyselém roztoku o pH 1,5 - 2,5, ze kterého jsou chinony, chinoniminy a semi-chinoniminy odstraněny buď filtrací, nebo extrakcí organickým rozpouštědlem. V průběhu této reakce jsou všechny přítomné chinony, chinoniminy a semi-chinoniminy redukovány.

Stabilita p-aminofenolu v 50% methanolu a v 0,5% kyselině octové po dobu 24 a 48 hodin je podrobně popsána v práci autora Bloomfielda. [10] p-Aminofenol byl stanovován metodou průtokové injekční analýzy (FIA).
Z této práce vyplývá, že p-aminofenol je stabilnější v 0,5% kyselině octové.

Na Katedře farmaceutické chemie a kontroly léčiv byla sledována stabilita p-aminofenolu v 50% methanolu při různém skladování. [11] Stanovení p-aminofenolu bylo prováděno pomocí HPLC metody.
Z této práce vyplývá, že p-aminofenol je v 50% methanolu nejstabilnější při 7°C bez přístupu světla.

Působení v živých organismech a metabolismus p-aminofenolu:

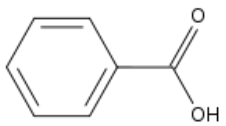
p-Aminofenol je často používanou průmyslovou chemikálií, na krysy působí výrazně nefrotoxicky. U myší způsobuje akutní poškození jater. Na míře poškození jaterních buněk indukované p-aminofenolem se podílí jednak glutathion, jednak N-acetylace p-aminofenolu na acetaminofen. Přesný mechanismus hepatotoxicity však není znám.
Dalším důsledkem toxického působením p-aminofenolu je vznik methemoglobinémie. p-Aminofenolem vyvolaná methemoglobinémie byla prokázána u koček, psů, krys a myší. U koček může methemoglobinémii způsobit i paracetamol.
Osud p-aminofenolu v organismu není dosud plně objasněn. U krys p-aminofenol pravděpodobně podléhá N-acetylaci za vzniku acetaminofenu, jeho metabolismus pak probíhá podobnou cestou jako metabolismus paracetamolu.
Podobně jako paracetamol může p-aminofenol podléhat konjugaci s kyselinou glukuronovou nebo sulfáty. Rovněž může podléhat konjugaci s glutathionem, pravděpodobně po předchozí oxidaci na benzochinonimin. Je dokázáno, že glutathion je nutný nejen k ochraně proti paracetamolem způsobené hepatotoxicitě, ale i proti jaternímu poškození indukovanému p-aminofenolem. Reakcí toxických metabolitů p-aminofenolu s glutathionem vzniká netoxický konjugát.

4.3 Kyselina benzoová

Fyzikální a chemické vlastnosti: [3] [12]

Kyselina benzoová je nejjednodušší aromatická jednosytná karboxylová kyselina. Za normálních podmínek je to bílý krystalický prášek nebo bezbarvé krystaly bez pachu nebo s velmi slabým charakteristickým pachem. Je těžce rozpustná ve vodě, dobře rozpustná ve vroucí vodě, snadno rozpustná v lihu 96%, v etheru a v mastných olejích.
Jedná se o slabou kyselinu. Využívá se jako konzervační prostředek, léčivo proti kožním infekcím a je velice důležitým prekurzorem v organické syntéze.

Struktura:



Sumární vzorec: $C_7H_6O_2$

M_r: 122,12

Teplota tání: 124 °C

Výskyt a výroba: [12]

V přírodě se vyskytuje jak volně tak i ve sloučeninách, hlavně v pryskyřici benzoe a v esterech (tzv. balzámech).

Kyselina benzoová se průmyslově vyrábí oxidací toluenu kyslíkem za katalýzy kobaltu nebo manganistanu draselného, reakce probíhá s velmi vysokými výtěžky a vychází z lehce dostupného prekurzoru.
Další způsob výroby spočívá v dekarboxylaci kyseliny ftalové.

Použití: [12]

Kyselina benzoová a její soli (sodné, draselné a vápenaté) se používají jako konzervační prostředky. Dále je velice důležitým prekurzorem pro syntézu mnoha dalších organických látek (např. benzoylchlorid, benzoylperoxid, fenol atd.).

V lékařství se používá v kombinaci s kyselinou salicylovou při léčbě kožních infekcí, může se používat také proti akné.

Nežádoucí účinky kyseliny benzoové při nadměrné expozici na tělo mohou vyvolat kopřivku, astma, rinitidu nebo anafylaktický šok.

4.4 Toxicita paracetamolu

Paracetamol byl prvně popsán jako analgetikum a antipyretikum Von Meringem v roce 1893. V roce 1940 Brodie a Axelrod potvrdili jeho analgetické a antipyretické účinky. Usuzovali, že je terapeuticky aktivním metabolitem acetanilidu a fenacetinu, ale na rozdíl od nich není odpovědný za vyvolání methemoglobinémie. Narůstal zájem o jeho klinické využití. PAR byl představen na kanadském trhu v roce 1950 jako antipyretikum a analgetikum k úlevě od slabých a středně silných bolestí. [13]

4.4.1 Mechanismus účinku [8] [14]

Antipyretické účinky paracetamolu se vysvětlují inhibicí cyklooxygenasy v hypotalamu, centrální mechanismus se podílí rovněž na analgetickém účinku (selektivní inhibice COX-3, nepřímé působení na serotoninové receptory v míše).
Na periferii paracetamol urychluje přeměnu prostaglandinu PGG_2 na PGH_2 a tím snižuje protizánětlivé působení nestabilního endoperoxidu PGG_2.
Po perorálním podání se dobře absorbuje z trávicího ústrojí. Maximální koncentrace dosahuje za 30-60 minut. Vazba na plazmatické bílkoviny je nízká.

Paracetamol je dnes obecně používané analgetikum-antipyretikum, ze všech léků je však celosvětově nejčastější příčinou otrav. Vážné nežádoucí účinky PAR dosažené při běžných terapeutických dávkách (500 mg 3-4krát denně) jsou neobvyklé. Vzácně se objeví hypersenzitivní reakce, pouze v několika málo případech musel být lék vysazen a symptomy léčeny. K otravě paracetamolem dochází buď akutním předávkováním (jednorázové požití vysoké dávky paracetamolu), nebo velmi často opakovaným užitím léku s léčebným záměrem.

4.4.2 Paracetamol – hepatotoxicita [13] [15] [16] [17]

Hepatotoxicita vyvolaná PAR je výrazně závislá na dávce a může být příčinou závažného hepatocelulární poškození, které obvykle vyžaduje akutní požití nejméně 10–15g léku. Hlavním patologickým znakem poškození jater působením PAR je centralizovaná nekrosa. Mnoho základních mechanismů podílejících se na vzniku nekrosy poskytl Mitchell a jeho spolupracovníci. Studie na zvířatech ukazují, že většina podaného paracetamolu (více než 90%) je metabolizována glukuronidací a sulfatací na netoxické metabolity. Přibližně 5% terapeutické dávky je metabolizováno cytochromem P 450 2E1 na elektrofilní N-acetyl-p benzochinoniminu (NAPQI). NAPQI je vysoce reaktivní sloučenina, toxický meziprodukt, který poškozuje jaterní buňky kovalentní vazbou na proteiny jaterní tkáně. [15]
N-acetyl-p-benzochinonimin je normálně okamžitě inaktivován reakcí s jaterním glutationem a následně vytvořené konjugáty s cysteinem a merkapturovou kyselinou jsou vylučovány ledvinami. V případě předávkování (jednorázovým nebo opakovaným podáváním vysokých

dávek paracetamolu) může dojít k vyčerpání zásob glutationu. Je-li vyčerpán z 25 – 30%, zůstává N-acetyl-p- benzochinoniminu nevázaný, vzrůstá jeho vazba na proteiny jaterní tkáně a tím dochází k jejímu poškození. [15]

Ukázalo se, že sloučeniny obsahující sulfhydrylové skupiny např. cysteamin, cystein, N-acetylcystein, mohou zabránit jaterní nekrose vyvolané paracetamolem. Z výše uvedených sloučenin je všeobecně preferován N-acetylcystein (Mucomyst). Ačkoli některé tyto sloučeniny mohou zabránit vzniku toxického metabolitu paracetamolu a mechanismus jejich účinku je komplexní, pro jejich ochranný efekt na jaterní tkáň má však hlavní význam znovuobnovení zásob glutationu a z toho vyplývající jejich schopnost zabránit kovalentní vazbě reaktivních meziproduktů na proteiny jaterní tkáně. [16] [15]
Užití N-acetylcysteinu významně zvýšilo procento přežití pacientů předávkovaných paracetamolem. Orální i intravenosní podání bylo navrhováno libovolně. Bezpečností a účinností intravenosně podaného N-acetylcysteinu při otravě paracetamolem se zabývali Ian M. Whyte a kolektiv, kteří reprospektivně analyzovali data o pacientech předávkovaných paracetamolem v letech 1987 – 2003. [17] Došli k závěru, že i.v. podání N-acetylcysteinu bylo v prevenci hepatotoxicity a jaterního poškození nejúčinnější, byl-li podán během osmi hodin od požití paracetamolu. S rostoucím časovým intervalem mezi otravou léčivem a zahájením léčby N-acetylcysteinem současně roste riziko vzniku hepatotoxicity a jaterního poškození.

Po orálním podání je terapie N-acetylcysteinem často komplikována nauzeou a zvracením, po intravenosním podání se může objevit anafylaktická reakce zahrnující vyrážku, svědění, angioedém, bronchospasmus, tachykardii a hypotenzi. Velmi závažný nežádoucí účinek se může objevit po intravenosním podání nesprávných dávek N-acetylcysteinu u dětí
Protože je léčba N-acetylcysteinem poměrně bezpečná, ale výrazně závislá na čase, je lepší i v případě pochybností začít terapii co nejdříve. [13] [16]

Studie na zvířatech ukazují, že zásoby jaterního glutationu jsou přímo ovlivněny stavem výživy, tudíž riziko poškození jater při předávkování PAR je zvýšeno u podvyživeného jedince.
Jaterní poškození se objeví teprve po vyčerpání zásob glutationu. V praxi to znamená, že PAR má velmi široké bezpečnostní rozpětí do doby, než je zapotřebí se obávat poškození jater. Prahová hodnota škodlivé dávky u dospělých je obvykle 10 - 15 g (cca 20 – 30 500 mg tablet). Děti léčivo tolerují dokonce lépe než dospělí, snad kvůli odlišnému metabolismu a zvýšené přeměně glutationu. Toxická prahová hodnota je nejméně 150 mg/kg pro děti do 12ti let a jaterní poškození je neobvyklé dokonce i při vyšších dávkách. [13]

Studie mikrosomálních enzymů u zvířat ukazují, že chemická stimulace může snížit a chemická inhibice naopak zvýšit dávku PAR potřebnou k vyvolání poškození jater. Význam tohoto faktu v lidském metabolismu závisí na relativní indukci hlavní a vedlejší metabolické cesty. Chronické užívání alkoholu zvyšuje aktivitu cytochromu P 450, v důsledku čehož současně dochází ke zvýšení produkce N-acetyl-p-benzochinoniminu i po terapeutických

dávkách PAR. Stejně tak užití léků vyvolávajících jaterní indukci (např. phenytoin, isoniazid atd.) může snížit prahovou hodnotu PAR vyvolávající hepatotoxicitu. [13]
Cimetidin, známý enzymový inhibitor, inhibuje oxidaci mnohých léčiv včetně paracetamolu působením na cytochrom P 450 a byl zkoumán jako látka vhodná k prevenci produkce toxického metabolitu při předávkování PAR. Selektivní inhibicí oxidace paracetamolu a jeho toxicity cimetidinem a dalšími antagonisty histaminových H2 receptorů u krys a u člověka se zabýval Mitchell a kolektiv. [16] Výsledky jeho studií potvrzují, že cimetidin inhibuje potenciálně toxickou cestu oxidace paracetamolu in vitro. Naproti tomu, jedna z hlavních cest jeho metabolizace, glukuronidace, je cimetidinem relativně málo ovlivněna. Proto je cimetidin označován jako relativně selektivní inhibitor potenciálně toxické oxidace paracetamolu, obzvláště při nízkých koncentracích, kterých je v játrech pravděpodobně obvykle dosaženo. Tento účinek cimetidinu je toxikologicky nesmírně významný především proto, že důsledkem inhibice oxidační cesty metabolizace paracetamolu je potlačen vznik reaktivního toxického meziproduktu, zodpovědného za poškození jaterních buněk. U pacientů předléčených cimetidinem došlo tedy k výraznému snížení deplece jaterního glutationu vyvolané paracetamolem. Se schopností cimetidinu potlačovat vznik reaktivního toxického meziproduktu paracetamolu, souvisí i jeho ochrana lidských lymfocytů před toxicitou paracetamolu.

Přestože je cimetidin považován za lék výrazně bezpečný, přestože inhibice oxidace paracetamolu nastupuje velmi rychle a je reverzibilní, a přestože současné studie poukazují na prospěch cimetidinu při léčbě předávkování paracetamolem u lidí, je v těchto případech standardně používanou látkou N-acetylcystein. Při podání cimetidinu k prevenci poškození jater nastává problém ve chvíli, kdy došlo k otravě více léčivy, což bývá poměrně časté. V takovém případě může cimetidin prodloužit metabolizaci především barbiturátů a benzodiazepinů. Proto nemůže být cimetidin pro léčbu předávkování paracetamolem v těchto případech doporučen.

4.4.3 Akutní jaterní selhání po předávkování paracetamolem [13] [15] [18]

Akutní jaterní selhání je dramatický a vysoce nepředvídatelný klinický syndrom charakterizovaný náhlým výskytem koagulopatie a encefalopatie. Ačkoli chorobných procesů vyvolávajících akutní jaterní selhání je mnoho, předávkování paracetamolem je v USA hlavní vyvolávající příčinou. Při časném zahájení léčby N-acetylcysteinem a podpůrné péči je 66ti % šance na zotavení. Edém mozku a infekční komplikace jsou většinou těžko rozpoznatelné a léčitelné a mohou vést k poškození mozku a k multiorgánovému selhání.
Diagnóza akutního jaterního selhání je založena na zdravotní prohlídce a laboratorním nálezu. Počáteční symptomy akutního jaterního selhání jsou obvykle nespecifické jako nauzea, zvracení, malátnost atd. Dokonce po smrtelných dávkách se pacient prvních 36 – 72 hodin obvykle cítí dobře s výjimkou občasného nechutenství a zvracení. Lékaři by tedy u takového pacienta neměli přehlížet masivní předávkování jen proto, že se u něj nemoc ještě neprojevila. Je nezbytné, je-li to možné, pokusit se odhadnout požitou dávku PAR pohovorem

s nemocným nebo s jeho příbuznými. Zhoršené vědomí poukazuje na doprovodné užití jiných léků.
Závažné akutní jaterní poškození často vede ke zhoršenému vylučování bilirubinu, projevující se jako žloutenka. Navíc snížená syntéza a masivní spotřeba srážecích faktorů vede ke komplexní koagulopatii. Nižší produkce glukosy, zvýšená intracelulární produkce laktátu a snížené jaterní vychytávání laktátu může vést k hypoglykémii a metabolické acidóze. U třiceti až čtyřiceti procent pacientů se objeví zhoršená funkce ledvin a s tím související nahromadění dusíkatých látek a oligurie. Změny mentálního stavu nebo encefalopatie jsou charakteristické pro akutní jaterní poškození a pravděpodobně jsou způsobeny mozkovým edémem.
Charakteristický znak hepatotoxicity vyvolané paracetamolem je přítomnost zvýšené hladiny sérové aminotransferasy se současnou hypoprotrombinémií, metabolickou acidózou, a renální selhání. Mnozí pacienti mají normální nebo minimálně zvýšené hladiny sérového bilirubinu a to hlavně v důsledku prudkého jaterního poškození.
Minimální dávka paracetamolu, která vyvolá jaterní poškození, kolísá v rozmezí 4 – 10g. Současné studie dokázaly slabé jaterní poškození po terapeutické dávce paracetamolu 1g podané každých šest hodin u zdravých dobrovolníků. Hepatotoxicita vyvolaná paracetamolem by proto měla být zvažována pokaždé, když požitá dávka převýší 4g/den.
Sérové hladiny paracetamolu mohou pomoci odhadnout riziko jaterního poškození následující po jednorázovém užití, ačkoli nízké hladiny nevylučují významné předávkování.

Předávkování PAR je unikátní tím, že jaternímu poškození lze zabránit časnou prevencí vyčerpání zásob jaterního glutationu. Tento princip vycházející z patogenese poškození, učiní dokonce potenciálně fatální předávkování neškodným. Léčba však musí být zahájena během osmi až dvanácti hodin od požití léku, před tím, než dojde k ireverzibilní vazbě toxického metabolitu. Jakmile se vyvine jaterní poškození, neexistuje žádná specifická terapie.
Standardní terapie při známém nebo předpokládaném předávkování paracetamolem zahrnuje vyvolání zvracení, výplach žaludku a podání černého uhlí. Pravděpodobnost následné hepatotoxicity je odhadována u pacientů, kteří požili dávku jednorázově, pomocí jednoduchých grafů týkajících se plazmatických hladin léčiva, času uplynulého od požití léku a pravděpodobnosti jaterní nekrosy (RUMACK nomogram). Mnoho veřejných nemocnic v současné době dovede určit krevní koncentraci PAR během hodiny.

Symptomy a vysoká hladina aminotransferasy se podobají akutní virové hepatitidě, a proto je pro rozlišení zásadní léková historie. Měření plazmatické koncentrace PAR je rozhodující, je-li podezření na předávkování, navzdory pacientovu odmítnutí. Jaterní biopsie může odlišit tato dvě onemocnění, ale normálně není potřeba. Na rozdíl od virové hepatitidy PAR charakteristicky způsobí sbíhající se centrolobulární nekrosu s relativně malým zánětlivým průnikem.
U alkoholiků může být hepatitida způsobená paracetamolem špatně diagnostikovaná, poškození jaterní tkáně bývá připisováno alkoholu, obzvláště u pacientů s jaterní cirhosou nebo jinými příznaky chronického jaterního poškození. Zde je důležitým záchytným bodem míra zvýšení hladiny aminotransferasy. I při vážných hepatitidách vyvolaných působením alkoholu jsou hladiny aminotransferasy obvykle nižší než 300 U/L, hladiny vyšší než 500

U/L téměř vždy odrážejí proces vyvolaný poškozením jaterní tkáně léčivem. Hladiny aminotransferasy mohou dosahovat až několik tisíc jednotek na litr při otravě PAR a současným požitím alkoholu. U několika takových pacientů byla současně pozorována nezvyklá metabolická acidóza, která by mohla být záchytným bodem při diagnóze.
Pacienti, kteří se pokusili vědomě otrávit PAR, často současně užívali ještě jiná léčiva, zejména benzodiazepiny nebo jiné psychotropní látky. Tato léčiva mohou zkomplikovat klinický obraz, obzvláště neurologickými příznaky, jsou však málokdy odpovědná za jaterní poškození.
Roztroušené zprávy o chronické hepatotoxicitě způsobené PAR se objevují obvykle u alkoholiků, kteří užívají tři i více gramů léku denně. Tito pacienti mají onemocnění podobné chronicky aktivní hepatitidě s progresivním jaterním poškozením a kolísáním hladin aminotransferasy.

V posledních několika letech pravděpodobně vzrostl počet předávkování PAR. Ačkoli většina případů nevyústila v jaterní selhání, potenciál smrtelné jaterní nekrosy vyvolal zájem o poznání základních principů k tomu vedoucích. Nejdůležitější z nich je prahová hodnota toxické dávky, projevy jaterního poškození až po určité době, možnost zabránit jaterní nekrose pomocí N-acetylcysteinu a doba dlouhá pouze několik hodin, ve které může být léčba účinná. Lékaři, kteří jsou si vědomi těchto principů mohou pomoci minimalizovat nebezpečí vyplývající z předávkování PAR.

Metabolismem paracetamolu a důkladným popisem působení jednotlivých metabolitů na myší organismus se důkladně zabýval článek autorů Chi Chen a kol. [19]

4.4.4 Paracetamolem vyvolaná nefrotoxicita [20]

Paracetamolem vyvolaná jaterní nekrosa byla podrobně studována, ale extrahepatální projevy toxicity paracetamolu nejsou v současné literatuře dobře popsány. Renální nedostatečnost se objeví asi u 1-2% pacientů po předávkování paracetamolem. Ačkoli je glutation považován za důležitý prvek při detoxifikaci po otravě paracetamolem a jeho metabolitů, účastní se jeho konjugáty vzniku nefrotoxických sloučenin.
Paracetamolem vyvolané renální selhání je po hepatotoxicitě patrné v mnoha případech, ale mělo by být odlišeno od hepatorenálního syndromu, které může komplikovat náhlé jaterní selhání. Role N-acetylcysteinu při léčbě paracetamolem vyvolaného renálního selhání je nejasná. Omezená data získaná retrospektivně z případů pediatrických pacientů hospitalizovaných po otravě paracetamolem poukazují na to, že související nefrotoxicita je více obvyklá u dětí a adolescentů.

Patofyziologie:

V jaterní i v extrahepatálních tkáních vyplývá primární toxický efekt paracetamolu z metabolismu léčiva. Jen 1% léčiva je vylučováno močí v nezměněné formě. U dospělých je přibližně 63% terapeutické dávky paracetamolu metabolizováno glukuronidací a asi 34%

sulfatací. Tato reakce probíhá primárně v játrech a vznikají tak ve vodě rozpustné metabolity, které jsou vylučovány ledvinami. Z terapeutické dávky je méně než 5% paracetamolu oxidováno mikrozomálním P 450 enzymovým systémem na reaktivní meziprodukt N-acetyl-p-benzochinonimin (NAPQI). *(viz výše)*
Proces vazby N-acetyl-p-benzochinoniminu na buněčné proteiny, z toho vyplývající buněčná smrt a následná orgánová dysfunkce, byla na zvířecích modelech demonstrována v obou tkáních, jaterní i ledvinové. Mechanismus toxicity paracetamolu je dobře popsán v játrech, ale méně jasně vysvětlen v ledvinách. Vyskytuje se zde několik mechanismů poškození ledvin zahrnujících cestu cytochromu P 450, prostaglandin syntetázu a N-deacetylační enzymy.

Mikrozomální enzymy cytochromu P 450 zahrnuty v tomto procesu se v obou tkáních trochu liší. Izoenzym cytochromu P 450, který se primárně podílí na biotransformaci v ledvinách je cytochrom 2E1, který je indukovatelný testosteronem. Důsledkem toho byly předpokládány významné pohlavní rozdíly v metabolismu a toxicitě paracetamolu v ledvinách. Definitivní souvislost mezi pohlavím a nefrotoxicitou nebyla u lidí zaznamenána.
Zdá se, že metabolismus paracetamolu probíhající v ledvinách je nezávislý na tomtéž procesu probíhajícím v játrech. Renální toxicita byla pozorována na izolovaných myších ledvinách a v některých případech se renální onemocnění objevilo bez současně přítomné významné hepatotoxicity.

Ačkoli je glutation tradičně považován za důležitý detoxifikační prvek při otravě paracetamolem a jeho metabolitů, účastní se jeho konjugáty vzniku nefrotoxických sloučenin. Není však jisté, zda je renální poškození způsobeno přímo výše uvedenými konjugáty s glutationem nebo jejich metabolity. Další možností je, že vznik těchto konjugátů může přispívat k vyčerpání zásob glutationu.
Jiný potenciální mechanismus toxicity vyvolané paracetamolem souvisí s prostaglandin endoperoxid-syntetázou (PGES). Její efekt je však významnější při chronickém než při akutním působení. PGES je enzym nacházející se v ledvinách, který aktivuje přeměnu paracetamolu na toxické metabolity, nejpravděpodobněji NAPQI. Poškození renálních buněk pak probíhá stejně jako v játrech: kovalentní vazba toxických metabolitů na buněčné proteiny následovaná buněčnou smrtí a tkáňovou nekrosou.
Klinické důsledky tohoto procesu musí být ještě objasněny.
Enzym N-deacetylasa se také podílí na vzniku nefrotoxicity vyvolané paracetamolem, ačkoli je jeho role stále nejistá. Je známo, že tento enzym deacetyluje paracetamol na p-aminofenol. Ten je dále přeměněn na volné radikály, které váží buněčné proteiny. Na zvířecích modelech bylo demonstrováno, že tento proces probíhá v kombinaci s cestou cytochromu P 450.

Pacienti s potenciálně vyšším rizikem ke vzniku paracetamolem vyvolané nefrotoxicity odpovídají pacientům náchylnějším ke vzniku hepatotoxicity vyvolané tou samou látkou. Jde o pacienty s vyčerpanými zásobami glutationu v důsledku hladovění nebo alkoholismu. Navíc léky, které indukují systém enzymů cytochromu P 450 mohou zhoršit toxicitu paracetamolu a způsobit zvýšený vznik reaktivních meziproduktů. Ačkoli je příčina nejasná, bylo zjištěno, že mladí pacienti jsou více náchylní ke vzniku renální insuficience po předávkování paracetamolem.

Vztah mezi dávkou a nefrotoxicitou není tak jasně definován jako při paracetamolem způsobené hepatotoxicitě. PAR vyvolaná nefropatie se může objevit i při nižších dávkách než takových, které vyvolají hepatotoxicitu. Tento jev je vysvětlován tím, že produkce toxinů v obou tkáních je nezávislá. Je pochopitelné, že pacienti s multisystémovým orgánovým selháním mají tendence ke klinicky horšímu průběhu.

N-acetylcystein hraje významnou roli při prevenci jaterní nekrosy vyvolané paracetamolem, ale nebyl dokázán jeho prospěch pro prevenci nefropatie. To dále posiluje fakt, že mechanismus toxicity paracetamolu probíhá v játrech a v ledvinách nezávisle na sobě. N-acetylcystein však průběh nefropatie nezhoršuje.
Na základě dosud provedených studií je léčba N-acetylcysteinem zahájena pouze v případě rizika jaterní nekrosy, ne však pro prevenci renální dysfunkce.

Závěr:
PAR indukovaná nefropatie se příležitostně objeví u pacientů po požití paracetamolu, není však tak dobře popsaná jako hepatotoxicita. Mechanismus vzniku nekrosy je v obou orgánech podobný, ačkoli jsou zde drobné rozdíly, které zůstávají nejasné. Renální toxicita se může projevit jako izolovaná nebo jako multiogránové selhání. Většinou dojde k zotavení, výjimečně je nutné provést hemodialýzu. Nebyl prokázán žádný prospěch po podání N-acetylcysteinu pro prevenci renálního selhání.

Důkladná znalost pacientovy historie, zdravotní prohlídka s rozeznáním rizikových faktorů, terapie N-acetylcystinem založená na potenciálu vzniku hepatotoxicity, podpůrná péče, pravidelný rozbor moči a monitorování krevního tlaku a markerů glomerulární filtrace jsou nezbytné pro léčbu po předávkování paracetamolem.

4.5 Chromatografické separační metody [3] [21]

Chromatografické metody jsou vysoce účinné separační metody, sloužící k oddělení analyzovaných složek ze směsi a zároveň k jejich kvalitativní i kvantitativní analýze. Složky vzorku jsou rozdělovány mezi dvě vzájemně nemísitelné fáze, z nichž jedna je stacionární a druhá mobilní. Stacionární fází může být pevná látka (sorbent) nebo kapalina nanesená na tuhý nosič nebo gel, může být naplněna do kolon, rozprostřena do vrstvy nebo filmu atd. Mobilní fáze může být kapalná (eluent, eluční činidlo), plynná (nosný plyn) nebo kapalina v superkritickém stavu.
Hybnou silou v chromatografickém systému je tok mobilní fáze, která unáší ionty nebo molekuly. Vlastní dělení látek v systému však závisí na brzdící síle (retenci), která působí selektivně (některá látka je zadržována více, jiná méně). Při chromatografickém procesu se ustanovuje dynamická rovnováha mezi vratnou sorpcí na stacionární fázi a desorpcí do mobilní fáze. Rychlost postupu látky závisí na sorpční rovnováze, tj. čím pevněji se látka sorbuje na stacionární fázi, tím pomaleji v chromatografickém systému postupuje.
Separace může být založena na adsorpci, rozdělování, výměně iontů nebo na rozdílech ve fyzikálně chemických vlastnostech molekul jako je velikost, hmotnost, objem atd.

ČL uvádí definice a výpočty společných parametrů chromatografických separačních metod a obecné požadavky pro způsobilost systému.

Grafický nebo jiný záznam odezvy detektoru představuje chromatogram.

Pro identifikaci složek směsi jsou významná retenční data jako je retenční čas t_R, tj. doba od nástřiku po maximum daného píku, a retenční objem V_R. Z retenčního času můžeme vypočítat retenční objem podle vzorce

$V_R = t_R \cdot v$,

kde t_R značí retenční čas nebo vzdálenost podél základní linie od bodu nástřiku ke kolmici spuštěné z vrcholu píku odpovídajícího dané složce,
v značí průtokovou rychlost mobilní fáze.

Kvantitativní zastoupení složky ve směsi je za určitých podmínek dáno plochou pod píkem dané složky. U symetrických píků lze ke jištění koncentrace stanovované složky c_x využít způsob přímého srovnání výšek píků standardu h_s a stanovované složky h_x:

$h_x : h_s = c_x : c_s$

Moderní přístroje jsou vybaveny digitálními integrátory s výstupem do tiskárny, jenž umožňuje automatický záznam retenčních dat pro přesnou kvantifikaci analýzy.

Obsah látky ve vzorku se zjišťuje vždy relativně s použitím standardů. Při *metodě vnějšího standardu* se porovnává plocha píku stanovované složky s plochou píku standardu chromatografovaného za stejných podmínek. Při *metodě vnitřního standardu* se přidá přesně

známé množství standardní látky přímo do analyzované směsi. Protože standard i vzorek jsou při tomto způsobu provedení vystaveny stejným vlivům, dochází tím k jejich eliminaci. [21]

4.5.1 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie [1]

Vysokoúčinná kapalinová chromatografie – High Performance Liquid Chromatography (HPLC) je v současné době jedna z nejprogresivnějších analytických metodik, která nachází stále větší uplatnění ve všech oblastech analýzy léčiv. HPLC je široce využívána ve všech moderních lékopisných monografiích.

Jde o separační metodu, která umožňuje kvalitativní i kvantitativní hodnocení separovaných složek směsi. Její další hlavní předností je rychlost analýzy a citlivost stanovení (v závislosti na použitém detektoru). Pro analýzu postačuje minimální množství vzorku. Současné nejmodernější HPLC chromatografy jsou vybaveny automatickými dávkovači, které umožňují automatizaci. HPLC je prakticky srovnatelná s plynovou chromatografií, pro analýzu léčiv je však vhodnější technologií především z důvodu netěkavého charakteru většiny léčiv.

Principem chromatografického procesu je postupné mnohonásobné vytváření rovnovážných stavů dělených látek mezi dvěma vzájemně nemísitelnými fázemi. Nepohyblivá stacionární fáze různou měrou zadržuje jednotlivé součásti analyzované směsi, pohyblivá mobilní fáze je ze stacionární fáze vymývá a odnáší je ve směru toku různou rychlostí v závislosti na rozdílné afinitě dělených látek ke stacionární fázi. V případě HPLC nastává dělení látek mezi stacionární fází naplněnou v koloně a mobilní fází procházející kolonou za vysokého tlaku. Separační účinnost kapalinové kolonové chromatografie závisí na velikosti částic stacionární fáze. Čím menší a stejnoměrnější jsou jednotlivé částice stacionární fáze, tím větší je účinná plocha a separační účinnost. Pro dostatečně rychlý průtok mobilní fáze je zapotřebí ji protlačit kolonou pomocí čerpadla pod vysokým tlakem.

Rychlý rozvoj HPLC byl umožněn nalezením vhodných, vysoce účinných stacionárních fází a citlivých detektorů. K dělení látek lze přitom využít všech vratných dvoufázových separačních mechanismů (adsorpce, rozdělování, iontová výměna, sítový efekt gelu). Proto je dnes možné nalézt selektivní a účinný chromatografický systém k dělení směsi prakticky všech organických látek rozpustných ve vodě, zředěných kyselinách nebo organických rozpouštědlech.

4.5.2 Separace paracetamolu, kofeinu, propyfenazonu a p-aminofenolu metodou HPLC [1]

V dostupné literatuře byla nalezena jediná práce zabývající se separací paracetamolu, kofeinu, propyfenazonu a p-aminofenolu pomocí HPLC metody. Je jí rigorózní práce Jany Daňkové [22]. Cílem této práce byla optimalizace separačních podmínek pro stanovení výše uvedených látek v hromadně vyráběném léčivém přípravku Valetol. Z důvodu problematického chování látek v izokratickém režimu byla v práci zvolena gradientová eluce za následujících podmínek:

• Mobilní fáze: ACN : voda (bez úpravy pH)
• Stacionární fáze: kolona Discovery RP-AMIDE C 16 (250 x 4,6mm, 5 µm)
• Průtok: 1 ml/min
• Teplota měření: 40°C
• Detekce UV 270 nm
• Gradientový režim: 0 - 1.min. – 5 : 95
1.– 8.min. – 40 : 60
8. – 9.min – 5 : 95
9. – 13.min. – 5 : 95 [1]

4.5.3 Separace paracetamolu, kofeinu a propyfenazonu metodou HPLC

V dostupné literatuře byly nalezeny tři metody zabývající se separací paracetamolu, kofeinu a propyfenazonu. Převzato z rigorózní práce [1].

1. Kolona Nucleosil 100-5 C_{18}, 5 µm, 250 x 4,5 mm, detekce UV 254 nm. Složení mobilní fáze: voda : metanol 20 : 80. Jako vnitřní standard byl použit cetrimid, rychlost průtoku mobilní fáze 1 ml/min, dávkovaný objem 10 µl, laboratorní teplota, izokratický režim.
2. Kolona Spherisorb 5 ODSl, 250 x 4,6 mm, detekce UV 273 nm. Složení mobilní fáze: fosfátový pufr (1,3g $(NH_4)_2HPO_4$ v 1000ml vody) : 2-propanol : diethylamin : methanol (50 + 15 + 3 + 32 (v/v)). Dávkovaný objem 5 µl, rychlost průtoku mobilní fáze 0,5 ml/min, teplota 25°C, izokratický režim.
3. Kolona ODS Hypersil, 250 x 4,6 mm, velikost částic 5 µm, detekce UV 273 nm. Složení mobilní fáze: voda : 2-propanol : diethylamin : metanol (50 + 15 + 3 + 32) upraveno kyselinou fosforečnou na pH 7,5. Dávkovaný objem 5µl, rychlost průtoku mobilní fáze 0,5 ml/min, laboratorní teplota, izokratický režim.

4.5.4 PEG kolona v systému reverzních fází [1]

Tradičním problémem analytických metod je současné stanovení látek rozdílné polarity (rozdílné hodnoty log P). Obtížnost stanovení vychází z výrazně odlišné retence látek na koloně. Problém často nespočívá ve vzájemné separaci analytů, ale v délce analýzy, která hraje při kontrole kvality a stability přípravků významnou roli.

Paracetamol, kofein, propyfenazon a p-aminofenol jsou látky výrazně se lišící lipofilitou a acidobazickými vlastnostmi. Souhrn acidobazických a lipofilních vlastností látek výše uvedených viz. tabulka č. 1.

Tabulka č.1: Souhrn acidobazických a lipofilních vlastností PAR, KOF, PRO a AMF

Název	Sumární vzorec	Průměr logP	exp.log P	pKa (kys)	pKb (baze)
Paracetamol	$C_8H_9NO_2$	0,44 ± 0,19	0,46	10,2	-
Kofein	$C_8H_{10}N_4O_2$	-0,25 ± 0,27	-0,07	-	-
Propyfenazon	$C_{14}H_{18}N_2O$	2,27 ± 0,68	1,94	-	1,3
p-aminofenol	C_6H_7NO	0,30 ± 0,19	0,04	10,4	5,4

Použití klasických kolon s reverzní fází je proto pro jejich vzájemnou separaci problematické především z důvodu jejich výrazně rozdílné retence, chvostování píků a odlišné ionizace látek při různém pH.

Polyethylenglykolová kolona se ukázala jako vhodná pro efektivní separaci látek výrazně se lišících svou polaritou, v systému reverzních fází poskytuje specifickou selektivitu. Efektivita se projevuje především ve zkrácení celkové doby analýzy, což je významné především při analýzách velkých sérií vzorků.

4.6 Validace analytických metod [23] [24] [25]

Validace analytické metody je postup užívaný k ověření vhodnosti této metody pro zamýšlené použití. Cílem validace je určit podmínky, za kterých je zkušební postup použitelný a zajistit stejnou spolehlivost při opakovaném použití v jedné nebo i v různých laboratořích. Validaci můžeme definovat jako proceduru, jejímž cílem je demonstrovat a dokumentovat kvalitu analytické metody ustanovením definovaných kritérií a měřením hodnot těchto kritérií. Zjednodušeně řečeno je validace ověření platnosti zvolného analytického postupu (metody). Předmětem validace je validovaná vlastnost. Může jí být např. koncentrace hlavní látky, koncentrace nečistoty, fyzikálně chemický parametr atd.

Validační program slouží ke statickému prokázání spolehlivosti analytické metody včetně celého obslužného analytického systému. Tento program stanovuje základní pravidla pro plánování a organizaci validace analytických dat a pro plánování a užití takto stanovených ukazatelů v praxi.

Validace se provádí při vývoji nové metody, jestliže byla metoda změněna, při převodu validované metody (např. z vývojové do přijímací laboratoře, publikované validované metody), při průkazu rovnocennosti dvou metod, při kontrole způsobilosti systému a při revalidaci metody, kdy podmínky revalidace jsou striktně stanoveny.
Zjištěné hodnoty validačních parametrů se zpracovávají do validačního protokolu, který musí obsahovat příslušnou dokumentaci.

Validaci metody je v současné době věnována značná pozornost.
Americká FDA (Food and Drug Administration) cGMPs (Facts About Current Good Manufacturing Practices) vyžaduje validaci metod, která současně s dokumentací musí být provedena podle předem stanovených pravidel. FDA současně navrhla vedení Analytických Procedur a Validací Metod.
ISO/IEC (International Ogranization for Standardization/International Electrotechnical Committee) obsahuje kapitolu o validaci metod a seznam devíti validačních parametrů.
ICH (The International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use) vytvořila společný text o validaci analytických postupů pro Evropu, Japonsko a Spojené státy americké. Dokument zahrnuje definici osmi validačních charakteristik. ICH rovněž vytvořila směrnice s podrobnou metodikou.
Americká EPA (Enviromental Protection Agency) vytvořila směrnice pro vývoj metod a validaci pro Zákon o ochraně a obnově přírodních zdrojů.
AOAC je mezinárodní nezisková organizace, která se zabývá vývojem a validací analytických metod, zvyšováním kvality a bezpečnosti laboratorních postupů a profesním zdokonalováním vědeckých pracovníků.
EPA, AOAC a jiné vědecké organizace poskytují metody, které jsou validovány multi-laboratorními studiemi.
V České republice je nejvyšší autoritou pro kontrolní laboratoře SÚKL.

Validace v rámci jedné laboratoře se nazývá interní, vnitřní. Podle účelu použití může být průzkumová, plná atd. Cílem průzkumové validace je na omezeném počtu vzorků stanovit, zda je zvolená analytická metoda vhodná pro plnou validaci. Úkolem plné validace je demonstrovat vhodnost metody k zamýšlenému použití vyhodnocením všech požadovaných validačních parametrů. Externí (vnější) validace srovnává výsledky validací interních z více laboratoří (mezilaboratorní porovnávací zkoušky) a zahrnuje výpočet reprodukovatelnosti metody.

4.6.1 Validace analytické metody [24] [25] [26] [27]

O sjednocení hlavních validačních parametrů pro farmaceutické použití se pokusila ICH. Patří mezi ně tyto parametry:

- správnost
- přesnost - opakovatelnost
  - intermediální přesnost
  - reprodukovatelnost
- selektivita
- detekční limit
- kvantitativní limit
- linearita
- rozsah
- robustnost

4.6.1.1 Správnost

Správnost metody je definována jako těsnost shody výsledků měření a skutečné hodnoty měřené veličiny. Jedná se tedy o statisticky významnou rozdílnost mezi získanou a skutečnou hodnotou dané veličiny.
Hodnocením správnosti metody se určuje přítomnost či nepřítomnost náhodné soustavné složky chyby, nejčastěji sledováním odchylky výsledků od správné hodnoty. To se provádí buď porovnáním se standardem, porovnáním analýz ověřené a osvědčené (zavedené) metody, srovnáním s referenčním materiálem nebo s výsledky z referenční laboratoře.
Správnost se označuje také jako výtěžnost metody – recovery a udává poměr množství analytu získaného danou analytickou metodou k přijaté referenční hodnotě. Hodnota recovery se může vyjadřovat jako desetinný zlomek nebo v procentech (%)

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

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

4.6.1.2 Přesnost

Přesnost analytické metody určuje blízkost shody (stupeň rozptylu) mezi množstvím výsledků získaných opakovaným měřením jednoho homogenního vzorku za předepsaných podmínek. Obvykle se tento vzorek nezávisle šestkrát analyzuje kompletním postupem včetně přípravy vzorků. Přesnost výsledků se určuje pomocí tzv. dovolené diference paralelních stanovení, tj. maximálním rozpětím, které charakterizuje přesnost výsledků a dovoluje toto rozpětí vysvětlit přítomností náhodných chyb. Určení dovolené diference vychází z vypočtené směrodatné odchylky, která se značí řeckým písmenem σ a je definována jako odmocnina z rozptylu náhodné veličiny X. Její hodnota charakterizuje rozptýlení jednotlivých hodnot x_i okolo průměru x. N označuje počet měření.

$$\sigma = \sqrt{\frac{1}{N}\sum_{i=1}^{N}(x_i - \overline{x})^2} = \sqrt{\left(\frac{1}{N}\sum_{i=1}^{N}x_i^2\right) - \overline{x}^2}$$

Protože je směrodatná odchylka náhodná veličina, nemůže být pokládána za obecně platnou charakteristiku dané analytické metody.

Relativní mírou přesnosti série paralelních stanovení je tzv. *relativní směrodatná odchylka* s_r (dříve *variační koeficient*), většinou uváděný v procentech. Používá se pro posouzení míry variability.

$$s_r = \frac{s}{\overline{x}} \text{ resp. } s_{r,R} = \frac{s_R}{\overline{x}} \quad (s_r)_{\%} = 100 \cdot s_r,$$

kde S, resp. S_R je relativní směrodatná odchylka.
Variační koeficient je použitelný i při porovnání různých proměnných, které jsou v různých měrných jednotkách.
Směrodatná odchylka i relativní směrodatná odchylka budou tím menší, čím přesnější budou výsledky měření. Pro danou analytickou metodu je tedy určitou veličinou, která charakterizuje reprodukovatelnost daného počtu paralelních měření.

Přesnost může být hodnocena pomocí *opakovatelnosti*, *intermediální přesnosti* a *reprodukovatelnosti*.
Opakovatelnost vyjadřuje přesnost za zcela stejných operačních podmínek v krátkém časovém intervalu.
Intermediální přesnost vyjadřuje kolísání v rámci laboratoře např. jiný den, jiný pracovník, jiné vybavení, jiný vzorek atd.
Reprodukovatelnost vyjadřuje přesnost mezilaboratorní (porovnání výsledků z různých laboratoří), využívá se ke standardizaci analytické metody.

4.6.1.3 Selektivita

Selektivita analytické metody je definována jako schopnost přesného a správného určení analytu i v přítomnosti interferujících látek (matrice). Těmi mohou být další účinné látky u složených přípravků, pomocné látky, nečistoty z výroby, rozkladné produkty, zbytková rozpouštědla. Selektivní metoda je tedy taková metoda, která za určitých podmínek umožňuje přesné a správné stanovení obsahu složky ve vymezené směsi jiných složek. Selektivita analytické metody je testována porovnáním výsledků vzorků standardů s výsledky vzorků s matricí. Interference matrice se projevuje tím, že analytický signál neodpovídá stanovovanému analytu, ale je superponován signálem rušivé složky. Prokazování selektivity metody je do jisté míry závislé na použité instrumentální technice a proto je nutné pro každý použitý systém vypracovat individuální program prokazování selektivity metody.

Je-li dostupná matrice vzorku, k zjištění selektivity metody se analyzují srovnávací vzorky matrice, srovnávací vzorky metody (vzorek bez přítomnosti matrice a analytu – rozpouštědla) v minimálním počtu tří těchto vzorků a kalibrační standard o nejnižší koncentraci. Stanoví se velikost a rozptyl signálů pozadí a významnost těchto signálů vzhledem k výsledku kalibračního standardu.

V případě prokazatelné statistické významnosti pozadí signálu pocházejícího ze srovnávacího vzorku metody se musí odstranit zdroj interference (kontaminace rozpouštědla, laboratorního nádobí, přístrojů). Pochází-li signál ze srovnávacího vzorku matrice je nutné optimalizovat extrakci vzorku předseparací (čištěním vzorku) nebo chromatografickou separací.

Odezva interferujících látek musí být menší než 1% odezvy nejnižší koncentrační hladiny analytu ve vzorku.

Není-li dostupná matrice vzorku, použijí se místo analýz srovnávacích vzorků matrice pozitivní vzorky s analytem a sledují se kvalitativní data signálu, zda je signál tvořen pouze sledovaným analytem (UV spektra, IR spektra pro standardní substanci a vzorek). Neumožňuje-li detekční metoda sbírat kvalitativní data, použije se k prokázání čistoty signálu jiná technika nebo se používají certifikované materiály s přijatou referenční hodnotou a selektivita metody se takto prokazuje nepřímo.

4.6.1.4 Detekční limit

Detekční limit vyjadřuje citlivost metody. Je to nejnižší detekovatelná koncentrace látky, kterou ale nemusí být možné kvantitativně stanovit.

Mez detekce odpovídá koncentraci, pro kterou je analytický signál stasticky významně odlišný od šumu.

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.

4.6.1.5 Kvantitativní limit

Kvantitativní limit je též parametrem citlivosti metody. Vyjadřuje nejnižší koncentraci analytu ve vzorku, která může být kvantifikována s přijatelnou přesností a správností. Obvykle to bývá trojnásobek detekčního limitu. Často se vyjadřuje jako koncentrace s poměrem signálu k šumu s hodnotou 10.

Kvantitativní limit je prakticky používán pro stanovení nečistot a/nebo degradačních produktů.

4.6.1.6 Linearita

Linearita odráží schopnost metody dávat výsledky přímo úměrné koncentraci analyzované látky. Obvykle se stanovuje minimálně pět různých koncentrací v rozmezí 50 – 150% deklarovaného obsahu. Je chápána jako přímková závislost mezi dvěma náhodnými proměnnými, tj. odezvou instrumentace (analytickým signálem) a koncentrací analytu. Těsnost vzájemné závislosti dvou náhodných proměnných charakterizuje korelační koeficient (r). Při lineární závislosti nabývá hodnoty + 1 a čím více se blíží jedné, tím je závislost obou proměnných těsnější.

Je-li metoda lineární, lze určit směrnici z jednoho kalibračního bodu, pokud není, je třeba vyhodnocovat výsledky z celé kalibrační křivky.

4.6.1.7 Rozsah

Tento parametr se obvykle odvozuje z linearity metody. Jde o intervaly mezi horní a dolní koncentrací analytu ve vzorku, pro které analytická metoda poskytuje přijatelnou hodnotu přesnosti, správnosti a linearity.

4.6.1.8 Robustnost

Robustnost metody je definována jako míra vlivu kolísání úrovně jednotlivých parametrů na výsledek analytického stanovení. Sbírají se poznatky z vývoje metody a cílem je upozornit na podmínky, které mohou ovlivnit výsledky. Např. u metody využívající HPLC se sledují vlivy: složení mobilní fáze, pH vodné složky mobilní fáze, teplota na koloně, rychlost průtoku atd.

4.6.2 Test způsobilosti chromatografického systému [3] [24] [25] [26] [28] [29]

Test způsobilosti analytického systému je nedílnou součástí validace analytické metody a slouží k zajištění přiměřené účinnosti chromatografického systému. Test způsobilosti definuje určitá kritéria, která musí být splněna, a zajišťuje, že předepsané parametry jsou na požadované úrovni pro správné provedení stanovení obsahu či zkoušky na čistotu.
Pro hodnocení účinnosti kolony se používají následující parametry: zdánlivá účinnost, kapacitní faktor (hmotnostní distribuční poměr Dm), rozlišení, relativní retence a faktor symetrie, které musí odpovídat předepsaným lékopisným hodnotám.

4.6.2.1 Účinnost chromatografické kolony

Účinnost kolony (zdánlivá) charakterizuje její schopnost separovat jednotlivé složky směsi a může být vypočítána jako zdánlivý počet teoretických pater (N). Čím je separační účinnost chromatografické kolony větší, tím méně je rozmývána zóna separované látky při průchodu kolonou a pík v chromatogramu je užší. Pro výpočet se použije následující vzorec, v němž veličiny t_R a $W_{0,05}$ musí být vyjádřeny ve stejných jednotkách:

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

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

4.6.2.2 Rozlišení chromatografických píků

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

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

kde t_R je retenční čas (min.) a W je šířka píku v základně (min.)
Rozlišení vetší než 1,5 odpovídá rozdělení píků na základní linii.

4.6.2.3 Relativní retence

Relativní retence (r) je retence sledované látky srovnávaná se standardem, který je součástí vzorku, nebo je alespoň chromatografován za stejných podmínek. Nejjednodušším způsobem vyjádření relativní retence je poměr redukovaných retenčních časů:

$$r_{12} = \frac{t'_{R_1}}{t'_{R_2}},$$

kde t'_{R_2} je retenční čas sledovaného píku redukovaný o mrtvý čas a t'_{R_1} je retenční čas referenčního píku redukovaný o mrtvý čas.
Vyjádřením retence relativně ke standardu se vyloučí chyby vzniklé nepřesným měřením pracovních podmínek i parametrů kolony.

4.6.2.4 Faktor symetrie

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

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

kde $W_{0,01}$ je šířka píku v jedné dvacetině jeho výšky a f je vzdálenost mezi kolmicí spuštěnou z vrcholu píku a vzestupnou částí píku v jedné dvacetině jeho výšky.
Hodnota faktoru symetrie 1,0 značí úplnou (ideální) symetrii píku.
Pokud není v lékopisném článku stanoveno jinak, faktor symetrie hlavního píku má být mezi 0,8 až 1,5.

Jednotlivé části použitého zařízení musí být kvalifikovány a musí být schopny dosáhnout přesnosti požadované pro provedení zkoušky nebo stanovení obsahu.

4.6.2.5 Opakovatelnost analýzy

Opakovatelnost analýzy je definována jako těsnost shody mezi vzájemně nezávislými výsledky zkoušek získaných za podmínek opakovatelnosti (opakované použití téže zkušební metody na identickém materiálu, v téže laboratoři, týmž pracovníkem za použití stejných přístrojů a zařízení, během krátkého časového rozmezí).
Získává se ze šesti až deseti měření standardního roztoku a vyjadřuje se jako relativní směrodatná odchylka s_r (%). *(viz přesnost metody)*

5 Experimentální část

5.1 Materiály a pomůcky

5.1.1 Chemikálie, standardy, vzorky

Paracetamolum, š. 0440713, vz. 78496, Anqiu Pharmaceutical Co Ltd, Čína
Coffeinum anhydricum, š. 200411057, vz. 73854, Jilin Shulan Synt. Pharm. Factory, Čína
Propyphenazonum, š. PPE2391204, vz. 79387, Vani Chemicals, Hyderabad, Indie
p-Aminofenol, Riedel de Haën
Methanol 99,9%, Chromasolv, Sigma Aldrich GmbH, SRN
Acetonitril 99,9%, Chromasolv, Sigma Aldrich GmbH, SRN
Kyselina octová koncentrovaná, Fluka
Triethylamin, Sigma Aldrich GmbH, SRN
Ultračistá voda, čištěná systémem MILLI Q (Millipore, Bedford, MA, USA)
Kyselina o-chlorbenzoová, Lachema N.P. Brno
Kyselina 4-aminobenzoová, Balex, Pardubice
Benzamid, Chromasolv, Sigma Aldrich GmbH, SRN
Sulfanilamid, Sigma Aldrich GmbH, SRN
Anilin, Sigma Aldrich GmbH, SRN
4-Chloranilin, Sigma Aldrich GmbH, SRN
Prilocain, Sigma Aldrich GmbH, SRN
Atenolol, Sigma Aldrich GmbH, SRN
Norepinefrin, Sigma Aldrich GmbH, SRN
Amilorid, Sigma Aldrich GmbH, SRN
Furosemid, Sigma Aldrich GmbH, SRN
Pindolol, Sigma Aldrich GmbH, SRN
Salbutamol, Sigma Aldrich GmbH, SRN

5.1.2 Přístroje, podmínky separace

Kapalinový chromatograf

Chromatografická sestava:	Shimadzu LC–10
Pumpy:	LC-10 AD VP
Degasser:	DGU-14 A
Autosampler:	SIL-HTA
Termostat kolony:	CTO-10 AC VP
Detektor:	DAD detektor SPD-M10A VP
Vyhodnocení:	Chromatografický software LC Solution
Kolony:	Discovery HS PEG (15 x 4 mm, 3 µm)
Dávkování:	5µl
Detekce:	UV 210 nm
Mobilní fáze:	Pro přípravu byla použita ultračištěná voda pro HPLC. pH upraveno na pH metru. Před použitím byla mobilní fáze přefiltrována pomocí filtračního zařízení Millipore, filtr ze skleněných vláken o velikosti pórů 0,45 µm.

Izokratický režim

Teplota:	laboratorní

pH metr:	Hanna intrumens
Ultrazvuková lázeň:	Tescon 1, Tesla, ČR
Centrifuga:	EBA 21, Hettich Zentrifugen, Germany
Analytické váhy:	Sartorius GENIUS, SRN

5.2 Příprava vzorku

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

5.3 Příprava roztoku standardů

Navážíme přesně 230,0 mg paracetamolu, 460,0 mg propyfenazonu, 76,0 mg kofeinu, 5,0 mg p-aminofenolu a 200,0 mg kyseliny benzoové do 100 ml odměrné baňky a doplníme methanolem po rysku.

5.4 Příprava směsného roztoku standardů

Odměříme 200 µl z každého roztoku standardů do vialky, vzniklý roztok promísíme a přímo dávkujeme.

5.5 Izolace účinných látek – paracetamolu, propyphenazonu a kofeinu

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

Při přípravě vzorku se postupuje takto:

K navážené rozdrcené tabletovině umístěné do 50 ml odměrné baňky se přidá methanol a doplní se jím po značku. Směs se ponoří na 30 minut do ultrazvukové lázně. Poté se 15 min. centrifuguje při 6000 otáčkách/min. Po nastříknutí do HPLC se analyzuje mobilní fází octanový pufr o pH 4,5 s obsahem 0,04% triethylaminu.

6 Výsledky a diskuze

6.1 Optimalizace chromatografických podmínek [1]

Optimalizace chromatografických podmínek pro separaci paracetamolu, propyfenazonu, kofeinu a p-aminofenolu byla provedena v rámci diplomové práce [1]. Byla použita PEG kolona v systému reverzních fázích, která se ukázala jako vhodná pro efektivní řešení problému společného stanovení látek odlišné polarity. Závěrem práce bylo nalezení optimálních chromatografických podmínek pro separaci výše uvedených látek. Tyto podmínky současně vyhovují požadavkům na jednoduchost a časovou nenáročnost metody při zachování vysoké spolehlivosti.

6.1.1 Optimalizace složení mobilní fáze [1]

V rámci optimalizace složení mobilní fáze byla testována různá organická rozpouštědla a jejich zastoupení v mobilní fázi. Dále bylo testováno pH mobilní fáze v rozmezí 4 – 7 a různé pufry.
Během testování složení mobilní fáze byl zjištěn výrazný vliv obsahu triethylaminu na retenci p-aminofenolu na koloně. Bylo tedy stanoveno přesné množství triethylaminu v mobilní fázi, při kterém dojde k separaci látek.
Významné bylo dále konečné desetinásobné zředění mobilní fáze, za účelem zvýšení retence p-aminofenolu na koloně.

6.1.2 Volba vnitřního standardu

Bylo vyzkoušeno několik látek, které odpovídaly požadavkům na vnitřní standard pro kvantifikaci všech účinných látek a nečistoty. *Viz. tabulka č. 2.*
Tyto látky se strukturně podobají p-aminofenolu a mají podobnou retenci na koloně. Jako vnitřní standard byla zvolena kyselina benzoová, která svým chromatografickým chováním nezasahuje do separace výše uvedených látek. Na koloně je nejméně zadržována, neovlivňuje délku analýzy.

Tabulka č. 2: Volba vnitřního standardu

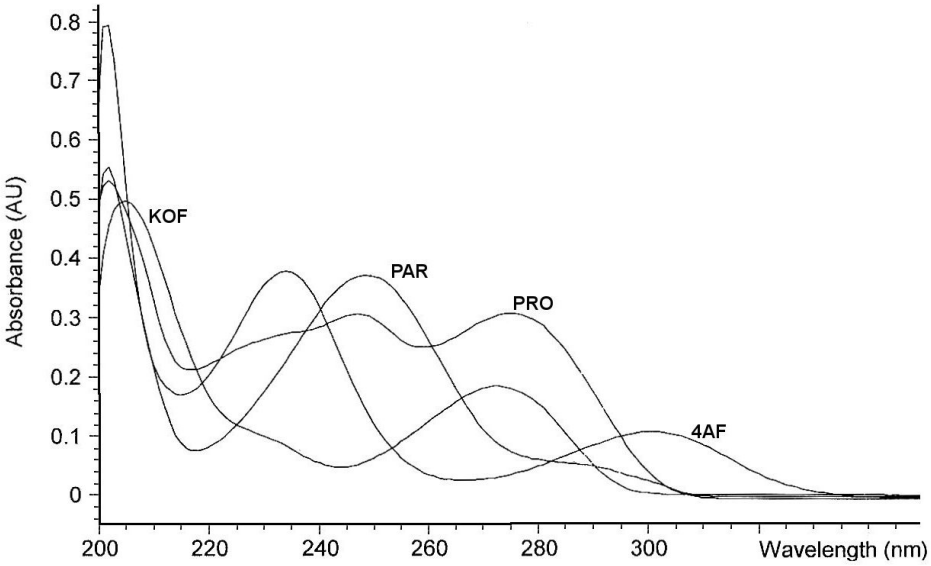
Testovaná látka	Rt	Komentář
anilin	3,545	neseparován
4-chloranilin	6,635	neseparován
prilocain	6,723	neseparován
atenolol	4,861	neseparován
norepinefrin	4,233	neseparován
amilorid	4,750	neseparován
sulfanilamid	2,624	neseparován
benzamid	2,987	neseparován
furosemid	8,527	separován
pindolol	1,566	neseparován od mrtvého objemu
salbutamol	4,794	neseparován
kyselina 4-aminobenzoová	2,985	neseparována
kyselina o-chlorbenzoová	4,233	neseparována
kyselina benzoová	2,060	separována

6.1.3 Volba vlnové délky detektoru

Proměřená UV spektra roztoků paracetamolu, kofeinu, propyfenazonu a p-aminofenolu v methanolu pro volbu vlnové délky detektoru byla převzata z rigorózní práce Jany Daňkové [(22)]. Absorpční spektrum kyseliny benzoové proměřováno nebylo. Koncentrace roztoků nebyly přesně definovány, jelikož se jednalo zejména o zjištění absorpčních maxim a minim těchto látek.

Z hlediska velkých rozdílů absorpčních maxim měřených látek byla pro detekci zvolena vlnová délka 210 nm, kde většina látek dostatečně absorbuje UV záření a detekce může být tudíž dostatečně citlivá.

Komentář [s1]: Tady s tím si dovolím nesouhlasit, protože jsme tu integraci ploch dělali při 210 nm určitě proto že odezva pro 4-amf byla určitě větší než při 254 nm. Možná by to bylo při 230 nm ještě citlivější, ale tam by nám zas neabsorboval ten kofein. Navíc ten obrázek je hodně orientační a je to měřeno tuším v metanolu. V mobilce se ty spektra pak můžou trošku posouvat díky jinému pH. Věřím že to měření při 210 nm jsem tenkrát vybral z těchto logických důvodů větší absorbance všech látek. Můžu si to ověřit, ale to bych musel běžet zase na zámostí a to se mi teď nechce…



Obrázek 1- UV spektra roztoků paracetamolu, kofeinu, propyfenazonu a p-aminofenolu v metanolu

6.1.4 Volba dávkovaného objemu a rychlosti průtoku mobilní fáze

Optimální objem dávkovaného vzorku byl zvolen 5 µl. Optimální průtoková rychlost je 1 ml/min.

6.1.5 Souhrn optimálních chromatografických podmínek

Stacionární fáze:	Supelco Discovery HS PEG kolona (15 x 4 mm, 3 µm)
Mobilní fáze:	octanový pufr pH 4,5 s obsahem triethylaminu 0,04%
Příprava mobilní fáze:	Do 0,5 l vody byly přidány 2 ml triethylaminu, roztok byl koncentrovanou kyselinou octovou pufrován na pH 4,5, takto připravená mobilní fáze byla následně 10x zředěna destilovanou vodou.
Rychlost průtoku mobilní fáze:	1 ml/min
Detekce:	UV 210 nm
Izokratický režim	
Teplota:	laboratorní

Za těchto podmínek jsou látky separovány až na základní linii s rozlišením větším než 1,5, délka analýzy je do sedmi minut.

6.2 Validace metody

6.2.1 Test vhodnosti chromatografického systému

6.2.1.1 Účinnost chromatografického systému – počet teoretických pater (N)

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

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

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

Tabulka č. 3: Počet teoretických pater

Analyzovaná látka	t_R (min)	$w_{0,05}$	N
Kyselina benzoová	2,06	0,09	2954,72
Kofein	2,52	0,09	4606,70
Paracetamol	3,16	0,09	6684,62
p-Aminofenol	4,49	0,13	6559,77
Propyfenazon	5,89	0,15	8654,72

Požadavek na počet teoretických pater N > 1500 je splněn pro všech pět látek.

6.2.1.2 Asymetrie chromatografických píků (T)

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

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

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

Tabulka č. 4: Asymetrie chromatografických píků

Sloučenina	$w_{0,01}$	f	Asymetrie (T)
Kyselina benzoová	0,18	0,08	1,11
Kofein	0,17	0,06	1,39
Paracetamol	0,20	0,10	1,03
p-Aminofenol	0,30	0,14	1,07
Propyfenazon	0,33	0,11	1,56

Požadavek na asymetrii chromatografických píků T < 2 byl splněn pro všech pět látek.

6.2.1.3 Rozlišení chromatografických píků (*R*)

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

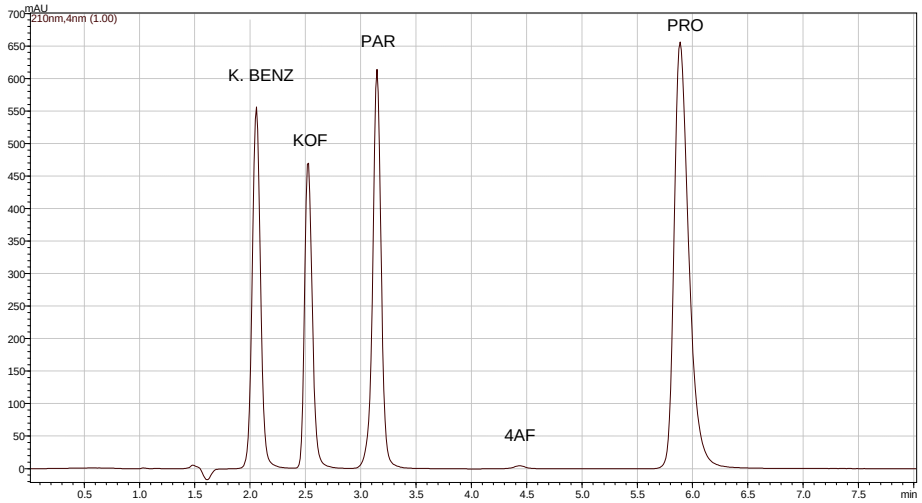
$$R_{ij} = \frac{2 \cdot \left| t_{Ri} - t_{Rj} \right|}{W_i + W_j}$$, kde

t_{Ri}, t_{Rj} jsou retenční časy složek (min.)
W_i, W_j jsou šířky píků na základně (min.)

Tabulka č. 5: Rozlišení chromatografických píků

Hodnocené látky	R_{ij}
Kyselina benzoová- Kofein	3,06
Kofein – Paracetamol	4,19
Paracetamol-p-Aminofenol	7,05
p-Aminofenol-Propyfenazon	5,91

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



Obrázek 2 – Chromatogram účinných látek léčivého přípravku Valetol, nečistoty p-aminofenolu a vnitřního standardu kyseliny benzoové

6.2.1.4 Opakovatelnost analýzy

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

Paracetamol	229,6 mg/100 ml
Kofein	71,9 mg/100 ml
Propyfenazon	458,5 mg/100 ml
p-Aminofenol	4,5 mg/100 ml
Kyselina benzoová	198,9 mg/100 ml

N vyjadřuje počet měření, $\bar{x}$ aritmetický průměr, σ směrodatnou odchylku, s_r (%) relativní směrodatnou odchylku.

Tabulka č. 6: Opakovatelnost analýzy - paracetamol

PARACETAMOL		
Číslo pokusu	**Plocha píku (A)**	**Retenční čas (t_R) (min)**
1	3323076	3,17
2	3316243	3,16
3	3312247	3,17
4	3309344	3,17
5	3312545	3,17
6	3312217	3,17
N	6	6
$\bar{x}$	3314278,7	3,17
σ	4415,62	0,00
s_R (%)	0,13	0,00

Požadavek na relativní směrodatnou odchylku s_R < 1 % byl splněn.

Tabulka č. 7: Opakovatelnost analýzy - kofein:

KOFEIN		
Číslo pokusu	**Plocha píku (A)**	**Retenční čas (t_R) (min)**
1	2335987	2,52
2	2333579	2,52
3	2332397	2,53
4	2332379	2,52
5	2335041	2,52
6	2334181	2,53
N	6	6
$\bar{x}$	2333927,3	2,52
σ	1317,03	0,00
s_R (%)	0,06	0,00

Požadavek na relativní směrodatnou odchylku s_R < 1 % byl splněn.

Tabulka č. 8: Opakovatelnost analýzy - propyfenazon

PROPYFENAZON		
Číslo pokusu	**Plocha píku (A)**	**Retenční čas (t_R) (min)**
1	6148229	5,92
2	6132719	5,91
3	6117101	5,91
4	6132301	5,91
5	6141571	5,91
6	6132592	5,91

N	6	6
$\bar{x}$	6134085,5	5,91
σ	9590,16	0,00
s_R (%)	0,16	0,00

Požadavek na relativní směrodatnou odchylku s_R < 1 % byl splněn.

Tabulka č. 9: Opakovatelnost analýzy – p-aminofenol

P - AMINOFENOL		
Číslo pokusu	**Plocha píku (A)**	**Retenční čas (t_R) (min)**
1	37330	4,51
2	37271	4,50
3	36580	4,50
4	37347	4,50
5	37258	4,50
6	37275	4,50

N	6	6
$\bar{x}$	37176,8	4,50
σ	268,86	0,00
s_R (%)	0,72	0,00

Požadavek na relativní směrodatnou odchylku s_R < 1 % byl splněn.

Tabulka č. 10: Opakovatelnost analýzy – kyselina benzoová

KYSELINA BENZOOVÁ		
Číslo pokusu	**Plocha píku (A)**	**Retenční čas (t_R) (min)**
1	2657467	2,07
2	2670170	2,06
3	2670138	2,07
4	2663995	2,06
5	2665256	2,06
6	2661914	2,06
N	6	6
$\bar{x}$	2664823,3	2,06
S	4477,46	0,00
s_R (%)	0,17	0,00

Požadavek na relativní směrodatnou odchylku $s_R < 1$ % byl splněn.

6.2.2 Validace analytické metody

6.2.2.1 Přesnost

Byly analyzovány roztoky vzorku Valetol HERBACOS-BOFARMA š. č. 2230905, které byly paralelně připraveny samostatným postupem uvedeným v kapitole 5.2. Plochy píků jsou přepočteny na navážku 50,00 mg tabletoviny.

Tabulka č. 11: Přesnost

Roztok	**Plocha píku (m = 50 mg)**				
	k. Benzoová	**Paracetamol**	**Kofein**	**Propyfenazon**	**p-Aminofenol**
1	688593	3380257	2146643	6522480	418500
2	699117	3639361	2222697	6435380	424600
3	683858	3531632	2236551	6348364	425056
4	689852	3464516	2217480	6347486	420933
5	687499	3200743	2148429	6428530	418478
6	686045	3250393	2165597	6637083	426322
n	6	6	6	6	6
$\bar{x}$	689160,7	3411150,3	2189566,2	6453220,5	422314,8
s	4839,3	153031,80	36954,01	101410,77	3161,7
s_R (%)	0,70	4,49	1,69	1,57	0,75

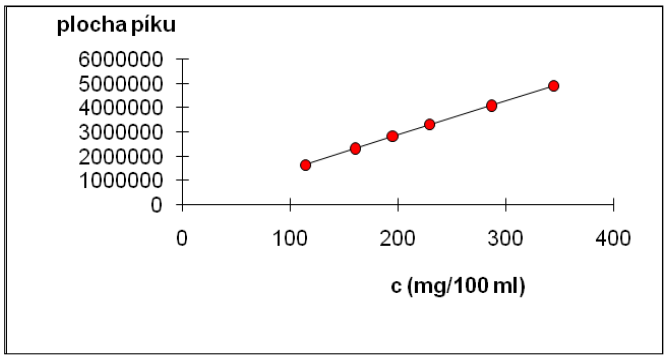
Požadavek na relativní směrodatnou odchylku $s_R < 5\%$ byl splněn.

6.2.2.2 Linearita

Byla použita metoda absolutní kalibrace. Bylo připraveno 6 kalibračních roztoků pracovních standardů paracetamolu, kofeinu, propyfenazonu a kyseliny benzoové v rozmezí 50 – 150% a nečistoty p-aminofenolu v rozmezí 20 – 100% deklarovaného obsahu. (koncentrace pro každou látku jsou uvedeny v následujících tabulkách – obr. 1 až 5). Plochy píků látek pro každou koncentraci jsou průměrem ze tří měření a pro další výpočty byl brán průměr z těchto tří hodnot. Závislost absorbancí kalibračních roztoků na jejich koncentraci byla vyhodnocena metodou lineární regrese.

PARACETAMOL

c (mg/100 ml)	plocha píku
114,8	1651022
160,7	2325709
195,2	2838675
229,6	3309415
287,0	4084948
344,4	4900277



Obrázek 3:Testování linearity - paracetamol

Regresní funkce :	**y = k x + q**

počet: bodů n =	6

Parametry regresní přímky a odhady jejich směrodatných odchylek						
směrnice		k	=	14072,06	±	124,3218
absolutní člen		q	=	61714,16	±	29191,51

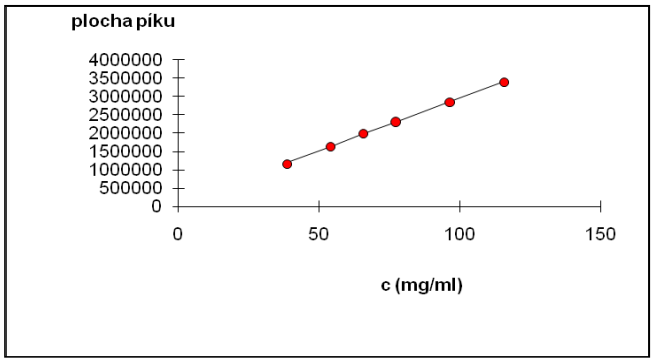
koeficient korelace	R	= 0,999844
reziduální odchylka	s_{rez}	= 23335,54

Závislost y na x byla prokázána se spolehlivostí 99.9 % .

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

KOFEIN

c (mg/100 ml)	plocha píku
38,6	1163702
53,9	1641505
65,6	1993548
77,1	2311442
96,4	2845746
115,6	3392875



Obrázek 4: Testování linearity - kofein

Regresní funkce :	**y = k x + q**

počet: bodů n =	6

Parametry regresní přímky a odhady jejich směrodatných odchylek					
směrnice		k =	28699,97	±	353,7367
absolutní člen		q =	85220,68	±	27899,04

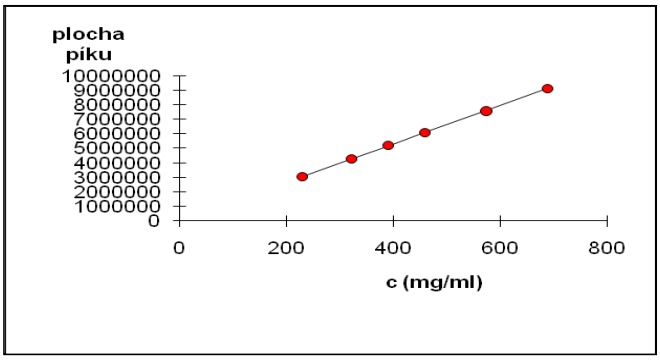
koeficient korelace	R =	0,999696
reziduální odchylka	s_{rez} =	22305,55

Závislost y na x	byla	prokázána se spolehlivostí 99.9 % .

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

PROPYFENAZON

c (mg/100 ml)	plocha píku
229,3	3041896
321,0	4273811
390,0	5204089
458,5	6086014
573,1	7575221
687,8	9112209



Obrázek 5: Testování linearity - propyfenazon

Regresní funkce :	**y = k x + q**

počet: bodů n =	6

Parametry regresní přímky a odhady jejich směrodatných odchylek						
směrnice		k	=	13194,86	±	49,02344
absolutní člen		q	=	33146,91	±	22989,28

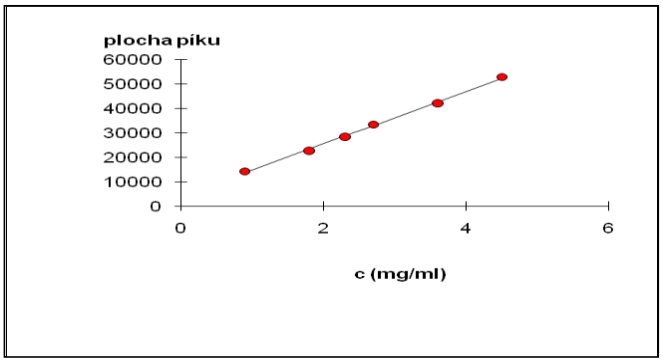
koeficient korelace	R =	0,999972
reziduální odchylka	s_{rez} =	18372,58

Závislost y na x	byla	prokázána se spolehlivostí 99.9 % .

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

P – AMINOFENOL

c (mg/100 ml)	plocha píku
0,9	14278
1,8	22581
2,3	28305
2,7	33279
3,6	42070
4,5	52710



Obrázek 6: Testování linearity – p-aminofenol

Regresní funkce :	**y = k x + q**

počet: bodů n =	6

Parametry regresní přímky a odhady jejich směrodatných odchylek					
směrnice		k	=	10721,93	± 222,6771
absolutní člen		q	=	3969,415	± 641,7842

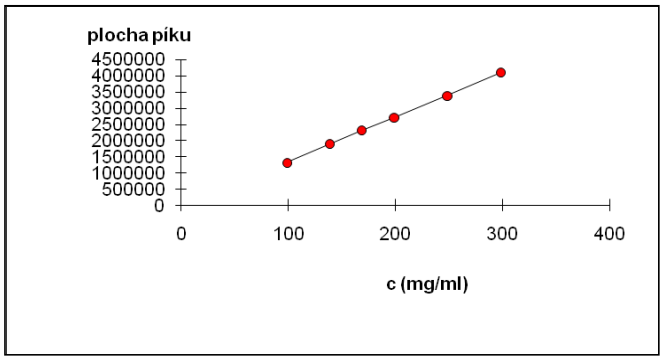
koeficient korelace	R	=	0,999138
reziduální odchylka	s_{rez}	=	638,945

Závislost y na x	byla	prokázána se	spolehlivostí 99.9 % .

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

KYSELINA BENZOOVÁ

c (mg/100 ml)	plocha píku
99,5	1323711
139,2	1901599
169,0	2318251
198,9	2712541
248,6	3383420
298,4	4102519



Obrázek 7: Testování linearity – kyselina benzoová

Regresní funkce :	**y = k x + q**

počet: bodů n =	6

Parametry regresní přímky a odhady jejich směrodatných odchylek						
směrnice		k	=	13853,79	±	105,8664
absolutní člen		q	=	-39949,29	±	21533,84

koeficient korelace	R	= 0,999883
reziduální odchylka	s_{rez}	= 17215,84

Závislost y na x	byla	prokázána se spolehlivostí 99.9 % .

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

Kalibrační křivky jsou lineární v rozsahu 114,8 – 344,4 mg/100ml pro paracetamol, 38,6 – 115,6 mg/100ml pro kofein, 229,3 – 687,8 mg/100ml pro propyfenazon, 0,9 – 4,5 mg/100ml pro p-aminofenol a 99,5 – 298,4 mg/100mg pro k.benzoovou.

6.2.2.3 Správnost

Byly změřeny roztoky standardů: c_o = 229,6 mg/100 ml (paracetamol), 77,1 mg/100 ml (kofein), 458,5 mg/100 ml (propyfenazon), c = 4,5 mg/100 ml (p-aminofenol), c = 198,9 mg/100 ml (k. benzoové), n = 3.

Byly analyzovány modelové vzorky (placebo tabletoviny + paracetamol + kofein + propyfenazon), které byly paralelně připraveny samostatným postupem uvedeným v kapitole 5.2. s přídavkem roztoku standardů o koncentraci c_o.

Výtěžnost R_i byla vypočtena podle vzorce:

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

c_0 je koncentrace vložená
c_i je koncentrace stanovená HPLC

Výsledky jsou uvedeny v tabulkách č. 12 - 16.

Tabulka č. 12: Správnost - paracetamol

Vzorek č.	**C_0 (mg/100 ml)**	**C_i (mg/ 100 ml)**	**R_i (%)**
1		228,7	99,61
2		227,4	99,04
3	229,6	228,1	99,35
4		227,8	99,22
5		227,4	99,04
6		228,2	99,39

n = 6
$\bar{x}$ = 99,28
σ = 0,2019
s_R = 0,2034

Tabulka č. 13: Správnost - kofein

Vzorek č.	C_0 (mg/100 ml)	C_i (mg/ 100 ml)	R_i (%)
1		77,4	100,39
2		77,3	100,26
3	77,1	77,4	100,39
4		77,4	100,39
5		77,7	100,78
6		78,1	101,30

n = 6

$\bar{x}$ = 100,59

s = 0,3580

s_R = 0,3559

Tabulka č. 14: Správnost - propyfenazon

Vzorek č.	C_0 (mg/100 ml)	C_i (mg/ 100 ml)	R_i (%)
1		464,5	101,31
2		458,0	99,89
3	458,5	460,6	100,46
4		459,5	100,22
5		460,2	100,37
6		460,7	100,48

n = 6

$\bar{x}$ = 100,46

s = 0,4308

s_R = 0,4288

Tabulka č. 15: Správnost - p-aminofenol

Vzorek č.	C_0 (mg/100 ml)	C_i (mg/ 100 ml)	R_i (%)
1		4,40	96,92
2		4,47	98,46
3	4,54	4,47	98,46
4		4,43	97,58
5		4,40	96,92
6		4,49	98,90

n = 6
$\bar{x}$ = 97,87
s = 0,7795
s_R = 0,7965

Tabulka č. 16: Správnost - kyselina benzoová

Vzorek č.	C_0 (mg/100 ml)	C_i (mg/ 100 ml)	R_i (%)
1		206,8	103,97
2		207,3	104,22
3	198,9	206,3	103,72
4		206,9	104,02
5		205,3	103,22
6		205,4	103,27

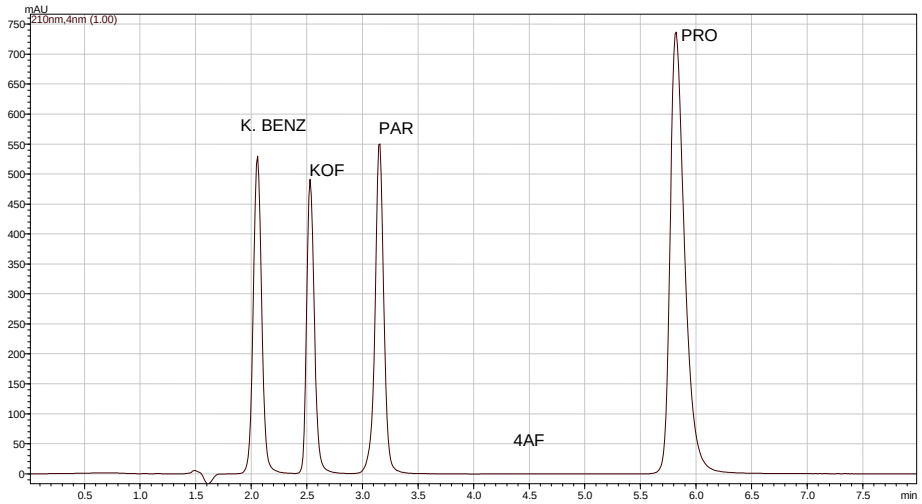
n = 6
$\bar{x}$ = 103,74
s = 0,3771
s_R = 0,3635

Požadavek na výtěžnost R v intervalu 100 ± 5 % vyhovuje. Relativní směrodatná odchylka s_R < 5 % je splněna u všech pěti látek.

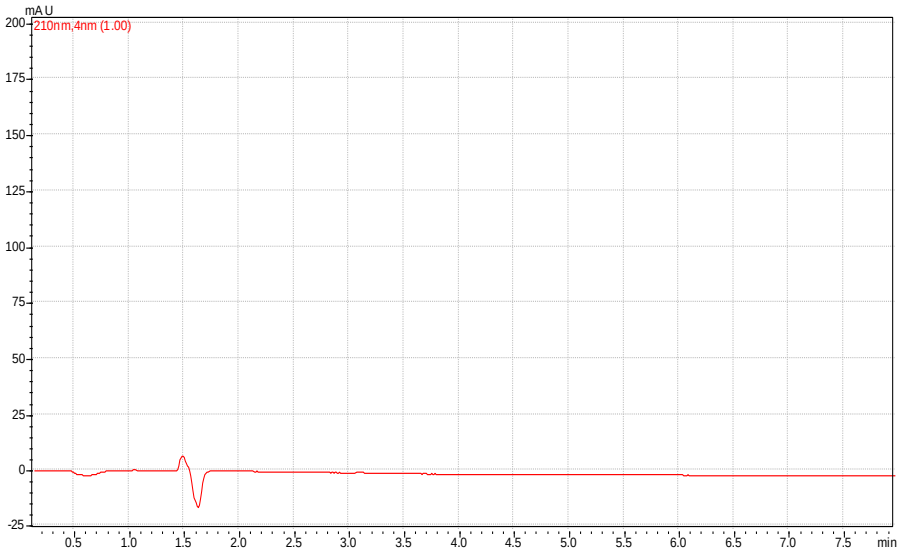
6.2.2.4 Selektivita

Separace standardních látek paracetamolu (c = 229,6 mg/100 ml), kofeinu (c = 77,1 mg/100 ml), propyfenazonu (c = 458,5 mg/100 ml), p-aminofenolu (c = 4,5 mg/100 ml) a k. benzoové (c = 198,9 mg/100 ml) je dokumentována na chromatogramu standardních látek (viz. obr. 8).

Na chromatogramu placeba (obr. 9) je patrno, že v retenčních časech odpovídajících sledovaným látkám nejsou přítomny žádné píky interferujících látek.



Obrázek 8: Chromatogram separace standardních látek



Obrázek 9: Chromatogram placeba

Předložená HPLC metoda umožňuje selektivně změřit plochy píků odpovídající účinným látkám paracetamolu, kofeinu, propyfenazonu, nečistotě p-aminofenolu a vnitřnímu standardu k. benzoové.

6.2.2.5 Robustnost

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

Paracetamol (c = 229,6 mg/100 ml)

Kofein (c = 77,1 mg/100 ml)

Propyfenazon (c = 458,5 mg/100 ml)

p-Aminofenol (c= 4,5 mg/100 ml)

Kyselina benzoová (c= 198,9 mg/100 ml)

Vliv složení mobilní fáze na plochu chromatografických píků

1) Změna pH pufru

Každá mobilní fáze byla proměřena třikrát.

$$A_R = 100 \cdot \frac{A_i}{A_{pH4,5}}$$, kde

A_i- plocha píku za testovaných podmínek
$A_{pH4,5}$ – plocha píku za standardních podmínek

Výsledky jsou uvedeny v tabulkách č. 17 - 20.

Tabulka č. 17: Vliv pH na plochu píku (paracetamol)

	Paracetamol	
	A_i	**A_R(%)**
PH 5,0	3288114	99,91
PH 3,5	30556823	92,85

n = 3

Tabulka č. 18: Vliv pH na plochu píku (kofein)

	Kofein	
	A_i	**A_R(%)**
PH 5,0	2347230	101,4
PH 3,5	2002112	86,49

n = 3

Tabulka č. 19: Vliv pH na plochu píku (propyfenazon)

	Propyfenazon	
	A_i	**A_R(%)**
PH 5,0	6113571	100,49
PH 3,5	5355796	88,04

n = 3

Tabulka č. 20: Vliv pH na plochu píku (kyselina benzoová)

	Kyselina benzoová	
	A_i	**A_R(%)**
PH 5,0	2855052	105,58
PH 3,5	2697675	99,76

Při změně pH mobilní fáze nebyl pík p-aminofenolu v průběhu analýzy detekován. Plochy jeho píků proto nejsou uvedeny.

Při pH 5,0 byla retence k. benzoové shodná s mrtvým objemem, to zdůvodňuje její větší pík. Při pH 4.0 se k. benzoová téměř shoduje s retenčním časem paracetamolu – píky se neoddělí.

2) Změna obsahu trietylaminu v mobilní fázi

Tabulka č. 21: Vliv množství obsahu TEA v mobilní fázi na plochu píku - paracetamol

	Paracetamol	
Množství TEA v %	**A_i**	**A_R(%)**
0,03%	3281304	99,71
0,05%	3256618	98,96

Tabulka č. 22: Vliv množství obsahu TEA v mobilní fázi na plochu píku - kofein

	Kofein	
Množství TEA v %	**A_i**	**A_R(%)**
0,03%	2340931	101,13
0,05%	2278034	98,41

Tabulka č. 23: Vliv množství obsahu TEA v mobilní fázi na plochu píku - propyfenazon

	Propyfenazon	
Množství TEA v %	**A_i**	**A_R(%)**
0,03%	6124377	100,67
0,03%	6054810	99,53

Tabulka č. 24: Vliv množství obsahu TEA v mobilní fázi na plochu píku – kyselina benzoová

	Kyselina benzoová	
Množství TEA v %	**A_i**	**A_R(%)**
0,03%	2716225	100,44
0,05%	2668807	98,69

Tabulka č. 25: Vliv množství obsahu TEA v mobilní fázi na plochu píku – p-aminofenol

	p-Aminofenol	
Množství TEA v %	**A_i**	**A_R(%)**
0,03%	24231	83,47
0,05%	24476	84,31

P-AMF mění při změně obsahu TEA výrazně retenční časy: 0,03% TEA 4,959 min, 0,05% TEA 3,964 min. Hodnota plochy píku je za těchto podmínek tedy výrazně odlišná.

6.2.2.6 Stabilita

Stabilita roztoku standardních látek v methanolu o koncentraci c = 229,6 mg/100 ml paracetamolu, c = 77,1 mg/100 ml kofeinu, c = 458,5 mg/100 ml propyfenazonu, c = 4,5mg/100 ml p-aminofenolu a c = 198,9 mg/100 ml k. benzoové byla testována při uchovávání:

1) za snížené teploty (4 ^{o}C), chráněné před světlem
2) za laboratorní teploty, chráněné před světlem

Výsledky uvedené v tabulkách č. 26 - 30 jsou průměrem ze tří měření.

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

A_i je plocha píku za daných podmínek
A_0 je plocha píku za standardních podmínek

t je čas od přípravy roztoku vzorku
A je plocha píku

Tabulka č. 26: Stabilita paracetamolu v methanolu v závislosti na době a způsobu uchovávání

Paracetamol				
t	**A (4 ^{o}C)**	**S_T (%)**	**A (≈ 20 ^{o}C)**	**S_T (%)**
0	3309415	0,00	3309415	0,00
24 h	3290926	0,56	3295175	0,43
48 h	3332954	0,71	3352848	1,31
72 h	3325719	0,49	3240019	2,10

n = 3

Požadavek na stabilitu (S_T<1 %) roztoku paracetamolu v methanolu je splněn při jeho uchování za snížené teploty po dobu 72 hodin nebo za laboratorní teploty po dobu 24 hod od jeho přípravy.

Tabulka č.27: Stabilita kofeinu v methanolu v závislosti na době a způsobu uchovávání

Kofein				
t	**A (4 °C)**	**S_T (%)**	**A (≈ 20 °C)**	**S_T (%)**
0	2311442	0,00	2311442	0,00
24 h	2314840	0,15	2319952	0,37
48 h	2322827	0,50	2319760	0,36
72 h	2337228	1,12	2338808	1,18

n = 3

Požadavek na stabilitu (S_T<1 %) roztoku kofeinu v metanolu je splněn při jeho uchování za snížené teploty nebo za laboratorní teploty po dobu 48 hod od jeho přípravy.

Tabulka č. 28: Stabilita propyfenazonu v methanolu v závislosti na době a způsobu uchovávání

Propyfenazon				
t	**A (4 °C)**	**S_T (%)**	**A (≈ 20 °C)**	**S_T (%)**
0	6086014	0,00	6086014	0,00
24 h	6083573	0,04	6093187	0,12
48 h	6092311	0,10	6119293	0,55
72 h	6124794	0,64	6127176	0,68

n = 3

Požadavek na stabilitu (S_T<1 %) roztoku propyfenazonu v methanolu je splněn při jeho uchování za snížené teploty nebo za laboratorní teploty po dobu 72 hod od jeho přípravy.

Tabulka č. 29: Stabilita p-aminofenolu v methanolu v závislosti na době a způsobu uchovávání

p-Aminofenol				
t	**A (4 °C)**	**S_T (%)**	**A (≈ 20 °C)**	**S_T (%)**
0	33279	0,00	33279	0,00
24 h	29030	12,77	27615	17,02
48 h	24779	25,54	24779	25,54
72 h	22330	32,90	1888	94,33

Roztoky p-aminofenolu jsou obecně výrazně nestabilní. Požadavek na stabilitu (S_T<1 %) roztoku p-aminofenolu v metanolu není splněn pro žádný z výše uvedených způsobů uchování. Je proto nutné připravovat roztok p-aminofenolu v methanolu každý den čerstvý. *(viz teoretická část)*

Tabulka č. 30: Stabilita kyseliny benzoové v methanolu v závislosti na době a způsobu uchovávání

Kyselina benzoová				
t	**A (4 °C)**	**S_T (%)**	**A (≈ 20 °C)**	**S_T (%)**
0	2712541	0,00	2712541	0,00
24 h	2704288	0,30	2707212	0,20
48 h	2703380	0,34	2721320	0,32
72 h	2722078	0,35	2723773	0,41

Požadavek na stabilitu (S_T (%)<1 %) roztoku k. benzoové v methanolu je splněn při jeho uchování za snížené teploty nebo laboratorní teploty po dobu 72 hod od jeho přípravy.

7 Závěr

Tato práce navazuje na diplomovou práci [1], ve které byly optimalizovány chromatografické podmínky pro stanovení účinných látek léčivého přípravku Valetol, paracetamolu, kofeinu a propyfenazonu, a nečistoty p-aminofenolu.

Součástí práce bylo nalezení vhodného vnitřního standardu pro kvantifikaci všech účinných látek a nečistoty, kyseliny benzoové. Následně byla provedena validace analytické metody, včetně testu vhodnosti chromatografického systému.

V rámci testu vhodnosti chromatografického systému byla testována:

- účinnost kolony vyjádřená počtem teoretických pater N
- asymetrie chromatografických píků vyjádřená faktorem T
- rozlišení chromatografických píků
- opakovatelnost vyjádřená jako relativní směrodatná odchylka

Požadavek na účinnost kolony vyjádřené počtem teoretických pater N > 1500 byl splněn pro všech pět analyzovaných látek. Asymetrie chromatografických píků vyjádřená faktorem T byla menší než 2 u všech látek. Požadavek na rozlišení chromatografických píků $R_{ij} > 1,5$ byl splněn u všech hodnocených chromatografických píků. Opakovatelnost vyjádřená jako relativní směrodatná odchylka s_R byla splněna rovněž pro všech pět analyzovaných látek.

V rámci validace analytické metody byla testována:

- přesnost
- linearita
- správnost
- selektivita
- robustnost
- stabilita

Při testování přesnosti analytické metody byl požadavek na relativní směrodatnou odchylku s_R < 5% splněn pro všech pět látek.

Požadavku pro parametr linearity na hodnotu korelačního koeficientu R > 0,9990 bylo vyhověno u všech pěti látek.

Správnost stanovení je vyjádřena veličinou výtěžnost (R_i). Požadavek na výtěžnost R_i v rozmezí 100 ± 5% byl splněn pro všechny látky. Její hodnoty se pohybovaly v intervalu 99,04 – 99,61% pro paracetamol, 100,26 – 101,30% pro kofein, 99,89 – 101,31% pro propyfenazon, 96,92 – 98,90% pro p-aminofenol a 103,22 – 104,22% pro k.benzoovou.

Parametr selektivity byl ověřen porovnáním chromatogramů roztoků standardů a placeba. Látky jsou vzájemně separovány s rozlišením větším než 1,5. Na chromatogramu placeba nebyl nalezen žádný pík, který by interferoval s retenčním časem některé ze standardních látek.

Testování robustnosti prokázalo citlivost analýzy na změnu složení mobilní fáze. V rámci robustnosti byly testovány dva parametry mobilní fáze: pH a změna obsahu triethylaminu. Bylo prokázáno, že změna pH mobilní fáze má vliv především na retenční časy p-aminofenolu a kyseliny benzoové. Změna obsahu triethyaminu v mobilní fázi má výrazný vliv jak na retenční čas p-aminofenolu, tak na velikost plochy p-aminofenolu (na jeho kvantifikaci).

Roztok paracetamolu v methanolu je stabilní při jeho uchování za snížené teploty po dobu 72 hodin a za laboratorní teploty po dobu 24 hodin od jeho přípravy.
Požadavek na stabilitu S_T<1 % pro roztok kofeinu v methanolu je splněn při jeho uchování za snížené teploty nebo za laboratorní teploty po dobu 48 hod od jeho přípravy.
Roztok propyfenazonu v methanolu je stabilní po dobu 72 hodin od jeho přípravy při jeho uchování za snížené i laboratorní teploty. To samé platí i pro roztok kyseliny benzoové v mobilní fázi.
Požadavek na stabilitu roztoku p-aminofenolu v methanolu nebyl splněn pro žádnou z testovaných podmínek uchování, což je důkazem jeho výrazné nestability *(viz teoretická část)*. Je proto nutné připravovat jeho roztok každý den čerstvý.

Z validace analytické metody vyplývá, že kladeným požadavkům nevyhovuje parametr robustnosti a stability. Metoda tedy může být použita v praxi, ale pouze s ohledem na výše uvedené skutečnosti.

8 Citovaná literatura

1. **Marousková, A.** HPLC separace p-aminofenolu, paracetamolu, kofeinu a propyfenazonu na polární stacionární fázi. Hradec Králové : Katedra analytické chemie, Farmaceutická fakulta,Univerzita Karlova, 2009.

2. Databáze AISLP mikroverze. 2004/3.

3. **Kolektiv, autorů.** Český lékopis 2002. Praha : Grada, 2003.

4. **Hartl J., Palát K. a kol.** Farmaceutická chemie II. Praha : Karolinum, 1994.

5. **Klimeš J., a kol.** Kontrola léčiv I. Praha : Karolinum, 2002.

6. **Hanyšová L., Kastner P., Klimeš J.** Chemické listy 99. 2005. stránky 647 - 648.

7. **Hanyšová L., Kastner P., Klimeš J**. Chemické listy 98. 2004.

8. **Lincová D., Farghali H. a kol. autorů.** Základní a aplikovaná farmakologie. RAHA : Galén, 2007.

9. **Hartl J., Palát K. a kol.** Farmaceutická chemie III. Praha : Karolinum, 2004.

10. **Bloomfield, M.S.** Talanta : 580, 2002, stránky 1301 - 1310.

11. **Hanyšová L., Kastner P., Klimeš J.** *Chemické listy 98.* 2004, str. 152.

12.**Wikipedie Otevřená encyklopedie** *www.cs.wikipedia.org/wiki/Kyselina_benzoová, cit. 2009 - 10*

13. **C. Harold Jackson, Nancy C. MacDonald, J. William D. Corne.** Acetaminophen: a practical pharmacologic overview. *Can Med Assoc J.* July 1 1984, 131, stránky 25 - 37.

14. **Kennon J. Heard, M.D.** Acetylcysteine for Acetaminophen Poisoning. *N Engl J Med.* July 17 2008, Sv. 359(3), stránky 285 -292.

15. **Simon, Jerome B.** Acetaminophen Liver Injury. *Can. Fam. Physician.* November 1985, stránky 2155 - 2158.

16. **Mack C.Michell, Seven Schenker, K.V. Speeg, Jr.** Selective inhibition of acetaminophen oxidation and toxicity by cimetidine and other histamine H2-receptor antagonists in vivo and in vitro in the rat and in man. *J Clin Inves.* Fabruary 1984, stránky 383 - 391.

17. **Ian M Whyte, Barbara Francis, Andrew H Dawson.** Safety and efficacy of intravenous N-aceylcysteine for acetaminophen overdose. *Curr Med Res Opin.* October 2007, vol. 23, stránky 2359 - 2368.

18. **Rober J. Fonana, MD.** Acute liver failure including aceaminophen overdose. *Med Clin Noh Am.* July 2008, stránky 761 - 794.

19. **Chi Chen, Krisopher W. Krausz, Jeffrey R. Idle, Frank J. Gonzalez.** Identificaion of novel toxicity - associaed metabolites by metabolomics and mass isotopomer analysis of acetaminophen metabolism i wild-type and CZP2E1-null mice. *J Biol Chem.* February 2008, stránky 4543 - 4559.

20. **Maryann Mazer, MD, PharmD, Jeanmarie Perrone, MD.** Acetaminophen-induced nephrotoxicity: Pathophysiology, Clinical manifestation and manegemen. *J Med Toxicol.* March 2008, Sv. Volume 4, stránky 2 - 6.

21. **Karlíček R., a kol.** *Analytická chemie pro farmaceuty.* Praha : Karolinum, 2001.

22. **Daňková, Jana.** *Optimalizace chromatografické separace pro stanovení 4-aminofenolu a účinných látek v léčivém přípravku Valetol.* Hradec Králové : UK v Praze Univerzita Karlova v Hradci Králové, 2008.

23. Validation of Analytical Methods and Procedures. *www.labcompliance.com/tutorial/methods/default.aspx?sm=d_d., cit. 2009 - 10*

24. **Jiří Klimeš, a kol.** *Kontrola léčiv II.* Praha : Karolinum, 2004.

25. **VŠCHT.** Validační program pro statistické zpracování analytických dat. *www.vscht.cz/ktk/www_324/lab/texty/ana/**validace**.pdf, cit. 2009 - 10*

26. **International conference of harmonisation.** Validation of analytical procedures:Text and methodology Q2(R1). *ICH Harmonised Tripartite Guideline.* October 1994. Current Step 4 version.

27. **Katedra analytické chemie Přírodovědecká fakulta Univerzita Palackého.** Hodnocení analytických výsledků. *ach.upol.cz/ucebnice/**hodnoceni**.htm, cit. 2009 - 10*

28. **SÚKL.** Věštník SÚKL. *1/1994.* Praha : SÚKL, 1994.

29. **Pavel Zachař, David Sýkora.** Plynová chromatografie. *www.vscht.cz., cit. 2009 - 10*