

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

Katedra analytické chemie

**Vývoj a validace HPLC metod pro stanovení
ketoprofenu v léčivých přípravcích**

Rigorózní práce

Prof. RNDr. Petr Solich, CSc.
vedoucí katedry

PharmDr. Ludmila Matysová, Ph.D.
vedoucí rigorózní práce

Hradec Králové 2011

Mgr. Lucie Bajcurová

Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány.

Mgr. Lucie Bajcurová

Děkuji PharmDr. Ludmile Matysové, Ph.D. za její odborné vedení a pomoc při vypracování této rigorózní práce.

Děkuji všem pracovníkům Katedry analytické chemie za ochotu a odbornou a technickou podporu při řešení dané problematiky.

Abstrakt

Univerzita Karlova v Praze

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra analytické chemie

Kandidát: Mgr. Lucie Bajcurová

Konzultant: PharmDr. Ludmila Matysová, Ph.D.

Název rigorózní práce: Vývoj a validace HPLC metod pro stanovení ketoprofenu v léčivých přípravcích

Byla validována již vyvinutá metoda pro stanovení ketoprofenu v léčivém přípravku PRONTOFLEX 10% kožní sprej, roztok. Přesnost vyjádřená jako relativní směrodatná odchylka je 1,43 %. Správnost vyjádřená jako výtěžnost je 101,52 %. Korelační koeficient R je větší než 0,999.

Bylo pokračováno ve vývoji metody pro stanovení ketoprofenu v léčivém přípravku Ketonal 5% krém. Vyvinutá metoda byla validována. Optimální chromatografické podmínky byly: kolona SUPELCO Discovery C18 (150 mm x 4,6 mm, 5 μ m), mobilní fáze acetonitril : voda : fosforečnanový pufr 3,5 (39:59:2, v/v/v), rychlost průtoku mobilní fáze 1,5 ml/min, dávkovaný objem 5 μ l, UV detekce při vlnové délce 233 nm. Celkový čas analýzy byl pod 10 minut. Jako vnitřní standard byl užit ethylparaben. Přesnost vyjádřená jako relativní směrodatná odchylka je 0,64 %. Správnost vyjádřená jako výtěžnost je 98,10 %. Korelační koeficient R je větší než 0,998.

Abstract

Charles University in Prague

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Analytical Chemistry

Candidate: Mgr. Lucie Bajcurová

Consultant: PharmDr. Ludmila Matysová, Ph.D.

Title of Thesis: The Development and Validation of HPLC Methods for Determination of Ketoprofen in Pharmaceutical Preparations

The already developed method for determination of ketoprofen in the pharmaceutical preparation “PRONTOFLEX” – a 10% skin spray has been validated. The precision expressed as relative standard deviation was 1.43 %. The accuracy expressed as recovery was 101.52 %. The correlation coefficient R was more than 0.999.

The method for determination of ketoprofen in the pharmaceutical preparation “Ketonal” – a 5% cream has been further developed. The already developed method has been validated. The chromatographic separation was performed on a SUPELCO Discovery C18 column (150 mm x 4.6 mm, 5 μ m). The mobile phase consisted of a mixture of acetonitrile, water and a phosphate buffer pH 3.5 (39:59:2, v/v/v). At a mobile phase flow rate of 1.5 ml/min, injection volume of 5 μ l and UV detection at a wavelength of 233 nm, the total time of analysis was less than 10 minutes. Ethylparaben was used as an internal standard. The precision expressed as relative standard deviation was 0.64 %. The accuracy expressed as recovery was 98.10 %. The correlation coefficient R was more than 0.998.

Obsah

<u>1</u>	<u>ÚVOD</u>	<u>13</u>
1.1	ÚVOD A CÍL PRÁCE	14
<u>2</u>	<u>TEORETICKÁ ČÁST</u>	<u>15</u>
2.1	VYSOKOÚČINNÁ KAPALINOVÁ CHROMATOGRAFIE	16
2.1.1	HPLC	16
2.1.2	HPLC S OBRÁCENÝMI FÁZEMI (RP HPLC, RPLC)	16
2.1.3	OBLASTI VYUŽITÍ HPLC V ANALÝZE LÉČIV	16
2.2	VALIDACE	17
2.2.1	VALIDACE ANALYTICKÝCH METOD	17
2.2.2	VALIDAČNÍ PROTOKOL	17
2.2.3	PROBLEMATIKA VALIDACE	17
2.2.3.1	ČSN EN ISO/IEC 17025:2005	17
2.2.3.2	ICH, USP a FDA	18
2.2.3.3	Postavení testu způsobilosti systému v rámci validace	20
2.2.3.4	SÚKL	21
2.2.4	REVALIDACE	21
2.2.5	TEST ZPŮSOBILOSTI SYSTÉMU (TEST VHODNOSTI)	21
2.2.5.1	Úprava chromatografických podmínek	22
2.2.5.2	Parametry pro hodnocení SST	24
2.2.5.2.1	Účinnost kolony a zdánlivý počet teoretických pater	24
2.2.5.2.2	Faktor symetrie	25
2.2.5.2.3	Retenční faktor (kapacitní faktor, hmotnostní distribuční poměr)	25
2.2.5.2.4	Relativní retence	26
2.2.5.2.5	Rozlišení	26
2.2.5.2.6	Opakovatelnost	26
2.2.6	VALIDAČNÍ PARAMETRY	27
2.2.6.1	Správnost	27
2.2.6.1.1	Definice	27

2.2.6.1.2	Provedení.....	27
2.2.6.2	Přesnost	28
2.2.6.2.1	Definice	28
2.2.6.2.1.1	Opakovatelnost.....	28
2.2.6.2.1.2	Mezilehlá přesnost.....	28
2.2.6.2.1.3	Reprodukovatelnost.....	28
2.2.6.2.2	Provedení.....	29
2.2.6.3	Selektivita.....	29
2.2.6.3.1	Definice	29
2.2.6.3.2	Provedení.....	29
2.2.6.4	Detekční limit (LOD)	30
2.2.6.4.1	Definice	30
2.2.6.4.2	Provedení.....	30
2.2.6.4.2.1	Poměr signálu k šumu	30
2.2.6.5	Kvantitativní limit (LOQ).....	31
2.2.6.5.1	Definice	31
2.2.6.5.2	Provedení.....	31
2.2.6.6	Linearita.....	32
2.2.6.6.1	Definice	32
2.2.6.6.2	Provedení.....	32
2.2.6.7	Rozsah	32
2.2.6.7.1	Definice	32
2.2.6.7.2	Provedení.....	32
2.2.6.8	Robustnost.....	33
2.2.6.8.1	Definice	33
2.2.6.8.2	Provedení.....	33
2.2.6.8.2.1	Stabilita.....	33
2.2.7	POŽADAVKY NA HODNOTY JEDNOTLIVÝCH PARAMETRŮ	33
2.2.8	PARAMETRY POŽADOVANÉ PRO VALIDACI METODY	34
2.3	KĚTOPROFEN.....	36
2.3.1	CHEMICKÉ A FYZIKÁLNĚ-CHEMICKÉ VLASTNOSTI	36
2.3.2	FARMAKOLOGICKÉ VLASTNOSTI.....	36
2.4	PARABENY	37

2.4.1	METHYLPARABEN.....	37
2.4.1.1	Chemické a fyzikálně-chemické vlastnosti	37
2.4.2	ETHYLPARABEN.....	38
2.4.2.1	Chemické a fyzikálně-chemické vlastnosti	38
2.4.3	PROPYLPARABEN.....	38
2.4.3.1	Chemické a fyzikálně-chemické vlastnosti	38
2.5	METODY HODNOCENÍ KETOPROFENU	40
2.5.1	LÉKOPISNÉ METODY	40
2.6	HODNOTY PARAMETRŮ ZJIŠTĚNÉ PŘI VALIDACI	41
2.7	ZHODNOCENÍ REŠERŠE	45
<u>3</u>	<u>EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST</u>	<u>46</u>
3.1	PŘÍSTROJOVÉ VYBAVENÍ	47
3.2	CHEMIKÁLIE A VZORKY	48
3.2.1	CHEMIKÁLIE	48
3.2.2	VZORKY	48
3.3	PŘÍPRAVA ROZTOKŮ A VZORKŮ.....	49
3.3.1	ROZTOKY PRO VALIDACI – SPREJ.....	49
3.3.2	ROZTOKY A VZORKY PRO VÝVOJ METODY – KRÉM.....	52
3.3.3	ROZTOKY PRO VALIDACI – KRÉM	53
3.4	STANOVENÍ OBSAHU KETOPROFENU A KONZERVAČNÍCH LÁTEK.....	56
<u>4</u>	<u>VÝSLEDKY A DISKUSE</u>	<u>57</u>
4.1	SPREJ – VALIDACE.....	58
4.1.1	METODA	58
4.1.1.1	Optimální chromatografické podmínky.....	58
4.1.1.2	Příprava vzorku – sprej.....	58
4.1.2	TEST VHODNOSTI CHROMATOGRAFICKÉHO SYSTÉMU	58
4.1.2.1	Účinnost chromatografické kolony	58
4.1.2.2	Faktor symetrie.....	59
4.1.2.3	Rozlišení.....	59

4.1.2.4	Opakovatelnost	59
4.1.3	VALIDAČNÍ PARAMETRY	61
4.1.3.1	Přesnost	61
4.1.3.2	Správnost	61
4.1.3.3	Linearita.....	63
4.1.3.4	Selektivita.....	64
4.1.3.5	Robustnost	65
4.1.3.5.1	Vliv složení mobilní fáze.....	65
4.1.3.5.1.1	Vliv na plochu píku	66
4.1.3.5.1.2	Vliv na retenční čas	67
4.1.3.5.2	Stabilita.....	68
4.2	KRÉM – VÝVOJ METODY	70
4.2.1	METODA	70
4.2.1.1	Chromatografické podmínky.....	70
4.2.1.2	Příprava vzorku	70
4.2.2	MOBILNÍ FÁZE	71
4.2.3	VÝSLEDKY ANALÝZ.....	71
4.2.3.1	SUPELCO Discovery C18, 5 µm, 125 mm x 4,6 mm.....	71
4.2.3.2	SUPELCO Discovery C18, 5 µm, 150 mm x 4,6 mm.....	72
4.3	KRÉM – VALIDACE	77
4.3.1	METODA	77
4.3.1.1	Optimální chromatografické podmínky.....	77
4.3.1.2	Příprava vzorku – krém	77
4.3.2	TEST VHODNOSTI CHROMATOGRAFICKÉHO SYSTÉMU	77
4.3.2.1	Účinnost chromatografické kolony	77
4.3.2.2	Faktor symetrie.....	78
4.3.2.3	Rozlišení	78
4.3.2.4	Opakovatelnost	79
4.3.3	VALIDAČNÍ PARAMETRY	81
4.3.3.1	Přesnost	81
4.3.3.2	Správnost	85
4.3.3.3	Linearita.....	89
4.3.3.4	Selektivita.....	91

4.3.3.5	Robustnost	92
4.3.3.5.1	Vliv složení mobilní fáze.....	93
4.3.3.5.1.1	Vliv na plochu píku	93
4.3.3.5.1.2	Vliv na retenční čas	95
4.3.3.5.2	Stabilita.....	96
5	<u>SHRNUTÍ A ZÁVĚR.....</u>	100
5.1	SHRNUTÍ.....	101
5.1.1	PRONTOFLEX 10% KOŽNÍ SPREJ, ROZTOK	101
5.1.1.1	Metoda.....	101
5.1.1.1.1	Optimální chromatografické podmínky.....	101
5.1.1.1.2	Příprava vzorku – sprej.....	101
5.1.1.2	Test vhodnosti chromatografického systému	102
5.1.1.3	Validační parametry	102
5.1.2	KETONAL 5% KRÉM.....	103
5.1.2.1	Metoda.....	103
5.1.2.1.1	Optimální chromatografické podmínky.....	103
5.1.2.1.2	Příprava vzorku – krém	103
5.1.2.2	Test vhodnosti chromatografického systému	104
5.1.2.3	Validační parametry	104
5.2	ZÁVĚR	106
6	<u>POUŽITÉ ZDROJE.....</u>	107

Seznam zkratk

ABF	3-acetylbenzofenon
ACN	acetonitril
CV	coefficient of variation variační koeficient
ČL	Český lékopis
EP	ethylparaben
FDA	U. S. Food and Drug Administration
FIA	Flow Injection Analysis průtoková injekční analýza
HETP	Height Equivalent to the Theoretical Plate výškový ekvivalent teoretického patra
HPLC	High Performance Liquid Chromatography vysokoúčinná kapalinová chromatografie
HVLP	hromadně vyráběné léčivé přípravky
ICH	The International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use
KP	ketoprofen
LOD	limit of detection detekční limit
LOQ	limit of quantitation kvantitativní limit
MEKC	micellar electrokinetic chromatography micelární elektrokinetická chromatografie
MeOH	methanol
MF	mobilní fáze
MP	methylparaben
PP	propylparaben
RP	Reversed-Phase systém obrácených fází
SF	stacionární fáze

SST	System Suitability Testing test způsobilosti systému
SÚKL	Státní ústav pro kontrolu léčiv
USP	United States Pharmacopoeia
UV/VIS	Ultra Violet/Visible ultrafialová/viditelná oblast spektra

1 ÚVOD

1.1 Úvod a cíl práce

S rozvojem společnosti dochází k neustálému zvyšování požadavků. Týká se to také léčivých přípravků. Léčivý přípravek musí být kvalitní, účinný, bezpečný, snadno aplikovatelný, dosažitelný, levný a s dostatkem informací. Důležitým předpokladem pro zajištění kvality, účinnosti a bezpečnosti léčivých přípravků je jejich hodnocení vhodnou analytickou metodou.

Jednou z předních analytických metod je v současné době vysokoúčinná kapalinová chromatografie s obrácenými fázemi. Tato metoda je hojně využívána zejména pro řadu svých předností.

Pokud je vypracována nová metoda, je důležité zajistit, aby postup této metody byl vhodný, správný a přesný. To je úkolem validace, jejímž cílem je stanovit podmínky, kdy je postup metody použitelný, a zajistit stejnou spolehlivost při opakovaném používání této metody v různých laboratořích.

Cílem této práce je validovat již vyvinutou metodu pro stanovení množství ketoprofenu v léčivém přípravku PRONTOFLEX 10% kožní sprej, roztok, pokračovat ve vývoji metody pro stanovení množství ketoprofenu v léčivém přípravku Ketonal 5% krém a vyvinutou metodu validovat.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Vysokoučinná kapalinová chromatografie

2.1.1 HPLC

Vysokoučinná kapalinová chromatografie (HPLC) je v současné době jednou z předních analytických metod. Své uplatnění nachází ve všech oblastech analýzy léčiv, a to především proto, že umožňuje současné kvalitativní i kvantitativní hodnocení separovaných složek analytu, a to s vysokou selektivitou, citlivostí a v relativně krátkém čase [1], [2].

Jedná se o separační metodu, při které dochází k mnohonásobnému ustavování dynamické rovnováhy jednotlivých složek analytu mezi dvě vzájemně nemísitelné fáze, mobilní a stacionární. Principem separace je tedy dělení složek analytu mezi stacionární fázi naplněnou v koloně a mobilní fázi procházející kolonou za vysokého tlaku [3], [4].

2.1.2 HPLC s obrácenými fázemi (RP HPLC, RPLC)

Systém obrácených fází se v HPLC používá nejčastěji a je vhodný zejména pro dělení méně polárních látek. Je založen na hydrofobních, disperzních (Van der Waals) silách, které patří k nejslabším molekulárním interakcím. Jako mobilní fáze zde slouží hydrofilní rozpouštědlo a povrch stacionární fáze je hydrofobní (nepolární) [1], [4].

2.1.3 Oblasti využití HPLC v analýze léčiv

Mezi nejdůležitější oblasti využití HPLC v analýze léčiv patří kontrolně-analytická problematika zahrnující identifikaci, stanovení obsahu a čistoty léčiv, problematika stability léčiv, problematika analýzy přírodních léčiv v rostlinném materiálu a problematika monitorování léčiv a jejich metabolitů v tělních tekutinách [3].

2.2 Validace

2.2.1 Validace analytických metod

Validace je proces, který slouží k zajištění toho, že postup dané metody je vhodný, správný a přesný pro svůj zamýšlený účel, a měla by být prováděna na plně způsobilém a kalibrovaném vybavení [1], [5].

Cílem validace je stanovení podmínek, při kterých je zkušební postup použitelný, a zajistit při opakovaném použití v jedné nebo v různých laboratořích jeho stejnou spolehlivost [2].

Validaci je třeba provést při vývoji nové metody, při změně již existující metody, při přenosu metody do jiné laboratoře nebo při prokazování rovnocennosti dvou metod. Získané údaje se zaznamenávají do validačního protokolu [2].

2.2.2 Validační protokol

Vypracuje se validační protokol, do kterého se zaznamenávají nejen zjištěné hodnoty validačních parametrů, ale také další údaje. Validační protokol by měl obsahovat základní údaje o analytické metodě, seznam použitých chemikálií, vzorků a standardů a seznam přístrojů. Dále by validační protokol měl obsahovat požadavky na vyhovující rozmezí výsledných hodnot, výsledné hodnoty získané při měření a shrnutí, zda výsledek vyhovuje či nevyhovuje. Do validačního protokolu patří také chromatogramy. V závěru protokolu by mělo být uvedeno, zda je vypracovaná validace vyhovující a zda je metoda vhodná pro zamýšlený účel [1], [2].

2.2.3 Problematika validace

2.2.3.1 ČSN EN ISO/IEC 17025:2005

Podle mezinárodní normy ČSN EN ISO/IEC 17025:2005 je validace potvrzení přezkoušením a poskytnutím objektivního důkazu, že jsou jednotlivé požadavky na specifické zamýšlené použití splněny. Podle této normy se validace musí provést v takové šíři, jak je to třeba ke splnění potřeb týkající se daného použití nebo oblasti

použití a to v případech kdy se jedná o nenormalizované metody, metody navržené nebo vyvinuté laboratoří, normalizované metody používané mimo zamýšlenou oblast použití nebo normalizované rozšířené anebo modifikované metody [6].

2.2.3.2 ICH, USP a FDA

Obecnými požadavky na validaci se zabývá řada zahraničních a mezinárodních regulačních autorit, jako např. ICH, USP a FDA. Tyto regulační autority se pokouší sjednotit a v rámci možností harmonizovat proces validace předkládáním různých dokumentů. Snaží se o sjednocení termínů a jejich definic a o přemostění rozdílů, které existují mezi jednotlivými regulačními autoritami. Následující tabulka (Tab. 1) uvádí příklady některých vybraných dokumentů, které se vztahují k problematice validace metody [1], [5], [7], [8].

Citace	Autorita	Dokument	Publikováno
[7]	ICH	Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2(R1)	2005
[8]	USP 32	<1225> Validation of Compendial Procedures	2009
[9]	FDA	Reviewer Guidance Validation of Chromatographic Methods	1994
[10]	FDA	Guidance for Industry Analytical Procedures and Methods Validation	2000
[11]	FDA	Guidance for Industry Bioanalytical Method Validation	2001

Tab. 1: Vybrané dokumenty a kapitoly vztahující se k problematice validace metody

Po prostudování těchto dokumentů lze dojít k závěru, že problematika validací zatím není zcela jednoznačně dořešena.

Dokument ICH Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology předkládá tabulku Tab. 2. United State Pharmacopoeia (USP 32) předkládá tabulku Tab. 3.

Správnost		Accuracy	
Přesnost	Opakovatelnost	Precision	Repeatability (též Intra-assay Precision)
	Mezilehlá přesnost		Intermediate Precision (též Ruggedness [8])
Selektivita		Specificity	
Detekční limit		Detection Limit	
Kvantitativní limit		Quantitation Limit	
Linearita		Linearity	
Rozsah		Range	

Tab. 2: Přehled typických validačních parametrů dle ICH [7]

Správnost	Accuracy
Přesnost	Precision
Selektivita	Specificity
Detekční limit	Detection Limit
Kvantitativní limit	Quantitation Limit
Linearita	Linearity
Rozsah	Range
Robustnost	Robustness

Tab. 3: Přehled typických validačních parametrů dle USP 32 [8]

Při srovnání výše uvedených tabulek (Tab. 2 a Tab. 3) je patrné, že jsou zde určité rozdíly. Tabulka dle ICH (Tab. 2) neuvádí jako jeden z typických validačních parametrů robustnost. V textu pod touto tabulkou je ale uvedeno, že v tabulce jsou uvedeny nejdůležitější validační parametry a že zařazení robustnosti mezi validační parametry, by mohlo být zvaženo ve vhodném stupni vývoje analytické metody [7]. Naproti tomu tabulka dle USP 32 (Tab. 3) již rovnou uvádí robustnost jako jeden z typických validačních parametrů a v textu pod tabulkou v odstavci Robustnost – definice je uvedeno, že robustnost může být stanovena během vývoje analytické metody [8].

Dále si lze povšimnout, že zatímco tabulka dle USP 32 (Tab. 3) uvádí jako jeden z typických validačních parametrů přesnost (jak se lze dočíst z dalšího textu z odstavce Přesnost – definice, zahrnuje tento pojem tři „úrovně“ přesnosti – opakovatelnost, mezilehlá přesnost a reprodukovatelnost), tabulka dle ICH (Tab. 2) tento parametr ještě dále specifikuje a uvádí jen dvě ze tří „úrovní“ přesnosti, a to opakovatelnost a mezilehlou přesnost. V dalším textu je pak uvedeno, že zařazení reprodukovatelnosti mezi validační parametry by mělo být zvaženo v případě standardizace analytické metody, např. při začleňování metody do lékopisu [7].

2.2.3.3 Postavení testu způsobilosti systému v rámci validace

Otázkou zůstává, zda test způsobilosti systému (test vhodnosti, System Suitability Test, SST) je nebo není součástí validace. Z výše uvedeného vyplývá, že test způsobilosti systému nepatří mezi validační parametry. Přesto je test způsobilosti systému zmiňován v souvislosti s validacemi jak v dokumentu ICH, tak v USP 32.

V dokumentu ICH Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology je uvedeno, že test způsobilosti systému je nedílnou součástí mnoha analytických metod a že další informace je možné dohledat v lékopisech [7]. V USP 32 je v kapitole <621> Chromatografie v části Způsobilost systému uvedeno, že test způsobilosti systému je nedílnou součástí chromatografických metod [8].

Ve Validating chromatographic methods je test způsobilosti systému zařazen mezi parametry testované během validace [12], v Handbook of Pharmaceutical Analysis by HPLC: Volume 6 (Separation Science and Technology) je test způsobilosti systému uveden mezi validačními parametry [5] a v HPLC Method Development for Pharmaceuticals: Volume 8 (Separation Science and Technology) je test způsobilosti zařazen mezi další, doplňkové validační parametry a měl by být vykonán před provedením validace [15].

V ČL 2009 je uvedeno, že test způsobilosti systému představuje nedílnou součást chromatografické metody [13]. V Kontrole léčiv II je test způsobilosti systému popsán jako nedílná součást validace analytické metody [2].

2.2.3.4 SÚKL

Validací se zabývá také Státní ústav pro kontrolu léčiv. Ve Věstníku SÚKLu č. 1 z roku 1994 vyšel na straně 6 článek Kontrolní metody – Validace analytických metod v kontrole léčiv od RNDr. Jitky Šabartové, CSc. zabývající se problematikou validací [32].

Kapitola Validace analytických metod je obsažena také v Pokynech pro správnou výrobní praxi při výrobě léčivých látek VYR-26 verze 2 s platností od 31.07.2010 [14].

2.2.4 Revalidace

Validace není jednorázovým procesem. Validace by měla být vždy po několika letech přezkoumána, případně aktualizována, aby se zajistilo, že postup dané metody zůstává nadále vhodný, správný a přesný pro svůj zamýšlený účel [5].

Revalidace je podle dokumentu ICH Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology nutná v následujících případech: při změnách v syntéze léčivé látky, při změnách složení konečného produktu (léčivého přípravku) a při změnách v analytické metodě, přičemž míra revalidace závisí na povaze provedených změn [7], [8].

Podle USP 32 je revalidace nezbytná při použití již zavedeného postupu pro nový produkt nebo novou surovinu a při předložení revidovaného analytického postupu USP [8].

2.2.5 Test způsobilosti systému (Test vhodnosti)

Test způsobilosti systému představuje nedílnou součást chromatografické metody a slouží k zajištění přiměřené účinnosti chromatografického systému, čímž zajišťuje, že předepsané parametry jsou na požadované úrovni a že metoda poskytuje spolehlivé výsledky. Test je založen na konceptu, že celkové vybavení, elektronika, analytické operace a analyzované vzorky představují integrální systém, který může být hodnocen jako takový [2], [8], [13].

V této práci je test způsobilosti zahrnut mezi procedury prováděné v rámci validace a je chápán nejen jako součást chromatografické metody, ale také jako součást validace dané chromatografické metody.

Test způsobilosti systému představuje určité požadavky, které musí být splněny, aby bylo možné spolehlivě použít daný analytický systém. Při každém dalším použití zmíněné metody pak není třeba opakovat celou validaci, ale stačí splnit požadavky testu způsobilosti, čímž se předpokládá, že dříve provedená validace platí [2], [32].

Pro hodnocení se nejčastěji využívají následující parametry: účinnost, retenční faktor (kapacitní faktor), rozlišení, relativní retence, faktor symetrie a opakovatelnost [8], [9], [13].

Mezi faktory, které mohou ovlivnit chromatografické chování je zahrnuto složení mobilní fáze, její iontová síla, teplota a zdánlivé pH, průtoková rychlost, velikost nástřiku, délka kolony, teplota a tlak, charakteristika stacionární fáze včetně její porozity, velikosti a typu částic, specifického povrchu a u nosičů používaných v chromatografii s obrácenými fázemi i rozsah chemické modifikace vyjádřené jako odstranění silanolové skupiny či obsah vázaného uhlíku apod. a u UV/VIS detektorů vlnová délka [8], [13].

2.2.5.1 Úprava chromatografických podmínek

Pokud jeden nebo více parametrů neodpovídá daným požadavkům, je možné upravit chromatografické podmínky, a to v rozsahu, aby byla splněna kritéria způsobilosti chromatografického systému a aniž by přitom došlo k podstatnému pozměnění metody [2], [13].

Zejména u metod kapalinové chromatografie s obrácenými fázemi se ale úpravou různých parametrů nemusí vždy dosáhnout uspokojivého výsledku (dělení složek analytu apod.). U kritických parametrů je jejich úprava jasně stanovena v lékopisném článku, aby byla zajištěna způsobilost systému. Je vhodné vyhnout se několikanásobnému upravování, protože to může mít vliv na účinnost chromatografického systému [13].

V ČL 2009 je v kapitole Chromatografické separační metody nedefinován obecný rozsah úprav jednotlivých parametrů pro kapalinovou chromatografii, který je platný, pokud není v příslušném článku uvedeno jinak. Možná úprava

chromatografických podmínek pro kapalinovou chromatografii je uvedena v tabulce Tab. 4.

Faktor	Úprava čeho, jak	Poznámka
Složení MF	množství minoritní složky rozpuštědla lze upravit v rozmezí ± 30 relativních procent nebo ± 2 absolutní procenta	podle toho, která hodnota je větší
	žádnou další složku nelze měnit o více než 10 absolutních procent	
pH vodné složky MF	bud' $\pm 0,2$ hodnoty pH	
	nebo $\pm 1,0$ hodnoty pH	neutrální látka
Koncentrace solí v pufru MF	± 10 procent	
SF	délka kolony ± 70 procent	
	vnitřní průměr kolony ± 25 procent	
	velikost částic lze zmenšit nejvýše o 50 procent	zvětšení nedovoleno
Průtoková rychlost (F)	± 50 procent	je-li uveden t_R , musí se upravit F, pokud se změní dálka či vnitřní průměr kolony
		užívá-li se N v kvalifikační části, nesmí se snížit F
Nástřik	lze změnit, pokud detekce píků a opakovatelnost je vyhovující	
Teplota	± 10 procent	nejvýše 60 °C
Detektor UV/VIS	nelze upravovat vlnovou délku	

F	průtoková rychlost
t_R	retenční čas hlavního píku
N	zdánlivý počet teoretických pater

Tab. 4: Možná úprava chromatografických podmínek pro kapalinovou chromatografii [13]

2.2.5.2 Parametry pro hodnocení SST

2.2.5.2.1 Účinnost kolony a zdánlivý počet teoretických pater

Účinnost je především parametr kolony [15], který je závislý hlavně na kinetických faktorech chromatografického systému, jako jsou rychlost průtoku mobilní fáze, molekulární difúze, vlastnosti kolony a její náplně atd. [1].

Hlavním faktorem, který charakterizuje účinnost kolony je geometrie, homogenita a hustota náplně kolony [15]. Čím jsou částice menší a náplň kolony homogennější, tím je účinnost kolony vyšší [1]. Je to způsobeno tím, že se zmenší rozdíl mezi průměrnou velikostí pórů částic a mezi prostory mezi částicemi, což vede k rovnoměrnějšímu proudění uvnitř a kolem částic [15].

Účinnost kolony lze vypočítat jako zdánlivý počet teoretických pater (N) [13], což je kvantitativní vyjádření účinnosti [5], a lze vypočítat ze vzorce:

$$N = 5,54 \times \left(\frac{t_R}{w_h} \right)^2, \quad [13]$$

kde t_R je retenční čas a w_h šířka píku v polovině jeho výšky [13].

Důležitým parametrem pro výpočet účinnosti kolony je výška patra (H), nebo-li výškový ekvivalent teoretického patra (HETP), který je určen rozměrem částic a v menší míře rychlostí průtoku mobilní fáze a teplotou [5] a který je vyjádřen vzorcem:

$$H(\text{HETP}) = \frac{L}{N}, \quad [5]$$

kde L je délka kolony a N je počet teoretických pater. Výška teoretického patra je zhruba 2,5krát rozměr částice [5].

2.2.5.2.2 Faktor symetrie

Faktor symetrie píku (A_s) nebo-li faktor chvostování píku je definován jako míra symetrie píku [8], [13] a lze určit ze vzorce:

$$A_s = \frac{w_{0,05}}{2 \times d}, \quad [13]$$

kde $w_{0,05}$ značí šířku píku v jedné dvacetině jeho výšky a d vzdálenost mezi kolmicí spuštěnou z vrcholu píku a vzestupnou částí píku v jedné dvacetině jeho výšky [13].

ČL 2009 požaduje, aby faktor symetrie píků byl v rozmezí 0,8 až 1,5. Hodnota faktoru symetrie 1,0 značí úplnou, ideální symetrii píku [13]. Pokud faktor symetrie nabývá hodnot větších než 1,0, jedná se o tzv. tailing, pokud nabývá hodnot menších než 1,0, jedná se o tzv. fronting [5].

Fronting píku může být způsoben velkým mrtvým objemem systému, příliš vysokým objemem nástřiku nebo vysokou koncentrací vzorku. Dále může být způsoben přetíženou, kontaminovanou nebo degradovanou kolonou, předkolonou nebo kontaminovaným filtrem mobilní fáze, nekompatibilitou analytu s mobilní fází, chemickou reakcí nebo izomerizací v průběhu chromatografického procesu apod. [5], [16].

Tailing píku může vzniknout jako důsledek adsorpce nebo jiných silných interakcí analytu se stacionární fází, dále k němu může docházet vlivem velkého mrtvého objemu systému, vlivem netěsnosti v nástřikovém zařízení, vlivem příliš vysokého objemu nástřiku nebo vysokou koncentrací vzorku, vlivem kontaminované nebo degradované kolony, předkolony nebo kontaminovaného filtru mobilní fáze apod. [5], [16].

2.2.5.2.3 Retenční faktor (kapacitní faktor, hmotnostní distribuční poměr)

Retenční faktor (k) je mírou zadržení analytu v koloně vzhledem k nezadržené komponentě [5], [16]. Jedná se o bezrozměrný parametr nezávislý na rychlosti průtoku mobilní fáze ani na rozměrech kolony [1].

Retenční faktor lze určit z chromatogramu za použití následujícího vzorce [13]:

$$k = \frac{V_R - V_0}{V_0} = \frac{t_R - t_0}{t_0}, \quad [1], [13]$$

kde V_R je retenční objem, V_0 mrtvý objem, t_R retenční čas a t_0 mrtvý retenční čas [1].

Pokud je retenční faktor roven nule znamená to, že komponenta není zadržována. Jestliže nabývá hodnot větších než nula, komponenta je kolonou zadržována [5]. Z toho vyplývá, že čím je hodnota retenčního faktoru vyšší, tím více je analyt v koloně zadržován a je eluován později [16].

2.2.5.2.4 Relativní retence

Relativní retenci (r) lze vypočítat podle vzorce:

$$r = \frac{t_{R2} - t_0}{t_{R1} - t_0}, \quad [13]$$

kde t_{R2} značí retenční čas sledovaného píku, t_{R1} retenční čas referenčního píku a t_0 mrtvý retenční čas [13].

2.2.5.2.5 Rozlišení

Rozlišení (R_s) je míra separace dvou sousedních píků [5] a je vyjádřeno vzorcem:

$$R_s = \frac{1,18 \times (t_{R2} - t_{R1})}{w_{h1} + w_{h2}}, \quad [13]$$

kde $t_{R2} > t_{R1}$, v němž t_R jsou retenční časy nebo vzdálenosti podél základní linie od bodu nástřiku ke kolmicím spuštěným z vrcholů dvou sousedních píků a w_h značí šířky píků v poloviční výšce. Pokud píky nejsou rozděleny na základní linii, nemusí být tento vzorec použitelný [13].

Většina HPLC analýz usiluje o rozdělení u všech klíčových komponent na základní linii. Rozdělení píků na základní linii odpovídá rozlišení větší než 1,5. Rozlišení větší než 2,0 ale umožňuje přesnější kvantitativní stanovení [5], [13].

2.2.5.2.6 Opakovatelnost

Opakovatelnost je vlastností metody, která vyjadřuje těsnost souhlasu mezi výsledky nezávislých měření [17] roztoku standardu a zajišťuje, že požadavky na

přesnost jsou splněny [8]. Vyjadřuje se jako relativní směrodatná odchylka (s_R) v procentech pro řadu tří až šesti následných měření roztoku standardu [13].

2.2.6 Validační parametry

2.2.6.1 Správnost

2.2.6.1.1 Definice

Správnost analytické metody vyjadřuje těsnost shody mezi získanou hodnotou a přijatou dohodnutou pravdivou hodnotou nebo referenční hodnotou, tedy mezi naměřeným výsledkem a správnou hodnotou [2], [7]. Lze říci, že se jedná o odchylku výsledku od správné hodnoty [32].

Správnost se vyjadřuje buď jako rozdíl mezi získanou a správnou hodnotou [7], nebo jako výtěžnost (recovery) [2] podle následujícího vzorce:

$$\text{recovery} = \frac{100 \times \text{získaná_hodnota}}{\text{správná_hodnota}} \quad [2]$$

2.2.6.1.2 Provedení

Pokud je analyzována léčivá látka, může být správnost stanovena aplikací analytické metody na analyt o známé čistotě, nebo srovnáním výsledků vyvinuté metody s výsledky jiné nezávislé metody, jejíž správnost je ověřená a definovaná, a nebo může být odvozena z přesnosti, linearitu a selektivity [1], [7].

V případě, že je předmětem analýzy léčivý přípravek, může být správnost stanovena aplikací analytické metody na uměle připravenou směs všech složek léčivého přípravku, ke které se přidá známé množství léčivé látky, která má být analyzována. Jestliže není možné získat všechny složky léčivého přípravku, může se přidat známé množství analytu k léčivému přípravku, nebo je možné srovnat výsledky vyvinuté metody s výsledky jiné nezávislé metody, jejíž správnost je ověřená a definovaná. Také v tomto případě může být správnost odvozena z přesnosti, linearitu a selektivity [2], [7], [8].

Podle dokumentu ICH Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology by správnost měla být vyhodnocena nejméně z devíti stanovení alespoň tři

koncentračních úrovní pokrývajících stanovený rozsah koncentrací, např. tři nástříky každé ze tří zvolených koncentračních úrovní [7]. V Kontrole léčiv II je uvedeno, že správnost se obvykle zjistí analýzou nejméně šesti vzorků [2].

2.2.6.2 Přesnost

2.2.6.2.1 Definice

Přesnost analytické metody je těsnost shody (míra rozptylu) mezi jednotlivými výsledky získanými z opakovaného nástříku stejného homogenního vzorku za předepsaných podmínek [2], [7], [32].

Přesnost se vyjadřuje jako relativní směrodatná odchylka, nebo jako variační koeficient opakovaných měření [2], [7], [8].

Podle podmínek opakování se rozlišují tři „úrovně“ přesnosti: opakovatelnost, mezilehlá přesnost a reprodukovatelnost [2].

2.2.6.2.1.1 Opakovatelnost

Opakovatelnost je vyjádřením přesnosti za stejných provozních podmínek a v krátkém časovém intervalu [7]. Metoda se opakuje jedním pracovníkem, stejným způsobem, se stejnými činidly a na stejném přístroji [2].

Opakovatelnost lze rozdělit na opakovatelnost nástříku a na opakovatelnost analýzy. Opakovatelnost nástříku je založena na vícenásobném nástříku jednoho připraveného vzorku v jednom dni. Opakovatelnost analýzy je založena na vícenásobném nástříku více připravených vzorků v jednom dni [1].

2.2.6.2.1.2 Mezilehlá přesnost

Mezilehlá přesnost se provádí v jedné laboratoři, se stejným homogenním vzorkem, ale v různé dny, s různými činidly, s různými přístroji a různými pracovníky [2], [7]. Testování mezilehlé přesnosti může ukázat jaké problémy mohou nastat při přenosu metody [1].

2.2.6.2.1.3 Reprodukovatelnost

Reprodukovatelnost je vyjádřením přesnosti [7]. Probíhá v různých laboratořích za stejných podmínek jako u mezilehlé přesnosti [2].

2.2.6.2.2 Provedení

Přesnost analytické metody by měla být stanovena analýzou dostatečného množství homogenních vzorků (minimálně šesti) tak, aby bylo možné spočítat statisticky platnou relativní směrodatnou odchylku [8], [32]. Analýza by měla být nezávislá a měla by být provedena kompletním postupem včetně přípravy vzorku [2], [8], z čehož vyplývá, že přesnost by měla být provedena až po kompletním dokončení analytické metody [1].

2.2.6.3 Selektivita

2.2.6.3.1 Definice

Selektivita analytické metody je schopnost jednoznačně stanovit danou látku v přítomnosti jiných složek, jejichž přítomnost lze očekávat. Jedná se zejména o další účinné látky u složených přípravků, pomocné látky, nečistoty z výroby, rozkladné produkty, zbytková rozpouštědla, těžké kovy a další [2], [7].

2.2.6.3.2 Provedení

Provedení závisí na zamýšleném cíli analytické metody [1], [7].

Podle Věstníku SÚKLu č.1 z roku 1994 se selektivita vyjadřuje jako rozdíl mezi výsledky analýzy vzorku bez nečistot a vzorku s přidávanými nečistotami, rozkladnými produkty nebo různými pomocnými látkami. Selektivitu je možné prokázat také jako výtěžnost standardního přídávku čisté látky k materiálu, který obsahuje stálé množství jiných látek. Další možností vyjádření selektivity je srovnání analýzy vzorku obsahujícího nečistoty s výsledky jiných zkoušek na čistotu. Jako potvrzení získaných výsledků je potřeba přiložit získané chromatogramy [32].

Podle USP 32 by se v případě kvalitativní analýzy (identifikace) měla schopnost selektivity demonstrovat na směsi látek podobné (příbuzné) struktury. Selektivita by měla být potvrzena získáním kladných výsledků ze vzorků obsahujících analyt společně se získáním záporných výsledků ze vzorků, které analyt neobsahují. V případě kvantitativní analýzy (stanovení obsahu) se selektivita dokazuje tím, že metoda není ovlivněna nebo rušena přítomností nečistot, pomocných látek nebo jiných látek [8].

V případě, že je analytická metoda určena pro zjištění stability, mělo by být doloženo oddělení rozkladných produktů [32].

2.2.6.4 Detekční limit (LOD)

2.2.6.4.1 Definice

Detekční limit vyjadřuje citlivost metody. Jedná se o nejnižší množství analyzované látky ve vzorku, které je za daných experimentálních podmínek detekovatelné, ale ne nutně kvantitativně stanovované [2], [7], [8]. Obvykle se vyjadřuje jako koncentrace analyzované látky ve vzorku. Jedná se o limitní test, který určí, zda množství analyzované látky je nad či pod určitou hodnotou [8].

Detekční limit je důležitým parametrem u metod pro stanovení nečistot [32].

2.2.6.4.2 Provedení

U neinstrumentálních metod se detekční limit obecně určuje analýzou vzorků se známými koncentracemi analyzované látky a experimentálním stanovením minimální hranice, při které je analyzovaná látka ještě spolehlivě detekována [2], [7], [8].

U instrumentálních metod může být pro určení detekčního limitu použit stejný postup jako při neinstrumentálních metodách, nebo může být detekční limit určen jako koncentrace analyzované látky s poměrem signálu k šumu s hodnotou tři [2], [8].

Detekční limit lze určit také ze směrodatné odchylky odezvy a směrnice kalibrační křivky, a to podle následujícího vzorce:

$$LOD = \frac{3,3 \times \sigma}{S}, \quad [7]$$

kde σ je směrodatná odchylka odezvy a S je směrnici kalibrační křivky [7].

Nalezený detekční limit by měl být ověřen analýzou dostatečného množství vzorků s koncentrací blízkou nebo shodnou s detekčním limitem [2], [8].

2.2.6.4.2.1 Poměr signálu k šumu

Poměr signálu k šumu (S/N), který ovlivňuje přesnost stanovení obsahu složek, lze vypočítat podle následujícího vzorce:

$$S / N = \frac{2 \times H}{h}, \quad [13]$$

kde H je výška píku měřená od vrcholu píku k extrapolované základní linii signálu, který se sleduje na vzdálenosti rovné dvacetinásobku šířky píku v polovině jeho

výšky a h je rozpětí šumu pozadí na chromatogramu získaného při slepé zkoušce a zaznamenávaného na dvacetinásobku šířky píku v polovině jeho výšky na chromatogramu předepsaného porovnávacího roztoku [13].

2.2.6.5 Kvantitativní limit (LOQ)

2.2.6.5.1 Definice

Kvantitativní limit vyjadřuje citlivost metody. Jedná se o nejnižší množství analyzované látky ve vzorku, které může být kvantitativně stanoveno s přijatelnou přesností a správností za daných experimentálních podmínek. Obvykle se vyjadřuje jako koncentrace analyzované látky ve vzorku [2], [7], [8].

Kvantitativní limit je důležitým parametrem u metod pro stanovení nečistot [32].

2.2.6.5.2 Provedení

U neinstrumentálních metod se kvantitativní limit obecně určuje analýzou vzorků se známými koncentracemi analyzované látky a experimentálním stanovením minimální hranice, při které může být analyzovaná látka ještě stanovena s přijatelnou přesností a správností [8].

U instrumentálních metod může být pro určení kvantitativního limitu použit stejný postup jako při neinstrumentálních metodách, nebo může být kvantitativní limit určen jako koncentrace analyzované látky s poměrem signálu k šumu s hodnotou deset [2], [8].

Kvantitativní limit lze určit také ze směrodatné odchylky odezvy a směrnice kalibrační křivky, a to podle následujícího vzorce:

$$LOQ = \frac{10 \times \sigma}{S}, \quad [7]$$

kde σ je směrodatná odchylka odezvy a S je směrnici kalibrační křivky [7].

Nalezený kvantitativní limit by měl být ověřen analýzou dostatečného množství vzorků s koncentrací blízkou nebo shodnou s kvantitativním limitem [8].

2.2.6.6 Linearita

2.2.6.6.1 Definice

Linearita je schopnost v daném rozsahu dosáhnout výsledků, které jsou přímo úměrné koncentraci analyzované látky ve vzorku [7].

2.2.6.6.2 Provedení

Linearita se obvykle stanovuje z minimálně pěti různých koncentrací v rozmezí 50–150 % deklarovaného obsahu analyzované látky ve vzorku [2], [7]. Vzhledem k tomu, že rušivé vlivy u reálných vzorků jsou hodnoceny jinými parametry validace, je možné použít pro stanovení linearit roztoky standardů [2].

Získané výsledky by měly být zpracovány vhodnými statistickými metodami, např. metodou lineární regrese. Uvést by se měly hodnoty koeficientu korelace, směrnice přímky, absolutního členu (průsečíku s osou y) nebo reziduální odchylky [8]. Je vhodné přiložit i grafické znázornění [5].

2.2.6.7 Rozsah

2.2.6.7.1 Definice

Rozsahem se rozumí koncentrační interval, ve kterém se může daná analytická metoda používat, protože bylo dokázáno, že má vhodnou přesnost, správnost a linearitu. Koncentrační interval zahrnuje hodnoty koncentrací mezi nejnižší a nejvyšší koncentrací analyzované látky ve vzorku včetně těchto krajních hodnot koncentrací [2], [7].

2.2.6.7.2 Provedení

Rozsah se obvykle odvozuje z linearit a závisí na zamýšleném použití dané metody [2], [7]. Následující tabulka Tab. 5 udává doporučené rozmezí rozsahu, které by se mělo testovat pro danou metodu.

Typ metody	Rozsah
Stanovení obsahu	80–120 %
Obsahová stejnoměrnost	70–130 %
Testování nečistot	50–120 %
Testování rozpustnosti	± 20 % ke koncentrační oblasti

Tab. 5: Hodnoty rozsahu, které je doporučeno testovat při dané metodě [7], [8]

2.2.6.8 Robustnost

2.2.6.8.1 Definice

Robustnost je definována jako míra schopnosti analytické metody zůstat neovlivněna malými, ale úmyslnými změnami jejích parametrů [7], [12]. Robustnost se může stanovit již během vývoje analytické metody a jejím cílem je ukázat spolehlivost analýzy s ohledem na změny parametrů metody a upozornit na podmínky, které mohou ovlivnit výsledky analýzy [2], [7], [8].

2.2.6.8.2 Provedení

Provedení robustnosti závisí na typu analytické metody. U kapalinové chromatografie se sledují například vlivy změny složení mobilní fáze, změny pH mobilní fáze, změna kolony (různé šarže, různí výrobci), změna teploty na koloně, rychlost průtoku mobilní fáze, stabilita analyzovaných vzorků apod. [2], [7].

2.2.6.8.2.1 Stabilita

Provedením stability se dokazuje, že roztok standardu, a nebo vzorku připravený podle podmínek stanovených v příslušné metodě je stabilní alespoň v určitém časovém intervalu. Obvykle se stabilita hodnotí po 24, 48 a 72 hodinách, a to za různých podmínek uchovávání: za snížené teploty (5 °C), chráněné před světlem a za laboratorní teploty, za přístupu světla [1].

2.2.7 Požadavky na hodnoty jednotlivých parametrů

V případech, kdy je v platném lékopise uvedeno, že musí být splněny určité požadavky na výsledné hodnoty daných parametrů, vychází se z těchto požadavků [13].

U řady parametrů nejsou uvedeny konkrétní požadavky na jejich výsledné hodnoty. Záleží totiž na použité metodě, jejím cíli a analyzovaném vzorku, a nelze proto obecně požadovat konkrétní hodnoty jednotlivých parametrů. V konkrétních případech musí přijatelnost získaných hodnot posoudit příslušný analytik [32].

2.2.8 Parametry požadované pro validaci metody

Jak vyplývá z tabulek Tab. 6 a Tab. 7, ne vždy je v rámci validace požadováno provedení všech validačních parametrů. Záleží na účelu použití dané analytické metody. Požadavky na provedení validačních parametrů se liší pro metody identifikace, stanovení obsahu, stanovení nečistot nebo pro stanovení zkoušky lékové formy (rozpuštění atd.) [32].

Validační parametr	Identifikace	Testování nečistot		Obsah
		Kvantitativní	Limitní	
Správnost	-	+	-	+
Přesnost – opakovatelnost	-	+	-	+
Přesnost – mezilehlá přesnost	-	+ ^o	-	+ ^o
Selektivita	+	+	+	+
Detekční limit	-	-*	+	-
Kvantitativní limit	-	+	-	-
Linearita	-	+	-	+
Rozsah	-	+	-	+

+ provádí se

- neprovádí se

^o neprovádí se, je-li provedena reprodukovatelnost

* v některých případech se může provádět

Tab. 6: Přehled testovaných validačních parametrů podle účelu použití dle ICH [7]

Validační parametr	Kategorie I	Kategorie II		Kategorie III	Kategorie IV
		Kvantitativní	Limitní		
Správnost	Yes	Yes	-*	-*	No
Přesnost	Yes	Yes	No	Yes	No
Selektivita	Yes	Yes	Yes	-*	Yes
LOD	No	No	Yes	-*	No
LOQ	No	Yes	No	-*	No
Linearita	Yes	Yes	No	-*	No
Rozsah	Yes	Yes	-*	-*	No

Kategorie I – obsah

Kategorie II – stanovení nečistot – kvantitativní a limitní

Kategorie III – stanovení význačné vlastnosti – rozpouštění, uvolňování léčivé látky atd.

Kategorie IV – identifikace

Yes provádí se

No neprovádí se

* v některých případech se může provádět

Tab. 7: Přehled testovaných validačních parametrů podle účelu použití dle USP 32 [8]

2.3 Ketoprofen

2.3.1 Chemické a fyzikálně-chemické vlastnosti

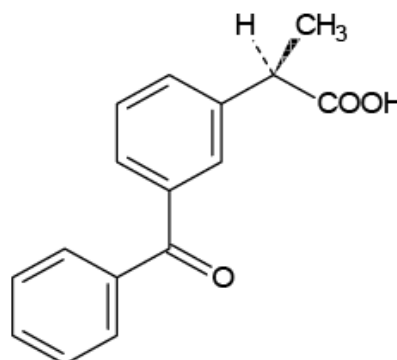
Ketoprofenum

$C_{16}H_{14}O_3$

M_r 254,28

Absorpční maximum při 255 nm

Teplota tání 94 °C až 97 °C



Obr. 1: Chemická struktura ketoprofenu

Ketoprofen (Obr. 1) je kyselina (2RS)-2-(3-benzoylphenyl)propanová. Jedná se o bílý nebo téměř bílý krystalický prášek, který je prakticky nerozpustný ve vodě, snadno rozpustný v acetonu, v ethanolu 96% a v dichlormethanu [13].

2.3.2 Farmakologické vlastnosti

Ketoprofen, arylpropionátové nesteroidní antiflogistikum, má protizánětlivý, analgetický a antipyretický účinek. Lze ho použít jak lokálně ve formě roztoku, gelu, krému a náplastí, tak i systémově formou tablet, tobolek, čípků, injekčně nebo infúzí. Indikován je při bolestivých a zánětlivých stavech zejména při revmatických onemocněních, artróze nebo po úrazech [18].

Vlivem nízké rozpustnosti v tucích se po aplikaci na intaktní kůži málo vstřebává (5 %). Vzácně může vyvolat fototoxicitu nebo fotosensitivitu, a proto se doporučuje během terapie a čtrnáct dní po jejím ukončení nevystavovat ošetřovaná místa slunečnímu záření a jiným zdrojům UV záření [18].

Při systémové aplikaci může vyvolat gastrointestinální potíže jako nauzeu, zvracení, bolesti břicha až ulcerace s rizikem krvácení nebo perforace. Pro omezení těchto nežádoucích účinků na gastrointestinální trakt se doporučuje jeho užívání s jídlem nebo krátce po jídle [18].

2.4 Parabeny

Parabeny, estery kyseliny 4-hydroxybenzoové, jsou protimikrobní konzervační látky se širokým spektrem účinku, které zabraňují množení a růstu mikroorganismů [19]. Jako konzervační látky se používají od 30. let 20. století [20].

Parabeny mají mírný anestetický účinek a u citlivých jedinců mohou vyvolávat alergické reakce [20]. Vzniklá alergie je zkřížená na deriváty kyseliny 4-hydroxybenzoové [21]. Účinek parabenů roste s rostoucí délkou alkylového řetězce. Velmi často se používá kombinace methylparabenu a propylparabenu v různých poměrech [19].

2.4.1 Methylparaben

2.4.1.1 Chemické a fyzikálně-chemické vlastnosti

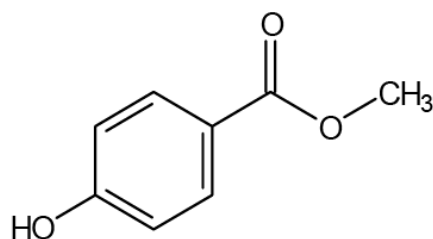
Methylparabenum

Methylis parahydroxybenzoas

$C_8H_8O_3$

M_r 152,15

Teplota tání 125 °C až 128 °C



Obr. 2: Chemická struktura methylparabenu

Methylparaben (Obr. 2) je methyl-4-hydroxybenzoát. Jedná se o bílý nebo téměř bílý krystalický prášek nebo bezbarvé krystaly [13], které jsou téměř bez zápachu, slabě palčivé chuti [21].

Methylparaben je velmi těžce rozpustný ve vodě, snadno rozpustný v ethanolu 96%, v methanolu [13] a propylenglykolu, dobře rozpustný v etheru, mírně rozpustný v glycerolu 85% a prakticky nerozpustný v tekutém parafínu [21].

Optimální pH pro antimikrobiální účinnost je 4–7. Při pH vyšším než 8 dochází k hydrolyze [21].

2.4.2 Ethylparaben

2.4.2.1 Chemické a fyzikálně-chemické vlastnosti

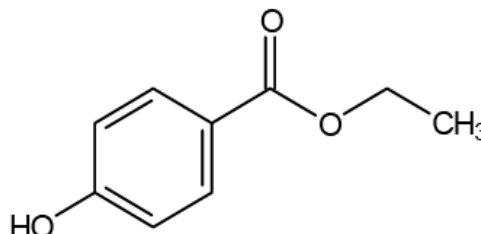
Ethylparabenum

Ethylis parahydroxybenzoas

$C_9H_{10}O_3$

M_r 166,18

Teplota tání 115 °C až 118 °C



Obr. 3: Chemická struktura ethylparabenu

Ethylparaben (Obr. 3) je ethyl-4-hydroxybenzoát. Jedná se o bílý nebo téměř bílý krystalický prášek nebo bezbarvé krystaly, které jsou velmi těžce rozpustné ve vodě, snadno rozpustné v ethanolu 96% a v methanolu [13].

2.4.3 Propylparaben

2.4.3.1 Chemické a fyzikálně-chemické vlastnosti

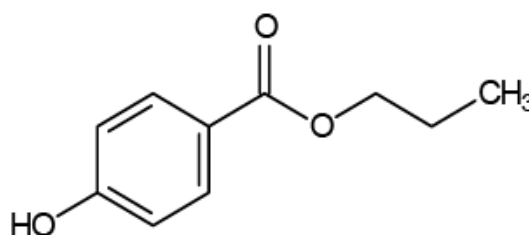
Propylparabenum

Propylis parahydroxybenzoas

$C_{10}H_{12}O_3$

M_r 180,20

Teplota tání 96 °C až 99 °C



Obr. 4: Chemická struktura propylparabenu

Propylparaben (Obr. 4) je propyl-4-hydroxybenzoát. Jedná se o bílý nebo téměř bílý krystalický prášek [13], který je téměř bez zápachu, nahořklé chuti [21].

Propylparaben je velmi těžce rozpustný ve vodě a glycerolu 85%, snadno rozpustný v ethanolu 96%, methanolu, etheru a propylenglykolu, velmi těžce rozpustný v tekutém parafinu [13], [21].

Optimální pH pro antimikrobiální účinnost je 4–7. Při pH vyšším než 8 dochází k hydrolyze [21].

2.5 Metody hodnocení ketoprofenu

2.5.1 Lékopisné metody

	ČL 2009 [13]	British Pharmacopoeia 2004 [22]	USP 32 [8]
citace			
hodnoceno	1-(3-benzoylfenyl)ethan-1-on, kyselina 3-[(1RS)-1-karboxyethyl]benzoová, ketoprofen	1-(3-benzoylfenyl)ethan-1-on, kyselina 3-[(1RS)-1-karboxyethyl]benzoová, ketoprofen	kyselina 3-benzoylbenzoová, ketoprofen
rozměry kolony	150 mm x 4,6 mm	150 mm x 4,6 mm	150 mm x 4,6 mm
stacionární fáze	C18; 5 μm	C18; 5 μm	C18; 3 μm
mobilitní fáze	fosforečnanový pufr 3,5: ACN : voda 2:43:55	fosforečnanový pufr 3,5: ACN : voda 2:43:55	fosforečnanový pufr 3,5: ACN : voda 2:43:55
F (ml/min)	1,0	1,0	1,0
nástřik (μl)	20	20	20
detekce λ (nm)	233	233	233
vnitřní standard	ne	ne	ne

Tab. 8: Lékopisné metody hodnocení ketoprofenu (výsledky rešerše)

2.6 Hodnoty parametrů zjištěné při validaci

V následujících tabulkách Tab. 9 až Tab. 11 jsou uvedeny výsledky rešerše ze článků, kde byla HPLC použita ke stanovení ketoprofenu, případně dalších látek, z různých materiálů. Rešerše je zaměřena především na hodnoty parametrů zjišťovaných v rámci validace.

V případech, kdy bylo během metody analyzováno více látek, jsou v tabulkách Tab. 9 až Tab. 11 uvedené hodnoty získané pro ketoprofen.

Citace	[23], [24]	[25]
Hodnoceno	ketoprofen, 3-acetylbenzofenon, kyselina 2-(3-karboxyfenyl)propionová, methylparaben, propylparaben	ketoprofen
Materiál	gel	gel
Detekce λ (nm)	233	233
Účinnost kolony	5113	11600
Faktor symetrie	1,21	1,10
Opakovatelnost	0,22 %	0,1–0,4 %
Přesnost	1,20 %	0,3–0,6 %
Variační koeficient	-	-
Správnost	0,40 %	0,2–0,4 %
Výtěžnost	101,3 %	100,1–100,5 %
Linearita	R = 0,9989	R = 1,0000
Rozsah	20–150 %	4×10^{-5} – 1×10^{-1} mg/ml
LOD (mg/l)	ABF: 0,014 kyselina: 0,040	-
LOQ (mg/l)	ABF: 0,046 kyselina: 0,135	-
Selektivita	ANO	ANO
Robustnost	ANO	-

Tab. 9: Hodnoty parametrů zjištěné při validaci (pro ketoprofen)

Citace	[26]	[27]
Hodnoceno	ketoprofen	kofein, indoprofen, ketoprofen , naproxen, fenbufen, ibuprofen
Materiál	roztok po penetraci skrz kůži u krysy	krevní plazma, tablety, tobolky
Detekce λ (nm)	260	254
Účinnost kolony	-	-
Faktor symetrie	0,85	-
Opakovatelnost	-	-
Přesnost	$\leq 3,52 \%$	$< 1,00 \%$
Variační koeficient	-	-
Správnost	ANO	-
Výtěžnost	-	98,2 %
Linearita	$R \geq 0,998$	$R > 0,999$
Rozsah	0,02–40 mg/l	5–35 mg/l
LOD (mg/l)	0,003	0,9
LOQ (mg/l)	0,02	3,1
Selektivita	ANO	ANO
Robustnost	ANO	-

Tab. 10: Hodnoty parametrů zjištěné při validaci (pro ketoprofen)

Citace	[28]	[29]
Hodnoceno	naproxen, ketoprofen , fenol	antipyrim, metoprolol, ketoprofen , furosemid, fenol
Materiál	roztok po penetraci skrz stěvní stěnu u krysy	roztok po penetraci skrz stěvní stěnu u krysy
Detekce λ (nm)	270	210–600 pro KP: 258,0
Účinnost kolony	3912	ANO
Faktor symetrie	1,14	1,55 \pm 0,24
Opakovatelnost	-	0,13 %
Přesnost	-	< 0,78 % pro KP: 0,26 %
Variační koeficient	\leq 5,3 %	-
Správnost	-	-
Výtěžnost	95,36–101,6 %	103,14 %
Linearita	R > 0,999 pro KP R = 0,9998	R = 0,9976 R ² = 0,9954
Rozsah	12,5–200 mg/l	5–150 %
LOD	0,05 ng/ml	-
LOQ	0,25 ng/ml	-
Selektivita	ANO	ANO
Robustnost	-	ANO

Tab. 11: Hodnoty parametrů zjištěné při validaci (pro ketoprofen)

V následující tabulce Tab. 12 jsou uvedeny výsledky rešerše ze článků, kde byly použity jiné metody ke stanovení ketoprofenu, případně dalších látek, z různých materiálů. Rešerše je zaměřena především na hodnoty parametrů zjišťovaných v rámci validace.

V případech, kdy bylo během metody analyzováno více látek, jsou v tabulce Tab. 12 uvedené hodnoty získané pro ketoprofen.

Cítace	[30]	[31]
Metoda	FIA	MEKC
Hodnoceno	ketoprofen	ketoprofen , methylparaben, propylparaben
Materiál	tablety	gel
Detekce λ (nm)	260	200
Účinnost kolony	-	8772
Faktor symetrie	-	0,62
Opakovatelnost	-	0,77 %
Přesnost	2,02 %	-
Variační koeficient	-	-
Správnost	-	-
Výtěžnost	102,75 %	96,56 %
Linearita	R = 0,9997	R = 0,9969
Rozsah	$1,6 \times 10^{-6}$ – $1,7 \times 10^{-4}$ M	100–2000 mg/l
LOD	$1,7 \times 10^{-6}$ M	0,82 mg/l
LOQ	$5,3 \times 10^{-6}$ M	1,78 mg/l
Selektivita	-	ANO
Robustnost	-	-

Tab. 12: Hodnoty parametrů zjištěné při validaci (pro ketoprofen)

2.7 Zhodnocení rešerše

Údaje získané při zpracování rešerše ukazují, že vysokoúčinná kapalinová chromatografie s obrácenými fázemi je velmi často používanou metodou pro analýzu ketoprofenu v různých lékových formách.

Pro hodnocení ketoprofenu lékopisnými metodami se jako stacionární fáze využívá chemicky vázaných uhlovodíkových řetězců obsahujících osmnáct uhlíkových atomů a jako mobilní fáze je využita směs acetonitrilu, vody a fosforečnanového pufru o pH 3,5.

Častým způsobem detekce je detekce pomocí UV záření. Využívají se různé vlnové délky. Absorpční maximum ketoprofenu 255 nm je jako detekční vlnová délka využíváno jen minimálně.

Z validačních parametrů je velmi často hodnocena správnost, přesnost, linearita a selektivita. Někdy, v závislosti na typu analytické metody, je hodnocen také detekční a kvantitativní limit. Výsledky testu způsobilosti chromatografického systému nejsou vždy uvedeny.

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Přístrojové vybavení

Kapalinový chromatograf

Čerpadlo	Waters 1525
Autosampler	Waters 717 plus
UV detektor	Waters 2487
Kolona	SUPELCO Discovery C18 rozměry kolony 125 mm x 4,6 mm velikost částic 5 µm
Kolona	SUPELCO Discovery C18 rozměry kolony 150 mm x 4,6 mm velikost částic 5 µm
Vyhodnocení	chromatografická stanice Breeze, verze 3,30
Ultrazvuková lázeň	Bandelin SONOREX, Berlín, Německo
Centrifuga	EBA 21, Hettich Zentrifugen, Německo
Laboratorní pH metr	HANNA Instruments, USA
Analytické váhy	Sartorius GENIUS, Německo
Filtrace	filtrační zařízení na mobilní fáze Millipore, USA (filtr ze skleněných vláken) membránový filtr o velikosti pórů 0,45 µm

3.2 Chemikálie a vzorky

3.2.1 Chemikálie

Ketoprofen	Sigma-Aldrich s. r. o., Německo
Methylparaben	Sigma-Aldrich s. r. o., Německo
Ethylparaben	Sigma-Aldrich s. r. o., Německo
Propylparaben	Sigma-Aldrich s. r. o., Německo
Acetonitril CHROMASOLV	Sigma-Aldrich s. r. o., Německo
Methanol CHROMASOLV	Sigma-Aldrich s. r. o., Německo
Kyselina fosforečná 85% p. a.	Merck, Německo
Dihydrogenfosforečnan draselný p. a., 99,5%	Merck, Německo
Ultračistá voda, čištěná systémem Milli-Q (Millipore, Bedford, MA, USA)	
před použitím filtrováno pomocí filtračního zařízení na mobilní fáze, Millipore	

3.2.2 Vzorky

PRONTOFLEX 10% (Ketoprofenum) – kožní sprej, roztok

- čirý nažloutlý roztok s vůní máty
- léčivé látky – ketoprofen
- pomocné látky – roztok sójového lecitinu (sójový lecitin, bezvodý ethanol), izopropylalkohol, propylenglykol, dihydrát dihydrogenfosforečnanu sodného, dodekahydrát hydrogenfosforečnanu sodného, hydroxid sodný, silice máty pepřné, čištěná voda

Ketonal 5% krém (Ketoprofenum)

- bílý homogenní krém
- léčivé látky – ketoprofen
- pomocné látky – methylparaben, propylparaben, propylenglykol, isopropyl-myristát, bílá vazelína, kopolymer makrogolu 2000 s dodekandiolem, glycerosorbitanester, heptahydrát síranu hořečnatého, čištěná voda

3.3 Příprava roztoků a vzorků

Roztoky byly připravovány z uvedených chemikálií a v případě potřeby uchovávány v chladničce. Vzorky byly připravovány z uvedených hromadně vyráběných léčivých přípravků (HVLP).

3.3.1 Roztoky pro validaci – sprej

Pracovní roztok standardu o koncentraci ketoprofenu 625 mg/l ve směsi acetonitril : methanol 3:1

125,0 mg ketoprofenu se rozpustí ve směsi acetonitril : methanol 3:1, přidají se 4,0 ml zásobního roztoku vnitřního standardu o koncentraci 500 mg/l ve směsi acetonitril : methanol 3:1 a doplní se na 200,0 ml směsí acetonitril : methanol 3:1

Tlumivý roztok fosforečnanový o pH 3,5

68,0 g dihydrogenfosforečnanu draselného se rozpustí v ultračisté vodě, zředí se jí na 1000,0 ml a pH se upraví kyselinou fosforečnou [10]
příprava v čas potřeby – vždy použít právě připravený roztok

Zásobní roztok vnitřního standardu o koncentraci 500 mg/l ve směsi acetonitril: methanol 3:1

50,0 mg ethylparabenu se rozpustí ve směsi acetonitril : methanol 3:1 a doplní se na 100,0 ml směsí acetonitril : methanol 3:1

Pracovní roztok vnitřního standardu o koncentraci 10 mg/l ve směsi acetonitril: methanol 3:1

1,0 ml zásobního roztoku vnitřního standardu o koncentraci 500 mg/l ve směsi acetonitril : methanol 3:1 se doplní na 50,0 ml směsí acetonitril : methanol 3:1

Zásobní roztok pro linearitu A o koncentraci ketoprofenu 5000 mg/l ve směsi acetonitril : methanol 3:1

250,0 mg ketoprofenu se rozpustí ve směsi acetonitril : methanol 3:1 a doplní se na 50,0 ml směsi acetonitril : methanol 3:1

Pracovní roztok pro linearitu o koncentraci ketoprofenu 1250 mg/l ve směsi acetonitril : methanol 3:1

ke 2,5 ml zásobního roztoku pro linearitu A ve směsi acetonitril : methanol 3:1 se přidají 0,2 ml zásobního roztoku vnitřního standardu o koncentraci 500 mg/l ve směsi acetonitril : methanol 3:1 a doplní se na 10,0 ml směsi acetonitril: methanol 3:1

Pracovní roztok pro linearitu o koncentraci ketoprofenu 1000 mg/l ve směsi acetonitril : methanol 3:1

k 10,0 ml zásobního roztoku pro linearitu A ve směsi acetonitril : methanol 3:1 se přidá 1,0 ml zásobního roztoku vnitřního standardu o koncentraci 500 mg/l ve směsi acetonitril : methanol 3:1 a doplní se na 50,0 ml směsi acetonitril: methanol 3:1

Zásobní roztok pro linearitu B o koncentraci ketoprofenu 1250 mg/l ve směsi acetonitril : methanol 3:1

25,0 ml zásobního roztoku pro linearitu A ve směsi acetonitril : methanol 3:1 se doplní na 100,0 ml směsi acetonitril : methanol 3:1

Pracovní roztok pro linearitu o koncentraci ketoprofenu 750 mg/l ve směsi acetonitril : methanol 3:1

ke 30,0 ml zásobního roztoku pro linearitu B ve směsi acetonitril : methanol 3:1 se přidá 1,0 ml zásobního roztoku vnitřního standardu o koncentraci 500 mg/l ve směsi acetonitril : methanol 3:1 a doplní se na 50,0 ml směsi acetonitril: methanol 3:1

Pracovní roztok pro linearitu o koncentraci ketoprofenu 625 mg/l ve směsi acetonitril : methanol 3:1

ke 25,0 ml zásobního roztoku pro linearitu B ve směsi acetonitril : methanol 3:1 se přidá 1,0 ml zásobního roztoku vnitřního standardu o koncentraci 500 mg/l ve směsi acetonitril : methanol 3:1 a doplní se na 50,0 ml směsí acetonitril: methanol 3:1

Pracovní roztok pro linearitu o koncentraci ketoprofenu 500 mg/l ve směsi acetonitril : methanol 3:1

ke 20,0 ml zásobního roztoku pro linearitu B ve směsi acetonitril : methanol 3:1 se přidá 1,0 ml zásobního roztoku vnitřního standardu o koncentraci 500 mg/l ve směsi acetonitril : methanol 3:1 a doplní se na 50,0 ml směsí acetonitril: methanol 3:1

Pracovní roztok pro linearitu o koncentraci ketoprofenu 250 mg/l ve směsi acetonitril : methanol 3:1

k 10,0 ml zásobního roztoku pro linearitu B ve směsi acetonitril : methanol 3:1 se přidá 1,0 ml zásobního roztoku vnitřního standardu o koncentraci 500 mg/l ve směsi acetonitril : methanol 3:1 a doplní se na 50,0 ml směsí acetonitril: methanol 3:1

Pracovní roztok pro přesnost

do odměrné baňky se naváží přibližně 0,1250 g roztoku vzorku a přidá se 20,0 ml pracovního roztoku vnitřního standardu o koncentraci 10 mg/l ve směsi acetonitril : methanol 3:1; směs se umístí do ultrazvukové lázně na 30 minut a poté zfiltruje přes membránový filtr o velikosti pórů 0,45 μm a dávákuje autosamplerem na kolonu

Pracovní roztok pro správnost

do odměrné baňky se naváží přibližně 0,1250 g roztoku vzorku a přidá se 20,0 ml pracovního roztoku standardu o koncentraci ketoprofenu 625 mg/l ve směsi acetonitril : methanol 3:1; směs se umístí do ultrazvukové lázně na

30 minut a poté zfiltruje přes membránový filtr o velikosti pórů 0,45 µm a dávkuje autosamplerem na kolonu

3.3.2 Roztoky a vzorky pro vývoj metody – krém

Pracovní roztok standardu o koncentraci ketoprofenu 625 mg/l, methylparabenu 25 mg/l a propylparabenu 12,5 mg/l v acetonitrilu

62,5 mg ketoprofenu, 2,5 mg methylparabenu a 1,25 mg propylparabenu se rozpustí v acetonitrilu, přidají se 2,0 ml zásobního roztoku vnitřního standardu o koncentraci 500 mg/l v acetonitrilu a doplní se na 100,0 ml acetonitrilem

Tlumivý roztok fosforečnanový o pH 3,5

68,0 g dihydrogenfosforečnanu draselného se rozpustí v ultračisté vodě, zředí se jí na 1000,0 ml a pH se upraví kyselinou fosforečnou [10]
příprava v čas potřeby – vždy použit právě připravený roztok

Zásobní roztok vnitřního standardu o koncentraci 500 mg/l v acetonitrilu

25,0 mg ethylparabenu se rozpustí v acetonitrilu a doplní se na 50,0 ml acetonitrilem

Pracovní roztok vnitřního standardu o koncentraci 10 mg/l v acetonitrilu

1,0 ml zásobního roztoku vnitřního standardu o koncentraci 500 mg/l v acetonitrilu se doplní na 50,0 ml acetonitrilem

Vzorek v acetonitrilu

do centrifugační zkumavky o objemu 50 ml se naváží přibližně 0,2000 g krému a přidá se 20,0 ml pracovního roztoku vnitřního standardu o koncentraci 10 mg/l v acetonitrilu; směs se umístí na 30 minut do ultrazvukové lázně a poté se 15 minut centrifuguje při rychlosti 3000 otáček/min; supernatant se zfiltruje přes membránový filtr o velikosti pórů 0,45 µm a dávkuje autosamplerem na kolonu

3.3.3 Roztoky pro validaci – krém

Pracovní roztok standardu o koncentraci ketoprofenu 625 mg/l, methylparabenu 25 mg/l a propylparabenu 12,5 mg/l v acetonitrilu

125,0 mg ketoprofenu, 5,0 mg methylparabenu a 2,5 mg propylparabenu se rozpustí v acetonitrilu, přidají se 4,0 ml zásobního roztoku vnitřního standardu o koncentraci 500 mg/l v acetonitrilu a doplní se na 200,0 ml acetonitrilem

Tlumivý roztok fosforečnanový o pH 3,5

68,0 g dihydrogenfosforečnanu draselného se rozpustí v ultračisté vodě, zředí se jí na 1000,0 ml a pH se upraví kyselinou fosforečnou [10]
příprava v čas potřeby – vždy použit právě připravený roztok

Zásobní roztok vnitřního standardu o koncentraci 500 mg/l v acetonitrilu

25,0 mg ethylparabenu se rozpustí v acetonitrilu a doplní se na 50,0 ml acetonitrilem

Pracovní roztok vnitřního standardu o koncentraci 10 mg/l v acetonitrilu

1,0 ml zásobního roztoku vnitřního standardu o koncentraci 500 mg/l v acetonitrilu se doplní na 50,0 ml acetonitrilem

Zásobní roztok pro linearitu A o koncentraci ketoprofenu 5000 mg/l, methylparabenu 200 mg/l a propylparabenu 80 mg/l v acetonitrilu

250,0 mg ketoprofenu, 10,0 mg methylparabenu a 4,0 mg propylparabenu se rozpustí v acetonitrilu a doplní se na 50,0 ml acetonitrilem

Pracovní roztok pro linearitu o koncentraci ketoprofenu 1250 mg/l, methylparabenu 50 mg/l a propylparabenu 20 mg/l v acetonitrilu

ke 2,5 ml zásobního roztoku pro linearitu A v acetonitrilu se přidají 0,2 ml zásobního roztoku vnitřního standardu o koncentraci 500 mg/l v acetonitrilu a doplní se na 10,0 ml acetonitrilem

Pracovní roztok pro linearitu o koncentraci ketoprofenu 1000 mg/l, methylparabenu 40 mg/l a propylparabenu 16 mg/l v acetonitrilu

k 10,0 ml zásobního roztoku pro linearitu A v acetonitrilu se přidá 1,0 ml zásobního roztoku vnitřního standardu o koncentraci 500 mg/l v acetonitrilu a doplní se na 50,0 ml acetonitrilem

Zásobní roztok pro linearitu B o koncentraci ketoprofenu 1250 mg/l methylparabenu 50 mg/l a propylparabenu 20 mg/l v acetonitrilu

25,0 ml zásobního roztoku pro linearitu A v acetonitrilu se doplní na 100,0 ml acetonitrilem

Pracovní roztok pro linearitu o koncentraci ketoprofenu 750 mg/l, methylparabenu 30 mg/l a propylparabenu 12 mg/l v acetonitrilu

ke 30,0 ml zásobního roztoku pro linearitu B v acetonitrilu se přidá 1,0 ml zásobního roztoku vnitřního standardu o koncentraci 500 mg/l v acetonitrilu a doplní se na 50,0 ml acetonitrilem

Pracovní roztok pro linearitu o koncentraci ketoprofenu 625 mg/l, methylparabenu 25 mg/l a propylparabenu 10 mg/l v acetonitrilu

ke 25,0 ml zásobního roztoku pro linearitu B v acetonitrilu se přidá 1,0 ml zásobního roztoku vnitřního standardu o koncentraci 500 mg/l v acetonitrilu a doplní se na 50,0 ml acetonitrilem

Pracovní roztok pro linearitu o koncentraci ketoprofenu 500 mg/l, methylparabenu 20 mg/l a propylparabenu 8 mg/l v acetonitrilu

ke 20,0 ml zásobního roztoku pro linearitu B v acetonitrilu se přidá 1,0 ml zásobního roztoku vnitřního standardu o koncentraci 500 mg/l v acetonitrilu a doplní se na 50,0 ml acetonitrilem

Pracovní roztok pro linearitu o koncentraci ketoprofenu 250 mg/l, methylparabenu 10 mg/l a propylparabenu 4 mg/l v acetonitrilu

k 10,0 ml zásobního roztoku pro linearitu B v acetonitrilu se přidá 1,0 ml zásobního roztoku vnitřního standardu o koncentraci 500 mg/l v acetonitrilu a doplní se na 50,0 ml acetonitrem

Pracovní roztok pro přesnost

do centrifugační zkumavky se naváží přibližně 0,2000 g krému a přidá se 20,0 ml pracovního roztoku vnitřního standardu o koncentraci 10 mg/l v acetonitrilu; směs se umístí do ultrazvukové lázně na 30 minut a poté se 15 minut centrifuguje při rychlosti 3000 otáček/min; supernatant se zfiltruje přes membránový filtr o velikosti pórů 0,45 µm a dává se autosamplérem na kolonu

Pracovní roztok pro správnost

do centrifugační zkumavky se naváží přibližně 0,2000 g krému a přidá se 20,0 ml pracovního roztoku standardu o koncentraci ketoprofenu 625 mg/l, methylparabenu 25 mg/l a propylparabenu 12,5 mg/l v acetonitrilu; směs se umístí do ultrazvukové lázně na 30 minut a poté se 15 minut centrifuguje při rychlosti 3000 otáček/min; supernatant se zfiltruje přes membránový filtr o velikosti pórů 0,45 µm a dává se autosamplérem na kolonu

3.4 Stanovení obsahu ketoprofenu a konzervačních látek

Obsah ketoprofenu, methylparabenu a propylparabenu se vypočítá podle následujícího vzorce:

$$c_i = \frac{A_V / A_{IS} \times m_S \times F \times 100}{A_S / A_{IS} \times m_V \times Z}, \text{ kde} \quad (3-4)$$

c_i	obsah stanovované složky v procentech (%)
A_V	plocha píku stanovované látky ve vzorku
A_S	plocha píku stanovované látky ve standardu
A_{IS}	plocha píku vnitřního standardu (ethylparabenu)
m_V	navážka vzorku v gramech (g)
m_S	navážka standardu v gramech (g)
F	faktor korekce na obsah referenční látky
	pro ketoprofen 0,9972
	pro methylparaben 0,9891
	pro propylparaben 0,9950
Z	faktor zředění

4 VÝSLEDKY A DISKUSE

4.1 Sprej – validace

4.1.1 Metoda

4.1.1.1 Optimální chromatografické podmínky

mobilní fáze:	acetonitril : voda : fosforečnanový pufr 3,5 (40:58:2, v/v/v)
kolona	SUPELCO Discovery C18, 5 µm, 125 mm x 4,6 mm
průtok (ml/min)	1,0
vlnová délka detekce (nm)	233
vnitřní standard	ethylparaben
dávkovaný objem (µl)	10
teplota	laboratorní

4.1.1.2 Příprava vzorku – sprej

Do odměrné baňky se naváží přibližně 0,1250 g roztoku a přidá se 20,0 ml pracovního roztoku vnitřního standardu o koncentraci 10 mg/l ve směsi acetonitril: methanol 3:1. Směs se umístí do ultrazvukové lázně na 30 minut, poté zfiltruje přes membránový filtr o velikosti pórů 0,45 µm a dávákuje autosamplrem na kolonu.

4.1.2 Test vhodnosti chromatografického systému

4.1.2.1 Účinnost chromatografické kolony

Pro stanovení účinnosti chromatografické kolony byl použit pracovní roztok standardu o koncentraci ketoprofenu 625 mg/l ve směsi acetonitril : methanol 3:1. Hodnoty uváděné v tabulce Tab. 13 jsou průměrem ze tří měření.

analyzovaná látka	N (zdánlivý počet teoretických pater)
ketoprofen	4733
ethylparaben	3719

Tab. 13: Účinnost chromatografické kolony

Účinnost chromatografické kolony je vyjádřena jako zdánlivý počet teoretických pater (N). Účinnost chromatografické kolony $N \geq 3719$.

4.1.2.2 Faktor symetrie

Pro stanovení faktoru symetrie píku (A_S) byl použit pracovní roztok standardu o koncentraci ketoprofenu 625 mg/l ve směsi acetonitril : methanol 3:1. Hodnoty uváděné v tabulce Tab. 14 jsou průměrem ze tří měření.

analyzovaná látka	A_S (faktor symetrie)
ketoprofen	1,08
ethylparaben	1,17

Tab. 14: Faktor symetrie

Parametr VYHOVUJE požadavku na faktor symetrie A_S v rozmezí 0,8–1,5.

4.1.2.3 Rozlišení

Pro určení rozlišení (R_S) byl použit pracovní roztok standardu o koncentraci ketoprofenu 625 mg/l ve směsi acetonitril : methanol 3:1. Hodnoty uváděné v tabulce Tab. 15 jsou průměrem ze tří měření.

analyzovaná látka	R_S (rozlišení)
ethylparaben - ketoprofen	8,35

Tab. 15: Rozlišení

Parametr VYHOVUJE požadavku na rozlišení $R_S > 1,5$.

4.1.2.4 Opakovatelnost

Opakovatelnost analýzy byla provedena opakovaným nástřikem pracovního roztoku standardu o koncentraci ketoprofenu 625 mg/l ve směsi acetonitril : methanol 3:1 na kolonu. Hodnoty uváděné v tabulkách Tab. 16 a 17 jsou průměrem ze šesti měření. K výpočtům byla použita aplikace Microsoft Office Excel 2003.

Číslo měření	Plocha píku (A)	Retenční čas (t_R)
1	9079089	6,327
2	9058251	6,306
3	9078101	6,344
4	9086416	6,363
5	9061905	6,371
6	9122072	6,316

n	6	6
x	9080972,3333	6,337
s	22849,2004	0,026
s_R (%)	0,25	0,41

Tab. 16: Opakovatelnost pro ketoprofen

Číslo měření	Plocha píku (A)	Retenční čas (t_R)
1	148556	3,791
2	148422	3,781
3	148684	3,797
4	148807	3,805
5	148804	3,810
6	147155	3,790

n	6	6
x	148404,6667	3,795
s	629,9579	0,010
s_R (%)	0,42	0,28

Tab. 17: Opakovatelnost pro ethylparaben

Relativní směrodatná odchylka s_R (%) se pohybovala v rozmezí 0,25–0,42 % pro plochu píku a v rozmezí 0,28–0,41 % pro retenční čas.

4.1.3 Validační parametry

4.1.3.1 Přesnost

Bylo analyzováno šest paralelně připravených pracovních roztoků pro přesnost. Každý roztok byl třikrát nastříknut na kolonu. Pro každé tři nástřiky byl vypočten průměr plochy píku. Takto získané plochy píků byly přepočteny na navážku 0,1250 g spreje. Hodnoty jsou zaznamenány v tabulce Tab. 18. K výpočtům byla použita aplikace Microsoft Office Excel 2003.

Roztok číslo	Průměr plochy	Navážka	Přepočet na navážku
1	8816028,3333	0,1202	9168082,7094
2	9928936,0000	0,1354	9166299,8523
3	9387260,6667	0,1259	9320155,5467
4	10087853,6667	0,1362	9258309,1654
5	10011185,6667	0,1350	9269616,3580
6	10525188,3333	0,1381	9526781,6196

n	6
x	9284874,2086
s	132968,1196
s_R (%)	1,43

Tab. 18: Přesnost

Relativní směrodatná odchylka s_R (%) $\leq 1,43$ %.

4.1.3.2 Správnost

Byla použita metoda standardního přídavku.

Byl šestkrát změřen pracovní roztok standardu o koncentraci ketoprofenu 625 mg/l ve směsi acetonitril : methanol 3:1 (viz opakovatelnost).

Bylo analyzováno šest paralelně připravených pracovních roztoků pro správnost. Každý roztok byl třikrát nastříknut na kolonu.

Výtěžnost R_i (%) se vypočítá podle vzorce:

$$R_i = 100 \times \frac{c_i - c_v}{c_0}, \text{ kde}$$

c_0 koncentrace KP přidaná ke vzorku (viz opakovatelnost)

c_i koncentrace KP zjištěná při HPLC

c_v koncentrace KP zjištěná ve vzorku (viz přesnost)

Navážka KP (mg)	A_0	c_0 (mg/100 ml)
124,7	9080972,3333	62,35

A_v	c_v (mg/100 ml)
9284874,2086	63,75

Roztok číslo	A_i (průměr)	c_i (mg/100 ml)
1	18181020,3333	124,83
2	18725221,6667	128,56
3	18492662,0000	126,97
4	18638833,3333	127,97
5	18575972,0000	127,54
6	18411147,3333	126,41

Roztok číslo	R_i (%)
1	97,96
2	103,96
3	101,39
4	103,01
5	102,31
6	100,49

n	6
x	101,52
s	2,12
s_R (%)	2,09

Tab. 19: Správnost

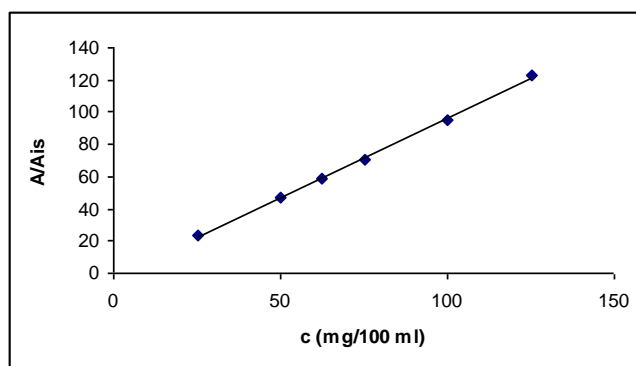
Relativní směrodatná odchylka s_R (%) $\leq 2,09$ % a R_i (%) je v rozmezí 97,96–103,96 %.

4.1.3.3 Linearita

Byla použita metoda vnitřního standardu, kdy jako vnitřní standard byl použit ethylparaben (přídavek 10 mg/l). Bylo připraveno šest pracovních roztoků pro linearitu o koncentracích uvedených v tabulce Tab. 20. Každý roztok byl třikrát změřen a ze získaných hodnot byla vypočítána průměrná hodnota plochy píku pro každou koncentraci. Závislost A_{VZ}/A_{IS} roztoků pro linearitu na jejich koncentraci byla vyhodnocena metodou lineární regrese za použití aplikace Microsoft Office Excel 2003.

c (mg/100 ml)	A_{VZ}	A_{IS}	A_{VZ}/A_{IS}
25	3682477,6667	158394,0000	23,2488
50	7386306,6667	156147,0000	47,3035
62,5	9248115,6667	157343,0000	58,7768
75	11062356,0000	156485,6667	70,6924
100	14758046,0000	155533,3333	94,8867
125	18608443,3333	151511,3333	122,8188

c (mg/100 ml)	A_{VZ}/A_{IS}
25	23,2488
50	47,3035
62,5	58,7768
75	70,6924
100	94,8867
125	122,8188



Regresní funkce	$y = k x + q$	
počet bodů	n	6
Parametry regresní přímky a odhady jejich směrodatných odchylek		
směrnice	k	$0,988 \pm 0,017$
absolutní člen	q	$-2,420 \pm 1,376$
koeficient korelace	R	0,9994
reziduální odchylka	S_{rez}	1,3764

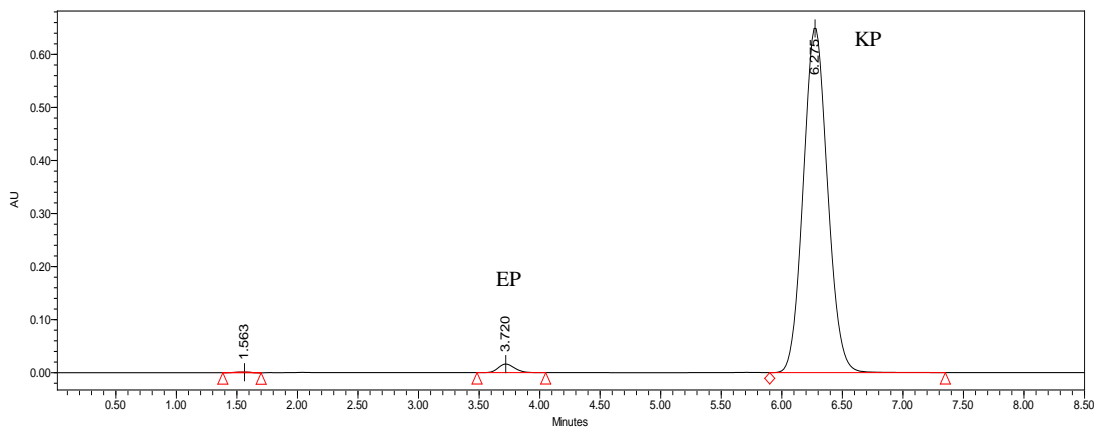
Tab. 20: Linearita

Koeficient korelace $R > 0,999$.

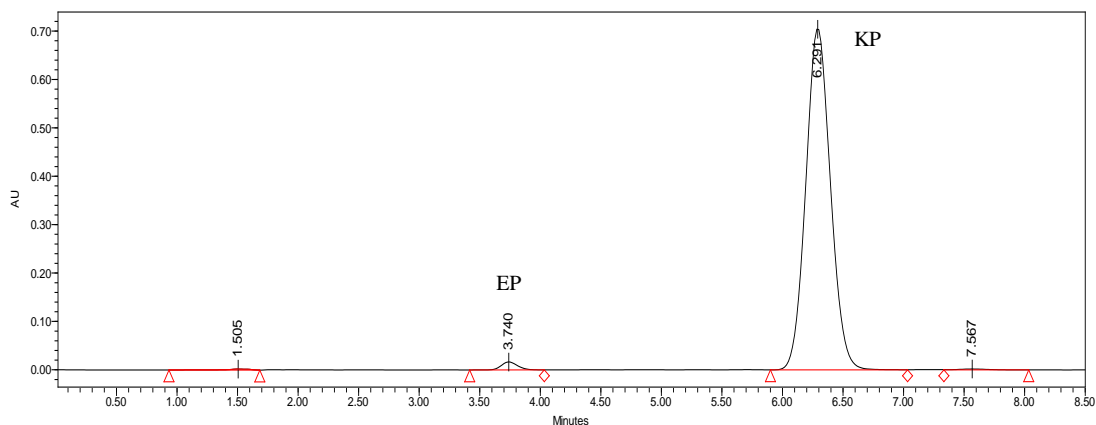
4.1.3.4 Selektivita

Pro zjištění selektivity byl použit pracovní roztok standardu o koncentraci ketoprofenu 625 mg/l ve směsi acetonitril : methanol 3:1. Separace všech složek je dokumentována na chromatogramu na obrázku Obr. 5. Píky ketoprofenu a ethylparabenu mají odlišné retenční časy.

Chromatogram přípravku PRONTOFLEX 10% kožní sprej, roztok, s přidavkem vnitřního standardu je dokumentován na obrázku Obr. 6. Píky ketoprofenu a ethylparabenu jsou dokonale rozlišeny.



Obr. 5: Pracovní roztok standardu o koncentraci ketoprofenu 625 mg/l ve směsi acetonitril : methanol 3:1, $R_S = 8,38$ mezi píky ethylparabenu a ketoprofenu



Obr. 6: Pracovní roztok pro přesnost ve směsi acetonitril : methanol 3:1, $R_S = 8,32$ mezi píky ethylparabenu a ketoprofenu

HPLC metoda umožňuje selektivně změřit plochu píků odpovídající účinné látce ketoprofenu.

4.1.3.5 Robustnost

Testování míry vlivu proměnných experimentálních podmínek na stanovení obsahu analytů bylo testováno u pracovního roztoku standardu o koncentraci ketoprofenu 625 mg/l ve směsi acetonitril : methanol 3:1.

4.1.3.5.1 Vliv složení mobilní fáze

Pro zjištění vlivu složení mobilní fáze na plochu píku a na retenční čas byly použity mobilní fáze při různých poměrech acetonitrilu, vody a fosforečnanového pufru o pH 3,5 uvedené v následující tabulce Tab. 21:

acetonitril	voda	pufr
36	62	2
38	60	2
40	58	2
42	56	2
44	54	2

Tab. 21: Složení mobilní fáze pro testování robustnosti

4.1.3.5.1.1 Vliv na plochu píku

Vliv na plochu píku je vyjádřen v procentech a vypočítá se podle následujícího vzorce:

$$A_R = 100 \times \frac{A_i}{A_{40:58:2}},$$

kde A_i je plocha píku získaná jako průměr ze tří měření pro dané složení mobilní fáze a $A_{40:58:2}$ je plocha píku získaná jako průměr ze tří měření pro optimální složení mobilní fáze acetonitril : voda : fosforečnanový pufr o pH 3,5 (40:58:2).

MF	Ketoprofen	
	A_i	A_R (%)
36:62:2	8766712,0000	96,54
38:60:2	9003562,0000	99,15
40:58:2	9080972,3333	100,00
42:56:2	8886217,0000	97,86
44:54:2	9062078,6667	99,79

Tab. 22: Vliv složení mobilní fáze na plochu píku KP, průměr ze tří měření

MF	Ethylparaben	
	A_i	A_R (%)
36:62:2	148399,3333	99,99
38:60:2	151998,3333	102,42
40:58:2	148404,6667	100,00
42:56:2	149214,6667	100,55
44:54:2	151427,0000	102,04

Tab. 23: Vliv složení mobilní fáze na plochu píku EP, průměr ze tří měření

Byly získány výsledky uvedené v tabulkách Tab. 22 a 23. Relativní plocha píků vztažená na plochu píku při optimálním složení mobilní fáze se pohybovala v rozmezí 96,54 % až 102,42 % a proto v uvedeném rozmezí změny v poměru složek mobilní fáze neovlivňují stanovení analyzovaných látek.

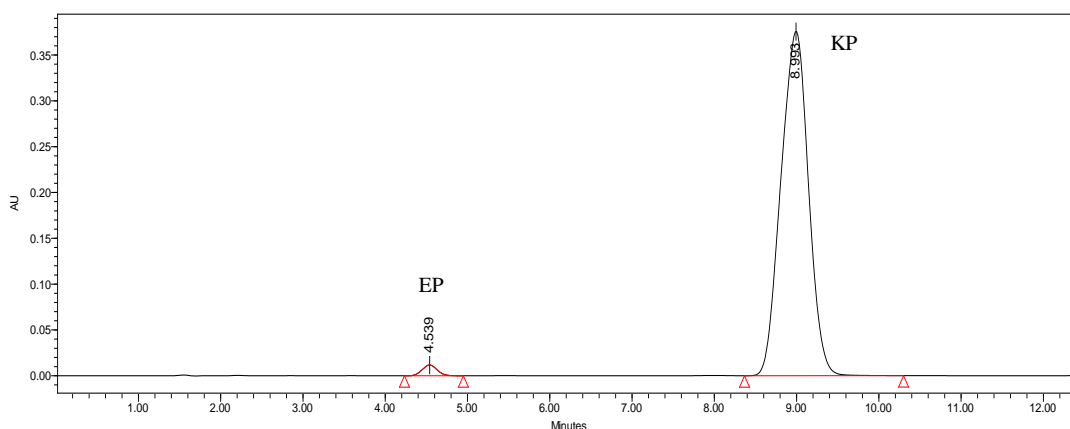
4.1.3.5.1.2 Vliv na retenční čas

Složení mobilní fáze ovlivňuje dobu analýzy. V celém testovacím rozmezí však dochází k dokonalé separaci všech složek.

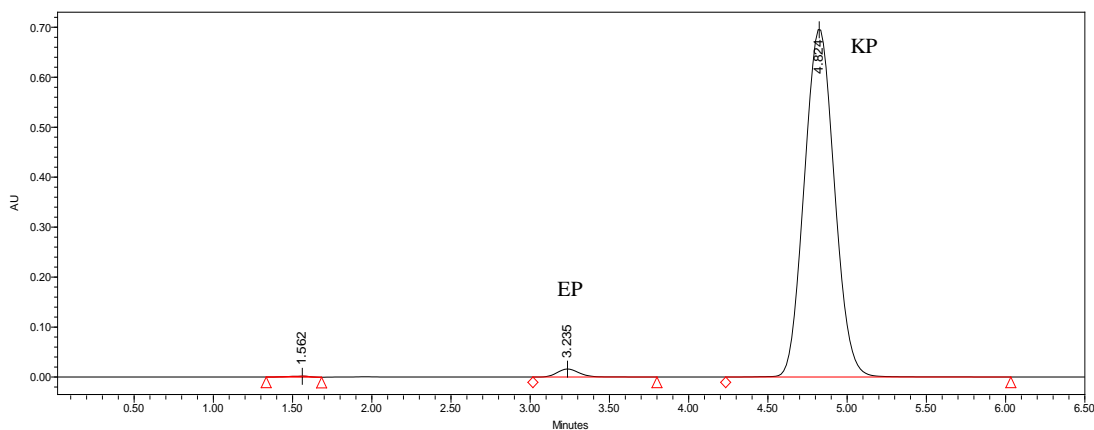
MF	Ketoprofen	Ethylparaben
	t_R (min)	t_R (min)
36:62:2	8,958	4,523
38:60:2	7,399	4,068
40:58:2	6,299	3,737
42:56:2	5,474	3,470
44:54:2	4,831	3,238

Tab. 24: Vliv složení mobilní fáze na retenční časy píků KP a EP, průměr ze tří měření

Na obrázcích Obr. 7 a 8 jsou znázorněny chromatogramy při poměrech acetonitrilu, vody a fosforečnanového pufru o pH 3,5 = 36:62:2 a 44:54:2. Jedná se o krajní hranice testovacího rozmezí. Z chromatogramů je patrné, že při zvýšení podílu vody v mobilní fázi dochází k prodloužení analýzy a naopak při snížení podílu vody v mobilní fázi dochází ke zkrácení doby analýzy.



Obr. 7: Pracovní roztok standardu o koncentraci ketoprofenu 625 mg/l ve směsi acetonitril : methanol 3:1, MF 36:62:2



Obr. 8: Pracovní roztok standardu o koncentraci ketoprofenu 625 mg/l ve směsi acetonitril : methanol 3:1, MF 44:54:2

4.1.3.5.2 Stabilita

Stabilita pracovního roztoku standardu o koncentraci ketoprofenu 625 mg/l ve směsi acetonitril : methanol 3:1 byla testována za uchovávání:

1. za snížené teploty (5 °C), chráněné před světlem
2. za laboratorní teploty, za přístupu světla

Odchylka vyjádřená v procentech je vypočtena podle vzorce:

$$S_T = 100 \times \frac{|A_t - A_0|}{A_0},$$

kde A_t je plocha píku v čase t , A_0 je plocha píku v čase 0 a t je čas od přípravy roztoku.

t (hod)	A_t	S_T (%)
0	9080972,3333	0
24	9069819,6667	0,12
48	9036489,6667	0,49
72	8963993,6667	1,29

Tab. 25: Stabilita ketoprofenu za podmínek uchovávání při laboratorní teplotě, za přístupu světla

t (hod)	A_t	S_T (%)
0	9080972,3333	0
24	9086395,3333	0,06
48	9046884,0000	0,37
72	8988377,0000	1,02

Tab. 26: Stabilita ketoprofenu za podmínek uchovávání při snížené teplotě, chráněné před světlem

Z tabulek Tab. 25 a 26 vyplývá, že roztok ketoprofenu ve směsi acetonitril: methanol 3:1 je možné používat při uchovávání za laboratorní nebo snížené teploty do 48 hodin od jeho přípravy, kdy $S_T (\%) < 0,49 \%$.

4.2 Krém – vývoj metody

4.2.1 Metoda

Při stanovení množství ketoprofenu, methylparabenu a propylparabenu v Ketonal 5% krému se vycházelo ze závěrů uvedených v diplomové práci Lucie Bajcurové „Využití HPLC ve farmaceutické analýze“, FaF UK Hradec Králové 2010.

4.2.1.1 Chromatografické podmínky

mobilitní fáze:	acetonitril : voda : fosforečnanový pufr 3,5 (40:58:2, v/v/v)
kolona	SUPELCO Discovery C18, 5 μm , 125 mm x 4,6 mm
průtok (ml/min)	1,0
vlnová délka detekce (nm)	233
vnitřní standard	ethylparaben
dávkovaný objem (μl)	10
teplota	laboratorní

4.2.1.2 Příprava vzorku

Do centrifugační zkumavky o objemu 50 ml se naváží přibližně 0,2000 g krému a přidá se 20,0 ml pracovního roztoku vnitřního standardu o koncentraci 10 mg/l v acetonitrilu. Směs se umístí do ultrazvukové lázně na 10 minut a poté se 15 minut centrifuguje při rychlosti 3000 otáček/min. Supernatant se zfiltruje přes membránový filtr o velikosti pórů 0,45 μm a dává se autosamplerem na kolonu.

Takto připravený roztok vzorku neobsahuje deklarovaných 5 % ketoprofenu, proto navrhuji jako další postup vyzkoušet izolaci ketoprofenu ze vzorku, který bude umístěn do ultrazvukové lázně na 30 až 45 minut a poté 15 minut centrifugován.

Pokud se tímto postupem nedosáhne deklarovaného obsahu 5 % ketoprofenu, navrhuji vyzkoušet izolaci ketoprofenu ze vzorku ve směsi acetonitril : methanol 3:1 za použití jiné mobilní nebo stacionární fáze, nebo změnit parametry použité kolony.

4.2.2 Mobilní fáze

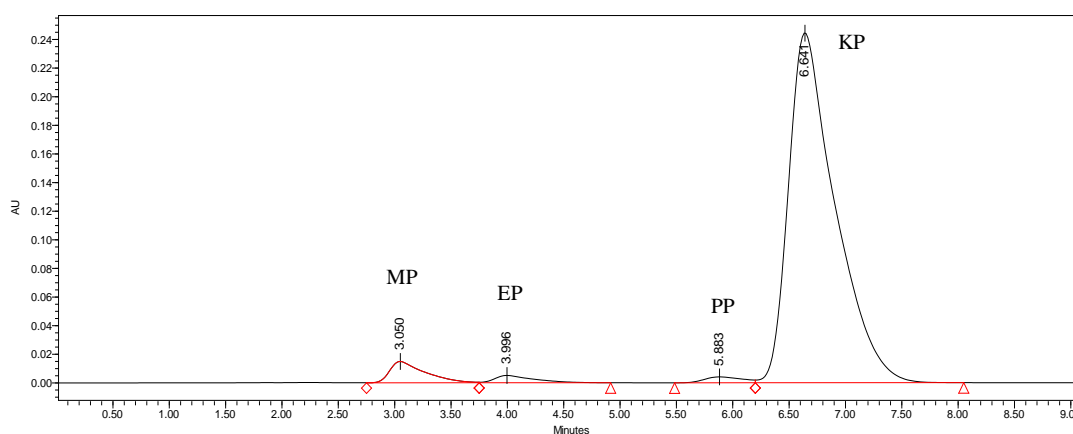
Při analýze vzorků byly využity následující mobilní fáze:

MF	acetonitril : voda : fosforečnanový pufr 3,5	39:59:2 (v/v/v)
MF1	acetonitril : voda : fosforečnanový pufr 3,5	40:58:2 (v/v/v)
MF2	acetonitril : voda : fosforečnanový pufr 3,5	40:57:3 (v/v/v)
MF3	acetonitril : voda : fosforečnanový pufr 3,5	36:60,8:3,2 (v/v/v)
MF4	acetonitril : voda : fosforečnanový pufr 3,5	36:61:3 (v/v/v)
MF5	acetonitril : voda : fosforečnanový pufr 3,5	38:59,1:2,9 (v/v/v)

4.2.3 Výsledky analýz

4.2.3.1 SUPELCO Discovery C18, 5 µm, 125 mm x 4,6 mm

Byl připraven pracovní roztok standardu o koncentraci ketoprofenu 625 mg/l, methylparabenu 25 mg/l a propylparabenu 12,5 mg/l v acetonitrilu, který byl dávkován autosamplerem na kolonu SUPELCO Discovery C18, 5 µm, 125 mm x 4,6 mm. Jako mobilní fáze byla použita MF1.



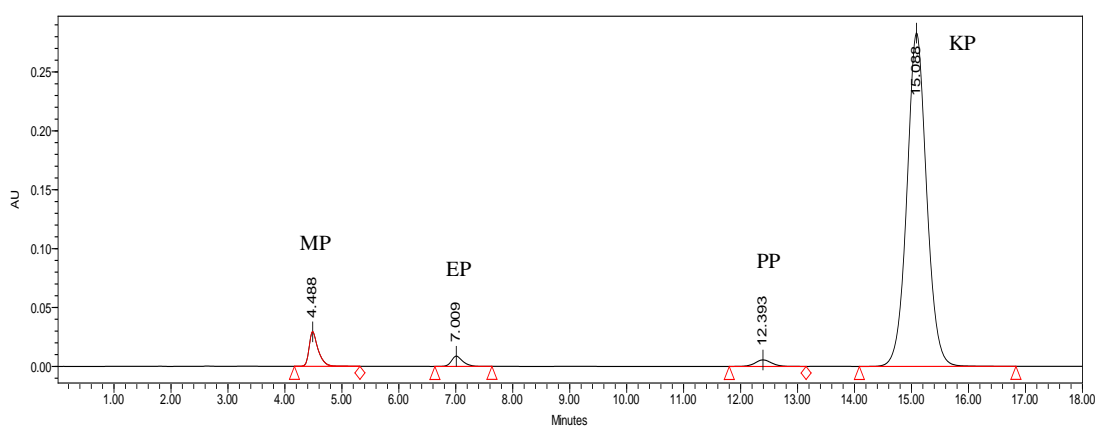
Obr. 9: Pracovní roztok standardu o koncentraci ketoprofenu 625 mg/l, methylparabenu 25 mg/l a propylparabenu 12,5 mg/l v acetonitrilu, MF1, nástřik 10 µl, průtok 1,0 ml/min

Při analýze se ukázalo, že separační schopnost kolony je značně zhoršena. Ve snaze zlepšit stav kolony byla provedena regenerace kolony. Po regeneraci se stav kolony krátkodobě zlepšil. Při dalších měření za použití mobilních fází MF1, MF2 a MF3 se ale separační schopnosti kolony začaly postupně zhoršovat.

Protože kolona se stejnými parametry nebyla k dispozici, byla pro další průběh analýzy použita kolona SUPELCO Discovery C18, 5 μm , 150 mm x 4,6 mm.

4.2.3.2 SUPELCO Discovery C18, 5 μm , 150 mm x 4,6 mm

Pracovní roztok standardu o koncentraci ketoprofenu 625 mg/l, methylparabenu 25 mg/l a propylparabenu 12,5 mg/l v acetonitrilu byl dávkován autosamplermem na kolonu SUPELCO Discovery C18, 5 μm , 150 mm x 4,6 mm. Jako mobilní fáze byla použita MF4.

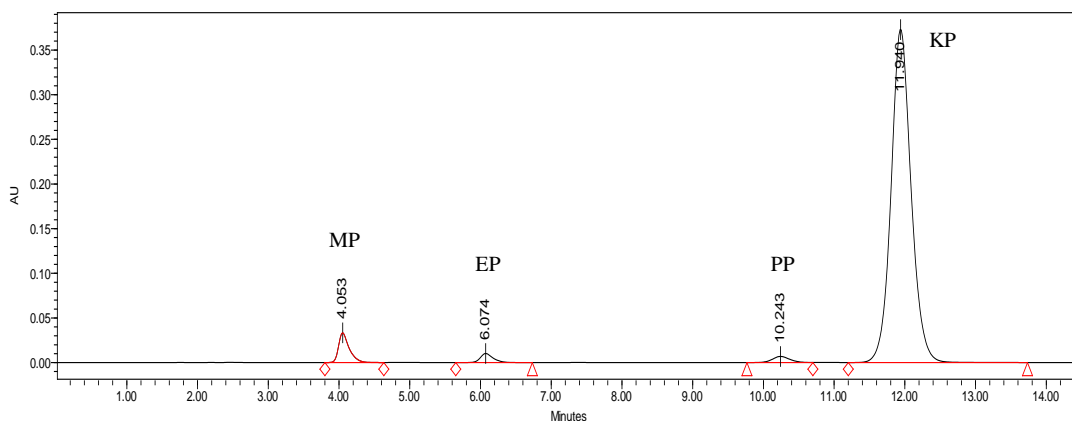


Obr. 10: Pracovní roztok standardu o koncentraci ketoprofenu 625 mg/l, methylparabenu 25 mg/l a propylparabenu 12,5 mg/l v acetonitrilu, MF4, nástřik 10 μl , průtok 1,0 ml/min

$$R_S (\text{MP/EP}) = 8,19; R_S (\text{EP/PP}) = 12,43; R_S (\text{PP/KP}) = 4,75$$

$$A_S (\text{MP}) = 1,46; A_S (\text{EP}) = 1,25; A_S (\text{PP}) = 1,05; A_S (\text{KP}) = 1,04$$

Vzhledem k délce analýzy byl změněn poměr složek mobilní fáze.

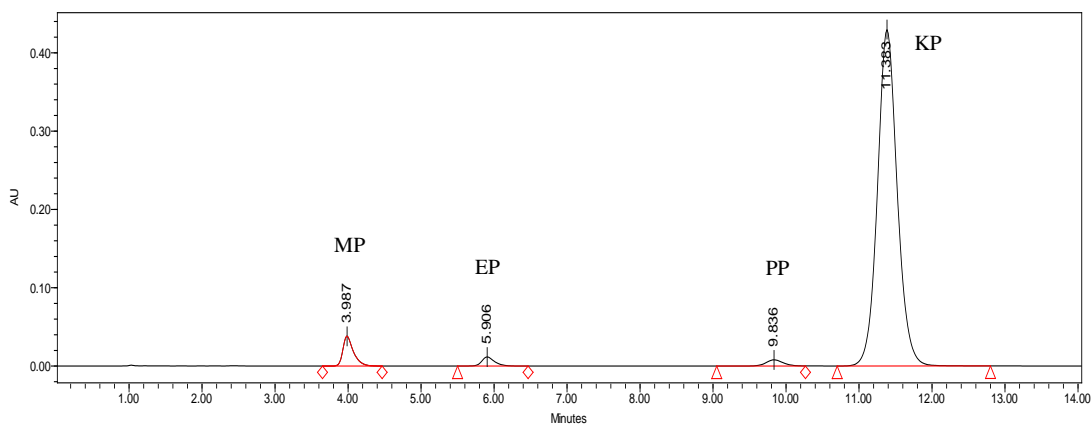


Obr. 11: Pracovní roztok standardu o koncentraci ketoprofenu 625 mg/l, methylparabenu 25 mg/l a propylparabenu 12,5 mg/l v acetonitrilu, MF5, nástřik 10 μ l, průtok 1,0 ml/min

$$R_S (\text{MP/EP}) = 7,12; R_S (\text{EP/PP}) = 11,08; R_S (\text{PP/KP}) = 3,62$$

$$A_S (\text{MP}) = 1,50; A_S (\text{EP}) = 1,30; A_S (\text{PP}) = 1,07; A_S (\text{KP}) = 1,08$$

Při použití mobilní fáze MF5 došlo ke zkrácení doby analýzy, ale ke zhoršení faktoru symetrie. Faktor symetrie píku methylparabenu nevyhovuje požadavkům ČL 2009. Poměr složek mobilní fáze byl proto opět změněn.

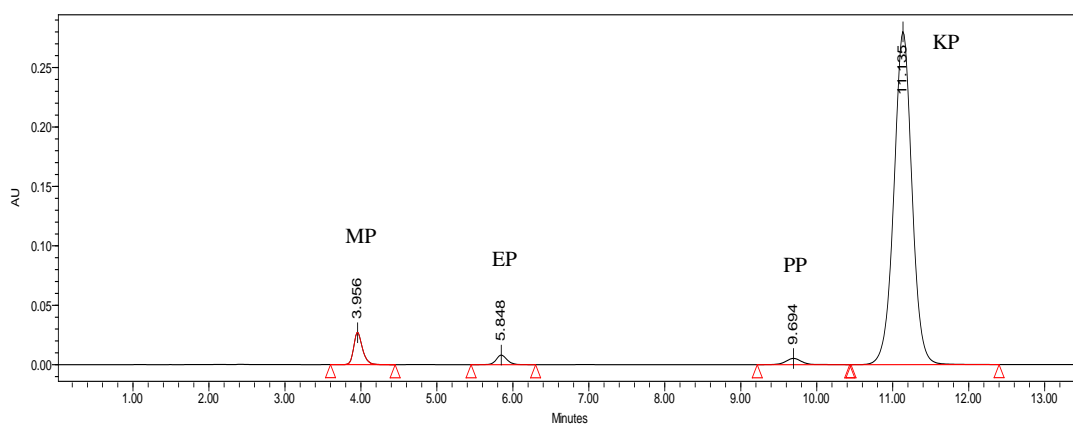


Obr. 12: Pracovní roztok standardu o koncentraci ketoprofenu 625 mg/l, methylparabenu 25 mg/l a propylparabenu 12,5 mg/l v acetonitrilu, MF, nástřik 10 μ l, průtok 1,0 ml/min

$$R_S (\text{MP/EP}) = 6,96; R_S (\text{EP/PP}) = 10,86; R_S (\text{PP/KP}) = 3,44$$

$$A_S (\text{MP}) = 1,48; A_S (\text{EP}) = 1,28; A_S (\text{PP}) = 1,06; A_S (\text{KP}) = 1,08$$

Při použití mobilní fáze MF došlo k dalšímu mírnému zkrácení doby analýzy a k mírnému zlepšení faktoru symetrie píků. Vzhledem k tomu, že faktor symetrie píku methylparabenu je téměř hraniční hodnotou intervalu 0,8–1,5, byl snížen dávkovaný objem z 10 μ l na 5 μ l ve snaze zlepšit faktor symetrie píků.

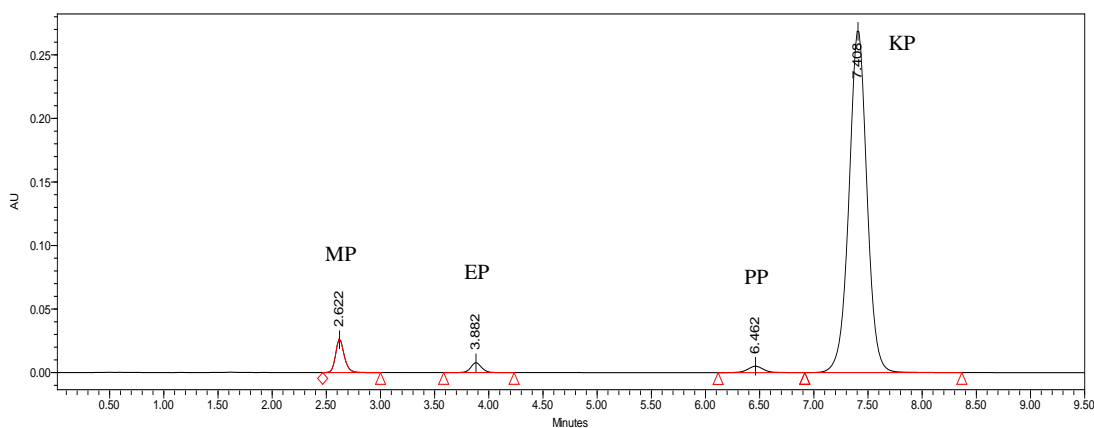


Obr. 13: Pracovní roztok standardu o koncentraci ketoprofenu 625 mg/l, methylparabenu 25 mg/l a propylparabenu 12,5 mg/l v acetonitrilu, MF, nástřik 5 μ l, průtok 1,0 ml/min

$$R_S (\text{MP/EP}) = 8,33; R_S (\text{EP/PP}) = 12,45; R_S (\text{PP/KP}) = 3,66$$

$$A_S (\text{MP}) = 1,26; A_S (\text{EP}) = 1,10; A_S (\text{PP}) = 1,02; A_S (\text{KP}) = 1,00$$

Při snížení dávkovaného objemu na 5 μ l se zlepšil faktor symetrie všech píků. Protože doba trvání analýzy stále přesahuje 10 minut a rozlišení píků je dostatečné, byl zvýšen průtok mobilní fáze z 1,0 ml/min na 1,5 ml/min.

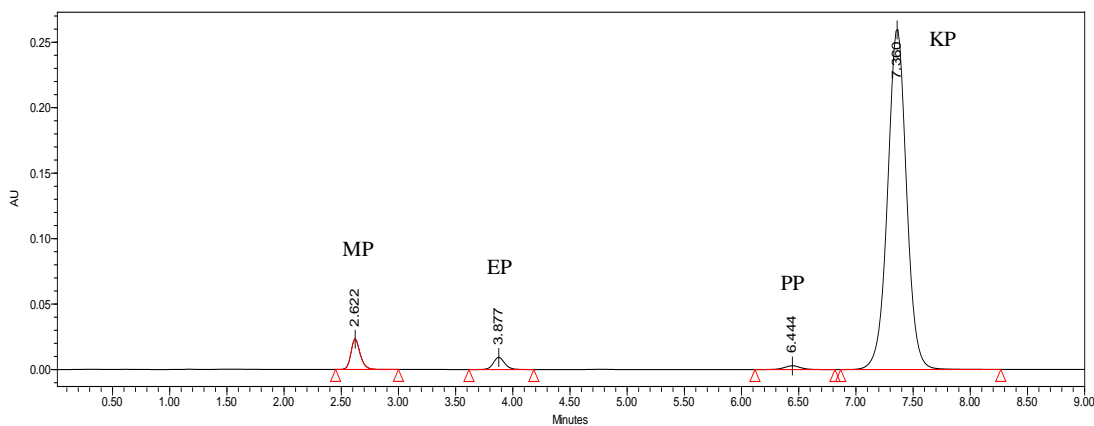


Obr. 14: Pracovní roztok standardu o koncentraci ketoprofenu 625 mg/l, methylparabenu 25 mg/l a propylparabenu 12,5 mg/l v acetonitrilu, MF, nástřik 5 μ l, průtok 1,5 ml/min

$$R_S (\text{MP/EP}) = 7,98; R_S (\text{EP/PP}) = 11,98; R_S (\text{PP/KP}) = 3,43$$

$$A_S (\text{MP}) = 1,19; A_S (\text{EP}) = 1,08; A_S (\text{PP}) = 1,03; A_S (\text{KP}) = 1,00$$

Při zvýšení průtoku mobilní fáze na 1,5 ml/min dojde ke zkrácení doby analýzy pod 10 minut a rozlišení pík je dostatečné.



Obr. 15: Vzorek v acetonitrilu, MF, nástřik 5 μ l, průtok 1,5 ml/min

$$R_S (\text{MP/EP}) = 7,90; R_S (\text{EP/PP}) = 11,95; R_S (\text{PP/KP}) = 3,35$$

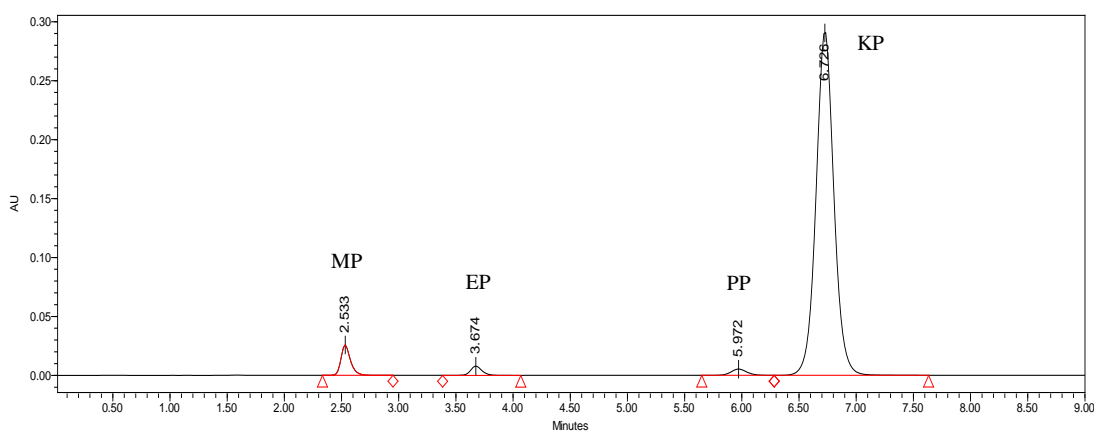
$$A_S (\text{MP}) = 1,19; A_S (\text{EP}) = 1,10; A_S (\text{PP}) = 1,00; A_S (\text{KP}) = 1,00$$

	ketoprofen	ethylparaben
	plocha píku průměr ze dvou měření	plocha píku průměr ze dvou měření
standard	3 137 455,5	54 841,5
vzorek	2 995 976,0	64 465,5

Tab. 27: Vzorek v acetonitrilu, MF, nástřik 5 μ l, průtok 1,5 ml/min, $n_{V_{KP}} = 0,0313$ g, $n_{V_Z} = 0,2030$ g, $Z = 2,5$

Po dosazení do vzorce 3-4 bylo zjištěno, že takto připravený vzorek obsahuje **4,99 %** ketoprofenu (**99,8 %** deklarovaného množství).

Při dávkovaném objemu 5 μ l a průtoku 1,5 ml/min byla vyzkoušena také mobilní fáze MF1. Použití této mobilní fáze se ale nakonec ukázalo jako nevhodné, protože se vzrůstajícím počtem měření se postupně zvyšoval faktor symetrie všech píků i přesto, že kolona byla dostatečně dlouho ekvilibrována.



Obr. 16: Pracovní roztok standardu o koncentraci ketoprofenu 625 mg/l, methylparabenu 25 mg/l a propylparabenu 12,5 mg/l v acetonitrilu, MF1, nástřik 5 μ l, průtok 1,5 ml/min

$$R_S (MP/EP) = 7,09; R_S (EP/PP) = 10,84; R_S (PP/KP) = 2,88$$

$$A_S (MP) = 1,27; A_S (EP) = 1,17; A_S (PP) = 1,08; A_S (KP) = 1,04$$

4.3 Krém – validace

4.3.1 Metoda

4.3.1.1 Optimální chromatografické podmínky

mobilní fáze:	acetonitril : voda : fosforečnanový pufr 3,5 (39:59:2, v/v/v)
kolona	SUPELCO Discovery C18, 5 µm, 150 mm x 4,6 mm
průtok (ml/min)	1,5
vlnová délka detekce (nm)	233
vnitřní standard	ethylparaben
dávkový objem (µl)	5
teplota	laboratorní

4.3.1.2 Příprava vzorku – krém

Do centrifugační zkumavky o objemu 50 ml se naváží přibližně 0,2000 g krému a přidá se 20,0 ml pracovního roztoku vnitřního standardu o koncentraci 10 mg/l v acetonitrilu. Směs se umístí na 30 minut do ultrazvukové lázně a poté se 15 minut centrifuguje při rychlosti 3000 otáček/min. Supernatant se zfiltruje přes membránový filtr o velikosti pórů 0,45 µm a dává se autosamplerem na kolonu.

4.3.2 Test vhodnosti chromatografického systému

4.3.2.1 Účinnost chromatografické kolony

Pro stanovení účinnosti chromatografické kolony byl použit pracovní roztok standardu o koncentraci ketoprofenu 625 mg/l, methylparabenu 25 mg/l a propylparabenu 12,5 mg/l v acetonitrilu. Hodnoty uváděné v tabulce Tab. 28 jsou průměrem ze tří měření.

analyzovaná látka	N (zdánlivý počet teoretických pater)
methylyparaben	5636
ethylparaben	8075
propylparaben	10457
ketoprofen	10256

Tab. 28: Účinnost chromatografické kolony

Účinnost chromatografické kolony je vyjádřena jako zdánlivý počet teoretických pater (N). Účinnost chromatografické kolony $N \geq 5636$.

4.3.2.2 Faktor symetrie

Pro stanovení faktoru symetrie píku (A_S) byl použit pracovní roztok standardu o koncentraci ketoprofenu 625 mg/l, methylyparabenu 25 mg/l a propylparabenu 12,5 mg/l v acetonitrilu. Hodnoty uváděné v tabulce Tab. 29 jsou průměrem ze tří měření.

analyzovaná látka	A_S (faktor symetrie)
methylyparaben	1,17
ethylparaben	1,08
propylparaben	0,99
ketoprofen	1,00

Tab. 29: Faktor symetrie

Parametr VYHOVUJE požadavku na faktor symetrie A_S v rozmezí 0,8–1,5.

4.3.2.3 Rozlišení

Pro určení rozlišení (R_S) byl použit pracovní roztok standardu o koncentraci ketoprofenu 625 mg/l, methylyparabenu 25 mg/l a propylparabenu 12,5 mg/l v acetonitrilu. Hodnoty uváděné v tabulce Tab. 30 jsou průměrem ze tří měření.

analyzovaná látka	R _S (rozlišení)
methylparaben - ethylparaben	8,09
ethylparaben - propylparaben	12,16
propylparaben - ketoprofen	3,58

Tab. 30: Rozlišení

Parametr VYHOVUJE požadavku na rozlišení $R_S > 1,5$.

4.3.2.4 Opakovatelnost

Opakovatelnost analýzy byla provedena opakovaným nástřikem pracovního roztoku standardu o koncentraci ketoprofenu 625 mg/l, methylparabenu 25 mg/l a propylparabenu 12,5 mg/l v acetonitrilu na kolonu. Hodnoty uváděné v tabulkách Tab. 31, 32, 33 a 34 jsou průměrem ze šesti měření. K výpočtům byla použita aplikace Microsoft Office Excel 2003.

Číslo měření	Plocha píku (A)	Retenční čas (t _R)
1	136271	2,669
2	136495	2,668
3	138157	2,662
4	136343	2,657
5	136659	2,657
6	137592	2,630

n	6	6
x	136919,5000	2,657
s	772,6095	0,014
s_R (%)	0,56	0,54

Tab. 31: Opakovatelnost pro methylparaben

Číslo měření	Plocha píku (A)	Retenční čas (t_R)
1	51008	3,957
2	50946	3,955
3	51213	3,944
4	51091	3,935
5	51164	3,932
6	51347	3,897

n	6	
x	51128,1667	3,936
s	145,1722	0,022
s_R (%)	0,28	0,55

Tab. 32: Opakovatelnost pro ethylparaben

Číslo měření	Plocha píku (A)	Retenční čas (t_R)
1	62758	6,596
2	62820	6,597
3	63179	6,574
4	62638	6,550
5	62864	6,549
6	63027	6,489

n	6	6
x	62881,0000	6,559
s	194,0659	0,040
s_R (%)	0,31	0,61

Tab. 33: Opakovatelnost pro propylparaben

Číslo měření	Plocha píku (A)	Retenční čas (t_R)
1	3018722	7,631
2	3016362	7,629
3	3034193	7,588
4	3024003	7,549
5	3028116	7,543
6	3037864	7,457

n	6	6
x	3026543,3333	7,566
s	8490,3978	0,065
s_R (%)	0,28	0,86

Tab. 34: Opakovatelnost pro ketoprofen

Relativní směrodatná odchylka s_R (%) se pohybovala v rozmezí 0,28–0,56 % pro plochu píku a v rozmezí 0,54–0,86 % pro retenční čas.

4.3.3 Validační parametry

4.3.3.1 Přesnost

Bylo analyzováno šest paralelně připravených pracovních roztoků pro přesnost. Každý roztok byl třikrát nastříknut na kolonu. Pro každé tři nástřiky byl vypočten průměr plochy píku. Takto získané plochy píků byly přepočteny na navážku 0,2000 g krému. Při přípravě roztoků docházelo k jejich zakoncentrování a proto byl pro stanovení relativní směrodatné odchylky využit poměr ploch stanovované látky (methylparaben, propylparaben a ketoprofen) a vnitřního standardu (ethylparaben). Hodnoty jsou zaznamenány v tabulkách Tab. 35, 36 a 37. K výpočtům byla použita aplikace Microsoft Office Excel 2003.

Roztok číslo	Průměr plochy MP	Navážka	Přepočet na navážku
1	134599,6667	0,2074	129797,1713
2	133548,3333	0,2075	128721,2851
3	132585,0000	0,2010	131925,3731
4	134520,6667	0,2011	133784,8500
5	132953,3333	0,2000	132953,3333
6	138718,0000	0,2069	134091,8318

n	6
x	131878,9741
s	2190,4522
s_R (%)	1,66

Roztok číslo	Průměr plochy EP	Poměr ploch MP/EP	Přepočet na navážku
1	64186,6667	2,0970	2,0222
2	63492,6667	2,1034	2,0273
3	64599,6667	2,0524	2,0422
4	66211,6667	2,0317	2,0206
5	64746,6667	2,0534	2,0534
6	65522,6667	2,1171	2,0465

n	6
x	2,0354
s	0,0138
s_R (%)	0,68

Tab. 35: Přesnost pro methylparaben

Roztok číslo	Průměr plochy PP	Navážka	Přepočet na navážku
1	28875,0000	0,2074	27844,7445
2	28541,3333	0,2075	27509,7189
3	28578,0000	0,2010	28435,8209
4	29001,3333	0,2011	28842,6985
5	28782,6667	0,2000	28782,6667
6	29956,0000	0,2069	28956,9841

n	6
x	28395,4389
s	592,4043
s_R (%)	2,08

Roztok číslo	Průměr plochy EP	Poměr ploch PP/EP	Přepočet na navážku
1	64186,6667	0,4499	0,4338
2	63492,6667	0,4495	0,4333
3	64599,6667	0,4424	0,4402
4	66211,6667	0,4380	0,4356
5	64746,6667	0,4445	0,4445
6	65522,6667	0,4572	0,4419

n	6
x	0,4382
s	0,0047
s_R (%)	1,06

Tab. 36: Přesnost pro propylparaben

Roztok číslo	Průměr plochy KP	Navážka	Přepočet na navážku
1	3086980,6667	0,2074	2976837,6728
2	3047034,3333	0,2075	2936900,5622
3	3042750,0000	0,2010	3027611,9403
4	3070425,6667	0,2011	3053630,6978
5	3021903,0000	0,2000	3021903,0000
6	3129923,3333	0,2069	3025542,1299

n	6
x	3007071,0005
s	42400,1202
s_R (%)	1,41

Roztok číslo	Průměr plochy EP	Poměr ploch KP/EP	Přepočet na navážku
1	64186,6667	48,0938	46,3778
2	63492,6667	47,9903	46,2557
3	64599,6667	47,1016	46,8673
4	66211,6667	46,3729	46,1192
5	64746,6667	46,6727	46,6727
6	65522,6667	47,7686	46,1755

n	6
x	46,4114
s	0,2975
s_R (%)	0,64

Tab. 37: Přesnost pro ketoprofen

Relativní směrodatná odchylka s_R (%) se pohybovala v rozmezí 0,64–1,06 %.

4.3.3.2 Správnost

Byla použita metoda standardního přídavku.

Byl šestkrát změřen pracovní roztok standardu o koncentraci ketoprofenu 625 mg/l, methylparabenu 25 mg/l a propylparabenu 12,5 mg/l v acetonitrilu (viz opakovatelnost).

Bylo analyzováno šest paralelně připravených pracovních roztoků pro správnost. Každý roztok byl třikrát nastříknut na kolonu.

Výtěžnost R_i (%) se vypočítá podle vzorce:

$$R_i = 100 \times \frac{c_i - c_v}{c_0}, \text{ kde}$$

c_0 koncentrace KP přidaná ke vzorku (viz opakovatelnost)

c_i koncentrace KP zjištěná při HPLC

c_v koncentrace KP zjištěná ve vzorku (viz přesnost)

Při přípravě roztoků docházelo k jejich zakoncentrování, a proto byl pro stanovení relativní směrodatné odchylky využit poměr ploch stanovované látky (methylparaben, propylparaben a ketoprofen) a vnitřního standardu (ethylparaben). Hodnoty jsou uvedeny v tabulkách Tab. 38, 39 a 40.

Navážka MP (mg)
5,216

A₀ MP	A₀ EP	A₀ MP/EP	c₀ (mg/100 ml)
136919,5000	51128,1667	2,6780	2,61

A_v MP	A_v EP	A_v MP/EP	c_v (mg/100 ml)
131878,9741	64793,3333	2,0354	1,98

Roztok č.	A_i MP	A_i EP	A_i MP/EP	c_i (mg/100 ml)
1	305643,0000	65853,3333	4,6413	4,52
2	309767,0000	65179,0000	4,7526	4,63
3	307125,3333	64382,0000	4,7704	4,64
4	307543,3333	65928,6667	4,6648	4,54
5	310240,6667	66079,3333	4,6950	4,57
6	310353,3333	65165,0000	4,7626	4,64

Roztok číslo	R_i (%)
1	97,31
2	101,46
3	102,13
4	98,19
5	99,31
6	101,84

n	6
x	100,04
s	2,05
s_R (%)	2,05

Tab. 38: Správnost pro methylparaben

Navážka PP (mg)
2,796

A₀ PP	A₀ EP	A₀ PP/EP	c₀ (mg/100 ml)
62881,0000	51128,1667	1,2299	1,40

A_v PP	A_v EP	A_v PP/EP	c_v (mg/100 ml)
28395,4389	64793,3333	0,4388	0,50

Roztok č.	A_i PP	A_i EP	A_i PP/EP	c_i (mg/100 ml)
1	107694,3333	65853,3333	1,6354	1,86
2	109644,6667	65179,0000	1,6822	1,91
3	108579,3333	64382,0000	1,6865	1,92
4	109669,6667	65928,6667	1,6635	1,89
5	110192,6667	66079,3333	1,6676	1,89
6	109805,3333	65165,0000	1,6850	1,91

Roztok číslo	R_i (%)
1	97,34
2	101,14
3	101,49
4	99,62
5	99,95
6	101,37

n	6
x	100,15
s	1,58
s_R (%)	1,58

Tab. 39: Správnost pro propylparaben

Navážka KP (mg)
125,01

A₀ KP	A₀ EP	A₀ KP/EP	c₀ (mg/100 ml)
3026543,3333	51128,1667	59,1952	62,50

A_v KP	A_v EP	A_v KP/EP	c_v (mg/100 ml)
3007071,0005	64793,3333	46,4102	49,00

Roztok č.	A_i KP	A_i EP	A_i KP/EP	c_i (mg/100 ml)
1	6853792,3333	65853,3333	104,0766	109,90
2	6850404,3333	65179,0000	105,1014	110,98
3	6805479,0000	64382,0000	105,7047	111,61
4	6769969,3333	65928,6667	102,6863	108,43
5	6845809,3333	66079,3333	103,5999	109,39
6	6888639,3333	65165,0000	105,7107	111,62

Roztok číslo	R_i (%)
1	97,42
2	99,15
3	100,16
4	95,07
5	96,61
6	100,18

n	6
x	98,10
s	2,07
s_R (%)	2,11

Tab. 40: Správnost pro ketoprofen

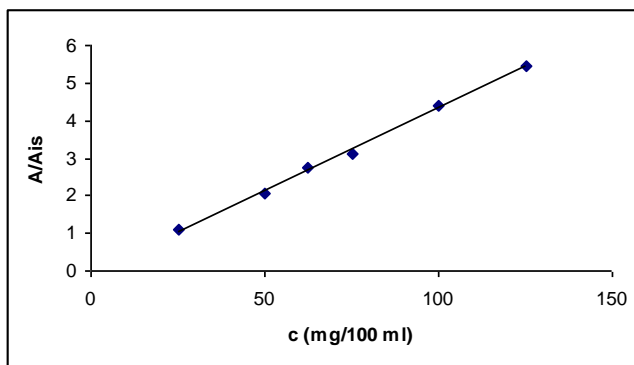
Relativní směrodatná odchylka $s_R (\%) \leq 2,11 \%$ a $R_i (\%)$ je v rozmezí 97,31–102,13 % pro MP, 97,34–101,49 % pro PP a 95,07–100,18 % pro KP.

4.3.3.3 Linearita

Byla použita metoda vnitřního standardu, kdy jako vnitřní standard byl užit ethylparaben (přídavek 10 mg/l). Bylo připraveno šest pracovních roztoků pro linearitu o koncentracích uvedených v tabulkách Tab. 41, 42 a 43. Každý roztok byl třikrát změřen a ze získaných hodnot byla vypočítána průměrná hodnota plochy píku pro každou koncentraci. Závislost A_{VZ}/A_{IS} roztoků pro linearitu na jejich koncentraci byla vyhodnocena metodou lineární regrese za použití aplikace Microsoft Office Excel 2003.

c (mg/100 ml)	A_{VZ}	A_{IS}	A_{VZ}/A_{IS}
25	56966,6667	51782,0000	1,1001
50	113852,6667	54738,6667	2,0799
62,5	142382,6667	51831,0000	2,7470
75	170001,0000	54337,3333	3,1286
100	226951,3333	51597,3333	4,3985
125	283679,6667	52127,6667	5,4420

c (mg/100 ml)	A_{VZ}/A_{IS}
25	1,1001
50	2,0799
62,5	2,7470
75	3,1286
100	4,3985
125	5,4420

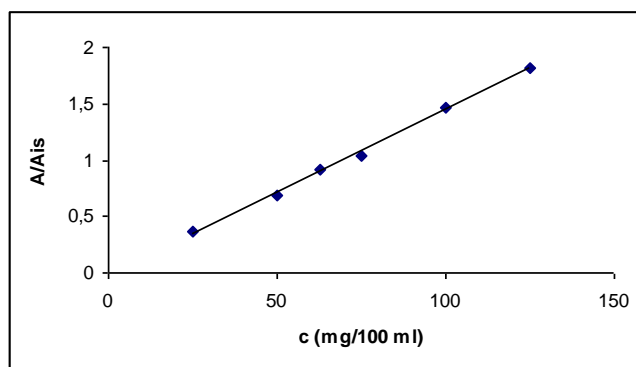


Regresní funkce	$y = k x + q$	
počet bodů	n	6
Parametry regresní přímky a odhady jejich směrodatných odchylek		
směrnice	k	$0,044 \pm 0,001$
absolutní člen	q	$-0,052 \pm 0,081$
koeficient korelace	R	0,9989
reziduální odchylka	S_{rez}	0,0810

Tab. 41: Linearita pro methylparaben

c (mg/100 ml)	A _{VZ}	A _{IS}	A _{VZ} /A _{IS}
25	18974,6667	51782,0000	0,3664
50	37819,0000	54738,6667	0,6909
62,5	47426,3333	51831,0000	0,9150
75	56557,6667	54337,3333	1,0408
100	75807,3333	51597,3333	1,4692
125	95100,0000	52127,6667	1,8243

c (mg/100 ml)	A _{VZ} /A _{IS}
25	0,3664
50	0,6909
62,5	0,9150
75	1,0408
100	1,4692
125	1,8243

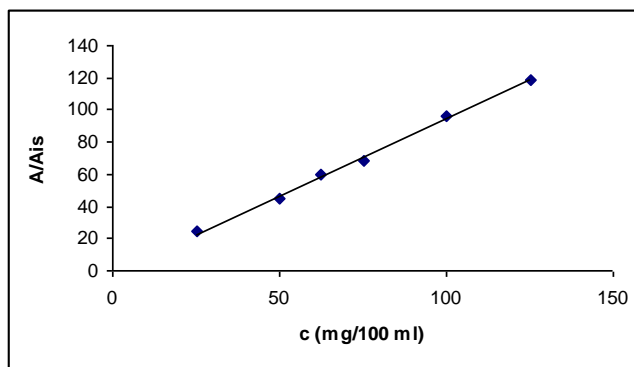


Regresní funkce	$y = k x + q$	
počet bodů	n	6
Parametry regresní přímky a odhady jejich směrodatných odchylek		
směrnice	k	$0,015 \pm 3,6 \times 10^{-4}$
absolutní člen	q	$-0,024 \pm 0,029$
koeficient korelace	R	0,9988
reziduální odchylka	S _{rez}	0,0289

Tab. 42: Linearita pro propylparaben

c (mg/100 ml)	A _{VZ}	A _{IS}	A _{VZ} /A _{IS}
25	1247486,0000	51782,0000	24,0911
50	2482217,6667	54738,6667	45,3467
62,5	3108930,3333	51831,0000	59,9820
75	3704313,0000	54337,3333	68,1725
100	4953444,6667	51597,3333	96,0019
125	6194641,0000	52127,6667	118,8359

c (mg/100 ml)	A _{VZ} /A _{IS}
25	24,0911
50	45,3467
62,5	59,9820
75	68,1725
100	96,0019
125	118,8359



Regresní funkce	$y = k x + q$	
počet bodů	n	6
Parametry regresní přímky a odhady jejich směrodatných odchylek		
směrnice	k	$0,958 \pm 0,023$
absolutní člen	q	$-1,125 \pm 1,836$
koeficient korelace	R	0,9989
reziduální odchylka	S _{rez}	1,8358

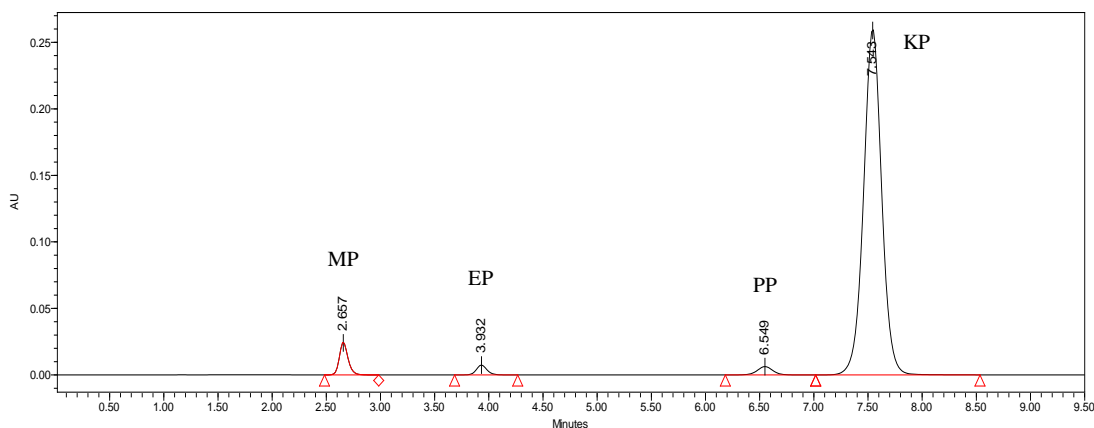
Tab. 43: Linearita pro ketoprofen

Koeficient korelace $R > 0,998$.

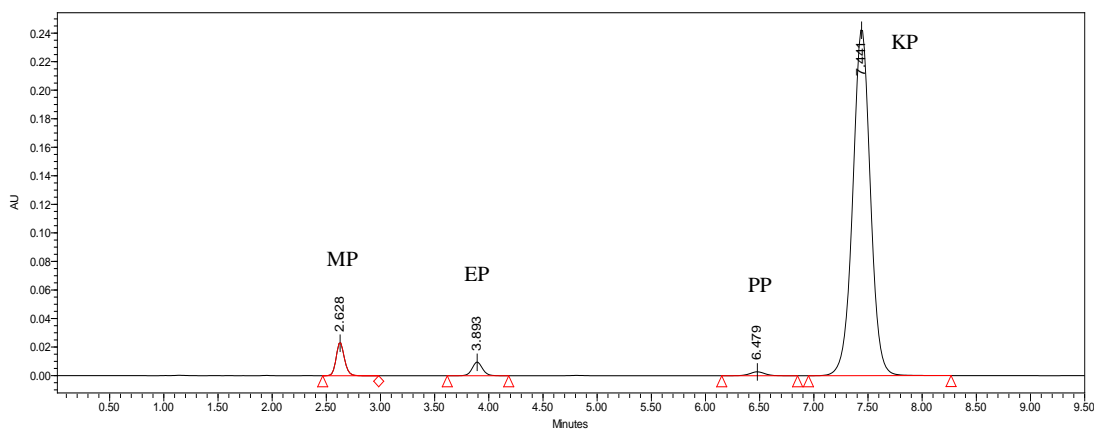
4.3.3.4 Selektivita

Pro zjištění selektivity byl použit pracovní roztok standardu o koncentraci ketoprofenu 625 mg/l, methylparabenu 25 mg/l a propylparabenu 12,5 mg/l v acetonitrilu. Separace všech složek je dokumentována na chromatogramu na obrázku Obr. 17. Píky jednotlivých složek mají odlišné retenční časy.

Chromatogram přípravku Ketonal 5% krém s přidavkem vnitřního standardu je dokumentován na obrázku Obr. 18. Píky methylparabenu, ethylparabenu, propylparabenu a ketoprofenu jsou dokonale rozlišeny.



Obr. 17: Pracovní roztok standardu o koncentraci ketoprofenu 625 mg/l, methylparabenu 25 mg/l a propylparabenu 12,5 mg/l v acetonitrilu, R_S (MP/EP) = 8,04, R_S (EP/PP) = 12,12, R_S (PP/KP) = 3,58



Obr. 18: Pracovní roztok pro přesnost v acetonitrilu, R_S (MP/EP) = 8,15, R_S (EP/PP) = 12,26, R_S (PP/KP) = 3,56

HPLC metoda umožňuje selektivně změřit plochu píků odpovídající účinné látce ketoprofenu.

4.3.3.5 Robustnost

Testování míry vlivu proměnných experimentálních podmínek na stanovení obsahu analytů bylo testováno u pracovního roztoku standardu o koncentraci ketoprofenu 625 mg/l, methylparabenu 25 mg/l a propylparabenu 12,5 mg/l v acetonitrilu.

4.3.3.5.1 Vliv složení mobilní fáze

Pro zjištění vlivu složení mobilní fáze na plochu píku a na retenční čas byly použity mobilní fáze při různých poměrech acetonitrilu, vody a fosforečnanového pufru o pH 3,5 uvedené v následující tabulce Tab. 44.

acetonitril	voda	pufr
35	62	3
37	61	2
39	59	2
40	58	2
41	56	3
43	55	2

Tab. 44: Složení mobilní fáze pro testování robustnosti

4.3.3.5.1.1 Vliv na plochu píku

Vliv na plochu píku je vyjádřen v procentech a vypočítá se podle následujícího vzorce:

$$A_R = 100 \times \frac{A_i}{A_{39:59:2}},$$

kde A_i je plocha píku získaná jako průměr ze tří měření pro dané složení mobilní fáze a $A_{39:59:2}$ je plocha píku získaná jako průměr ze tří měření pro optimální složení mobilní fáze acetonitril : voda : fosforečnanový pufr o pH 3,5 (39:59:2).

MF	Methylparaben	
	A_i	A_R (%)
35:62:3	138301,3333	101,01
37:61:2	137065,6667	100,10
39:59:2	136919,5000	100,00
40:58:2	136639,3333	99,79
41:56:3	136920,0000	100,00
43:55:2	136747,3333	99,87

Tab. 45: Vliv složení mobilní fáze na plochu píku MP, průměr ze tří měření

MF	Ethylparaben	
	A _i	A _R (%)
35:62:3	51379,6667	100,49
37:61:2	51442,0000	100,61
39:59:2	51128,1667	100,00
40:58:2	51058,6667	99,86
41:56:3	51211,3333	100,16
43:55:2	51398,3333	100,53

Tab. 46: Vliv složení mobilní fáze na plochu píku EP, průměr ze tří měření

MF	Propylparaben	
	A _i	A _R (%)
35:62:3	62967,3333	100,14
37:61:2	63046,6667	100,26
39:59:2	62881,0000	100,00
40:58:2	62682,6667	99,68
41:56:3	62815,0000	99,89
43:55:2	63027,6667	100,23

Tab. 47: Vliv složení mobilní fáze na plochu píku PP, průměr ze tří měření

MF	Ketoprofen	
	A _i	A _R (%)
35:62:3	3004250,0000	99,26
37:61:2	3020514,6667	99,80
39:59:2	3026543,3333	100,00
40:58:2	3032596,3333	100,20
41:56:3	3046360,0000	100,65
43:55:2	3062127,0000	101,17

Tab. 48: Vliv složení mobilní fáze na plochu píku KP, průměr ze tří měření

Byly získány výsledky uvedené v tabulkách Tab. 45, 46, 47 a 48. Relativní plocha píků vztažená na plochu píku při optimálním složení mobilní fáze se pohybovala

v rozmezí 99,26 % až 101,17 %, a proto v uvedeném rozmezí změny v poměru složek mobilní fáze neovlivňují stanovení analyzovaných látek.

4.3.3.5.1.2 Vliv na retenční čas

Složení mobilní fáze ovlivňuje dobu analýzy. V celém testovacím rozmezí však dochází k dokonalé separaci všech složek.

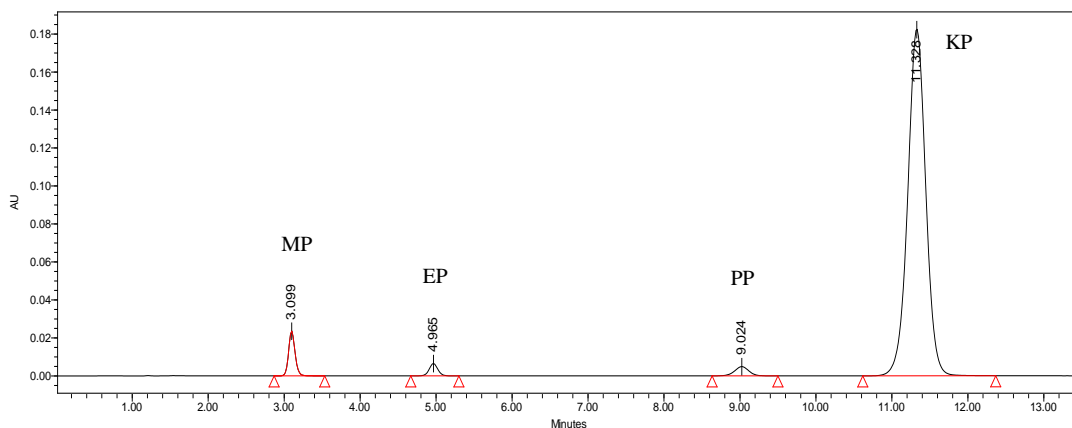
MF	Methylparaben	Ethylparaben
	t_R (min)	t_R (min)
35:62:3	3,105	4,977
37:61:2	2,827	4,350
39:59:2	2,657	3,937
40:58:2	2,513	3,660
41:56:3	2,424	3,466
43:55:2	2,287	3,169

Tab. 49: Vliv složení mobilní fáze na retenční časy píků MP a EP, průměr ze tří měření

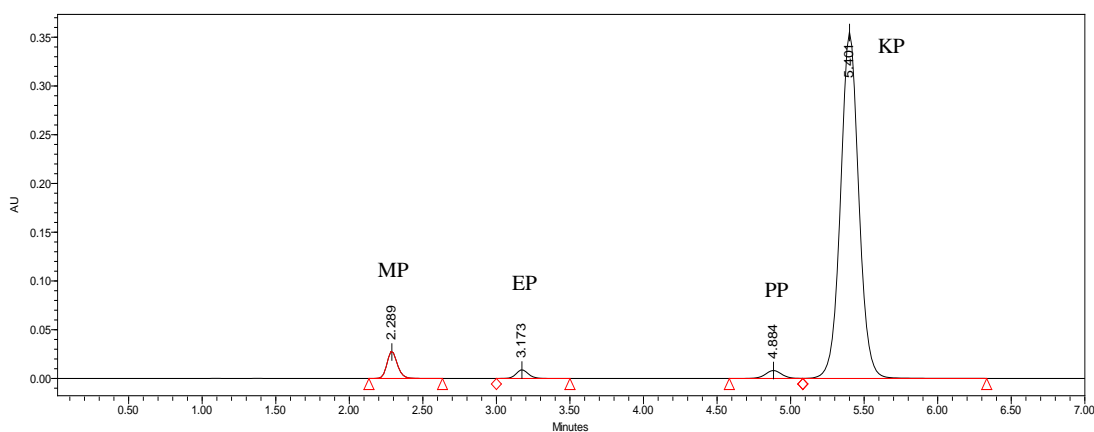
MF	Propylparaben	Ketoprofen
	t_R (min)	t_R (min)
35:62:3	9,047	11,365
37:61:2	7,551	9,087
39:59:2	6,559	7,566
40:58:2	5,969	6,857
41:56:3	5,534	6,267
43:55:2	4,879	5,396

Tab. 50: Vliv složení mobilní fáze na retenční časy píků PP a KP, průměr ze tří měření

Na obrázcích Obr. 19 a 20 jsou znázorněny chromatogramy při poměrech acetonitrilu, vody a fosforečnanového pufru o pH 3,5 = 35:62:3 a 43:55:2. Jedná se o krajní hranice testovacího rozmezí. Z chromatogramů je patrné, že při zvýšení podílu vody v mobilní fázi dochází k prodloužení analýzy a naopak při snížení podílu vody v mobilní fázi dochází ke zkrácení doby analýzy.



Obr. 19: Pracovní roztok standardu o koncentraci ketoprofenu 625 mg/l, methylparabenu 25 mg/l a propylparabenu 12,5 mg/l v acetonitrilu, MF 35:62:3



Obr. 20: Pracovní roztok standardu o koncentraci ketoprofenu 625 mg/l, methylparabenu 25 mg/l a propylparabenu 12,5 mg/l v acetonitrilu, MF 43:55:2

4.3.3.5.2 Stabilita

Stabilita pracovního roztoku standardu o koncentraci ketoprofenu 625 mg/l, methylparabenu 25 mg/l a propylparabenu 12,5 mg/l v acetonitrilu byla testována za uchovávání:

1. za snížené teploty (5 °C), chráněné před světlem
2. za laboratorní teploty, za přístupu světla

Odchylka vyjádřená v procentech je vypočtena podle vzorce:

$$S_T = 100 \times \frac{|A_t - A_0|}{A_0},$$

kde A_t je plocha píku v čase t , A_0 je plocha píku v čase 0 a t je čas od přípravy roztoku.

t (hod)	A_t	S_T (%)
0	136919,5000	0
24	135104,3333	1,32
48	130244,7500	4,87
72	132557,7500	3,18

Tab. 51: Stabilita methylparabenu za podmínek uchovávání při laboratorní teplotě, za přístupu světla

t (hod)	A_t	S_T (%)
0	136919,5000	0
24	136108,3333	0,59
48	135251,5000	1,22
72	133358,7500	2,60

Tab. 52: Stabilita methylparabenu za podmínek uchovávání při snížené teplotě, chráněné před světlem

t (hod)	A_t	S_T (%)
0	51128,1667	0
24	50447,3333	1,33
48	48517,5000	5,11
72	49457,2500	3,27

Tab. 53: Stabilita ethylparabenu za podmínek uchovávání při laboratorní teplotě, za přístupu světla

t (hod)	A_t	S_T (%)
0	51128,1667	0
24	50792,0000	0,66
48	50520,7500	1,19
72	49858,2500	2,48

Tab. 54: Stabilita ethylparabenu za podmínek uchovávání při snížené teplotě, chráněné před světlem

t (hod)	A_t	S_T (%)
0	62881,0000	0
24	62287,3333	0,94
48	60042,5000	4,51
72	61100,7500	2,83

Tab. 55: Stabilita propylparabenu za podmínek uchovávání při laboratorní teplotě, za přístupu světla

t (hod)	A_t	S_T (%)
0	62881,0000	0
24	62467,3333	0,66
48	62404,2500	0,76
72	61227,2500	2,63

Tab. 56: Stabilita propylparabenu za podmínek uchovávání při snížené teplotě, chráněné před světlem

t (hod)	A_t	S_T (%)
0	3026543,3333	0
24	2933324,0000	3,08
48	2874553,2500	5,02
72	2855134,5000	5,66

Tab. 57: Stabilita ketoprofenu za podmínek uchovávání při laboratorní teplotě, za přístupu světla

t (hod)	A_t	S_T (%)
0	3026543,3333	0
24	2966564,6667	1,98
48	2992364,2500	1,13
72	2871930,5000	5,11

Tab. 58: Stabilita ketoprofenu za podmínek uchovávání při snížené teplotě, chráněné před světlem

Z tabulek Tab. 51 a 52 vyplývá, že roztok methylparabenu v acetonitrilu je možné používat při uchovávání za snížené teploty, chráněné před světlem do 24 hodin od jeho přípravy, kdy $S_T (\%) < 0,59 \%$.

Z tabulek Tab. 53 a 54 vyplývá, že roztok ethylparabenu v acetonitrilu je možné používat při uchovávání za snížené teploty, chráněné před světlem do 24 hodin od jeho přípravy, kdy $S_T (\%) < 0,66 \%$.

Z tabulek Tab. 55 a 56 vyplývá, že roztok propylparabenu v acetonitrilu je možné používat při uchovávání za laboratorní teploty, za přístupu světla do 24 hodin od jeho přípravy a při uchovávání za snížené teploty, chráněné před světlem do 48 hodin od jeho přípravy, kdy $S_T (\%) < 0,76 \%$.

Z tabulek Tab. 57 a 58 vyplývá, že roztok ketoprofenu v acetonitrilu je nutné používat vždy čerstvý.

5 SHRNU TÍ A ZÁVĚR

5.1 Shrnutí

Tato práce navazuje na diplomovou práci Lucie Bajcurové „Využití HPLC ve farmaceutické analýze“, FaF UK Hradec Králové 2010.

5.1.1 PRONTOFLEX 10% kožní sprej, roztok

Byla validována již vyvinutá metoda pro stanovení množství ketoprofenu v léčivém přípravku PRONTOFLEX 10% kožní sprej, roztok.

5.1.1.1 Metoda

5.1.1.1.1 Optimální chromatografické podmínky

mobilitní fáze:	acetonitril : voda : fosforečnanový pufr 3,5 (40:58:2, v/v/v)
kolona	SUPELCO Discovery C18, 5 μ m, 125 mm x 4,6 mm
průtok (ml/min)	1,0
vlnová délka detekce (nm)	233
vnitřní standard	ethylparaben
dávkový objem (μ l)	10
teplota	laboratorní

5.1.1.1.2 Příprava vzorku – sprej

Do odměrné baňky se naváží přibližně 0,1250 g roztoku a přidá se 20,0 ml pracovního roztoku vnitřního standardu o koncentraci 10 mg/l ve směsi acetonitril: methanol 3:1. Směs se umístí do ultrazvukové lázně na 30 minut, poté zfiltruje přes membránový filtr o velikosti pórů 0,45 μ m a dávkuje autosamplrem na kolonu.

5.1.1.2 Test vhodnosti chromatografického systému

Hodnoty uvedené v následující tabulce Tab. 59 jsou hodnoty získané pro ketoprofen při testu vhodnosti chromatografického systému.

Účinnost chromatografické kolony		$N = 4733$
Faktor symetrie		$A_S = 1,08$
Rozlišení mezi EP a KP		$R_S = 8,35$
Opakovatelnost	Plocha píku	$s_R = 0,25 \%$
	Retenční čas	$s_R = 0,41 \%$

Tab. 59: Test vhodnosti chromatografického systému (pro ketoprofen)

5.1.1.3 Validační parametry

Hodnoty uvedené v následující tabulce Tab. 60 jsou hodnoty validačních parametrů získané pro ketoprofen.

Přesnost		$s_R = 1,43 \%$	
Správnost		$s_R = 2,09 \%$	
		R_i v rozmezí 97,96–103,96 %	
Linearita		$R = 0,9994$	
Selektivita		separace všech píků	
Robustnost	Složení MF	A	není negativní vliv na plochu píku
		t_R	není negativní vliv na separaci
	Stabilita		do 48 hodin

Tab. 60: Validační parametry (pro ketoprofen)

5.1.2 Ketonal 5% krém

Bylo dále pokračováno ve vývoji metody pro stanovení množství ketoprofenu v léčivém přípravku Ketonal 5% krém. Vyvinutá metoda byla validována.

5.1.2.1 Metoda

5.1.2.1.1 Optimální chromatografické podmínky

mobilitní fáze:	acetonitril : voda : fosforečnanový pufr 3,5 (39:59:2, v/v/v)
kolona	SUPELCO Discovery C18, 5 μ m, 150 mm x 4,6 mm
průtok (ml/min)	1,5
vlnová délka detekce (nm)	233
vnitřní standard	ethylparaben
dávkovaný objem (μ l)	5
teplota	laboratorní

5.1.2.1.2 Příprava vzorku – krém

Do centrifugační zkumavky o objemu 50 ml se naváží přibližně 0,2000 g krému a přidá se 20,0 ml pracovního roztoku vnitřního standardu o koncentraci 10 mg/l v acetonitrilu. Směs se umístí na 30 minut do ultrazvukové lázně a poté se 15 minut centrifuguje při rychlosti 3000 otáček/min. Supernatant se zfiltruje přes membránový filtr o velikosti pórů 0,45 μ m a dává se autosamplerem na kolonu.

5.1.2.2 Test vhodnosti chromatografického systému

Hodnoty uvedené v následujících tabulkách Tab. 61, 62 a 63 jsou hodnoty získané pro methylparaben, propylparaben a ketoprofen při testu vhodnosti chromatografického systému.

Účinnost chromatografické kolony		N = 5636
Faktor symetrie		$A_S = 1,17$
Rozlišení mezi MP a EP		$R_S = 8,09$
Opakovatelnost	Plocha píku	$s_R = 0,56 \%$
	Retenční čas	$s_R = 0,54 \%$

Tab. 61: Test vhodnosti chromatografického systému (pro methylparaben)

Účinnost chromatografické kolony		N = 10457
Faktor symetrie		$A_S = 0,99$
Rozlišení	mezi EP a PP	$R_S = 12,16$
	mezi PP a KP	$R_S = 3,58$
Opakovatelnost	Plocha píku	$s_R = 0,31 \%$
	Retenční čas	$s_R = 0,61 \%$

Tab. 62: Test vhodnosti chromatografického systému (pro propylparaben)

Účinnost chromatografické kolony		N = 10256
Faktor symetrie		$A_S = 1,00$
Rozlišení mezi PP a KP		$R_S = 3,58$
Opakovatelnost	Plocha píku	$s_R = 0,28 \%$
	Retenční čas	$s_R = 0,86 \%$

Tab. 63: Test vhodnosti chromatografického systému (pro ketoprofen)

5.1.2.3 Validační parametry

Hodnoty uvedené v následujících tabulkách Tab. 64, 65 a 66 jsou hodnoty validačních parametrů získané pro methylparaben, propylparaben a ketoprofen.

Přesnost			$s_R = 0,68 \%$
Správnost			$s_R = 2,05 \%$
			R_i v rozmezí 97,31–102,13 %
Linearita			$R = 0,9989$
Selektivita			separace všech píků
Robustnost	Složení MF	A	není negativní vliv na plochu píku
		t_R	není negativní vliv na separaci
	Stabilita		24 hodin za snížené teploty

Tab. 64: Validační parametry (pro methylparaben)

Přesnost			$s_R = 1,06 \%$
Správnost			$s_R = 1,58 \%$
			R_i v rozmezí 97,34–101,49 %
Linearita			$R = 0,9988$
Selektivita			separace všech píků
Robustnost	Složení MF	A	není negativní vliv na plochu píku
		t_R	není negativní vliv na separaci
	Stabilita		48 hodin za snížené teploty

Tab. 65: Validační parametry (pro propylparaben)

Přesnost			$s_R = 0,64 \%$
Správnost			$s_R = 2,11 \%$
			R_i v rozmezí 95,07–100,18 %
Linearita			$R = 0,9989$
Selektivita			separace všech píků
Robustnost	Složení MF	A	není negativní vliv na plochu píku
		t_R	není negativní vliv na separaci
	Stabilita		vždy čerstvý roztok

Tab. 66: Validační parametry (pro ketoprofen)

5.2 Závěr

Byla zpracována rešerše k problematice validací a validačních postupů.

Byla validována již vyvinutá metoda pro stanovení množství ketoprofenu v léčivém přípravku PRONTOFLEX 10% kožní sprej, roztok. Metodu lze použít pro stanovení množství ketoprofenu v léčivém přípravku PRONTOFLEX 10% kožní sprej, roztok.

Bylo dále pokračováno ve vývoji metody pro stanovení množství ketoprofenu v léčivém přípravku Ketonal 5% krém. Vyvinutá metoda byla validována. Metodu lze použít pro stanovení množství ketoprofenu v léčivém přípravku Ketonal 5% krém.

Cíl práce byl splněn.

6 POUŽITÉ ZDROJE

- [1] Kazakevich Y., LoBrutto R. *HPLC for Pharmaceutical Scientists*. USA: WILEY. 2007. 1164 s. ISBN 978-0-471-68162-5
- [2] Klimeš J. a kol. *Kontrola léčiv II*. 2. vydání. Praha: Karolinum. 2007. 94 s. ISBN 978-80-246-1460-1
- [3] Klimeš J. a kol. *Kontrola léčiv I*. 1. dotisk 1. vydání. Praha: Karolinum. 2006. 149 s. ISBN 80-246-0419-1. Kapitola 1.3.2: Vysokoučinná kapalinová chromatografie, s. 33–40
- [4] Karlíček R. a kol. *Analytická chemie pro farmaceuty*. Dotisk 2. vydání. Praha: Karolinum. 2005. 281 s. ISBN 80-246-0348-9. Kapitola 10: Separační metody, s. 265–281
- [5] Ahuja S., Dong M. W. *Handbook of Pharmaceutical Analysis by HPLC: Volume 6 (Separation Science and Technology)*. UK: Elsevier. 2005. 678 s. ISBN 0-12-088547-6
- [6] ČSN EN ISO/IEC 17025:2005. Posuzování shody – Všeobecné požadavky na způsobilost zkušebních a kalibračních laboratoří
- [7] *Official web site for ICH (The International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use)* [online]. poslední úpravy 19.10.2010 [citováno 7. listopadu 2010]. <<http://www.ich.org/LOB/media/MEDIA417.pdf>>
- [8] American Pharmacopoeial Convention Inc. *United State Pharmacopoeia (USP 32)*. Rockville. 2009. ISBN 1-889788-69-2.
- [9] *FDA U.S. Food and Drug Administration* [online]. [citováno 7. listopadu 2010]. <<http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/UCM134409.pdf>>
- [10] *FDA U.S. Food and Drug Administration* [online]. [citováno 7. listopadu 2010]. <<http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/ucm122858.pdf>>

- [11] *FDA U.S. Food and Drug Administration* [online]. [citováno 7. listopadu 2010]. <<http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/UCM070107.pdf>>
- [12] Bliesner D. M. *Validating chromatographic methods: A Practical Guide*. USA: WILEY. 2006. 291 s. ISBN 978-0-471-74147-3
- [13] *Český lékopis 2009 (ČL 2009)*. 1. vydání. Praha: Grada Publishing, a. s. 2009. 3968 s. ISBN 978-80-247-2994-7
- [14] *Státní ústav pro kontrolu léčiv* [online]. c2007, [citováno 9. listopadu 2010]. <http://www.sukl.cz/uploads/Pokyny_a_formulare/VYR/VYR_26_verze2.pdf>
- [15] Ahuja S., Rasmussen H. *HPLC Method Development for Pharmaceuticals: Volume 8 (Separation Science and Technology)*. Italy: Elsevier. 2007. 513 s. ISBN 978-0-12-370540-2
- [16] Douša M. *HPLC.cz* [online]. c1999, poslední úpravy 05.03.2010 [citováno 13. listopadu 2010]. <<http://www.hplc.cz>>
- [17] Terminologická komise: *Nomenklatura a terminologie – Metrologická terminologie v chemii*. Chem. Listy, **94**, 2000, s. 439–444; <<http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/archiv/2000-PDF/07-PDF/439-444.pdf>>
- [18] Autorský kolektiv. *Remedia Compendium*. 4. vydání. Praha: Panax Co. 2009. 946 s. ISBN 978-80-902806-4-9
- [19] Komárek P., Rabišková M. a kol. *Technologie léků*. 3. vydání. Praha: Galén. 2006. 399 s. ISBN 80 7262 423 7
- [20] Hartl J., Doležal M., Miletín M. a kol. *Farmaceutická chemie IV*. 1. vydání. Praha: Karolinum. 2006. 166 s. ISBN 80-246-1169-4. Kapitola 1.1: Dezinficiencia a antiseptika, s. 8–34
- [21] Sklenář Z. a kol. *Magistraliter receptura v dermatologii*. 1. vydání. Praha: Galén. 2009. 441 s. ISBN 978-80-7262-588-8

- [22] British Pharmacopoeia Commission *British Pharmacopoeia 2004, Volume II*. 1. vydání. London: HMSO. 2004. ISBN 0 11 322663 2. Ketoprofen s. 1125–1126
- [23] Dvořák J., Hájková R., Matysová L. a kol.: *Simultaneous HPLC determination of ketoprofen and its degradation products in the presence of preservatives in pharmaceuticals*. J. Pharm. Biomed. Anal., **36**, 2004, s. 625–629
- [24] Dvořák J.: *Vývoj a validace HPLC metody pro stanovení ketoprofenu, rozkladných produktů a konzervačních látek*. Hradec Králové. 2003. 63 s. Diplomová práce na Farmaceutické fakultě Univerzity Karlovy na Katedře analytické chemie. Vedoucí diplomové práce Prof. RNDr. Petr Solich, CSc.
- [25] Bempong D. K., Bhattacharyya L.: *Development and validation of a stability-indicating high-performance liquid chromatographic assay for ketoprofen topical penetrating gel*. J. Chromatogr., A, **1073**, 2005, s. 341–346
- [26] de Jalón E. G., Josa M., Campanero M. A. a kol.: *Determination by high-performance liquid chromatography of ketoprofen in vitro in rat skin permeation samples*. J. Chromatogr., A, **870**, 2000, s. 143–149
- [27] Martín M. J., Pablos F., González A. G.: *Simultaneous determination of caffeine and non-steroidal anti-inflammatory drugs in pharmaceutical formulation and blood plasma by reversed-phase HPLC from linear gradient elution*. Talanta, **49**, 1999, s. 453–459
- [28] Zakeri-Milani P., Barzegar-Jalali M., Tajerzadeh H. a kol.: *Simultaneous determination of naproxen, ketoprofen and phenol red in samples from rat intestinal permeability studies: HPLC method development and validation*. J. Pharm. Biomed. Anal., **39**, 2005, s. 624–630
- [29] Chawla S., Ghosh S., Sihorkar V. a kol.: *High-performance liquid chromatography method development and validation for simultaneous determination of five model compounds, antipyrine, metoprolol, ketoprofen, furosemide and phenol red, as a tool for the standardization of rat in situ intestinal permeability studies using timed wavelength detection*. Biomed. Chromatogr., **20**, 2006, s. 349–357

- [30] Aboul-Enein H. Y., Dal A. G., Tuncel M.: *A validated method development for ketoprofen by a flow-injection analysis with UV-detection and its application to pharmaceutical formulations*. *IL FARMACO*, **58**, 2003, s. 419–422
- [31] Šafra J., Pospíšilová M.: *Separation and determination of ketoprofen, methylparaben and propylparaben in pharmaceutical preparation by micellar electrokinetic chromatography*. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **48**, 2008, s. 452–455
- [32] Šabartová J.: *Věstník SÚKL 1/1994*. Státní Ústav pro Kontrolu Léčiv (1993), *Validace Analytických Metod*, s. 6–8

Poznámky