



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

Zavadilová Hana

Hodnocení vybrané účinné látky v přípravku VI.

Diplomová práce

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

Hradec Králové 2011

Prohlašuji, že jsem svou diplomovou práci vypracovala samostatně. Veškerá literatura a podkladové materiály, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány. Práce nebyla využita k získání stejného nebo jiného titulu.

V Hradci Králové 16. září 2011

Hana Zavadilová

Na tomto místě bych ráda poděkovala vedoucímu diplomové práce PharmDr. Petru Kastnerovi, Ph.D. za odborné vedení, cenné rady a připomínky k diplomové práci. A dále děkuji všem pracovníkům katedry farmaceutické chemie a kontroly léčiv za ochotu a vstřícné jednání.

OBSAH

1. ÚVOD.....	7
2. TEORETICKÁ ČÁST.....	9
2.1. CHROMATOGRAFICKÉ METODY	10
2.2. KAPALINOVÁ CHROMATOGRAFIE.....	12
2.3. CHROMATOGRAF.....	14
2.4. UPLC KOLONY	18
2.5. VALIDACE CHROMATOGRAFICKÉ METODY A VALIDAČNÍ PARAMETRY.....	21
2.5.1. Správnost	21
2.5.2. Přesnost	21
2.5.3. Selektivita.....	22
2.5.4. Detekční limit.....	22
2.5.5. Kvantitativní limit	23
2.5.6. Robustnost	23
2.5.7. Linearita	23
2.5.8. Rozsah	24
2.5.9. Test způsobilosti	24
2.6. PŘÍPRAVEK	25
2.7. CINCHOKAINI HYDROCHLORIDUM	26
2.8. DEXAMETHASONUM.....	29
3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	33
3.1. MATERIÁL A POMŮCKY	34
3.1.1. Chemikálie	34
3.1.2. Sestava pro HPLC s UV-VIS detektorem	34
3.1.3. Přístroje	34
3.1.4. Pomůcky	35
3.1.5. Složení modelového léčivého přípravku	35
3.2. ÚPRAVA VZORKU	36
3.3. OPTIMALIZACE CHROMATOGRAFICKÝCH PODMÍNEK.....	38
3.3.1. Optimalizace chromatografických podmínek pro stanovení cinchokainu-hydrochloridu	38
3.3.2. Optimalizace chromatografických podmínek pro stanovení nečistoty dexamethasonu	41
3.4. VALIDACE METODY	44
3.4.1. Validační parametry metody pro stanovení cinchokainu-hydrochloridu	44
3.4.1.1. Linearita	44
3.4.1.2. Správnost	45
3.4.1.3. Opakovatelnost	47
3.4.2. Validační parametry metody pro stanovení nečistoty dexamethasonu	48
3.4.2.1. Selektivita	48

3.4.2.2. Linearita a LOQ	49
3.4.2.3. Přesnost	51
3.4.2.4. Stabilita vzorku	52
3.4.2.5. Test způsobilosti	53
4. VÝSLEDKY A DISKUSE.....	54
4.1. OPTIMALIZACE CHROMATOGRAFICKÝCH PODMÍNEK.....	55
4.1.1. Optimalizace chromatografických podmínek pro stanovení cinchokainu-hydrochloridu	55
4.1.2. Optimalizace chromatografických podmínek pro stanovení nečistoty dexamethasonu	56
4.2. VALIDACE METODY	59
4.2.1. Validační parametry metody pro stanovení cinchokainu-hydrochloridu	59
4.2.1.1. Linearita	59
4.2.1.2. Správnost	61
4.2.1.3. Opakovatelnost	62
4.2.2. Validační parametry metody pro stanovení nečistoty dexamethasonu	63
4.2.2.1. Selektivita	63
4.2.2.2. Linearita a LOQ	66
4.2.2.3. Přesnost	69
4.2.2.4. Stabilita vzorků	69
4.2.2.5. Test způsobilosti	71
5. ZÁVĚR	72
LITERATURA.....	75
SOUHRN	79
ABSTRACT.....	80

1. ÚVOD

Cílem mojí diplomové práce bylo vyvinutí dvou metod UPLC. První metoda byla metodou pro stanovení cinchokainu-hydrochloridu. Druhá metoda byla vyvinuta pro stanovení nečistoty dexamethasonu v léčivém přípravku.

Zkoušený léčivý přípravek obsahoval dexamethason, cinchokain-hydrochlorid, butandiol a glycerol. Jedná se o otorinolaryngologikum v lékové formě ušních kapek. Jeho indikací jsou zánětlivá onemocnění ucha, ušního boltce. Používá se jako pomocný lék při akutním zánětu středního ucha. [10]

Cinchokain-hydrochlorid patří mezi lokální anestetika amidového typu. Jeho anestetický účinek je dán intrakcí s napětově řízenými sodíkovými kanály. [12]

Dexamethason je syntetický glukokortikoid s minimální mineralokortikoidní účinností. Kromě jiných účinků má účinky protizánětlivé, antialergické, antipyretické a imunosupresivní. [19, 20]

Pro separaci byla použita kolona KinetexTM s reverzní fází C18 od firmy Phenomenex. Rozměry kolony byly 150 x 2,1 mm, velikost částic byla 1,7 μm .

2. TEORETICKÁ ČÁST

2.1 CHROMATOGRAFICKÉ METODY

Chromatografické metody jsou metody separační, umožňující analýzu směsí s možností kvalitativního i kvantitativního hodnocení separovaných složek směsi. Chromatografie využívá dělení analyzovaných látek mezi dvěma fázemi, z nichž jedna je stacionární – nepohyblivá a druhá je mobilní – pohyblivá. V průběhu chromatografického procesu dochází k postupnému a mnohokrát opakovanému vytváření rovnovážných stavů dělených látek mezi stacionární fází a mobilní fází, která unáší separované látky. Pevná stacionární fáze se nazývá sorbent. Stacionární fáze může být pevná látka nebo kapalina nanesená na tuhý nosič nebo gel. Stacionární fáze se může naplnit do kolon nebo rovnoměrně rozprostřít do vrstvy nebo filmu. [1, 6].

Podle skupenství mobilní fáze se chromatografické metody dělí:

- kapalinová chromatografie (LC) – mobilní fází je kapalina
- plynová chromatografie (GC) – mobilní fází je inertní plyn
- chromatografie s nadkritickou mobilní fází [6, 2]

Kapalinová chromatografie může být realizována:

- a) v plošném uspořádání – tenkovrstvá chromatografie (TLC) nebo papírová chromatografie (PC)
- b) v kolonovém uspořádání – vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC) [6]

Základním předpokladem pro separaci látek jsou vzájemné interakce, ke kterým dochází při styku stacionární i mobilní fáze s dělenými látkami. Podle převažujícího mechanismu interakcí rozlišujeme chromatografické metody na:

- Adsorpční chromatografii – podstatou separace je rozdílná adsorbovatelnost dělených látek na aktivní povrch adsorbentu. V kapalinové chromatografii se jedná o separaci pevná fáze – kapalina (LLC), v plynové chromatografii pevná fáze – plyn (GSC).
- Rozdělovací chromatografii – k dělení látek dochází na základě rozdílné rozpustnosti v nepohyblivé fázi a pohyblivé fázi v důsledku různého rozdělovacího koeficientu. U kapalinové rozdělovací chromatografie je podstatou separace rozdílná rozpustnost dělených látek ve dvou vzájemně nemísitelných kapalinách (LLC), přičemž kapalina použitá jako stacionární fáze je zakotvena na vhodném nosiči. V plynové rozdělovací chromatografii

jde o separaci v systému kapalina (zakotvená fáze) – plyn (GLC) a podstatou separačního procesu je rozdílná rozpustnost dělených látek unášených nosným plynem v kapalně stacionární fázi.

- Iontově výměnnou chromatografií (IEC) – dochází k rozdělení iontů na základě výměny iontů mezi stacionární fází tvořenou iontoměničem (katexem nebo anexem) a mobilní fází obsahující ionty elektrolytu. Podstatou separace je tedy rozdílná afinita dělených látek, které jsou zpravidla ve formě iontů, k iontovým skupinám iontoměniče. Rozdílnost afinity separovaných látek je dána rozdílnými hodnotami disociačních konstant ionogenních skupin, různou velikostí iontů a různým mocenstvím iontů. Realizuje se jen jako kapalinová chromatografie.
 - Gelovou chromatografií – kapalinová chromatografie, při níž jsou analyzované látky separovány na základě velikosti molekul. Velké molekuly procházejí vrstvou stacionární fáze, menší se zadržují v důsledku různě velké difúze do pórů částic gelu.
 - Afinitní chromatografie – základem jsou specifické reakce funkčních skupin zabudovaných do syntetických molekul matrice (podobné gelům) se separovanými látkami. Jedná se o interakce charakteristické pro některé biologické a biochemické procesy. V analýze léčiv má omezené uplatnění.
- [2, 6]

2.2 KAPALINOVÁ CHROMATOGRRAFIE

Kapalinová chromatografie umožňuje dělení většiny organických i anorganických látek. Využívá se především k separaci směsí látek, které jsou netěkavé, nebo špatně těkavé a termicky labilní. Odstraňuje tak hlavní nedostatek plynové chromatografie. Protože většina léčiv není těkavá, je v analýze léčiv kapalinová chromatografie použitelnější technikou než plynová chromatografie. V kapalinové chromatografii se využívají především čtyři systémy podle převažujícího mechanismu separace:

- 1) kapalinová adsorpční chromatografie
- 2) kapalinová rozdělovací chromatografie
- 3) gelová permeační chromatografie
- 4) iontově výměnná chromatografie

Ve skutečnosti se mechanismy separace navzájem prolínají a někdy nelze jasně říci, který převažuje. [2, 3, 4]

Stále větší uplatnění v analýze léčiv nachází vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC – High Performance Liquid Chromatography). Principem HPLC je dělení látek mezi stacionární fází naplněnou v koloně a mobilní fází protékající kolonou za vysokého tlaku. Hlavními přednostmi je rychlost analýzy, citlivost stanovení (v závislosti na použitém detektoru), minimální množství vzorku dostačující pro analýzu. Další výhodou je možnost automatizace díky nejmodernějším chromatografům, které jsou vybavené automatickými dávkovači. [4, 6]

Chromatografické systémy s polární stacionární fází a méně polární mobilní fází se z historických důvodů nazývají systémy s normálními fázemi (NP – normal phase). Hlavním mechanismem separace je adsorpce na povrchu tuhého sorbentu. Chromatografický sloupec je naplněn inertním nosičem (silikagel, oxid hlinitý), na jehož povrchu je zakotvena stacionární kapalná fáze (voda). Mobilní fází je organické rozpouštědlo nemísitelné se stacionární fází. Častěji se v kapalinové chromatografii používá systém obrácených fází (RP – reversed phase), kdy organické hydrofobní rozpouštědlo slouží jako zakotvená fáze a mobilní fází je hydrofilní rozpouštědlo. Kapalná stacionární fáze může být fyzikálně zakotvená na inertním chromatografickém nosiči nebo může být kapalná stacionární fáze chemicky vázána na reaktivním nosiči. Jako chromatografický reaktivní nosič se pro přípravu chemicky vázaných stacionárních

fází používá silikagel. Polární silanolové skupiny silikagelu se nahrazují jak nepolárními, tak polárními skupinami. Nejčastěji se povrch silikagelu modifikuje navázáním funkčních skupin $-C_{18}H_{37}$ (sorbet má značení SiC₁₈), $-C_8H_{17}$ (SiC₈), $-C_2H_5$ (SiC₂), $-CH_3$, $-NH_2$, $-CN$, fenyl, diol. Jako mobilní fáze se používají vodné roztoky acetonitrilu, metanolu, dioxanu, diethyletheru a tetrahydrofuranu. Mobilní fáze často obsahují pufr o vhodném pH. [2, 4]

HPLC analýzu lze realizovat za konstantního složení mobilní fáze v průběhu celé analýzy, tzv. izokratická eluce. Pokud se v průběhu analýzy programově mění složení mobilní fáze, jedná se o gradientovou eluci. Při gradientové eluci se může plynule měnit pH mobilní fáze nebo koncentrace polárnější složky v mobilní fázi. [4, 6]

HPLC se provádí na kolonách dlouhých nejčastěji 10-25 cm o vnitřním průměru 3-5 mm, jsou zpravidla zhotoveny z nerezové oceli nebo ze skla. O kolonách je dále pojednáno v kapitole 2.3 Chromatograf. [6]

UPLC (Ultra Performance Liquid Chromatography) je novou separační technikou v oblasti kapalinové chromatografie. Separační proces využívá sorbentů připravených patentovanou technologií „bridged hybrid particle“, které vynikají svojí mechanickou pevností a mimořádnou separační účinností. Celý proces probíhá za velmi vysokých tlaků (15000 psi, 1000 bar, 100 MPa). UPLC má oproti klasické HPLC mnoho předností, například kratší dobu analýzy. Další předností je snížení nákladů díky menší spotřebě HPLC rozpouštědel. Důležitými přednostmi UPLC jsou např.: zvýšení separační účinnosti, snížení meze detekce, zvýšení citlivosti a více kvalitativních informací. Hlavní nevýhodou UPLC je potřeba vysokotlakých čerpadel schopných pracovat za velmi vysokých tlaků, jejichž cena je vyšší ve srovnání s běžnými HPLC čerpadly. O kolonách používaných v UPLC je pojednáno v samostatné kapitole. [2, 5]

2.3 CHROMATOGRAF

Chromatograf se skládá z čerpacího systému, dávkovacího zařízení, chromatografické kolony (může být použit i regulátor teploty), detektoru a zařízení na zpracování dat. Mobilní fáze je do systému přiváděna z jednoho nebo více zásobníků a protéká obvykle konstantní rychlostí kolonou a poté detektorem. [1]

ČERPACÍ SYSTÉMY

Kolony HPLC jsou plněny mikročásticemi, které při průchodu mobilní fáze kladou značný odpor. Z tohoto důvodu musí být mobilní fáze pod vysokým tlakem (až 40 MPa), aby mohla projít skrze kolonu. To je zajištěno vysokotlakými čerpadly. Průtok mobilní fáze musí být konstantní, reprodukovatelný a bezpulsní. V současnosti se nejčastěji používají reciproční čerpadla. Ta jsou tvořena válcem a dvěma zpětnými ventily, které se při pohybu pístu ve válci uzavírají nebo otevírají. Při nasávání kapaliny do vnitřního prostoru čerpadla je otevřen vstupní ventil a výstupní je uzavřen. Při vytlačování kapaliny z válce je poloha ventilů obrácená. U recipročních čerpadel může kapalina přicházet přímo do styku s písty čerpadla (pístová čerpadla), nebo je kapalina oddělena od pístů membránou (membránová čerpadla). Nevýhodou je pulsni chod. Pulsni chod se kompenzuje použitím dvou nebo více čerpadel současně, přičemž jejich písty se nepohybují rovnoměrně a jejich činnost je fázově posunuta. Reciproční čerpadla se s výhodou používají pro gradientovou eluci. Čerpací systémy mohou být vybaveny zařízením pro odstranění bublin vzduchu. [1, 2, 7]

DÁVKOVACÍ ZAŘÍZENÍ

Roztok vzorku se dávkuje do protékající mobilní fáze na horní konec kolony nebo blízko něj pomocí dávkovacího zařízení, které je schopno pracovat při vysokém tlaku. Téměř výhradně se používají dávkovací ventily se smyčkou, nejčastěji šesticestrné ventily s vyměnitelnou smyčkou, která je plněna injekční stříkačkou. Objem smyčky se pohybuje od desítek nanolitrů po mililitry. Zařízení s dávkovací smyčkou se dají použít pro ruční nebo automatické dávkovače. [1, 7]

KOLONY

V analytické chromatografii jsou používány kolony vyrobené s nerezové oceli nebo ze skla. Délka kolony pro HPLC se pohybuje v rozmezí 10 – 25 cm. Vnitřní průměr mají tyto kolony 3-5 mm. Kolony s vnitřním průměrem menším než 2 mm jsou označovány jako mikrokolony. Některé sorbenty používané pro chromatografii s normálními fázemi a pro chromatografii s reverzními fázemi jsou zmíněny v předchozí kapitole 2.2 Kapalinová chromatografie. Kolonám pro UPLC jsem věnovala samostatnou kapitolu. Pro HPLC se běžně používají stacionární fáze, které mají velikost částic od 3 μm do 10 μm . Částice mohou mít kulovitý nebo nepravidelný tvar, různou porozitu a specifický povrch. Pokud není výrobcem uvedeno jinak, předpokládá se, že kolony pro chromatografii s obrácenými fázemi s náplní na bázi silikagelu vykazují stabilitu v mobilních fázích o zdánlivém pH 2,0 až 8,0. Kolony, jejichž sorbentem je porézní grafit nebo částice polymerních materiálů, jsou stabilní v širším rozsahu pH. [1, 6]

V kapalinové chromatografii se používá mnoho typů stacionárních fází:

- oxid křemičitý, oxid hlinitý nebo porézní grafit (používané v chromatografii s normálními fázemi)
- pryskyřice nebo polymery s kyselými nebo zásaditými skupinami (používané v iontoměničové chromatografii)
- porézní oxid křemičitý nebo polymery (používané ve vylučovací chromatografii – separace je založena na rozdílech v objemech molekul)
- různé druhy chemicky modifikovaných nosičů připravených z polymerů, oxidu křemičitého nebo porézního grafitu (používané v chromatografii s obrácenými fázemi)
- speciální chemicky modifikované stacionární fáze, např. deriváty celulózy nebo amylózy, bílkoviny nebo peptidy, cyklodextriny (používané pro separaci enantiomerů u chirální chromatografie) [1]

DETEKTORY

Citlivost a selektivita chromatografické analýzy závisí na použitém detektoru. Nejběžněji používanými detektory jsou spektrofotometrické detektory pro měření v ultrafialové a viditelné oblasti. Mohou se také použít detektory fluorimetrické,

refraktometrické, elektrochemické, hmotnostní spektrometry, detektory na bázi měření radioaktivity. [1, 6]

SPEKTROFOTOMETRICKÉ DETEKTORY

Spektrofotometrické detektory proměřují absorbanci elektromagnetického záření o určité vlnové délce složkami eluátu protékajícího celou detektorem. K detekci léčiv se využívá především UV oblast spektra, mnohem méně oblast viditelného světla. Spektrofotometrické detektory mají velkou citlivost (10^{-9} až 10^{-10} g/ml). Můžeme je použít při gradientové eluci.

Nejpoužívanější UV detektory jsou:

- UV detektor s fixní vlnovou délkou (nejčastěji 254 nm nebo 280 nm, při nichž absorbuje většina léčiv)
- UV – VIS detektor s proměnnou vlnovou délkou
- scanning UV detektor
- diode array detektor - hodnotí léčivo současně při několika vlnových délkách, porovnává poměry absorbancí – snímáním získáme trojrozměrné chromatogramy (retenční čas vs. absorbance vs. vlnová délka) [6, 7]

FLUORIMETRICKÉ DETEKTORY

Fluorimetrické detektory ve farmaceutické analýze lze použít v případech, kdy analyzované léčivo vykazuje fluorescenci. Pokud látky fluorescenci nevykazují, lze je derivatizací s vhodnými činidly převést na fluoreskující deriváty. Fluorimetrické detektory jsou citlivější než UV-detektory (citlivost fluorimetrických detektorů je 10^{-9} až 10^{-12}). Lze je použít při gradientové eluci. [6]

ELEKTROCHEMICKÉ DETEKTORY

Elektrochemické detektory jsou založeny buď na měření vodivosti (pro látky iontové povahy), nebo elektrického proudu odpovídajícího oxidaci či redukci analytů. Elektrochemické detektory jsou selektivní a vysoce citlivé detektory (10^{-9} až 10^{-12} g/ml). Většinu z těchto detektorů nelze použít při gradientové eluci. [6, 7]

REFRAKTOMETRICKÉ DETEKTORY

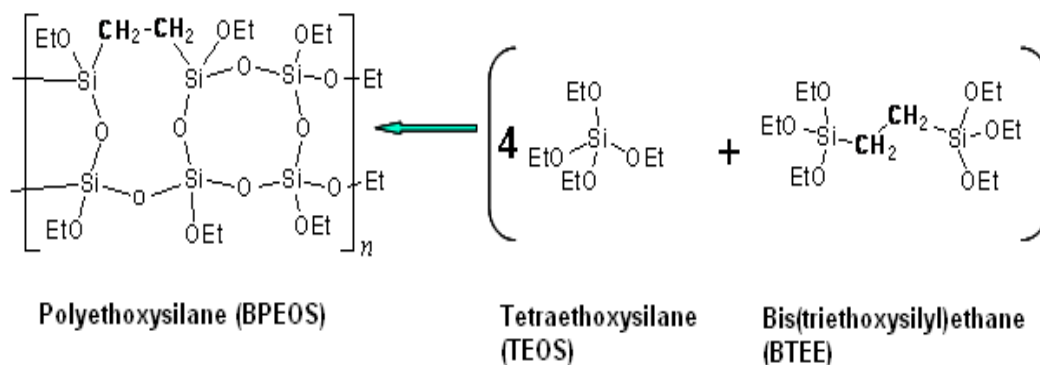
Refraktometrické detektory měří rozdílný index lomu mezi čistou mobilní fází a eluátem vytékajícím s kolony, který obsahuje analyzovanou látku. Tyto refraktory jsou univerzální, ale jsou málo citlivé (10^{-6} g/ml). Nevýhodou je závislost indexu lomu na teplotě. Refraktometrické detektory nelze použít při gradientové eluci. [6, 7]

HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETR (MS)

Hmotnostní detektor umožňuje nejen citlivé kvantitativní stanovení analytu, ale poskytuje také kvalitativní informace o jeho struktuře. Po výstupu eluátu z kolony je nutno z něj odstranit mobilní fázi, a pak jsou molekuly léčiva v hmotnostním spektrometru ionizovány nárazy elektronů, termoionizací či elektroionizací. Vznikají tak nabitě částice (molekulární a fragmentární ionty), které jsou v magnetickém nebo vysokofrekvenčním poli separovány podle hmotnosti a náboje a je zaznamenáno hmotnostní spektrum vyjadřující četnost iontů ve vztahu k poměru: hmotnost/počet nábojů. K detekci iontů se používá nejčastěji elektronový násobič nebo fotonásobič. Spojení kapalinové chromatografie a MS je vysoce selektivní a citlivé. Hmotnostní detektory jsou ale finančně velmi náročné. [2, 6]

2.4 UPLC KOLONY

Analýza UPLC probíhá za vysokého tlaku a tak se u UPLC kolon mění podstatným způsobem hardware. Velikost částic u UPLC kolon je 1,7 μm . Právě tato velikost částic poskytuje vyšší rozlišení z důvodu vyšší účinnosti kolony. Sorbenty klasických HPLC jsou založené buď na bázi silikagelu nebo na bázi polymeru. Každý z těchto typů základu sorbentu má své výhody a nevýhody. Například sorbenty založené na silikagelu jsou mechanicky poměrně odolné, nevýhodou je ale limitovaný rozsah pH mobilní fáze a chemická nestabilita. Sorbenty klasické HPLC kolony založené na polymerní fázi naopak mohou pracovat v široké oblasti pH, jsou chemicky stabilní a nedochází na nich k iontovým interakcím. Nevýhodou sorbentů na polymerní bázi je nižší mechanická odolnost. O spojení výhodných vlastností obou typů sorbentů se pokouší technologie “Hybrid (Silicon-Carbon) Particle Technology”. Aby se zamezilo vlivu volných hydroxylových skupin silikagelu, je u této technologie použito tzv. ethylenových můstků. [5]



[5]

Obr. č.1: Umístění ethylenových můstků technologií “Hybrid (Silicon-Carbon) Particle Technology“

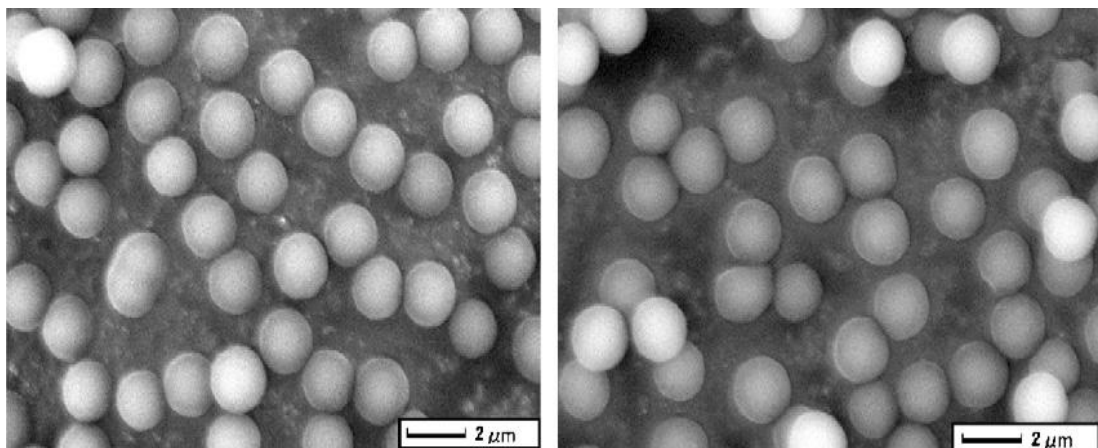
Velikost částic sorbentu má vliv na účinnost separačního procesu. Zmenšením velikosti částiček dochází ke zvýšení účinnosti separace (rozlišení). Velikost částic 1,7 μm je optimální velikostí pro UPLC. Další snižování velikosti částic vede pouze ke zvyšování zpětného tlaku a zvýšení účinnosti je zanedbatelné. [5]

Příkladem UPLC kolon je kolona ACQUITY UPLC BEH C 18 vyráběná firmou Waters. V současné době jsou k dispozici a druhy stacionárních fází: C18, C8, Shield RP18 (C18 se zabudovanou polární skupinou – karbamát) a fenylovou kolonou. [5]

KOLONY KINETEX

V praktické části své diplomové práce jsem analyzovala vzorky na koloně Kinetex™ C18 s velikostí částic 1,7 μm.

Kolony Kinetex jsou založené na nové technologii částic. Tyto částice kolony jsou složeny z pevného jádra a porézního povrchu. Částice Kinetex™ tedy nejsou plně porézní. Pomocí techniky koloidních roztoků a technologie uspořádávání nano-částic dochází k tvorbě homogenního porézního obalu na pevném jádře silikagelu. Porézní obal je také tvořen silikagelem. Kolony Kinetex™ uvádí na trh firma Phenomenex. Částice Kinetex™ jsou dostupné ve dvou velikostech: 2,6 μm a 1,7 μm. Díky tomu, že částice Kinetex™ nejsou plně porézní, analyty stráví při průtoku kolonou méně času difúzí do a z pórů částic. Tato krátká vzdálenost difúze umožňuje rychlejší přenos hmoty. To má za následek nižší rozmývání píků a vyšší účinnost ve srovnání se sub-2 μm plně porézními částicemi. Kolony Kinetex™ tvořené částicemi většími než 2 μm umožňují zmenšit protitlak na koloně při zachování účinnosti. Starší generací kolon s částicemi s porézním povrchem jsou kolony Halo™. Na rozdíl od kolon Kinetex™ mají méně výhodné vlastnosti v morfologii a distribuci částic, například částice Kinetex™ kolony mají hladší povrch než u Halo™ kolon. Další výhodou Kinetex™ kolon je menší spotřeba rozpouštědel. [8, 9, 17]



[8]

Obr. č.2: Částice Kinetex menší než $2\mu\text{m}$ zvětšené elektronovým skenovacím mikroskopem

2.5 VALIDACE CHROMATOGRAFICKÉ METODY A VALIDAČNÍ PARAMETRY

Validace metody je proces, kterým se u dané chromatografické metody zjišťuje, jestli je metoda vhodná pro zamýšlené použití. Validace má za cíl určit podmínky, za kterých je zkušební postup použitelný, a zajistí, že při opakovaném použití této metody stejným postupem v jedné nebo více různých laboratořích bude tato metoda spolehlivá. Validace dané metody se provádí proměřením validačních parametrů. Které validační parametry jsou při validaci metody požadovány, závisí na tom, jestli má daná metoda sloužit k identifikaci látky, ke stanovení obsahu látky, kvantitativnímu nebo limitnímu testování nečistot. Validaci je nutno provést při vývoji nové metody, jestliže byla metoda pozměněna, má-li být přenesena do jiné laboratoře, nebo při průkazu rovnocennosti dvou metod. [3, 5]

2.5.1 Správnost (accuracy)

Správnost vyjadřuje shodu mezi získaným výsledkem a správnou hodnotou. Správná hodnota se zjišťuje buď jinou nezávislou metodou s ověřenou správností, nebo se připraví modelový vzorek ze všech složek přípravku a přesně přidaného standardu. Pokud nemáme všechny složky přípravku k dispozici, můžeme jej při analýze pro určení správnosti nahradit přípravkem se známým přidaným množstvím standardu. Správnost se obvykle zjišťuje analýzou šesti vzorků, vyjadřuje se jako rozdíl správné a získané hodnoty nebo jako výtěžnost. [3]

Výtěžnost (recovery, značí se R_e) udává poměr množství analytu získaného danou analytickou metodou (n_{II}) k přijaté referenční hodnotě (n_I):

$$R_e = \frac{n_{II}}{n_I}$$

Hodnota výtěžnosti se může vyjadřovat jako desetinný zlomek nebo v procentech ($R_e / \% = R_e * 100$). [5]

2.5.2 Přesnost (precision)

Přesnost je míra shody mezi jednotlivými výsledky metody, které se získaly opakovanými analýzami jednoho vzorku. Obvykle se tento vzorek šestkrát analyzuje

kompletním postupem, včetně přípravy vzorku. Přesnost se vyjadřuje jako směrodatná odchylka výsledků těchto šesti stanovení. [3]

$$RSD_{\%} = \frac{100}{\bar{y}} \sqrt{\frac{\sum(y_i - \bar{y})^2}{n-1}} \quad [1]$$

y_i – jednotlivé hodnoty vyjádřené jako plocha píku, výška píku, nebo poměr ploch u metody vnitřního standardu

\bar{y} - průměr jednotlivých hodnot

n – počet jednotlivých hodnot

Podle podmínek opakování analýz se rozlišují tři úrovně přesnosti:

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

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

Reprodukovatelnost (reproducibility) – provedení je stejné jako v případě mezilehlé přesnosti, ale rozdíl je v tom, že probíhá v různých laboratořích.[3]

2.5.3 Selektivita (specificity)

Selektivita je vlastnost analytické metody přesně a správně určit analyt i v přítomnosti jiných látek obsažených ve vzorku. Jimi jsou například zbytková rozpouštědla, pomocné látky, rozkladné produkty, nebo také jiné účinné látky u kombinovaných léčivých přípravků.

Selektivita se doloží výsledky analýzy standardu, a dále například vzorků bez analyzované látky obsahujících všechny složky přípravku, rozkladné produkty, nečistoty. [3]

2.5.4 Detekční limit (limit of detection, LOD)

Detekční limit je nejnižší detekovatelná koncentrace látky, nestanovované kvantitativně. Je tedy parametrem vyjadřujícím citlivost metody. U instrumentálních metod se detekční limit může určit jako koncentrace analyzované látky s poměrem

signálu k šumu s hodnotou 3. Nalezený detekční limit se ověří analýzou příslušné koncentrace vzorku.[3]

Poměr signálu k šumu se značí S/N a vypočítá se podle vzorce:

$$S/N = \frac{2H}{h}$$

H ve vzorci značí výšku píku odpovídajícího dané složce na chromatogramu předepsaného porovnávacího roztoku měřenou od vrcholu píku k extrapolované základní linii signálu, který se sleduje na vzdálenost rovné dvacetinásobku šířky píku v polovině jeho výšky. h ve vzorci značí rozpětí šumu pozadí na chromatogramu získaného při slepé zkoušce a zaznamenávaného na vzdálenosti rovné dvacetinásobku šířky píku v polovině jeho výšky na chromatogramu předepsaného porovnávacího roztoku, a to možno rovnoměrně na obě strany od místa, kde by se měl nacházet sledovaný pík. [1]

2.5.5 Kvantitativní limit (limit of quantitation, LOQ)

Je také parametrem citlivosti metody. Je to nejnižší koncentrace látky, stanovitelná s přijatelnou přesností a správností. Za limitující směrodatnou odchylku se považuje 10 %, proto je možné kvantitativní limit vyjádřit jako koncentraci, při jejíž analýze se dosáhne této relativní směrodatné odchylky. Obvykle to bývá trojnásobek detekčního limitu. Často se vyjadřuje jako koncentrace s poměrem signálu k šumu s hodnotou 10. [3]

2.5.6 Robustnost (robustness)

Vyjadřuje, do jaké míry mají proměnné podmínky vliv na výsledky analýzy. Sbírají se poznatky z vývoje metody s cílem upozornit na podmínky, které mohou ovlivnit výsledky. Při vývoji metody využívající vysokoúčinnou kapalinovou chromatografii jsou sledovanými podmínkami: složení mobilní fáze, pH vodné složky mobilní fáze, teplota na koloně, rychlost průtoku, stabilita analyzovaných vzorků, rozdíl mezi kolonami různých šarží případně i výrobců atd.[3]

2.5.7 Linearita (linearity)

Linearita je chápána jako přímková závislost mezi dvěma náhodnými proměnnými, tj. odezvou instrumentace (analytickým signálem) a koncentrací analytu. Těsnost vzájemné závislosti dvou náhodných proměnných charakterizuje korelační koeficient (r). Linearita se obvykle stanovuje proměřením vzorků látky minimálně o

pěti různých koncentracích v rozmezí 50-150 % deklarovaného obsahu. Může se pracovat s roztoky standardů, neboť rušivé vlivy u reálných vzorků jsou hodnoceny jinými parametry validace. [3, 5]

2.5.8 Rozsah (range)

Tento parametr se obvykle odvozuje z linearity metody a rozumí se jím koncentrační hranice, v kterých může být metoda používána. Dolním limitem může být například detekční limit a horní může být určen maximální odezvou, při jejímž překročení už přístroj nepracuje přesně. [3]

2.5.9 Test způsobilosti (system suitability test)

Při každém novém použití metody se neopakuje celá validace, ale jsou definována určitá kritéria, která musí být splněna, aby dříve provedená validace platila. Tato kritéria se obecně nazývají test způsobilosti. [5]

Součástí testu způsobilosti bývá:

- faktor symetrie hlavního píku
- maximální dovolená relativní směrodatná odchylka ploch hlavního píku pro opakované nástřiky předepsaného porovnávacího vzorku
- poměr signálu k šumu
- účinnost
- kapacitní faktor
- rozlišení
- relativní retence

V případě, že některý parametr nebo více parametrů neodpovídá předepsaným lékopisným hodnotám, upraví se chromatografické podmínky v rozsahu, aby byla splněna kritéria způsobilosti chromatografického systému, a nedošlo přitom k podstatnému pozměnění metody, např. poměr jednotlivých složek mobilní fáze nebo její průtoková rychlost kolonou. Rozsah povolených změn je uveden v příslušné lékopisné monografii. [1, 3]

2.6 PŘÍPRAVEK

V experimentální části jsem hodnotila léčivý přípravek v lékové formě ušních kapek. Tyto ušní kapky byly ve formě čirého bezbarvého roztoku, bez zápachu. Jednalo se o otorinolaryngologikum, které obsahuje 0,2 mg dexamethasonu, 5 mg cinchokainu hydrochloridu a 479,8 mg butandiolu v 1 g roztoku. Jako pomocnou látku léčivý přípravek obsahuje glycerol. Dexamethason působí antiflogistickým účinkem, cinchokain-hydrochlorid je lokálním anestetikem. 1,3-butandiol působí lokálně dehydratačně a má také baktericidní účinky. 1,3-butandiol je často používán jako pomocná látka bez dráždivého působení. [10]

Terapeutické indikace

Léčivý přípravek je indikován k léčbě zánětlivých onemocnění ucha, především zánětu a ekzému zvukovodu, zánětlivých onemocnění ušního boltce bakteriálního původu. Dále se používá jako pomocný lék při akutním zánětu středního ucha (zároveň s antibiotiky a nosními kapkami pro dekonjesci sliznic). [10]

Nežádoucí účinky

Léčivý přípravek je obvykle dobře snášen. Vzácně se může vyskytnout přecitlivělost na některou ze složek léčivého přípravku projevující se kožními změnami, jako je zarudnutí, svědění, zduření pokožky v místě ošetření. Dalšími nežádoucími účinky mohou být ztenčení kůže a tvorba podkožních žilek (tzv. teleangiektázie). [10, 11]

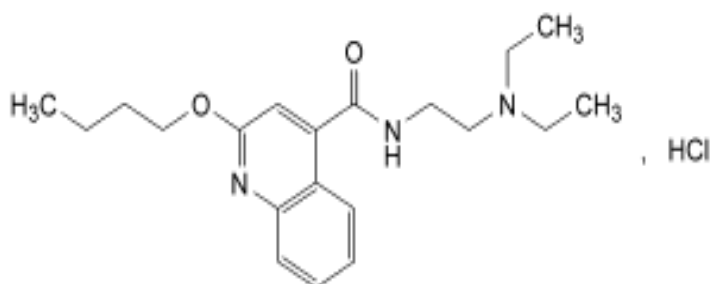
Kontraindikace

Kontraindikací je přecitlivělost na složky přípravku, dále pak specifická kožní zánětlivá onemocnění jako tuberkulóza nebo syfilis. Dalšími kontraindikacemi jsou také kožní mykózy, rosacea, herpes zoster oticus (pásový opar zvukovodu). [10, 11]

Těhotenství a kojení

V těhotenství (zvláště v 1. trimestru) a v období kojení má být přípravek používán pouze, pokud předpokládaný přínos léčby pro ženu jasně převažuje nad potenciálními riziky pro plod nebo kojence. [11]

2.7 CINCHOKAINI HYDROCHLORIDUM



[1]

Cinchokaini-hydrochloridum je 2-butoxy-*N*-[2-(diethylamino)ethyl]chinolin-4-karboxamid-hydrochlorid. Sumární vzorec: C₂₀H₃₀ClN₃O₂, M_r je 379.93. [1]

Cinchokain-hydrochlorid je bílý nebo téměř bílý krystalický prášek nebo bezbarvé krystaly. Je hygroskopický, velmi snadno rozpustný ve vodě, snadno rozpustný v acetonu, v 96% etanolu a v dichlormethanu. Velmi snadno tvoří aglomeráty. [1]

Farmakologické vlastnosti

Cinchokain-hydrochlorid se řadí mezi amidová lokální anestetika. Je to chinolinový derivát s amidově navázaným postraním řetězcem. Je nejúčinnějším, ale i nejtoxičtějším lokálním anestetikem. Cinchokain má delší účinek než jiná lokální anestetika, protože není degradován esterázami. [10, 12]

Anestetický účinek je dán přímou interakcí lokálních anestetik s napěťově řízenými sodíkovými kanály. Zde postupnou redukcí průchodu iontů Na⁺ lokální anestetika zvyšují práh excitability a snižují rychlost vzestupu akčního potenciálu, tím klesá až zaniká vedení vzruchu. [12]

V současnosti se cinchokain používá topicky jako součást mastí, krémů, čípků a ušních kapek.

NEČISTOTY CINCHOKAINU-HYDROCHLORIDU

V Českém lékopisu 2009 [1] jsou v monografii cinchokainu-hydrochloridu uvedeny následující nečistoty:

- A. 2-chlor-*N*-[2-(diethylamino)ethyl]chinolin-4-karboxamid
- B. kyselina 2-hydroxychinolin-4-karboxylová

C. *N*-[2-(diethyl-amino)ethyl]-2-hydroxychinolin-4-karboxamid

D. kyselina 2-butoxychinolin-4-karboxylová

STANOVENÍ CINCHOKAINU-HYDROCHLORIDU

Dle Českého lékopisu 2009 [1] je oficiální stanovení cinchokainu-hydrochloridu prováděno titrací hydroxidem sodným 0,1 mol/l VS za potenciometrické indikace bodu ekvivalence. Nejedná se tedy o HPLC metodu. Zkouška na příbuzné látky se podle Českého lékopisu 2009 [1] provádí tenkovrstvou chromatografií za použití vrstvy silikagelu s přísadou fluorescenčního indikátoru pro detekci při 254 nm. Na vrstvu se nanese odděleně po 5 μ l jednotlivých zkoušených a porovnávacích roztoků a vyvíjí se směs objemových dílů amoniaku 17,5 % R, methanolu R, acetonu R a toluenu R (1+5+30+50) po dráze 15 cm. Detekuje se v ultrafialovém světle při 254 nm. [1]

V americkém lékopisu je oficiální metoda stanovení cinchokainu-hydrochloridu pomocí HPLC. Tato metoda probíhá za použití kolony s reverzní fází C₁₈ a mobilní fáze methanol-voda s obsahem lauryl sulfátu sodného, octanu sodného, ledové kyseliny octové a triethylaminu. pH mobilní fáze je 5,6. [13]

Pomocí HPLC byl stanoven cinchokain-hydrochlorid v léčivém přípravku s acediasulfonem a byly proměřeny parametry validace. Stanovení obou léčiv probíhalo na koloně Zorbax C8 (5 μ m, 150 x 4,6 mm). Mobilní fází byl methanol-fosfátový pufr, pH 2,5 (66:34, v/v). Průtok mobilní fáze byl 1 ml/min. Byla použita detekce UV při 300 a 327 nm. [14]

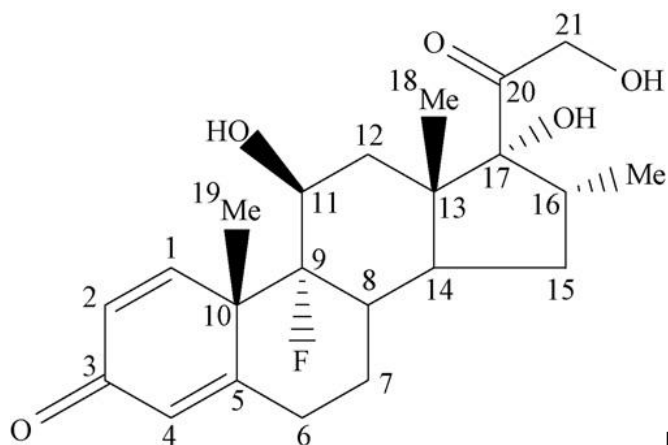
Kolona s reverzní fází C8 byla použita i v metodě pro současné stanovení crotamitonu, prednisolonu, glycyrrhizinové kyseliny, cinchokainu a chlorhexidinu v masti. Při stanovení byla použita mobilní fáze s obsahem sodium dodecyl sulfátu (SDS) a 2-propanolu. [16]

Pro stanovení cinchokainu-hydrochloridu současně s methylparabenem a propylparabenem byla zvolena kolona mBondapack C18. Mobilní fáze s acetonitrilem (45:55, v:v) s obsahem 0,06% (w:v) heptylsulfonátu sodného, upravená na pH 4,5 pomocí kys. octové. Průtok mobilní fáze byl 2 ml/min. Detekce UV při 254 nm. [15]

Pro stanovením cinchokainu-hydrochloridu společně s naphazolinem v lidském séru byla validována metoda HPLC na monolitické koloně. Využívalo se při ní spojení s hmotnostním detektorem. Jednalo se o gradientovou metodu, mobilní fází A byl 10 mM

roztok mravenčanu amonného a mobilní fázi B acetonitril. Průtok byl 0,2 ml/min. Separace probíhala na koloně XTerra[®] MS C18 při teplotě 50 °C. [18]

2.8 DEXAMETHASONUM



[24]

Je to 9-fluor-11 β ,17,21-trihydroxy-16 α -methylpregna-1,4-dien-3,20-dion.
Sumární vzorec: C₂₂H₂₉FO₅. [1]

Vzhledem je dexamethason bílý nebo téměř bílý krystalický prášek. Je prakticky nerozpustný ve vodě, mírně rozpustný v bezvodém ethanolu, těžce rozpustný v dichlormethanu. [1]

Farmakologické vlastnosti

Dexamethason je syntetický glukokortikoid s minimální mineralokortikoidní účinností. Kromě protizánětlivého účinku vykazuje stejně jako ostatní glukokortikoidy i antipyretické, antialergické a imunosupresivní účinky. Jelikož má minimální mineralokortikoidní účinky, nezpůsobuje téměř žádné zadržování vody ani solí, proto může být použit i u pacientů se srdečním selháním a hypertenzí. Má dlouhý biologický poločas (36-54 hodin).

Glukokortikoidy jsou vysoce lipofilní látky, a tak snadno přestupují skrze membrány cílových buněk a v cytoplasmě se váží na specifické glukokortikoidní receptory GR. Komplex hormon-receptor se přesune do jádra. V jádru buňky rozpozná malý úsek DNA, který je částí regulační sekvence příslušného genu a ovlivní jeho transkripci. Glukokortikoidy také interagují s transkripčními faktory, tlumí tak syntézu cytokínů a enzymů zapojených do imunitní a zánětlivé odpovědi organismu. Glukokortikoidy také indukují protein lipokortin, který inhibuje fosfolipázu A₂ a tím vznik kys. arachidonové (výchozí látky pro vznik prostaglandinů, tromboxanů, leukotrienů, PAF aj.). Glukokortikoidy svým mechanismem účinku zasahují i do metabolismu cukrů, proteinů, tuků, ovlivňují CNS i krevní elementy. Mají účinek na

svaly, kůži a kosti. Glukokortikoidy se používají k léčbě alergických reakcí, bronchiálního astmatu, revmatických onemocnění, polyarteridis nodosa, kožních onemocnění, zánětlivých onemocnění gastrointestinálního traktu a jater a k imunosupresivní terapii. Glukokortikoidy se lokálně aplikují u neinfekčních zánětů zevního ucha a zvukovodu. Dexamethason se užívá například i při terapii edému mozku nebo jako antiemetikum. [12, 19, 20]

NEČISTOTY DEXAMETHASONU

V monografii Českého lékopisu 2009 [1] se jako zkouška na příbuzné látky uvádí metoda HPLC. Metoda probíhá za gradientové eluce. Mobilní fáze A je 25% acetonitril, mobilní fáze B je acetonitril R. Stacionární fáze kolony tvoří silikagel pro chromatografii oktadecyl-silylovaný R (5 μ m). Délka kolony je 0,25 m, vnitřní průměr je 4,6 mm. Teplota kolony má být 45°C. Průtoková rychlost je u této metody 2,5 ml/min. K detekci se používá spektrofotometrický detektor. Detekce probíhá při 254 nm. Zkouška na nečistoty dexamethasonu je limitní. V monografii dexamethasonu v Českém lékopisu 2009 nejsou uvedeny žádné konkrétní nečistoty. [1]

Konkrétní nečistoty dexamethasonu jsou naopak uvedeny v Evropském lékopisu 7.0:

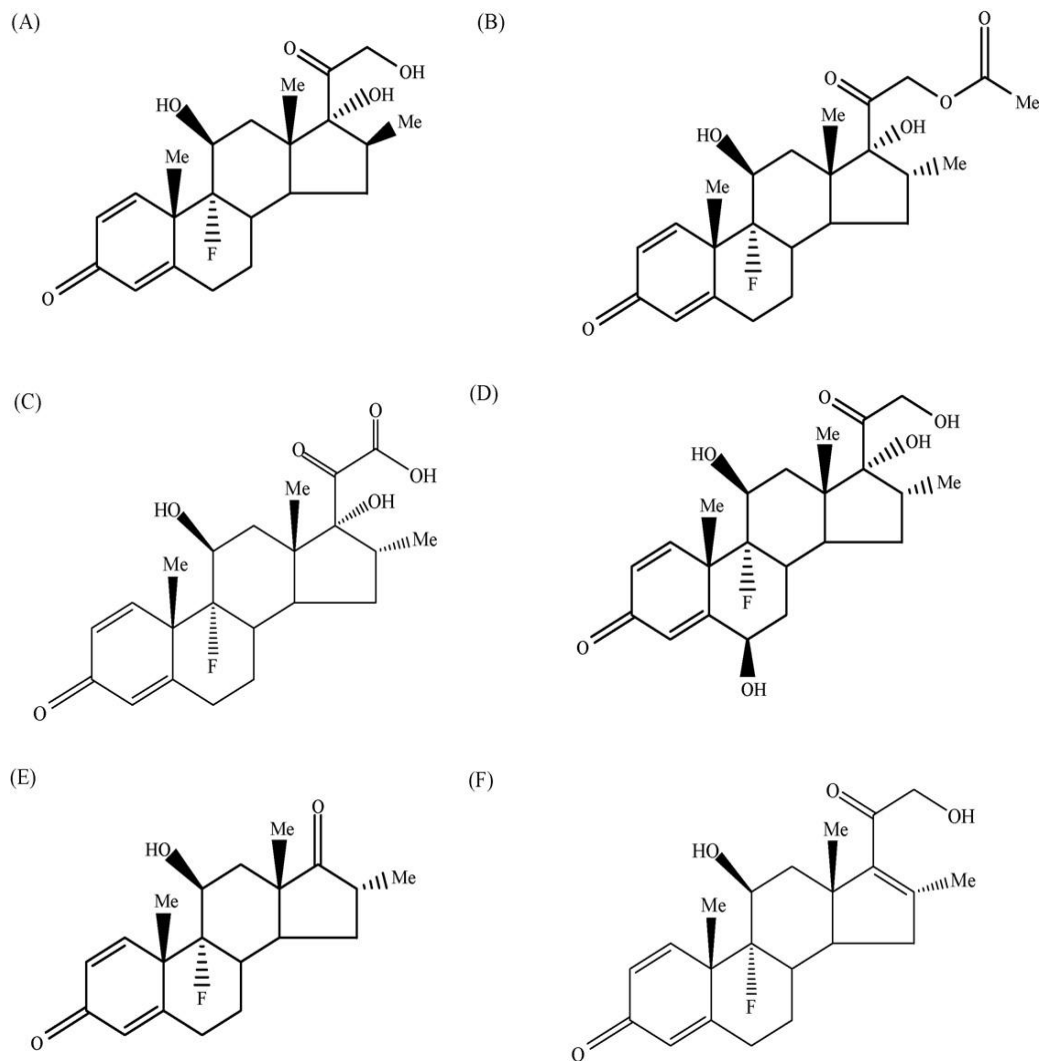
- 14-fluor-11 β ,17,21-trihydroxy-16 α -methylpregna-1,4-dien-3,20-dion
- 9-fluor-11 β ,17,21-trihydroxy-16 β -methylpregna-1,4-dien-3,20-dion (betamethason)
- 9-fluor-11 β ,17,21-trihydroxy-16 α -methylpregna-4-en-3,20-dion
- 17,21-dihydroxy-16 α -methyl-9 β ,11 β -epoxypregna-1,4-dien-3,20-dion
- 17,21-dihydroxy-16 α -methylpregna-1,4,9-trien-3,20-dion
- 9-fluor-11 β ,21-dihydroxy-16 α -methylpregna-1,4-dien-3,20-dion
- 9-fluor-11 β ,17-dihydroxy-16 α -methyl-3,20-dioxopregna-1,4-dien-21-yl acetát (dexamethason acetát)
- 17-hydroxy-16 α -methyl-3,20-dioxopregna-1,4,9(11)-trien-21-yl acetát [21]

V časopisu Chromatographia vyšel článek popisující validaci HPLC metody stanovující dexamethason, jeho nečistoty i degradační produkty, a konzervanty v léčivých přípravcích. Jednalo se o gradientovou metodu. Složení mobilní fáze A bylo acetonitril:voda:kys. fosforečná (100:900:0,5, v/v/v). Mobilní fáze B byla ve složení acetonitril:voda:kys. fosforečná (900:100:0,5, v/v/v). K separaci se použila kolona

YMC J'sphere, ODS-H80, 250x4,6 mm ID, 4 μm . Objem nástřiku byl 25 μl . Detekce UV při 240 nm. Vzorky byly podrobeny stresovým zkouškám.[22]

V následujícím odborném článku byly analyzovány léčivé přípravky za účelem stanovení dexamethasonu, betamethasonu a jejich příbuzných látek (především esterů) pomocí HPLC spojené s MS. Jednalo se o gradientovou metodu. Mobilní fáze A byla složena z 0,05M octanu amonného ve vodě, upraveného na pH 4,5 ledovou kyselinou octovou. Mobilní fáze B byla acetonitril. Zahřívání kolony bylo nastaveno na 40 °C. Průtok mobilní fáze byl 1 ml/min. Analýza probíhala na kolonách s reverzními fázemi: Zorbax Eclipse 5 μm C8, Zorbax Eclipse 5 μm C18, Luna C18 3 μm a Luna C8 3 μm . [23]

V časopisu Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis vyšel článek popisující validaci HPLC metody pro stanovení nečistot a rozkladných produktů dexamethasonu na stentech potažených dexamethasonem. Tato gradientová metoda probíhala na koloně Zorbax Eclipse XDB C8 5 μm . HPLC metoda byla spojena s hmotnostním detektorem. V tomto odborném článku jsou popsány některé nalezené nečistoty a produkty degradace (viz obrázek č. 3). [24]



- (A) betamethason
 (B) dexamethason acetát
 (C) dexamethason-21-ová kyselina
 (D) 6 β -hydroxydexamethason
 (E) 17-oxodexamethason
 (F) 16,17-nenasycený dexamethason [24]

Obr. č.3: Chemické struktury nečistot a degradačních produktů dexamethasonu

3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 MATERIÁL A POMŮCKY

3.1.1 CHEMIKÁLIE

- Cinchokaini-hydrochloridum, ČL 2009
- Dexamethason, ČL 2009
- Butandiol, Celanese, USA
- Glycerol, ČL 2009
- Triethylamin (=TEA), PENTA, Česká republika
- Methanol Lichrosolv, Merk, Darmstadt, Německo
- Acetonitril Lichrosolv, Merk, Darmstadt, Německo
- Kyselina fosforečná 85%, Čl 2002, Kulich s.r.o., Česká republika
- Voda čištěná reverzní osmózou

3.1.2 SESTAVA PRO HPLC S UV-VIS DETEKTOREM

- Kontrolní jednotka: DGU-20A3 Schimadzu
- Čerpadlo: LC-20AD XR Schimadzu
- Termostat kolony: CTO-20AC Schimadzu
- PC Program: LC Solution Schimadzu verze 1,2
- UV-VIS detektor: SPD-20A Schimadzu
- Autosampler: SIL-20AC XR Schimadzu

3.1.3 PŘÍSTROJE

- pH-metr SCHOTT CG 843, Schott Instruments GmbH
- Vakuová sušárna, výroba přístrojů Brandýs nad Labem
- Magnetická míchačka
- Digitální váhy, Sartorius Analytic A 200, Německo
- Digitální váhy, Sartorius CPA 225D-OCE, Německo

3.1.4 POMŮCKY

- Kádinky, odměrné baňky, odměrné válce, dělené pipety, nedělené pipety, balónek k pipetě, nálevky, stříčka, laboratorní lžička, alobal, membránový nylonový filtr 0,22 μm – Agilent – 47 mm/0,22 μm , zátky se zábrusem, vialky

3.1.5 SLOŽENÍ MODELOVÉHO LÉČIVÉHO PŘÍPRAVKU

Složení ušních kapek (rozpis na 25 g léčivého přípravku):

Dexamethasonum	0,005 g
Cinchocaini hydrochloridum	0,125 g
Základ (butandiol a glycerol)	24.87 g

Podle rozpisu modelového léčivého přípravku, se připravily i modelové přípravky:

Dexamethason se základem: dexamethason a základ ve výše uvedeném množství

Cinchocaini-hydrochloridum se základem: cinchocaini hydrochloridum a základ ve výše uvedeném množství

Základ: základ ve výše uvedeném množství

3.2 ÚPRAVA VZORKU

Příprava vzorků:

Vzorek č.1 (byl použit ke stanovení cinchokainu-hydrochloridu, jako porovnávací roztok obsahující standard): Asi 0,050 g cinchokainu-hydrochloridu se v odměrné baňce na 100 ml rozpustilo v methanolu a doplnilo metanolem po rysku. (Přesná navážka cinchokainu-hydrochloridu standardu byla 0,0496 g).

Příprava vzorků:

Nezahříváné vzorky

Vzorek č.2 (základ nezahříváný): Do vialky se navážilo 0,1-0,15 g základu. K navážce se přidala mobilní fáze A v množství odpovídající 9-ti násobku přesné navážky základu.

Vzorek č.3 (základ + dexamethason): Do vialky se navážilo 0,1-0,15 g dexamethasonu se základem. K navážce se přidala mobilní fáze A v množství odpovídající 9-ti násobku přesné navážky dexamethasonu se základem.

Vzorek č.4 (základ + cinchokain-hydrochlorid): Do vialky se navážilo 0,1-0,15 g cinchokainu-hydrochloridu se základem. K navážce se přidala mobilní fáze A v množství odpovídající 9-tinásobku přesné navážky cinchokainu-hydrochloridu se základem.

Vzorek č.5: (základ + dexamethason + cinchokain-hydrochlorid): Do vialky se navážilo 0,1-0,15 g modelového léčivého přípravku. K navážce se přidala mobilní fáze A v množství odpovídající 9-tinásobku přesné navážky modelového léčivého přípravku.

Zahříváné vzorky:

Vzorek č.6 (základ zahříváný): Do vialky se navážilo 0,1-0,15 g základu. Otvor vialky se překryl alobalem a vzorek se po dobu 20 hodin zahříval ve vakuové sušárně při 100 °C. Po zahřívání a vychladnutí se do vialky k základu navážila mobilní fáze A v navážce odpovídající 9-tinásobku přesné navážky základu.

Vzorek č.7 (základ + dexamethason): Do vialky se navážilo 0,1-0,15 g dexamethasonu se základem. Otvor vialky se překryl alobalem a vzorek se po dobu 20 hodin zahříval ve vakuové sušárně při 100 °C. Po zahřívání a vychladnutí se do vialky k dexamethasonu se základem navážila mobilní fáze A v navážce odpovídající 9-tinásobku přesné navážky dexamethasonu se základem.

Vzorek č.8 (základ + cinchokain-hydrochlorid): Do vialky se navážilo 0,1-0,15 g cinchokainu-hydrochloridu se základem. Otvor vialky se překryl alobalem a vzorek se po dobu 20 hodin zahříval ve vakuové sušárně při 100 °C. Po zahřívání a vychladnutí se do vialky k navážce cinchokainu-hydrochloridu se základem přidala mobilní fáze A v navážce odpovídající 9-tinásobku přesné navážky cinchokainu-hydrochloridu se základem

Vzorek č.9 (model): Do vialky se navážilo 0,1-0,15 g modelového léčivého přípravku. Otvor vialky se překryl alobalem a vzorek se po dobu 20 hodin zahříval ve vakuové sušárně při 100 °C. Po zahřívání a vychladnutí se do vialky k modelovému léčivému přípravku přidala mobilní fáze A v navážce odpovídající 9-tinásobku přesné navážky modelového léčivého přípravku.

3.3 OPTIMALIZACE CHROMATOGRAFICKÝCH PODMÍNEK

3.3.1 Optimalizace chromatografických podmínek pro stanovení cinchokainu-hydrochloridu

Nejprve jsem optimalizovala chromatografické podmínky pro metodu stanovení cinchokainu-hydrochloridu pomocí UPLC. Pro stanovení cinchokainu-hydrochloridu jsem použila kolonu KinetexTM C18 (150 x 2,1 mm, 1,7 μm). Při stanovení chromatografických podmínek se vycházelo dle rady školitele ze stanovení cinchokainu-hydrochloridu podle validované metody. Validovaná metoda stanovení cinchokainu-hydrochloridu pomocí HPLC využívá separaci na koloně Merck LiChrospher[®] 100 RP-18 e (250 x 4 mm, 5 μm). Při převodu metody HPLC na UPLC jsem vycházela z informací uvedených na webových stránkách HPLC.CZ [5]. Pracovala jsem s mobilní fází č.1, která je shodná s mobilní fází pro stanovení cinchokainu-hydrochloridu pomocí HPLC v již zmíněné validované metodě.

Příprava a složení mobilní fáze:

Mobilní fáze č.1 je složena z acetonitrilu a roztoku triethylaminu 30mmol/l (= 1,05 ml triethylaminu /250 ml) v poměru 75:25. Při přípravě mobilní fáze č.1 jsem si připravila roztok triethylaminu (TEA) o koncentraci 30 mmol/l tak, že jsem si pomocí odměrného válce odměřila 250 ml čištěné vody. Odměřila jsem pipetou 1,05 ml triethylaminu a přidala do kádinky k odměřeným 250 ml čištěné vody. Roztok se promíchal na magnetické míchače. pH tohoto roztoku triethylaminu jsem měřila pomocí pHmetru a přikapáváním kyseliny fosforečné jsem za současného měření nastavila pH na hodnotu 7,0. Po celou dobu měření pH se roztok promíchal na magnetické míchače. Po nastavení pH na hodnotu 7,0 se roztok triethylaminu přefiltroval přes nylonový filtr za podtlaku pomocí vodní vývěvy. Konečná mobilní fáze č.1 se připravila smísením objemových dílů ACN a přefiltrovaného roztoku triethylaminu o pH 7,0 v poměru 75:25.

Průtoková rychlost ve validované metodě byla 1 ml/min. Nástřik byl 20 μl a výsledky validované metody byly zaznamenány spektrofotometrickým detektorem při vlnové délce 325 nm.

Při převodu HPLC/UPLC bylo potřeba změnit objemový průtok. Objemový průtok UPLC se značí F_{UPLC} . Pro převod se používá vzorec:

$$F_{UPLC} = \frac{d_{UPLC}^2}{d_{HPLC}^2} * F_{HPLC} \quad [5]$$

F_{HPLC} - objemový průtok metody HPLC

d_{HPLC} - vnitřní průměr kolony pro HPLC

d_{UPLC} - vnitřní průměr kolony pro UPLC [5]

Vnitřní průměr kolony pro UPLC v případě kolony Kinetex C18 činí 2,1 mm. Vnitřní průměr kolony pro HPLC je 4 mm. F_{HPLC} byl 1 ml/min. Po dosazení do vzorce vychází, že objemový průtok pro UPLC (F_{UPLC}) je 0,2756 ml/min.

Dále jsem musela přizpůsobit objem nástřiku na kolonu podle vzorce:

$$V_{injUPLC} = \frac{d_{UPLC}^2}{d_{HPLC}^2} * \frac{L_{UPLC}}{L_{HPLC}} * V_{injHPLC} \quad [5]$$

$V_{injUPLC}$ - objem nástřiku na kolonu při UPLC

$V_{injHPLC}$ - objem nástřiku na kolonu při HPLC

L_{UPLC} - délka kolony používané při UPLC

L_{HPLC} - délka kolony používané při HPLC

d_{HPLC} - vnitřní průměr kolony pro HPLC

d_{UPLC} - vnitřní průměr kolony pro UPLC [5]

L_{UPLC} je v mém případě 150 mm. Délka kolony validované metody HPLC (L_{HPLC}) je 250 mm. Objem nástřiku na HPLC kolonu ($V_{injHPLC}$) je 20 μ l. Po dosazení do vzorce vychází objem nástřiku na kolonu UPLC ($V_{injUPLC}$) 3,3075 μ l. Vypočítané hodnoty F_{UPLC} a $V_{injUPLC}$ jsem vzala jako orientační.

Při stanovení optimálních chromatografických podmínek pro stanovení cinchokainu na koloně KinetexTM C18 (150 x 2,1 mm, 1,7 μ m) jsem pracovala s mobilní fází č.1 za izokratické eluce. UV detektor měřil při vlnové délce 325 nm. Teplota kolony byla nastavena na 30°C. Provedla jsem analýzu vzorku č.1 (roztok cinchokainu o navážce 0,0496 g, příprava vzorku je uvedena v kapitole 4.2) o objemu nástřiku 1 μ l a analýzu stejného vzorku o nástřiku 3 μ l. Nástřiky o objemech 1 μ l a 3 μ l se analyzovaly za následujících objemových průtoků mobilní fáze č.1: 0,1 ml/min, 0,15 ml/min, 0,20 ml/min, 0,25 ml/min, 0,30 ml/min. Pro kontrolu se provedla analýza slepého vzorku,

který neobsahoval cinchokain, ale pouze rozpouštědlo vzorku č.1, v tomto případě methanol.

3.3.2 Optimalizace chromatografických podmínek pro stanovení nečistoty dexamethasonu

Nečistotu jsem stanovovala v modelovém přípravku, který ve svém základu pomocných látek obsahoval jako účinné látky dexamethason a cinchokain-hydrochlorid. Pro účinnou separaci obou léčivých látek bylo nutno vytvořit metodu s gradientovou elucí. Při gradientové eluci se mobilní fáze skládala z mobilní fáze A, která byla klíčová pro vymytí z kolony a následnou analýzu dexamethasonu a jeho nečistoty, a z mobilní fáze B nutné pro vymytí cinchokainu-hydrochloridu. Nejprve jsem zjišťovala chromatografické podmínky, které budou ideální pro stanovení dexamethasonu a jeho nečistoty v modelovém léčivém přípravku. Při zjišťování chromatografických podmínek jsem vycházela z diplomové práce [25]. V této diplomové práci probíhalo stanovení nečistoty dexamethasonu pomocí HPLC za gradientové eluce na koloně Chromolith Speed ROD RP-18e 50-4.6, UV detekce probíhala při 238 nm, teplota kolony byla 25 °C. Metoda pro stanovení nečistoty dexamethasonu probíhala gradientovou elucí při složení mobilní fáze A: voda:acetonitril v poměru 80:20 a mobilní fáze B, v poměru 93:7, pH mobilní fáze bylo nastaveno kys. fosforečnou na hodnotu 7,0. Mobilní fáze B byla složena s vody a acetonitrilu v poměru 75:25; 1,05 ml triethylaminu na 250 ml vody, pH mobilní fáze nastaveno kys. fosforečnou na hodnotu 7,0. [25]

Nejprve jsem se snažila zjistit ideální složení mobilní fáze A, pro vymytí dexamethasonu z kolony KinetexTM C18 (150 x 2,1 mm, 1,7 μm). Jako výchozí fázi jsem si podle rady školitele zvolila mobilní fázi A z gradientové eluce používané v již zmíněné diplomové práci [25]. Označila jsem si ji jako mobilní fázi č.2.

Příprava mobilní fáze č.2:

Nejprve jsem si přefiltrovala čistou vodu přes nylonový filtr za podtlaku pomocí vodní vývěvy. Z přefiltrované vody jsem si připravila 20% roztok acetonitrilu smícháním objemových dílů acetonitrilu určeného ke kapalinové chromatografii a přefiltrované vody v poměru 20:80. Konečná mobilní fáze č. 2 vznikla smísením objemových dílů tohoto 20% roztok acetonitrilu a mobilní fáze č. 1 v poměru 93:7. Příprava mobilní fáze č.1 byla popsána v kapitole 3.3.1.

Mobilní fázi č.2 jsem za izokratické eluce proměřila vzorky č.2, č.3, č.6 a č.7 (jejich příprava je popsána v kapitole 3.2) a sledovala jsem separaci píku dexamethasonu a jeho nečistoty. Detekce UV probíhala při 238 nm. Průtok mobilní fáze č.2 byl 0,15 ml/min, teplota kolony 30 °C. Vzorky se proměřily při objemech nástřiku 3 μ l a 20 μ l.

Za výše uvedených chromatografických podmínek byly za průtoku mobilní fáze č.2 proměřeny i roztoky dexamethasonu označené: 1S_{dex} a 2S_{dex}.

Příprava roztoku S (koncentrace dexamethasonu 0,2 mg/ml):

Navážka dexamethasonu 2,15 mg se rozpustila v 10,75 ml acetonitrilu.

Příprava roztoků 1S_{dex} a 2S_{dex}:

Roztok 1S_{dex} (koncentrace dexamethasonu 0,02 mg/ml roztoku): 1 ml roztoku S a 9 ml mobilní fáze A.

Roztok 2S_{dex} (koncentrace dexamethasonu 0,04 mg/ml): 2 ml roztoku S a 8 ml mobilní fáze A.

Dále se vzorky č.2, č.3, č.6, č.7 a roztoky 1S_{dex} a 2S_{dex} proměřovaly o nástřících 5 μ l a 20 μ l různými mobilními fázemi A, lišícími se poměrem acetonitrilu a vody.

Tyto mobilní fáze A č.3 až č.5 byly připraveny stejným způsobem:

Nejprve jsem si přefiltrovala čistou vodu přes nylonový filtr za podtlaku pomocí vodní vývěvy. Přefiltrovaná voda se smísila s acetonitrem v určitém poměru:

- mobilní fáze č.3 - poměr acetonitrilu a vody byl 50:50
- mobilní fáze č.4 – poměr acetonitrilu a vody byl 40:60
- mobilní fáze č.5 – poměr acetonitrilu a vody byl 30:70
- mobilní fáze č.6 – poměr acetonitrilu a vody byl 25:75

Ostatní chromatografické podmínky zůstaly nezměněny: detekce UV při 238 nm, průtok mobilní fáze 0,15 ml/min, teplota kolony 30 °C. Po nalezení vhodné mobilní fáze A, se touto mobilní fází analyzovaly vzorky č.2, č.3, č.6, č.7 a vzorky 1S_{dex} a 2S_{dex} o rychlostech průtoku 0,25 ml/min a 0,2 ml/min. Vlnová délka při detekci a teplota kolony zůstala nezměněna. Objem nástřiku při zvýšených průtocích byl 5 μ l.

Z mobilní fáze A, která byla pro separaci píků dexamethasonu a jeho nečistoty nejvhodnější, a z mobilní fáze B se vytvořily mobilní fáze pro gradientovou eluci (mobilní fáze č.7 a č.8).

3.4 VALIDACE METODY

3.4.1 Validační parametry metody pro stanovení cinchokainu-hydrochloridu

3.4.1.1 Linearita

Podle předchozího měření byly vybrány následující chromatografické podmínky: mobilní fáze č.1 (acetonitril:roztok triethylaminu, 75:25), nástřik 3 μ l, průtok 0,20 μ l/min, detekce UV 325 nm, teplota kolony 30 °C, kolona KinetexTM C18 (150 x 2,1 mm, 1,7 μ m). Proměřovaly se roztoky standardu cinchokainu-hydrochloridu o odstupňované koncentraci, každý vzorek třikrát.

Příprava roztoků pro měření linearitu:

Do odměrné baňky na 50 ml se odvážilo asi 0,2500 g standardu cinchokainu-hydrochloridu a doplnilo se methanolem po rysku. Přesná navážka byla 0,25002 g, a koncentrace roztoku je 5,0004 mg/ml. Tento roztok byl označen jako roztok S_{cinch} . Ředěním tohoto roztoku byly připraveny pracovní roztoky s odstupňovanou koncentrací, jejichž proměřením se získal graf lineární regrese.

Roztoky pro stanovení linearitu:

Roztok A: Do 50 ml odměrné baňky byly odpipetovány 4 ml roztoku S_{cinch} a doplnilo se methanolem po rysku. Koncentrace cinchokainu-hydrochloridu v roztoku A je 0,400032 mg/ml.

Roztok B: Do 50 ml odměrné baňky bylo odpipetováno 4,5 ml roztoku S_{cinch} a doplnilo se methanolem po rysku. Koncentrace cinchokainu-hydrochloridu v roztoku B je 0,450036 mg/ml.

Roztok C: Do 50 ml odměrné baňky bylo odpipetováno 5 ml roztoku S_{cinch} a doplnilo se methanolem po rysku. Koncentrace cinchokainu-hydrochloridu v roztoku C je 0,50004 mg/ml.

Roztok D: Do 50 ml odměrné baňky bylo odpipetováno 5,5 ml roztoku S_{cinch} a doplnilo se methanolem po rysku. Koncentrace cinchokainu-hydrochloridu v roztoku D je 0,550044 mg/ml.

Roztok E: Do 50 ml odměrné baňky bylo odpipetováno 6 ml roztoku S_{cinch} a doplnilo se methanolem po rysku. Koncentrace cinchokainu-hydrochloridu ve v roztoku E je 0,600048 mg/ml.

3.4.1.2 Správnost

Chromatografické podmínky při zjišťování správnosti se nelišily od podmínek, při kterých byla měřena linearita. Správnost metody se zjišťovala analýzou 6 roztoků, které jsem si označila čísly 1-6.

Příprava roztoků č.1-č.6:

Do 10 ml odměrné baňky se navázilo 0,005 g cinchokainu-hydrochloridu a k němu se přidal 1 g základu léčivého přípravku s dexamethasonem. Doplnilo se methanolem po rysku odměrné baňky. Přesné navážky jednotlivých vzorků jsou uvedeny v tabulce č.4.

Dále jsem si připravila roztok cinchokainu-hydrochloridu o přesné koncentraci 0,4999 mg/ml. Tento roztok jsem si označila jako *roztok č.7*.

Příprava *roztoku č.7*: Do 100 ml odměrné baňky se navázilo 0,04999 g cinchokainu-hydrochloridu. Doplnilo se methanolem po rysku odměrné baňky.

Pak jsem si připravila ještě roztok placeba, tento roztok jsem označila č.8.

Příprava *roztoku č.8*: Do 5 ml odměrné baňky se navázilo 0,5 g základu léčivého přípravku s dexamethasonem. Doplnilo se methanolem po rysku odměrné baňky.

Z analýzy se vypočítalo množství cinchokainu v mg v 1g navážky přípravku (navážka přípravku = navážka cinchokainu-hydrochloridu + navážka základu s dexamethasonem). Množství cinchokainu-hydrochloridu se zjistilo metodou vnějšího standardu. Vnější standard představoval roztok č.7. Množství cinchokainu-hydrochloridu získané analýzou se porovnávalo se skutečným množstvím cinchokainu-hydrochloridu v léčivém přípravku vypočítaném ze skutečné navážky. Získala se tak výtěžnost metody (recovery) v %. Výtěžnost u jednotlivých analýz šesti roztoků se zprůměrovala a vypočetla se směrodatná odchylka.

Posloupnost vzorků při analýze:

Nejprve se vzorek č.7 proměřil pětkrát za sebou. Pak se proměřily roztoky č.1 až č.3, každý třikrát. Pak se znovu třikrát za sebou proměřil vzorek č.7 obsahující cinchokain-hydrochlorid. Po něm se analyzovaly roztoky č.4 až č.6, každý třikrát. Pak

se provedla analýza vzorku č.7 pětkrát za sebou. Z každé série nástřiků se počítala průměrná plocha píku. Pro kontrolu se na závěr dvakrát proměřil roztok č.8.

3.4.1.3 Opakovatelnost

Opakovatelnost metody se zjišťovala proměřením 6 vzorků modelu léčivého přípravku obsahujícího cinchokain-hydrochlorid a dexamethason. Analýzy vzorků probíhaly za stejných chromatografických podmínek jako ověření linearity a správnosti pro metodu stanovení cinchokainu-hydrochloridu.

Příprava každého vzorku pro ověření opakovatelnosti probíhala stejným způsobem. Vzorky se liší navázkou léčivého přípravku.

Příprava vzorků Op_1 až Op_6:

Do 10 ml odměrné baňky se navážil 1 g modelu léčivého přípravku a doplnilo se methanolem po rysku. Přesné navážky u jednotlivých vzorků jsou uvedeny v tabulce č.5.

Jako vnější standard se znovu proměřil *roztok č.7* (roztok o koncentraci cinchokainu-hydrochloridu 0,4999 mg/ml), jehož příprava je popsána v kapitole 3.4.1.2 Správnost. Každý vzorek se proměřil třikrát. Jako výsledná plocha píku cinchokainu se bral průměr z těchto tří měření. Množství cinchokainu u každého vzorku (Op_1 až Op_6) se vyjádřilo v mg v 1 g modelu léčivého přípravku. Hodnoty množství cinchokainu u jednotlivých vzorků Op_1 až Op_6 se zprůměrovaly a opakovatelnost se vyjádřila jako relativní směrodatná odchylka v procentech.

3.4.2 Validací parametry metody pro stanovení nečistoty dexamethasonu

3.4.2.1 Selektivita

Selektivita se zjišťuje porovnáním chromatogramu vzorků č.6, č.7, č.8 a č.9. Chromatogramy vzorků byly získány analýzami za chromatografických podmínek: Kolona KinetexTM C18 (150 x 2,1 mm, 1,7), mobilní fáze č.8, průtok mobilní fáze 0,2 ml/min, objem nástřiku 5 μ l, detekce UV při vlnové délce 238 nm, teplota kolony 30 °C.

3.4.2.2 Linearita a LOQ

Linearita metody a LOQ se zjišťovaly za stejných chromatografických podmínek jako selektivita: Kolona Kinetex[™] C18 (150 x 2,1 mm, 1,7), mobilní fáze č.8, průtok mobilní fáze 0,2 ml/min, detekce UV při vlnové délce 238 nm, teplota kolony 30 °C. Ale objem nástřiku byl 50 µl.

Na přípravu vzorků pro stanovení linearity se použil roztok standardu dexamethasonu (roztok 1S_{dex}). Koncentrace dexamethasonu v roztoku 1S_{dex} je 0,02 mg/ml. Příprava roztoku 1S_{dex} je popsána v kapitole 3.3.2. Tento roztok bylo potřeba naředit desetkrát a připravit roztok o koncentraci 0,002 mg/ml, tento roztok o c=0,002 mg/ml jsem si označila jako roztok D.

Příprava roztoku D: Do 10 ml odměrné baňky se pipetou odměřil 1 ml roztoku 1S_{dex} a odměrná baňka se doplnila mobilní fází A po rysku.

Naředěním roztoku D se připravily pracovní roztoky pro stanovení linearity. Množství dexamethasonu v roztocích je vyjádřeno jako % z množství dexamethasonu v roztoku 1S_{dex}, a tedy jako % z množství dexamethasonu v léčivém přípravku.

Roztok č.1 (0,05%): Do 10 ml odměrné baňky se odpipetovalo 0,5 ml roztoku č.4 (1%), jehož příprava je popsána níže, a doplnilo se mobilní fází A po rysku.

Roztok č.2 (0,1%): Do 10 ml odměrné baňky se odpipetoval 1 ml roztoku č.4 (1%), jehož příprava je popsána níže, a doplnilo se mobilní fází A po rysku.

Roztok č.3 (0,5%): Do 10 ml odměrné baňky se odpipetovalo 0,5 ml roztoku D a doplnilo se mobilní fází A po rysku.

Roztok č.4 (1%): Do 10 ml odměrné baňky se odpipetoval 1 ml roztoku D a doplnilo se mobilní fází A po rysku.

Roztok č.5 (1,5%): Do 10 ml odměrné baňky se odpipetovalo 1,5 ml roztoku D a doplnilo se mobilní fází A po rysku.

Roztok č.6 (2%): Do 10 ml odměrné baňky se odpipetovaly 2 ml roztoku D a doplnilo se mobilní fází A po rysku.

Limit kvantifikace (LOQ)

Limit kvantifikace jsem počítala z chromatogramu roztoku č.1 (0,05%) pro stanovení linearity. Pro LOQ jsem nejprve spočítala poměr signálu k šumu píku dexamethasonu na chromatogramu roztoku č.1 (0,05%). Jako blank se bere

chromatogram nezahříváného vzorku č.8 (cinchokain se základem). Tento blank ukazuje nulovou linii, pro výpočet poměru signálu k šumu S/N ($S/N= 2H/d$). LOQ jsem si vyjádřila jako koncentraci roztoku dexamethasonu s poměrem signálu k šumu s hodnotou 10.

3.4.2.3 Přesnost

Přesnost metody jsem stanovovala analýzou 6 vzorků léčivého přípravku označených LP_1, LP_2, LP_3, LP_4, LP_5, LP_6. Příprava všech vzorků probíhala stejným postupem a za stejných podmínek. Vzorky se liší jednotlivými přesnými navážkami léčivého přípravku.

Příprava vzorků LP_1 až LP_6:

Do vialky se navážilo 0,1-0,15 g léčivého přípravku. K němu se navážila mobilní fáze č.5 v navážce rovnající se 9-tinásobku navážky léčivého přípravku v dané vialce. Přesné navážky jsou uvedeny v tabulce č.9.

Přesnost jsem vyhodnocovala metodou normalizace. Při metodě normalizace se obsah jedné nebo více složek zkoušené látky v procentech vypočítá z ploch píku nebo píků jako procento celkové plochy všech píků, s výjimkou píků rozpouštědel nebo jakýchkoliv přidaných činidel a píků, jejichž plocha je pod limitem zanedbatelnosti. [1]

3.4.2.4 Stabilita vzorku

Stabilitu jsem zjišťovala u vzorků LP_1 až LP_6. Tyto vzorky jsem nechala stát po 24 hodin v autosampleru přístroje, který byl vypnut. Vzorky byly v přístroji při teplotě laboratoře, chráněny před světlem. Teplota laboratoře se pohybovala mezi 20 až 22 °C. U těchto vzorků (LP_1 až LP_6 po 24 hodinách) jsem zjišťovala množství nečistoty dexamethasonu vyjádřené v procentech, stejným postupem jako při měření přesnosti metody předchozí den, tudíž i za stejných chromatografických podmínek. Od průměrné hodnoty ploch píků (v %) vzorků LP_1 až LP_6 po 24 hodinách se odečetla průměrná hodnota ploch píků (v %) vzorků č. LP_1 až LP_6 měřených předchozí den. Tento rozdíl se vyjádřil jako procenta z průměrné hodnoty množství nečistoty ve vzorcích LP_1 až LP_2 po 24 hodinách.

3.4.2.5 Test způsobilosti

- opakovatelnost nástřiků: Počítá se směrodatná odchylka z 5 nástřiků roztoku č.3 o koncentraci dexamethasonu 0,5 % (příprava roztoku uvedena v kapitole 3.4.2.2)
- faktor symetrie hlavního píku: Byl určen z hlavního píku chromatogramu roztoku č.3. (příprava roztoku v kapitole 3.4.2.2). Vzorek se analyzoval třikrát za sebou a faktor symetrie musel odpovídat požadavku lékopisu [1]. Lékopis [1] udává že faktor symetrie píku by se měl pohybovat v rozmezí 0,8-1,5.

4. VÝSLEDKY A DISKUSE

4.1 OPTIMALIZACE CHROMATOGRAFICKÝCH PODMÍNEK

4.1.1 Optimalizace chromatografických podmínek pro stanovení cinchokainu-hydrochloridu

Při stanovování chromatografických podmínek pro metodu stanovení cinchokainu-hydrochloridu jsem proměřovala vzorek č.1 ve dvou objemových nástřících na kolonu: 1 μ l a 3 μ l. K izokratické eluci jsem použila mobilní fázi č.1. Ostatními chromatografickými podmínkami byly: Kolona KinetexTM C18 (150 x 2,1 mm, 1,7 μ m), UV detekce při 325 nm, teplota kolony temperována na 30 °C, rychlost průtoku mobilní fáze č.1 0,1 ml/min. Mobilní fáze dobře separovala pík cinchokainu-hydrochloridu s retenčním časem kolem 6,3 minut. Při nástřiku 1 μ l pík cinchokainu-hydrochloridu vykazoval faktor symetrie 1,3, při nástřiku 3 μ l se faktor symetrie píku cinchokainu-hydrochloridu pohyboval okolo 1,27. Faktor symetrie píku vyhovoval požadavku lékopisu.[1] Pro urychlení analýzy jsem proměřila roztok č.1 o nástřiku 1 μ l a 3 μ l za zvýšených průtoků: 0,15 ml/min, 0,20 ml/min, 0,25 ml/min, 0,30 ml/min. Ostatní chromatografické podmínky zůstaly nezměněny.

Při průtoku 0,15 ml/min se retenční čas píku cinchokainu-hydrochloridu pohyboval okolo 4,3 minut, při nástřiku 1 μ l měl pík faktor symetrie 1,38, při 3 μ l jej měl 1,34.

Při průtoku 0,2 ml/min se retenční čas píku cinchokainu-hydrochloridu pohyboval v rozmezí 3,2-3,3 minuty, u nástřiku 1 μ l byl faktor symetrie píku cinchokainu 1,42, u nástřiku 3 μ l byl 1,40.

Při průtoku 0,25 ml/min se retenční čas píku pohyboval okolo 2,6 minut, při nástřiku 1 μ l i při nástřiku 3 μ l byl faktor symetrie 1,6.

Při průtoku 0,30 ml/min se retenční čas píku pohyboval okolo 2,2 minut, při nástřiku 1 μ l i při nástřiku 3 μ l byl faktor symetrie okolo 1,6.

S přihlédnutím k faktoru symetrie píku cinchokainu-hydrochloridu u jednotlivých analýz byly jako ideální chromatografické podmínky pro stanovení cinchokainu vybrány následující: Kolona KinetexTM C18 (150 x 2,1 mm, 1,7 μ m), mobilní fáze č.1, průtok mobilní fáze 0,2 ml/min, UV detekce při 325 nm, teplota kolony temperována na 30 °C.

4.1.2 Optimalizace chromatografických podmínek pro stanovení nečistoty dexamethasonu

Při optimalizaci chromatografických podmínek jsem nejprve hledala optimální složení mobilní fáze A. Tato mobilní fáze byla odpovědná za vymytí dexamethasonu a jeho nečistoty při gradientové eluci. Začala jsem proměřením vzorků č.2, č.3, č.6, č.7 mobilní fází č.2 (20 % roztok acetonitrilu a mobilní fáze B v poměru 93:7, mobilní fází B byla mobilní fáze č.1 pro stanovení cinchokainu-hydrochloridu). Izokratická eluce probíhala na koloně Kinetex™ C18 (150 x 2,1 mm, 1,7 μm). UV detekce probíhala při 238 nm. Teplota kolony byla 30 °C. Průtok mobilní fáze č.2 byl 0,15 ml/min. Vzorky byly na kolonu nastříkány o objemu 3 μl. Po 20 minutové analýze se na chromatografu neobjevil žádný výrazný pík. Připravila jsem si roztoky 1S_{dex} a 2S_{dex}. Tyto roztoky jsem společně se vzorky č.2, č.3, č.6, č.7 proměřila mobilní fází č.2. Objem nástřiku jsem zvýšila ze 3 μl na 20 μl. Ostatní podmínky analýzy zůstaly nezměněny. Doba analýzy byla 25 minut. Analýza se nezdařila, ani po 25 minutách se dexamethason z kolony nevymyl. Proto jsem si připravila mobilní fází č.3 o větší eluční síle (acetonitril a voda v poměru 50:50).

Mobilní fází č.3 se za izokratické eluce proměřily vzorky č.2, č.3, č.6, č.7, 1S_{dex} a 2S_{dex} o objemech nástřiku 20 μl a 5 μl. Průtok mobilní fáze zůstal 0,15 ml/min. Detekce při 238 nm, teplota kolony 30 °C. Každý vzorek se proměřil dvakrát. Mobilní fází č.3 se pík nečistoty eluoval za píkem dexamethasonu. Píky nebyly dobře separovány.

Za stejných podmínek se stejné vzorky proměřily mobilní fází č.4 (acetonitril a voda v poměru 40:60). Změnou složení mobilní fáze ale nedošlo k lepší separaci a pík nečistoty se eluoval za píkem dexamethasonu. Při měření velmi stoupal tlak na koloně. Pracovní tlak se blížil maximálnímu pracovnímu tlaku nastavenému na 66 MPa. Proto jsem provedla čištění kolony podle pokynů výrobce.

Po pročištění kolony jsem analyzovala vzorky č.2, č.3, č.6, č.7, 1S_{dex}, 2S_{dex} mobilní fází č.5 (acetonitril a voda, 30:70). Ostatní chromatografické podmínky zůstaly nezměněny: průtok – 0,15 ml/min, detekce UV – 238 nm, teplota kolony – 30 °C, nástřiky – 5 μl a 20 μl. Separace píků při průtoku mobilní fází č.5 byla dobrá. Pík nečistoty dexamethasonu se eluoval před píkem dexamethasonu.

Pro urychlení analýzy jsem zvýšila v metodě průtok mobilní fáze č.5 na 0,25 ml/min. Analýza se nezdařila, protože pracovní tlak přesáhl maximální tlak, při

kterém jsem mohla analyzovat. Přístroj dovoval max. tlak 66 MPa. Proto jsem průtok mobilní fáze č.5 nastavila na 0,2 ml/min. Za tohoto průtoku mob. fáze č. 5 se proměřily stejné vzorky jako v předchozím případě. Pracovní tlak se ustálil přibližně na hodnotě 52 MPa. Při průtoku 0,2 ml/min se retenční čas dexamethasonu zkrátit, separace píků byla stále dobrá. Také faktor symetrie píků byl vyhovující.

Vzorky č.2, č.3, č.6, č.7 a 1S_{dex} a 2S_{dex} jsem proměřila za průtoku 0,2 ml/min mobilní fází č. 6 (acetonitril a voda v poměru 25:75). Ostatní podmínky zůstaly nezměněny. Separace nebyla lepší než při analýze mobilní fází č. 5.

S přihlédnutím k faktoru symetrie a rozlišení se pro stanovení dexamethasonu gradientovou metodu vybraly následující chromatografické podmínky: Mobilní fáze č.5 (ACN:voda, 30:70) byla vybrána jako ideální fáze pro stanovení nečistoty dexamethasonu a byla tedy použita jako mobilní fáze A při gradientové eluci. Průtok mob. fáze č.5 byl 0,2 ml/min, nástřik 5 µl, teplota kolony 30 °C, UV detekce při vlnové délce 238 nm, maximální tlak byl nastavený na 66 MPa. Analýza probíhala za tlaku kolem 50 MPa.

Mobilní fázi pro gradientovou eluci jsem si označila č. 7. Složení mobilní fáze č. 7: Mobilní fází A byla mobilní fáze č.5 (ACN:voda, 30:70), Mobilní fází B byla mobilní fáze č.1 (ACN: roztok TEA o pH 7,0, 75:25). Do 15. minuty kolonou protékala jen mobilní fáze A. Od 16.minuty protékala kolonou už jen mobilní fáze B. 100 % mobilní fáze B protékalo do 20. minuty. Od 21.minuty do konce analýzy ve 25. minutě protékala kolonou už jen mobilní fáze A. Gradient je shrnut v tabulce č.1.

Tabulka č.1: Schéma gradientové eluce u mobilní fáze č.7

čas (min)	Mobilní fáze A % (v/v)	Mobilní fáze B % (v/v)
0-15	100	0
15-16	100 → 0	0 → 100
16-20	0	100
20-21	0 → 100	100 → 0
21-25	100	0

Mobilní fází č. 7 se proměřily vzorky č.2-č.9. Za chromatografických podmínek: průtok mobilní fáze č.7 0,2 ml/min, objem nástřiku 5 µl, detekce UV při vlnové délce

238 nm, teplota kolony 30 °C. Maximální tlak byl nastavený na 66 MPa. Analýza probíhala za tlaku kolem 50 MPa. Doba analýzy byla nastavena na 25 minut.

Retenční čas dexamethasonu nám dovolil zkrátit čas analýzy na 23 minut. Změnilo se složení mobilní fáze. Nová mobilní fáze se označila č.8.

Složení mobilní fáze č.8: Mobilní fázi A byla mobilní fáze č.5 (ACN:voda, 30:70), Mobilní fázi B byla mobilní fáze č.1 (ACN: roztok TEA o pH 7,0, 75:25). 100 % mobilní fáze A teče kolonou do 12.minuty. Od 13.minuty do 18. minuty teče kolonou 100 % mobilní fáze B. Od 19. minuty teče kolonou 100 % mobilní fáze A. Konec analýzy je ve 23. minutě. Gradient je shrnut v tabulce č.2 .

Tabulka č.2: Schéma gradientové eluce u mobilní fáze č.8

čas (min)	Mobilní fáze A % (v/v)	Mobilní fáze B % (v/v)
0-12	100	0
12-13	100 → 0	0 → 100
13-18	0	100
18-19	0 → 100	100 → 0
19-23	100	0

Mobilní fázi č. 8 se proměřily vzorky č.2-č.9 za chromatografických podmínek : průtok mobilní fáze č.8 0,2 ml/min, objem nástřiku 5 µl, detekce UV při vlnové délce 238 nm, teplota kolony 30 °C. Analýza byla za těchto podmínek úspěšná. Separace a faktor symetrie píků byl dobrý.

4.2 VALIDACE METODY

4.2.1 Validační parametry metody pro stanovení cinchokainu-hydrochloridu

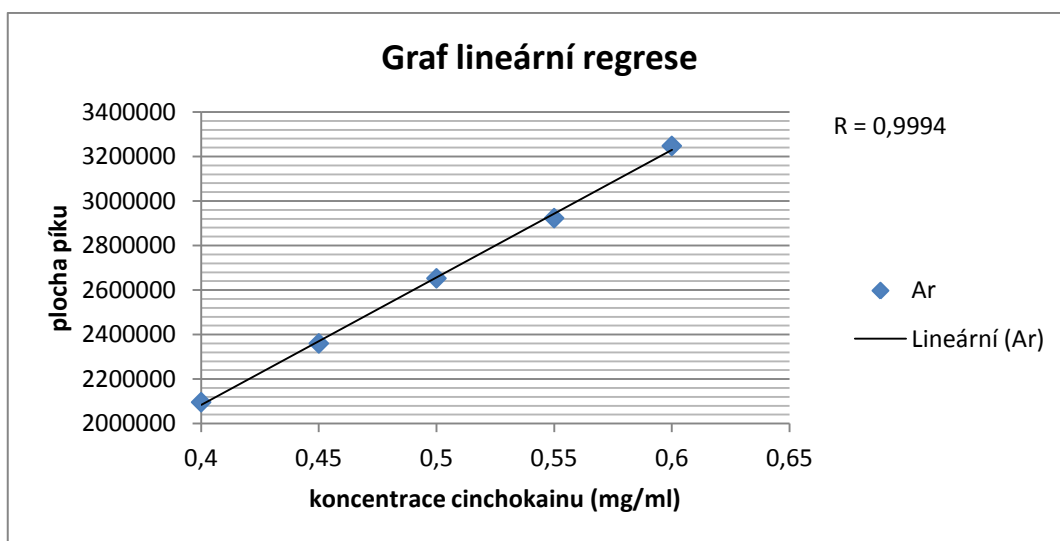
4.2.1.1 Linearita

Pro sestrojení kalibrační přímky se proměřily roztoky s odstupňovanou koncentrací cinchokainu-hydrochloridu 0,4-0,6 mg/ml označené jako roztoky A-E. Z hodnot ploch píku cinchokainu hydrochloridu získaných proměřením těchto roztoků se sestrojil graf (graf č.1). Sestrojením grafu byla prokázána lineární závislost. Korelační faktor má hodnotu 0,9994. Požadavek je, že korelační faktor linearity nesmí klesnout pod 0,999. Hodnota tedy vyhovuje.

Tabulka č.3: Stanovení cinchokainu-hydrochloridu – linearita

	c (mg/ml)	plochy	průměr ploch
roztok A	0,400032	2097539	2096744
		2096965	
		2095729	
roztok B	0,450036	2356006	2360932
		2362977	
		2363813	
roztok C	0,50004	2651182	2653315
		2664257	
		2644505	
roztok D	0,550044	2914414	2923916
		2921484	
		2935851	
roztok E	0,600048	3238742	3248200
		3253301	
		3252558	

Graf č.1: Graf lineární regrese – stanovení cinchokainu



4.2.1.2 Správnost

Analýzou vzorků cinchokainu-hydrochloridu pro ověření správnosti metody (vzorky č.1-6) a proměřením roztoku cinchokainu č.7 jsem u každého vzorku získala výtěžnost. Tato výtěžnost by se měla pohybovat od 98,0 do 102,0 %. Výsledky jsou shrnuty v tabulce č.4. Výtěžnosti u jednotlivých vzorků se zprůměrovaly a spočítala se směrodatná odchylka. Je požadováno aby směrodatná odchylka byla menší nebo rovna 2,0 %. Směrodatná odchylka (RSD) byla 1,0684%, což vyhovuje.

Tabulka č.4: Stanovení cinchokainu-hydrochloridu - správnost

čísla vzorků	průměr ploch	n_C (g)	n_D (g)	m_1 (mg/g)	c_{st} (mg/ml)	m_2 (mg/g)	výtěžnost (%)
č.7 st_1	2585995,8	0,04999			0,4999		
č.1	2537105,667	0,00498	1,02015	4,85792		4,78426	98,4837
č.2	2598466,667	0,00495	1,00071	4,92214		4,99484	101,4769
č.3	2533867,667	0,00495	1,00204	4,91564		4,90860	99,8568
č.7 st_2	2562621,333	0,04999			0,4999		
č.4	2555910	0,00505	1,00536	4,99797		4,93454	98,7309
č.5	2536341	0,00495	1,01638	4,84662		4,84315	99,9283
č.6	2552273,667	0,00500	0,99952	4,97750		4,95513	99,5505
č.7 st_3	2563285,4	0,04999			0,4999		

průměr (%) 99,6712
RSD(%) 1,0684

n_C – navážka cinchokainu-hydrochloridu v g

n_D - navážka základu léčivého přípravku s dexamethasonem v g

m_1 - skutečné množství cinchokain-hydrochloridu v mg v 1g léčivého přípravku, vypočítané z navážky, bere se jako referenční hodnota pro výpočet výtěžnosti metody

c_{st} – koncentrace standardu cinchokainu-hydrochloridu v mg/ml

m_2 – množství cinchokainu-hydrochloridu v mg v 1g léčivého přípravku získaného analytickou metodou

4.2.1.3 Opakovatelnost

Pro stanovení opakovatelnosti se analyzovalo 6 vzorků stejného léčivého přípravku, připravených za stejných podmínek. Vzorky jsem označila Op_1, Op_2, Op_3, Op_4, Op_5, Op_6. Analýzou vzorků se získalo množství cinchokainu-hydrochloridu v mg v 1g léčivého přípravku. Opakovatelnost se vyjádřila relativní směrodatnou odchylkou v procentech (RSD). Relativní směrodatná odchylka byla 0,48 %. To vyhovuje požadavku, který stanovuje, že RSD musí být menší nebo maximálně 2,0.

Tabulka č.5: Opakovatelnost metody stanovení cinchokainu-hydrochloridu

vzorky	plocha píku	navážka vzorku (g)	n (mg/g)
Op_1	2559505	1,00918	4,923511
Op_2	2546761	0,99882	4,979986
Op_3	2519629	0,99374	4,948125
Op_4	2570465,667	1,01644	4,935224
Op_5	2519112,333	0,99521	4,939803
Op_6	2545734	1,01292	4,911237

průměr n (mg/g)	4,939648
RSD%	0,477883

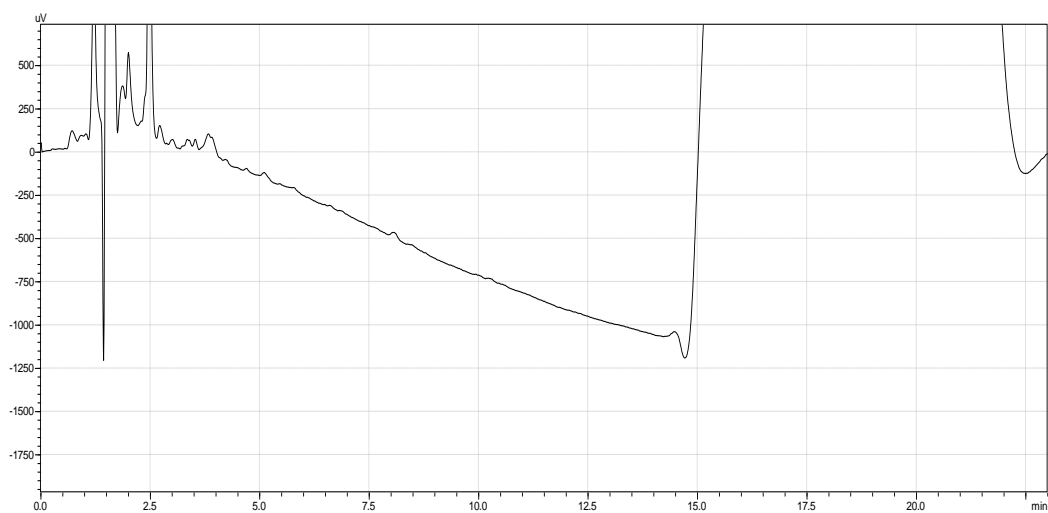
n – množství cinchokainu-hydrochloridu v mg v 1g léčivého přípravku

4.2.2 Validační parametry metody pro stanovení nečistoty dexamethasonu

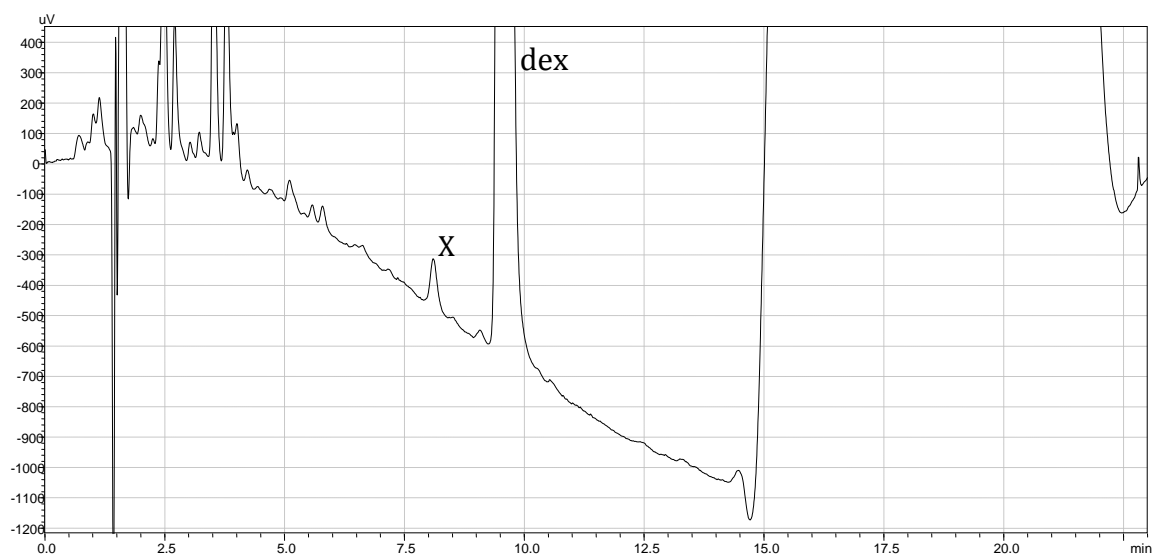
4.2.2.1 Selektivita

Pro zjištění selektivity se srovnaly chromatogramy získané proměřením vzorku č.6 (základ léčivého přípravku), vzorku č.7 (dexamethason se základem), vzorku č.8 (cinchokain se základem) a vzorku č.9 (modelu léčivého přípravku). Retenční čas dexamethasonu je 9,2 minut. Pík s retenčním časem 8,2 minut odpovídá nečistotě dexamethasonu. Porovnáním chromatogramů (obrázky č.4 –č.7) je vidět, že je metoda selektivní.

Obr.č.4: Chromatogram vzorku č.6, obsahujícího základ

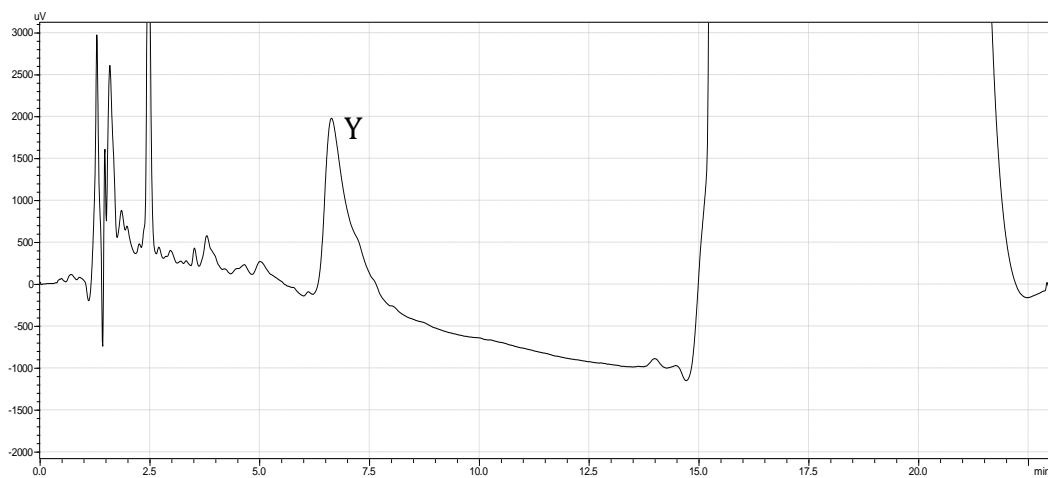


Obr.č.5: Chromatogram vzorku č.7, obsahujícího dexamethason se základem



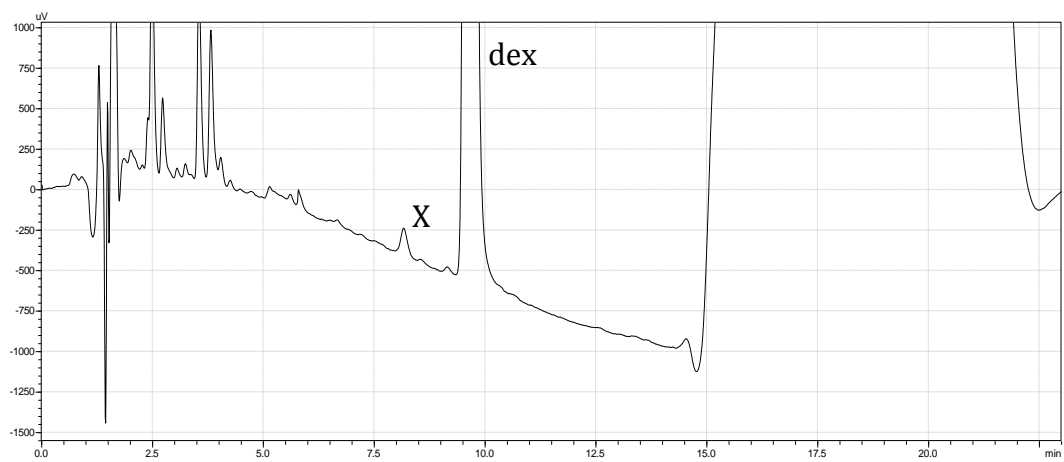
Pík dexamethasonu značen dex. Pík nečistoty je značen X.

Obr.č.6: Chromatogram vzorku č. 8, obsahujícím cinchokain-hydrochlorid se základem (tzn. přípravek bez dexamethasonu)



Pík nečistoty cinchokainu je značen Y.

Obr.č.7: Chromatogram vzorku č.9, obsahujícího model léčivého přípravku



Pík dexamethasonu značen dex. Pík nečistoty je značen X.

4.2.2.2 Linearita a LOQ

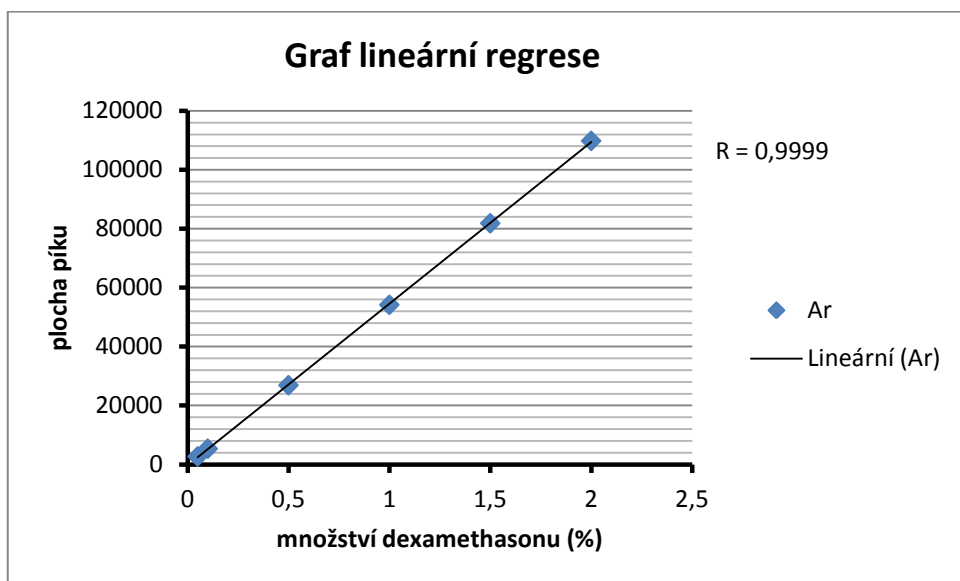
Pro ověření linearity jsem proměřila pracovní roztoky č.1-č.6. Každý roztok se proměřil třikrát za chromatografických podmínek: Kolona KinetexTM C18 (150 x 2,1 mm, 1,7), mobilní fáze č.8, průtok mobilní fáze 0,2 ml/min, detekce UV při vlnové délce 238 nm, teplota kolony 30 °C. Objem nástřiku byl 50 µl. Závislost byla lineární. Korelační faktor byl 0,9999. Korelační faktor vyhovuje požadavku. Pro stanovení nečistoty v léčivém přípravku je požadováno, aby naměřený korelační faktor neklesl pod hodnotu 0,99.

Tabulka č.6: Stanovení nečistoty dexamethasonu – linearita

roztok	m _D (%)	c _D (µg/ml)	plochy píků	průměr ploch
č.1	0,05	0,01	2611	
			2724	
			2763	2699,333
č.2	0,1	0,02	5343	
			5324	
			5340	5335,667
č.3	0,5	0,1	26859	
			26868	
			26891	26872,667
č.4	1	0,2	54276	
			54133	
			54084	54164,333
č.5	1,5	0,3	81896	
			81708	
			81872	81825,333
č.6	2	0,4	109686	
			109788	
			109793	109793

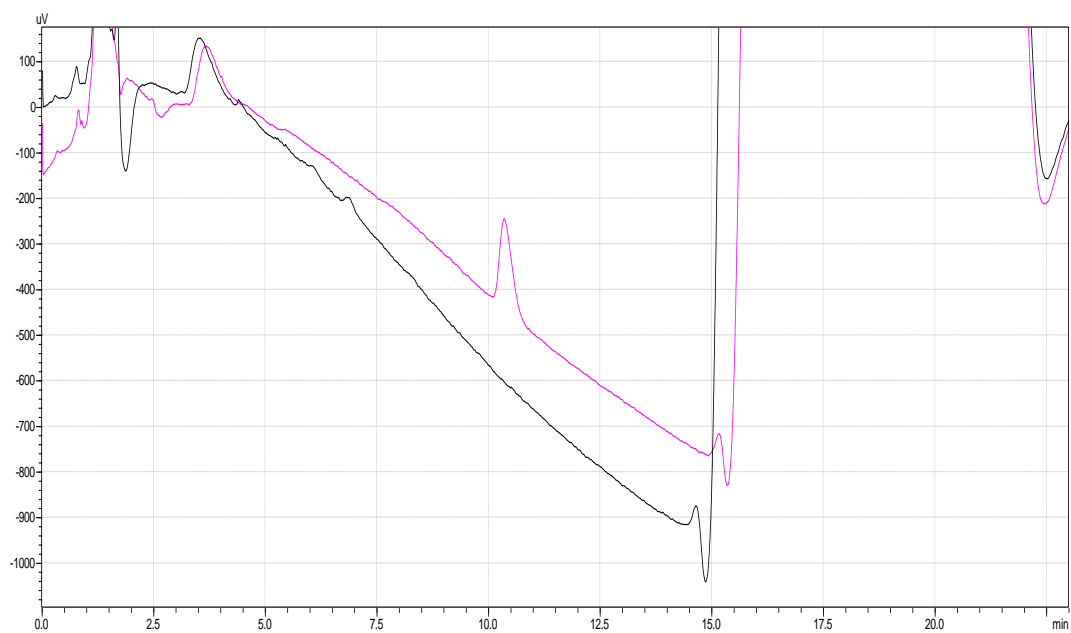
c_D – množství dexamethasonu v µg v 1 ml roztoku

Graf č.2: Graf lineární regrese pro metodu stanovení nečistoty dexamethasonu



LOQ jsem zjišťovala z chromatogramu vzorku standardu dexamethasonu o koncentraci 0,05 % (roztok č.1), jako blank určující nulovou linii jsem vzala chromatogram z analýzy vzorku č.8 (cinchokain-hydrochlorid se základem). Výška píku (H) byla 14 mm a h se rovnalo 1,5 mm. Dosazením do vzorce $S/D = 2 \cdot H/h$ S/D vyšel 18,67. Poměr signálu k šumu píku dexamethasonu pro roztok o koncentraci dexamethasonu 0,05% je 18,67. Přímou úměrou jsem vypočítala koncentraci roztoku, jehož poměr S/D by měl hodnotu právě 10. Tato koncentrace (LOQ) je 0,027%, což vyhovuje požadavku. Požadavek je aby LOQ byla méně než 0,05%.

Obr.č.8: Chromatogram roztoku č.1 pro výpočet LOQ



chromatogram nakreslený černou barvou: roztok č.8

chromatogram nakreslený růžovou barvou: roztok č.1 o koncentraci dexamethasonu 0,05%

4.2.2.3 Přesnost

Pro zjištění přesnosti metody jsem analyzovala vzorky LP_1, LP_2, LP_3, LP_4, LP_5 a LP_6. Výsledná plocha píku nečistoty dexamethasonu v procentech u jednotlivého vzorku je průměrnou hodnotou dvou měření. Průměry ploch píků vzorků LP_1 až LP_6 se zprůměrovaly a vypočítala se relativní směrodatná odchylka (RSD). RSD mi analýzou vyšla 0,95 %.

Tabulka č.7: Přesnost metody stanovení čistoty dexamethasonu

vzorek	n_v (g)	n_{mf} (g)	retenční čas píku (min)	tailing faktor	plocha píku (%)	průměr ploch píků (%)
LP_1 LP_1	0,11647	1,04224	7.677 7.598	1.033 1.021	1,172 1,188	1,18
LP_2 LP_2	0,11605	1,04625	7.593 7.590	1.017 1.015	1,191 1,193	1,192
LP_3 LP_3	0,11542	1,04187	7.595 7.606	0.999 1.002	1,206 1,213	1,2095
LP_4 LP_4	0,11964	1,08423	7.605 7.615	0.985 0.991	1,210 1,209	1,2095
LP_5 LP_5	0,11542	1,04001	7.613 7.630	0.991 0.970	1,200 1,201	1,2005
LP_6 LP_6	0,11662	1,05808	7.650 7.655	0.967 0.966	1,204 1,201	1,2025

průměr (%)	1,199
RSD%	0,947274119

n_v – navážka vzorku léčivého přípravku v g

n_{mf} – navážka mobilní fáze A v g

4.2.2.4 Stabilita vzorků

Stabilitu vzorků po 24 hodinách jsem zjišťovala u vzorků LP_1, LP_2, LP_3, LP_4, LP_5 a LP_6. Tyto vzorky se po 24 hodinovém stání ve tmě při teplotě laboratoře 20 -22 °C proměřily stejným postupem jako u stanovení přesnosti metody předchozí den. Výsledky analýz se také vyhodnocovaly stejným postupem jako u stanovení přesnosti. Zjistila se průměrná hodnota množství nečistoty ve vzorcích LP_1 až LP_6 po 24 hodinách. Tento průměr byl 1,203 %. Od této hodnoty průměru se odečetla

průměrná hodnota množství nečistoty zjištěná měřením přesnosti vzorků LP_1 až LP_6 předchozí den, která byla 1,199 %.

Rozdíl těchto hodnot byl 0,00375%. Tento rozdíl se vyjádřil jako procentuální podíl z průměrné hodnoty množství nečistoty dexamethasonu ve vzorcích LP_1_ po 24 hodinách až LP_6_po 24 hodinách. Rozdíl byl po zaokrouhlení 0,3%, vzhledem k původnímu obsahu.

Vzorky jsou po 24 hodinách, ve tmě, za teploty laboratoře 20-22 °C stabilní.

Tabulka č.8: Stabilita vzorků léčivého přípravku

analýza	čísla vzorků	ret. čas (min)	tailing faktor	plocha (%)	průměr ploch (%)
1	LP_1_po 24 hod.	7.813	1.031	1,164	1,17
2	LP_1_po 24 hod.	7.728	1.038	1,176	
3	LP_2_po 24 hod.	7.709	1.029	1,184	1,1835
4	LP_2_po 24 hod.	7.696	1.025	1,183	
5	LP_3_po 24 hod.	7.703	1.017	1,202	1,202
6	LP_3_po 24 hod.	7.714	1.016	1,202	
7	LP_4_po 24 hod.	7.716	1.006	1,221	1,2185
8	LP_4_po 24 hod.	7.711	0.998	1,216	
9	LP_5_po 24 hod.	7.703	0.989	1,212	1,2145
10	LP_5_po 24 hod.	7.719	0.990	1,217	
11	LP_6_po 24 hod.	7.706	0.973	1,228	1,228
12	LP_6_po 24hod.	7.740	0.951	1,228	

celkový průměr (%)	1,203
RSD%	1,846959

4.2.2.5 Test způsobilosti

- parameter opakovatelnosti nástřiků: Relativní směrodatná odchylka (RSD) pěti nástřiků roztoku č.3 vyšla 0,26%. Získaná RSD je menší než 4,0%, a tudíž vyhovuje požadavku.

Tabulka č.9: Test způsobilosti – opakovatelnost nástřiků

roztok č.3	retenční čas (min)	plocha
1.	9.037	27392
2.	9.026	27407
3.	9.068	27333
4.	9.088	27229
5.	9.102	27349
	průměr ploch	27342
	RSD (%)	0,256173082

- faktor symetrie hlavního píku: Faktor symetrie hlavního píku se u všech tří nástřiků vzorku č.3 pohyboval v rozmezí 0,8-1,5 a vyhovoval tak požadavku.

Tabulka č.10: Test způsobilosti – faktor symetrie

roztok č.3	ret. čas (min)	faktor symetrie
1.nástřik	9.931	1.520
2.nástřik	9.921	1.514
3. nástřik	9.914	1.496

5. ZÁVĚR

1. Byly zpracovány informační zdroje zabývající se vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií a UPLC, validací chromatografických metod, cinchokainem-hydrochloridem a dexamethasonem.
2. Byly optimalizovány chromatografické podmínky pro metodu stanovení cinchokainu-hydrochloridu na koloně Kinetex™ C18 (150 x 2,1 mm, 1,7 μm). Byla zvolena následující mobilní fáze: acetonitril a roztok triethylaminu (1,05 ml triethylaminu na 250 ml vody) v poměru 75:25, pH 7,0.
3. Byly optimalizovány chromatografické podmínky pro stanovení nečistoty dexamethasonu. Jednalo se o gradientovou metodu. Složení mobilní fáze bylo následující: Mobilní fáze A – směs acetonitrilu a vody v poměru 30:70. Mobilní fáze B - acetonitril a roztok triethylaminu (1,05 ml triethylaminu na 250 ml)
4. Byla provedena validace metod:

Stanovení cinchokainu-hydrochloridu

- linearita: korelační koeficient je 0,9994, linearita byla prokázána (korelační koeficient nesmí být pod 0,999)
- opakovatelnost: byla prokázána, relativní směrodatná odchylka je 0,48 %, není větší než maximální povolená směrodatná odchylka ($RSD_{\max}=2$)
- správnost: byla prokázána, průměrná výtěžnost je 99,7 % (vyhovuje požadavku 98,0-102,0 %)

Stanovení nečistoty dexamethasonu

- selektivita: byla prokázána
- linearita: byla prokázána, korelační koeficient je 0,9994 (korelační koeficient nesmí klesnout pod 0,99)
- LOQ: LOQ je 0,027 %, vyhovuje požadavku, aby LOQ byla méně než 0,05 %
- přesnost: byla prokázána, relativní směrodatná odchylka je 0,95 %, není větší než maximální povolená směrodatná odchylka ($RSD_{\max}=2$)
- stabilita vzorků: vzorky jsou stabilní po 24 hodinovém stání ve tmě, v autosampleru přístroje, při teplotě 20-22 °C
- test způsobilosti:
 - a) opakovatelnost nástřiků: RSD je 0,26 %, což vyhovuje požadavku, že RSD by měla mít hodnotu menší než 4

b) faktor symetrie hlavního píku: vyhovuje požadavku,
faktory symetrie jsou v rozmezí 0,8-1,5

LITERATURA

- [1] *Český lékopis 2009*. Praha: Grada, 2009.
- [2] MOTYKA, K. - HLAVÁČ, J. *Stručný přehled separačních metod*. 1. vyd. Olomouc: Univerzita Palackého v Olomouci, 2009. 45 s. ISBN 978-80-244-2304-3.
- [3] KLIMEŠ, J. et al. *Kontrola léčiv II.* 2. vyd. Praha: Karolinum, 2007. 94 s. ISBN 978-80-246-1460-1.
- [4] KARLÍČEK, R. et al. *Analytická chemie pro farmaceuty*. 2. vyd. Praha: Karolinum, 2001. 231 s. ISBN 80-246-0348-9.
- [5] DOUŠA, Michal. *HPLC.CZ* [online]. poslední revize 24.1.2011 [cit.2011-06-19]. Dostupné z: <http://www.hplc.cz>.
- [6] KLIMEŠ, J. et al. *Kontrola léčiv I.* 2. vyd. Praha: Karolinum, 2008. 149 s. ISBN 978-80-246-1613-1.
- [7] ŠTULÍK, K. et al. *Analytické separační metody*. 1. vyd. Praha: Karolinum, 2004. 264 s. ISBN 80-246-0852-9.
- [8] Fekete, S. - Ganzler, K. - Fekete, J. Efficiency of the new sub-2 μ m core-shell (KinetexTM) column in practice, applied for small and large molecule separation. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2011, vol. 54, no. 3, s. 482-490.
- [9] Gritti, F. et al. Performance of columns packed with the new shell particles, Kinetex-C₁₈. *Journal of Chromatography A*, 2010, vol. 1217, s. 1589-1603.
- [10] Souhrn SPC: 21123, AISLP WIN ČR
- [11] Příbalová informace: 21122, AISLP WIN
- [12] LINCOVÁ, D. et al. *Základní a aplikovaná farmakologie*. 2. vyd. Praha: Galén, 2007. 672 s. ISBN 978-80-7262-373-0.
- [13] *The United States Pharmacopeia USP 34-NF 29*, 2010
- [14] Mohammad, A.-A. M. et al. Column and Thin-Layer Chromatographic Methods for the Simultaneous Determination of Acediasulfone in the Presence of Cinchocaine, and Cefuroxime in the Presence of Its Hydrolytic Degradation Products. *Journal of AOAC International*, 2007, vol. 90, no. 2, s. 405-413.

- [15] El-Gindy, A. - Korany, M. A. - Bedair, M. F. First derivative spectrophotometric and high-performance liquid chromatographic determination of cinchocaine hydrochloride in presence of its acid degradation product. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 1998, vol. 17, s. 1357-1370.
- [16] Izumoto, S. et al. Chromatography of crotamiton and its application to the determination of active ingredients in ointments. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 1997, vol. 15, no. 9-10, s. 1457-66.
- [17] Baker, J. S. et al. Physical characterization and evaluation of HPLC columns packed with superficially porous particles. *Journal of Separation Science*, 2010, vol. 33, no. 17-18, s. 2547-2557.
- [18] Takeshi Saito et al. Simultaneous determination of dibucaine and naphazoline in human serum by monolithic silica spin column extraction and liquid chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*, 2008, vol. 872, no. 1-2, s. 186-190.
- [19] Souhrn SPC: 107987, AISLP WIN ČR
- [20] POUROVÁ, J. et al. *Farmakologie pro farmaceuty IV.*. 1. vyd. Praha: Karolinum, 2009. 75 s. ISBN 978-80-246-1704-6.
- [21] European Pharmacopoeia 7.0, C.H.Beck, Nörlingen, 2010
- [22] Spangler, M. - Mularz, E. A Validated, Stability-Indicating Method for the Assay of Dexamethasone in Drug Substance and Drug Product Analyses, and the Assay of Preservatives in Drug Product. *Chromatographia*, 2001, vol. 54, no. 5-6, s. 329-334.
- [23] Arthur, K. E. - Wolff, J.-C. - Carrier, D. J. Analysis of betamethasone, dexamethasone and related compounds by liquid chromatography/electrospray mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 2004, vol. 18, s. 678-684.
- [24] Chen, Q. et al. A validated, stability-indicating HPLC method for the determination of dexamethasone related substances on dexamethasone-coated drug-eluting stents. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2008, vol. 48, no. 3, s. 732-738.

[25] ŠALAMOUNOVÁ, A. *Hodnocení vybrané účinné látky v přípravku VII.*. Hradec Králové: Univerzita Karlova. Farmaceutická fakulta. Katedra farmaceutické chemie a kontroly léčiv, 2011. 68 s.. Vedoucí diplomové práce PharmDr. Petr Kastner, Ph.D.

SOUHRN

Hodnocení vybrané účinné látky v přípravku VI.

Diplomová práce

Hana Zavadilová

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

Byly hledány vhodné podmínky pro metodu stanovení cinchokainu-hydrochloridu a pro metodu hodnocení čistoty dexamethasonu v léčivém přípravku pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie. Pro separaci byla vybrána chromatografická kolona Kinetex™ C18 (150 x 2,1 mm, 1,7 μm).

Ideální mobilní fázi pro stanovení cinchokainu-hydrochloridu byla směs acetonitrilu a roztoku triethylaminu o koncentraci 30 mmol/l (1,05 ml triethylaminu na 250 ml vody) v poměru 75:25. pH roztoku triethylaminu bylo nastaveno kyselinou fosforečnou na hodnotu 7,0. Průtok mobilní fáze byl 0,2 ml/min. UV detektor snímal při 325 nm. Teplota kolony byla udržována při 30 °C. Za těchto podmínek byla zkoušena linearita, opakovatelnost a správnost.

Metoda hodnocení čistoty dexamethasonu probíhala za gradientové eluce. Složení mobilní fáze č.8: Mobilní fáze A byla směs acetonitrilu a vody v poměru 30:70. Mobilní fáze B byla směs acetonitrilu a roztoku triethylaminu 30 mmol/l (1,05 ml triethylaminu na 250 ml vody) v poměru 75:25. pH roztoku triethylaminu bylo nastaveno kyselinou fosforečnou na hodnotu 7,0. Průtok mobilní fáze 0,2 ml/min, detekce UV při vlnové délce 238 nm, teplota kolony 30 °C. Za těchto podmínek byla u metody proměřena selektivita, linearita, LOQ, přesnost. Pro test způsobilosti byly proměřeny faktory symetrie hlavních píků a opakovatelnost nástřiků.

ABSTRACT

Determination of Selected Active Substance in the Preparation

VI.

Thesis

Hana Zavadilová

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

Suitable UPLC methods for the determination of cinchocainum-hydrochloridum and for the determination purity of dexamethasonum were searched. The chromatographic column Kinetex™ C18 (150 x 2,1 mm, 1,7 µm) was chosen.

A suitable mobile phase for the determination of cinchocainum-hydrochloridum was a mixture of acetonitrile:solution of triethylamine in concentration 30 mmol/l (1,05 ml triethylamine in 250 ml of water), 75:25. pH of the mobile phase was adjusted to 7,0 by orthophosphoric acid. Flow rate was 0,2 ml/min. UV detector scanned at 325 nm. The column temperature was maintained at 30 °C. Linearity, repeatability and accuracy were tested under these conditions.

Method for determination purity of dexamethasonum was running under conditions of gradient elution. Composition of mobile phase: Mobile phase A was acetonitrile:water, 30:70. Mobile phase B mixture of acetonitrile:solution of triethylamine in concentration 30 mmol/l (1,05 ml triethylamine in 250 ml of water), 75:25. pH of the mobile phase was adjusted to 7,0 by orthophosphoric acid. Flow rate 0,2 ml/min. Detection UV at 238 nm, the column temperature 30 °C. Specificity, linearity, LOQ, precision were tested under these conditions.

Replicate injections and the symmetry factor of the principal peak were examined in system suitability test.