

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

FARMACEUTICKÁ FAKULTA

KATEDRA ANALYTICKÉ CHEMIE

VÝVOJ A VALIDACE HPLC METODY

PRO ANALÝZU PILOKARPINOVÝCH LÉKOPISNÝCH OČNÍCH KAPEK

(RIGORÓZNÍ PRÁCE)

KONZULTANT RIGORÓZNÍ PRÁCE:

HRADEC KRÁLOVÉ 2012

PharmDr. Ludmila Matysová, Ph.D.

Mgr. Tereza Bažantová

PROHLÁŠENÍ

„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. Práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.“

Děkuji PharmDr. Ludmile Matysové, Ph.D. za odborné vedení práce, ochotnou pomoc a cenné rady.

ABSTRAKT

Univerzita Karlova v Praze
Farmaceutická fakulta v Hradci Králové
Katedra analytické chemie

Kandidát: Mgr. Tereza Bažantová

Školitel: PharmDr. Ludmila Matysová Ph.D.

Název rigorózní práce: Vývoj a validace HPLC metody pro analýzu pilokarpinových lékopisných očních kapek.

Byla vyvinuta a částečně validována metoda vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC) pro stanovení pilokarpin-hydrochloridu v lékopisných očních kapkách o koncentraci 1 a 2% účinné látky.

V odborné literatuře bylo popsáno množství HPLC metod, stanovujících pilokarpin-hydrochlorid v očních kapkách. Metody využívají různé stacionární i mobilní fáze a rozdíly jsou také v době trvání samostatné analýzy.

V této práci je popsán vývoj metody, vycházející z práce autorů El-Deeb S, Schepers U a Wätzig H.: *Evaluation of monolithic C18 HPLC columns for the fast analysis of pilocarpine hydrochloride in the presence of its degradation products* publikované v roce 2006 v časopisu Pharmazie [17]. Byla použita monolitická kolona Chromolith High Resolution RP 18 endcapped 100 x 4,6 mm, Merck, Německo, způsob provedení chromatografie obráceného systému fází. Použitá mobilní fáze byla složena z pufru o pH 3 a methanolu v poměru 98:2 (V/V), rychlost průtoku 1 ml/min. Výsledky byly vyhodnoceny použitím UV-VIS detektoru při vlnové délce 220 nm. Pro kvantitativní stanovení byla zvolena metoda vnitřního standardu. Jako vnitřní standard byl použit fenylefrin hydrochlorid.

Metoda umožňuje stanovení pilokarpin-hydrochloridu i kyseliny pilokarpové. Sledované látky byly vylučovány v pořadí: isopilokarpin, pilokarpin, kyselina pilokarpová a kyselina isopilokarpová. Celková doba trvání analýzy je méně než 10 minut.

Byly provedeny tyto validační parametry metody: přesnost, správnost, linearita, selektivita, stabilita roztoku pilokarpin-hydrochloridu po dobu 72 hodin při teplotě $5 \pm 3^\circ\text{C}$ a $20 \pm 5^\circ\text{C}$ a přístupu či nepřístupu světla a test způsobilosti systému.

Metoda je selektivní, dává přesné a správné výsledky a lineární odpověď ve stanoveném rozsahu 12,5 – 75,0 mg/100 ml pilokarpin-hydrochloridu.

Z příbuzných látek byla blíže studována pouze kyselina pilokarpová, jejíž nárůst v očních kapkách se vlivem hydrolyzy především předpokládá. Z důvodu neexistence standardu kyseliny pilokarpové, bylo možné pro tuto sloučeninu provést pouze test způsobilosti chromatografického systému a z validačních parametrů test selektivity.

ABSTRACT

Charles University in Prague
Faculty of Pharmacy in Hradec Králové
Department of Analytical Chemistry

Candidate: Mgr. Tereza Bažantová

Supervisor: PharmDr. Ludmila Matysová Ph.D.

Title of rigorous thesis: Development and validation of HPLC method for analysis of pharmacopoeial eye drops with pilocarpine.

High-performance liquid chromatography method (HPLC) for the determination of pharmacopoeial pilocarpine-hydrochloride eye drops with a concentration of 1 and 2% was developed and partially validated.

A variety of HPLC methods have been described in the specialized literature for the determination of pilocarpine-hydrochlorid in eye drops. The methods use different stationary and mobile phases and the differences are in the time of analysis.

This work describes development of the method based on the work of authors El-Deeb S, Schepers U and Wätzig H.: Evaluation of Monolithic C18 HPLC columns for the fast analysis of pilocarpine-hydrochloride in the presence of its degradation products published in 2006 in the journal Pharmazie [17]. It was performed using a reverse phase liquid chromatography with a monolithic column Chromolith High Resolution RP 18 endcapped 100 x 4.6 mm, Merck, Germany. The used mobile phase was composed of buffer pH 3 and methanol in the ratio 98:2 (V/V) at the flow rate 1 ml / min. Results were analyzed by UV-VIS detector at a wavelength of 220 nm. The method of the internal standard was used for the quantitative determination. Phenylephrine hydrochlorid was chosen as an internal standard.

The method enables the determination of pilocarpine-hydrochloride and pilocarpic acid. The monitored substances were eluted in the order: isopilocarpin, pilocarpine, pilocarpic acid and isopilocarpic acid. The total time of the analysis is less than 10 minutes.

It was performed following validation parameters of the method: precision, accuracy, linearity, selectivity, stability pilocarpine-hydrochloride solution for 72 hours both at $5 \pm 3^\circ\text{C}$ and $20 \pm 5^\circ\text{C}$ and access to or protected from light and system suitability test.

The method is selective, precise and provides good results and is linear in range from 12.5 to 75.0 mg/100 ml of pilocarpine hydrochloride.

Only pilocarpic acid was closely studied from all four related substances, because its increasing in eye drops is mainly due to hydrolysis assumed. In the absence of pilocarpic acid standard only system suitability test and the test of the selectivity was possible to make.

OBSAH

1. ÚVOD	9
2. CÍL A POPIS ZADÁNÍ PRÁCE	10
3. TEORETICKÁ ČÁST	11
3.1. TEORIE HPLC.....	11
3.1.1. Úvod.....	11
3.1.2. Dělení HPLC.....	11
3.1.2.1. Podle způsobu chromatografie.....	11
3.1.2.2. Podle fyzikálně-chemického principu separace.....	11
3.1.2.3. Podle typu vylučování.....	12
3.1.2.4. Podle typu analýzy.....	13
3.1.3. Parametry zahrnuté v chromatografické separaci.....	13
3.1.3.1. Retenční data.....	13
3.1.3.2. Chromatografická data.....	15
3.1.3.3. Separační data.....	16
3.1.3.4. Přesnost kvantitativní analýzy.....	17
3.1.3.5. Způsobilost systému.....	18
3.1.4. Přístroj.....	19
3.1.4.1. Čerpací systémy.....	19
3.1.4.2. Dávkovací zařízení.....	19
3.1.4.3. Chromatografická kolona.....	20
3.1.4.4. Mobilní fáze.....	21
3.1.4.5. Detektory.....	22
3.1.5. Použití HPLC.....	23
3.1.5.1. Preparativní HPLC.....	23
3.1.5.2. Chemická separace.....	23
3.1.5.3. Čištění.....	24
3.1.5.4. Totožnost.....	24
3.1.5.5. Kvantifikace.....	24
3.2. VALIDACE.....	25
3.2.1. Úvod.....	25
3.2.2. Selektivita.....	26
3.2.2.1. Totožnost.....	26
3.2.2.2. Stanovení obsahu a zkouška nečistot.....	26
3.2.3. Správnost.....	27
3.2.3.1. Stanovení obsahu.....	27
3.2.4. Přesnost.....	28
3.2.4.1. Opakovatelnost.....	28
3.2.4.2. Mezilehlá přesnost.....	29
3.2.4.3. Reprodukovatelnost.....	29
3.2.5. Detekční limit (mez detekce).....	29
3.2.5.1. Na základě vizuálního hodnocení.....	29
3.2.5.2. Na základě poměru signálu k šumu.....	29
3.2.5.3. Na základě směrodatné odchylky odezvy a sklonu.....	29
3.2.6. Kvantitativní limit (mez stanovitelnosti).....	30
3.2.6.1. Na základě vizuálního hodnocení.....	30
3.2.6.2. Na základě poměru signálu k šumu.....	31
3.2.6.3. Na základě směrodatné odchylky signálu a sklonu.....	31
3.2.7. Linearita.....	31
3.2.8. Rozsah.....	32
3.2.9. Robustnost.....	32
3.2.10. Test způsobilosti systému.....	33
3.3. PILOKARPIN-HYDROCHLORID.....	34
3.3.1. Definice.....	34
3.3.2. Vlastnosti.....	34
3.3.3. Farmakologie.....	34
3.3.4. Mechanismus snížení nitroočního tlaku.....	35
3.3.5. Dávkování.....	35
3.3.6. Nežádoucí účinky.....	35
3.4. REŠERŠE PUBLIKOVANÝCH HPLC METOD.....	36

3.4.1.	<i>Iontovýměnná chromatografie</i>	36
3.4.2.	<i>HPLC normálního systému fází</i>	36
3.4.3.	<i>Fenylová stacionární fáze</i>	36
3.4.4.	<i>CN- stacionární fáze</i>	37
3.4.5.	<i>HPLC obráceného systému fází</i>	37
3.4.6.	<i>Isokratická separace na YMC ODS-AM koloně</i>	37
3.4.7.	<i>β-cyklodextrinová kolona</i>	38
3.4.8.	<i>Monolitická kolona</i>	38
4.	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	40
4.1.	CHEMIKÁLIE, STANDARDY, VZORKY.....	40
4.2.	PŘÍSTROJE, PODMÍNKY SEPARACE.....	41
4.3.	PŘÍPRAVA VZORKŮ, STANDARDŮ A ANALYZOVANÝCH ROZTOKŮ.....	42
4.3.1.	<i>Oční kapky s pilokarpin-hydrochloridem 1%</i>	42
4.3.2.	<i>Oční kapky s pilokarpin-hydrochloridem 2%</i>	42
4.3.3.	<i>Standard pilokarpin-hydrochloridu 0,1%</i>	42
4.3.4.	<i>Příprava roztoku vnitřního standardu o koncentraci 1,0 mg/100ml</i>	42
4.3.5.	<i>Příprava roztoku vnitřního standardu fenylefrin hydrochloridu v mobilní fázi o koncentraci 1,0 mg/100ml</i>	42
4.3.6.	<i>Porovnávací roztok kyseliny pilokarpové č. 1</i>	42
4.3.7.	<i>Porovnávací roztok kyseliny pilokarpové č. 2</i>	43
4.3.8.	<i>Zkušební roztok č. 1</i>	43
4.3.9.	<i>Zkušební roztok č. 2</i>	43
4.3.10.	<i>Pracovní standard pilokarpin-hydrochloridu s vnitřním standardem</i>	43
4.3.11.	<i>Pracovní roztok kyseliny pilokarpové s vnitřním standardem</i>	43
4.3.12.	<i>Příprava kalibračních roztoků pilokarpin-hydrochloridu pro test linearity</i>	43
4.4.	STANOVENÍ OBSAHU PILOKARPINU-HYDROCHLORIDU V OČNÍCH KAPKÁCH.....	45
4.5.	STANOVENÍ OBSAHU KYSELINY PILOKARPOVÉ V OČNÍCH KAPKÁCH.....	46
5.	VÝSLEDKY A DISKUZE	47
5.1.	VLASTNÍ VÝVOJ HPLC METODY.....	47
5.1.1.	<i>Měření na C₁₈ koloně</i>	47
5.1.2.	<i>Měření na monolitické koloně</i>	48
5.1.2.1.	<i>Hledání vnitřního standardu</i>	50
5.1.2.2.	<i>Zkouška změny mobilní fáze</i>	50
5.1.2.3.	<i>Hledání vhodné ředící směsi vzorků a úprava složení kyseliny pilokarpové</i>	51
5.2.	VYHODNOCENÍ OPTIMÁLNÍCH PODMÍNEK.....	55
5.3.	VALIDAČNÍ ZPRÁVA PRO OČNÍ KAPKY S PILOKARPIN-HYDROCHLORIDEM.....	56
5.3.1.	<i>Souhrn</i>	56
5.3.2.	<i>Podmínky separace</i>	56
5.3.3.	<i>Test způsobilosti chromatografického systému</i>	56
5.3.3.1.	<i>Zdánlivý počet teoretických pater (N)</i>	56
5.3.3.2.	<i>Faktor symetrie (A_S)</i>	57
5.3.3.3.	<i>Rozlišení</i>	57
5.3.3.4.	<i>Opakovatelnost</i>	58
5.3.4.	<i>Validace analytické metody</i>	59
5.3.4.1.	<i>Přesnost</i>	59
5.3.4.2.	<i>Linearita</i>	60
5.3.4.3.	<i>Správnost</i>	61
5.3.4.4.	<i>Selektivita</i>	62
5.3.4.5.	<i>Robustnost</i>	65
5.3.5.	<i>Závěr validační zprávy</i>	66
5.4.	VALIDAČNÍ ZPRÁVA PRO KYSELINU PILOKARPOVOU.....	67
5.4.1.	<i>Souhrn</i>	67
5.4.2.	<i>Podmínky separace</i>	67
5.4.3.	<i>Test způsobilosti chromatografického systému</i>	67
5.4.3.1.	<i>Zdánlivý počet teoretických pater (N)</i>	67
5.4.3.2.	<i>Faktor symetrie (A_S)</i>	68
5.4.3.3.	<i>Rozlišení</i>	68
5.4.3.4.	<i>Opakovatelnost</i>	69
5.4.4.	<i>Validace analytické metody</i>	70
5.4.4.1.	<i>Selektivita</i>	70

5.4.5.	<i>Závěr validační zprávy</i>	73
6.	ZÁVĚR	74
7.	POUŽITÁ LITERATURA	75

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

A	Plocha píku
A_s	Faktor symetrie píku
CONDUCT	Detektor vodivostní
CORONA	Charged Aerosol detektor (CAD) – aerosolový detektor nabitých částic
DL	Detekční limit
D_m	Hmotnostní distribuční poměr, známý jako kapacitní faktor K' nebo retenční faktor K
ECD detektor	Detektor elektrochemický
ELSD detektor	Evaporative Light Scattering detektor – odpařovací detektor rozptylu světla
FLD detektor	Detektor fluorimetrický
F_m	Průtok
HPLC	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie
IR detektor	Detektor infračervený
K_0	Distribuční koeficient
K_C	Rovnovážný distribuční koeficient (známý jako distribuční konstanta)
M	Molarita – molární koncentrace
N	Zdánlivý počet teoretických pater
n	Počet opakování
ODS	Stacionární fáze na bázi oktadecyl silikagelu
p/v	Poměr výšky píku k sedlu
QL	Kvantitativní limit
r	Relativní retence
RI detektor	Detektor refraktometrický
R_i	Výtěžnost
R_{ij}	Rozlišení dvou píků
RSD%	Relativní směrodatná odchylka (v procentech)
S/N	Poměr signálu k šumu

SD	Směrodatná odchylka
S_T	Faktor stability roztoku standardu v závislosti na době a způsobu uchovávání
t_R	Retenční čas
UV detektor	Detektor spektrofotometrický v ultrafialové oblasti
UV-VIS detektor	Detektor spektrofotometrický v ultrafialovo-viditelné oblasti
V/V	Procenta objemová, objem v objemu - udávají počet mililitrů látky ve 100 ml konečného výrobku.
V_R	Retenční objem
\bar{x}	Aritmetický průměr

1. ÚVOD

Oční kapky s pilokarpin-hydrochloridem jsou lékopisné oční kapky používané v očním lékařství k léčbě glaukomu.

Lékopisné stanovení pilokarpin-hydrochloridu je založeno na titrační metodě, která však nijak nevypovídá o čistotě připravených očních kapek. Pilokarpin ve vodném prostředí podléhá hydrolýze na pilokarpovou kyselinu a epimerizaci na isopilokarpin, který se může hydrolyzovat na isopilokarpovou kyselinu.

V očních kapkách je předpokládána především hydrolýza za vniku kyseliny pilokarpové.

Hlavním požadavkem při vývoji vhodné analytické metody byla proto schopnost stanovení jak pilokarpin-hydrochloridu, tak kyseliny pilokarpové. Mezi další vlastnosti, které měla metoda především splňovat, bylo, aby se dala provést v běžné analytické laboratoři, nevyžadovala složitou přípravu vzorku, a byla dostatečně rychlá.

Všechny tyto požadavky jsou splněny při použití vysokoúčinné kapalinové chromatografie. Metoda popsaná v této práci, umožňuje stanovení pilokarpin-hydrochloridu a sledování hladiny kyseliny pilokarpové za čas méně než 10 minut bez složité přípravy vzorku.

2. CÍL A POPIS ZADÁNÍ PRÁCE

Cílem této rigorózní práce bylo vyvinout HPLC metodu, vhodnou pro stanovení pilokarpin-hydrochloridu v lékopisných očních kapkách, o koncentraci 1 a 2%, včetně stanovení rozkladného produktu kyseliny pilokarpové.

Následným úkolem bylo provést validaci metody, která prokáže, že metoda poskytuje přesné a správné výsledky, je lineární ve stanoveném rozsahu a vhodná pro zamýšlené použití.

3. TEORETICKÁ ČÁST

3.1. Teorie HPLC

3.1.1. Úvod

Všechny chromatografické separační metody jsou založeny na rovnovážné distribuci složek vzorku mezi dvě fáze, z nichž jedna je mobilní a druhá stacionární [1].

HPLC je separační metoda, kdy analyzovaný vzorek, unášený v mobilní fázi, je pumpován skrz stacionární fázi. Obvykle je jedna z fází hydrofilní a druhá lipofilní. Složky vzorku rozdílně reagují s těmito dvěma fázemi. V závislosti na jejich polaritě se různou dobu zdržují na stacionární fázi. Tím dochází k separaci složek vzorku. Každá složka vzorku se vylučuje ze stacionární fáze ve specifický čas – retenční čas t_R . Průchodem složek přes detektor je zachycen jejich signál a zobrazen ve formě chromatogramu [2].

3.1.2. Dělení HPLC

3.1.2.1. Podle způsobu chromatografie

- Normální systém fází

Stacionární fáze je polární a mobilní fáze nepolární.

Při této metodě jsou nepolární sloučeniny unášeny rychleji a vylučují se první. Důvodem je nižší afinita rozpuštěné látky ke stacionární fázi.

Polární sloučeniny zůstávají na koloně delší dobu, protože mají vyšší afinitu ke stacionární fázi a trvá delší dobu, než jsou z kolony vyloučeny.

- Obrácený systém fází

Stacionární fáze je nepolární a mobilní fáze polární. Polární sloučeniny jsou vylučovány první a nepolární jsou zdržovány na koloně delší dobu.

Používají se různé kolony, např.: ODS nebo C₁₈, C₈, atd.

3.1.2.2. Podle fyzikálně-chemického principu separace

- Adsorpční chromatografie

Princip separace je adsorpce. Separace probíhá na základě odlišné adsorpce sloučenin na stacionární fázi. Používá se jak u normálního, tak obráceného systému fází [3].

- Rozdělovací chromatografie

K dělení látek dochází na základě jejich různých rozdělovacích koeficientů. Kapalná stacionární fáze je zakotvena na vhodném nosiči. Osvědčily se zvláště chemicky modifikované

stacionární fáze, u nichž se na bázi silikagelu silylací připravují fáze s různými skupinami. Po vnesení roztoku dělené směsi dochází při průchodu mobilní fáze k opakovanému rozdělování součástí směsi mezi obě kapalné fáze [4].

- Iontově výměnná chromatografie

Principem separace je iontová výměna, což je reverzibilní výměna funkčních skupin. Pro separaci směsi podobně nabitých iontů se používají iontově výměnné kolony. Pro kationty katexy a pro anionty anexy.

Tato technika je použitelná pro iontově výměnnou HPLC chromatografii.

- Ion párová chromatografie

Při chromatografii iontových párů se využívá tvorby iontových asociátů mezi separovanými látkami iontové povahy a opačně nabitým iontem, jehož molekula obsahuje relativně velký nepolární podíl [1].

Kolona pro obrácený systém fázi je dočasně konvertována na iontově výměnnou kolonu použitím iontově párových činidel jako je pentyl-, hexyl-, heptyl- nebo oktylsulfonové kyseliny, tetramethyl nebo tetraethyl amonium hydroxidu atd.

- Gelová permeační chromatografie

Sloučeniny s odlišnou velikostí molekul jsou pomocí gelu separovány ze směsi. Gel funguje jako molekulární síto.

Mechanismem separace je sterický a difusní efekt [3].

- Afinitní chromatografie

Afinitní chromatografie využívá vysoce specifické molekulární rozpoznávání určitých biomolekul. Ukotvením specifických ligandů, jako antigenů, na stacionární fázi se specificky a reverzibilně adsorbují odpovídající protilátky. Technika se využívá i u enzymů a co-enzymů, proteinových receptorů a hormonů.

Tato technika je široce používána v biotechnologii, mikrobiologii, biochemii atd.

Má vysokou specifitu a selektivitu a umožňuje purifikaci a izolaci biomolekul v nízké koncentraci [2].

- Chromatografie chirální fáze

Je používána pro separaci optických isomerů.

Pro odlišné typy stacionárních fází a druhů vzorků jsou použity různé principy.

Nejčastěji používaná stacionární fáze pro tento typ chromatografie je chemicky modifikovaný silikagel.

3.1.2.3. Podle typu vylučování

- Isokratická separace

Stejná polarita nebo eluční síla je udržena po celý proces [3].

Při isokratické eluci jsou sloučeniny vylučovány pomocí konstantního složení mobilní fáze. Tento typ je jednoduchý a levný, ale pro některé sloučeniny nevhodný, neboť není dosahováno požadovaného rozlišení v určeném čase.

- Gradientová separace

Pracuje se s mobilní fází, jejíž složení se mění s časem, takže v průběhu separace dochází ke zvyšování její eluční síly. Většinou se pracuje s binární elucí, kdy jedna fáze má výrazně nižší eluční sílu než druhá. Časová změna koncentrace v průběhu separace se označuje jako profil gradientu. Gradient může být spojitý (lineární nebo exponenciální) nebo gradient stupňovitý [1].

3.1.2.4. Podle typu analýzy

- Kvalitativní analýza

Slouží k identifikaci sloučenin, detekování přítomnosti nečistot, detekování složení vzorku apod. pomocí hodnoty retenčního času.

- Kvantitativní analýza

Stanovuje množství jednotlivé nebo několika sloučenin ve směsi pomocí porovnávání plochy píku standardu a vzorku [3].

3.1.3. Parametry zahrnuté v chromatografické separaci

3.1.3.1. Retenční data

- Retenční čas a retenční objem

Měření retence v eluční chromatografii může být vyjádřeno retenčním časem (t_R) přímo definovaným polohou vrcholu píku na chromatogramu. Z retenčního času může být vypočítán retenční objem (V_R) podle vzorce:

$$V_R = t_R \cdot v$$

v němž značí:

t_R – retenční čas nebo vzdálenost podél základní linie od bodu nástřiku ke kolmici spuštěné z vrcholu píku odpovídajícího dané složce;

v – průtokovou rychlost mobilní fáze.

- Hmotnostní distribuční poměr (známý jako kapacitní faktor K' nebo retenční faktor K)

Hmotnostní distribuční poměr (D_m) je definován jako:

$$D_m = \frac{\text{množství rozpuštěné látky ve stacionární fázi}}{\text{množství rozpuštěné látky v mobilní fázi}} = K_c \frac{V_S}{V_M}$$

v němž značí:

K_C – rovnovážný distribuční koeficient (známý jako distribuční konstanta);

V_S – objem stacionární fáze;

V_M – objem mobilní fáze [5].

Popisuje rychlost analyzované látky vzhledem k rychlosti mobilní fáze. Každá sloučenina stráví odlišné množství času interakcí s mobilní a stacionární fází.

Hodnota D_m menší než 1 značí, že sloučenina je slabě zadržována a vylučuje se blízko mrtvého objemu. Velká hodnota D_m značí dobrou separaci, ale nevýhodou toho je delší doba analýzy se širokými píky a snížením citlivosti. Ideální separace se vyskytuje s kapacitním faktorem mezi 1 a 5 [2].

Hmotnostní distribuční poměr složky může být určen z chromatogramu s použitím vzorce:

$$D_m = \frac{t_R - t_M}{t_M}$$

v němž značí:

t_R – retenční čas (nebo objem) nebo vzdálenost podél základní linie od bodu nástřiku ke kolmici spuštěné z vrcholu píku odpovídajícího dané složce;

t_M – mrtvý čas (nebo objem) nebo vzdálenost podél základní linie od bodu nástřiku ke kolmici spuštěné z vrcholu píku odpovídajícího nezadržované složce.

○ Distribuční koeficient

Eluční charakteristika látky na určité koloně ve vylučovací chromatografii může být dána distribučním koeficientem (K_0), který se vypočítá ze vzorce:

$$K_0 = \frac{t_R - t_M}{t_t - t_M}$$

v němž značí:

t_R – retenční čas (nebo objem) nebo vzdálenost podél základní linie od bodu nástřiku ke kolmici spuštěné z vrcholu píku odpovídajícího dané složce;

t_M – mrtvý čas (nebo objem) nebo vzdálenost podél základní linie od bodu nástřiku ke kolmici spuštěné z vrcholu píku odpovídajícího nezadržované složce;

t_i – retenční čas (nebo objem) nebo vzdálenost podél základní linie od bodu nástřiku ke kolmici spuštěné z vrcholu píku odpovídajícího složce, která může volně pronikat do všech pórů stacionární fáze [5].

3.1.3.2. Chromatografická data

o Účinnost chromatografické kolony

Chromatografická kolona je rozdělena do N teoretických pater. Termodynamická rovnováha analyzované látky mezi mobilní a stacionární fází se objevuje na každém patře. Účinnost kolony je vyjádřena počtem teoretických pater:

$$N = \frac{L}{H}$$

L – délka kolony (cm)

H – výška pater [3]

N je stanoveno experimentálně z chromatogramu za použití rovnice:

$$N = 5,54 \left(\frac{t_R}{w_h} \right)^2$$

v němž značí:

t_R – retenční čas nebo vzdálenost (nebo objem) podél základní linie od bodu nástřiku ke kolmici spuštěné z vrcholu píku odpovídajícího dané složce;

w_h – šířku píku v polovině jeho výšky.

Zdánlivý počet teoretických pater se mění se stanovovanou složkou, kolonou a retenčním časem.

o Faktor symetrie

Faktor symetrie píku (A_s) (nebo faktor chvostování píku) se vypočítá ze vzorce:

$$A_s = \frac{w_{0,05}}{2d}$$

v němž značí:

$w_{0,05}$ – šířku píku v jedné dvacetině jeho výšky;

d – vzdálenost mezi kolmicí spuštěnou z vrcholu píku a vzestupnou částí píku v jedné dvacetině jeho výšky.

Hodnota faktoru symetrie 1,0 značí úplnou (ideální) symetrii píku [5].

3.1.3.3. Separáční data

o Rozlišení

Cílem chromatografie je separace sloučenin ze směsi do pásem nebo píků při jejich průchodu kolonou. Rozlišení, R_{ij} poskytuje kvantitativní měřítko schopnosti kolony separovat dvě analyzované látky. Tato hodnota je získána díky retenčnímu času a šířce píku, které jsou snadno získány přímo z chromatogramu [3].

Rozlišení je veličina bezrozměrná a větší hodnota R_{ij} znamená lepší separaci, při volbě separačních podmínek nejde však o dosažení co největšího rozlišení, ale o dosažení právě potřebného rozlišení [1]. Dva píky se považují za úplně separované, jestliže R_{ij} je větší než 1,5. Rozlišení může být zlepšeno délkou kolony, což s sebou nese i zvýšení doby analýzy [3].

Rozlišení (R_{ij}) mezi píky dvou složek, které mají podobnou výšku, může být vypočteno ze vzorce:

$$R_{ij} = \frac{1,18(t_{R2} - t_{R1})}{w_{h1} + w_{h2}}$$

kde $t_{R2} > t_{R1}$,

v němž značí:

t_{R1} a t_{R2} – retenční časy nebo vzdálenosti podél základní linie od bodu nástřiku ke kolmicím spuštěným z vrcholů dvou sousedních píků;

w_{h1} a w_{h2} – šířky píků v poloviční výšce.

o Poměr výšky píku k sedlu

Jestliže není zcela oddělena nečistota od analyzované látky, lze použít jako kritérium způsobilosti systému ve zkouškách na příbuzné látky poměr výšky píku k sedlu (p/v)

$$p/v = \frac{H_p}{H_v}$$

v němž značí:

H_p – výšku píku nečistoty nad extrapolovanou základní linií;

H_v – výšku nejnižšího bodu křivky oddělující píky nečistoty a analyzované látky (sedlo) nad extrapolovanou základní linií.

○ Relativní retence

Relativní retence (r) se vypočítá ze vzorce:

$$r = \frac{t_{R2} - t_M}{t_{R1} - t_M}$$

v němž značí:

t_{R2} – retenční čas sledovaného píku;

t_{R1} – retenční čas referenčního píku (obvykle pík odpovídající zkoušené látce);

t_M – mrtvý čas nebo vzdálenost podél základní linie od bodu nástřiku ke kolmici spuštěné z vrcholu píku odpovídajícího nezadržované složce.

3.1.3.4. Přesnost kvantitativní analýzy

○ Poměr signálu k šumu

Poměr signálu k šumu (S/N), který ovlivňuje přesnost stanovení obsahu složek, se vypočítá ze vzorce:

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

v němž značí:

H – výšku píku odpovídající dané látce na chromatogramu předepsaného porovnávacího roztoku měřenou od vrcholu píku k extrapolované základní linii signálu, který se sleduje na vzdálenosti rovné dvacetinásobku šířky píku v polovině jeho výšky;

h – 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 pokud možno rovnoměrně na obě strany od místa, kde by se měl nacházet sledovaný pík.

○ Opakovatelnost

Opakovatelnost odezvy se vyjadřuje jako odhad relativní směrodatné odchylky (RSD_%) v procentech pro řadu následných měření porovnávacího roztoku a vypočítá se ze vzorce:

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

v němž značí:

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.

Maximální dovolená relativní standardní odchylka (RSD_{max}) se vypočítá pro řadu nástřiků porovnávacího roztoku pro definované limity podle následujícího vzorce:

$$RSD_{\max} = \frac{KB\sqrt{n}}{t_{90\%,n-1}}$$

v němž značí:

K – konstantu (0,349) získanou ze vztahu: v němž představuje požadovanou RSD pro 6 nástřiků a pro $B = 1,0$;

B – horní limit obsahu uvedený v jednotlivých lékopisných člancích minus 100 %, za předpokladu, že tento horní limit je určen podle reprodukovatelnosti metody;

n – počet opakovaných nástřiků porovnávacího roztoku ($3 \leq n \leq 6$);

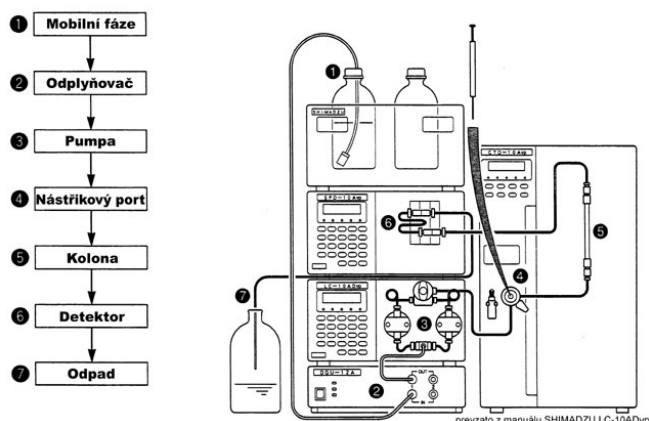
$t_{90\%,n-1}$ – Studentův parametr t při 90% pravděpodobnosti (oboustranný) pro $n - 1$ stupňů volnosti.

3.1.3.5. Způsobilost systému

Test způsobilosti systému představuje nedílnou součást metody a slouží k zajištění přiměřené účinnosti chromatografického systému. Pro hodnocení účinnosti kolony se používají následující parametry: zdánlivá účinnost, kapacitní faktor, rozlišení, relativní retence a faktor symetrie. Faktory, které mohou ovlivnit chromatografické chování, zahrnují složení mobilní fáze, její iontovou sílu, teplotu a zdánlivé pH, průtokovou rychlost, délku kolony, teplotu a tlak, charakteristiku stacionární fáze, včetně porozity, velikosti a typu částic, specifického povrchu a u nosičů používaných v chromatografii s obrácenými fázemi rozsah chemické modifikace (odstranění povrchových silanolových skupin, obsah vázaného uhlíku atd.).

Jednotlivé části použitého zařízení musí být kvalifikovány a musí být schopny dosáhnout přesnosti požadované pro provedení zkoušky nebo stanovení obsahu [5].

3.1.4. Příklad



Obr. 1. Schéma HPLC přístroje [6]

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

3.1.4.1. Čerpací systémy

Čerpací systémy jsou potřebné pro přivádění mobilní fáze konstantní průtokovou rychlostí. Kolísání tlaku má být co nejmenší, čehož se dosahuje např. průchodem tlakovaného rozpouštědla zařízením na tlumení pulzů. Hadičky a všechny spoje musí být schopny odolat tlaku vyvinutému čerpacím systémem. Čerpací systémy mohou být vybaveny zařízením pro odstranění uvolněných bublin vzduchu.

Systémy ovládané mikroprocesory jsou schopny přesně přivádět mobilní fázi buď s konstantním složením (izokratická eluce), nebo se složením, které se mění podle předem daného programu (gradientová eluce). V případě gradientové eluce se používají čerpací systémy, které dodávají rozpouštědlo či rozpouštědla z více zásobníků a míšení rozpouštědel se dosahuje buď před natlakováním, nebo v tlakované části čerpadla nebo čerpadel.

3.1.4.2. 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. Používají se zařízení s dávkovací smyčkou o konstantním nebo proměnném objemu pro ruční nebo automatické dávkovače. Ruční dávkování s částečně naplněnou smyčkou může způsobit horší přesnost nastříkovaného objemu [5].

Automatické dávkovače jsou spojené se zásobníkem vzorku, ve kterém jsou umístěny mikronádobky (vialky), uzavřené pryžovým septem nebo perforovanou zátkou z polypropylenu. Technické principy vlastního dávkování vzorku jsou poněkud odlišné. Buď je vzorek dávkován

pomocí vícecestných (většinou šesticestných) ventilů, nebo pomocí několika třicestných ventilů. Při dávkování by neměl být přerušen tok mobilní fáze kolonou, této podmínce více vyhovuje druhé zmiňované řešení. K zamezení kontaminace vzorků (crossover, cross contamination) se používá oplach jehly a to jak vnitřní tak vnější. Prostor pro vzorky je v současné době většinou temperován (0-50 °C) a chráněn před světlem.

3.1.4.3. Chromatografická kolona

Chromatografická kolona je v podstatě trubka nebo kapilára rovnoměrně naplněná, nebo pokrytá stacionární fází. Plášť kolony (hardware) má za úkol tudíž udržet pohromadě stacionární fází, přičemž na hardware kolony jsou kladeny určité požadavky:

- musí být chemicky inertní
- musí odolávat poměrně vysokým tlakům
- vnitřní povrch pláště kolony musí být dostatečně hladký

Nejpoužívanější materiál k výrobě kolon je nerezová ocel, plasty nebo sklo. Vlastní klasická HPLC kolona se skládá z kovového pláště, který je uzavřen porézní kovovou fritou, která zabraňuje uvolňování stacionární fáze z kolony a současně umožňuje plynulý průtok mobilní fáze. Oba konce kolony jsou ukončeny převlečným ochranným kroužkem a koncovou hlavici, ve které je navrtán vstup pro kapiláru se šroubem [1].

V analytické chromatografii se používají kolony vyrobené z nerezové oceli, pokud není v článku uvedeno jinak, mají různé délky a vnitřní průměry. Kolony s vnitřním průměrem menším než 2 mm jsou často označovány jako mikrokolony. Během analýzy musí být udržována konstantní teplota mobilní fáze a kolony. Většina separací se provádí při pokojové teplotě, ale kolony mohou být také zahřívány na vyšší teplotu pro dosažení vyšší účinnosti. Doporučuje se, aby kolony nebyly zahřívány na teplotu vyšší než 60 °C, vzhledem k nebezpečí degradace stacionární fáze nebo změn ve složení mobilní fáze.

Nejběžněji používané stacionární fáze jsou:

- oxid křemičitý, oxid hlinitý nebo porézní grafit, používané v chromatografii s normálními fázemi, kde je separace založena na rozdílech v adsorpci a/nebo rozdělování;
- pryskyřice nebo polymery s kyselými nebo zásaditými skupinami používané v iontoměničové chromatografii, kde je separace založena na konkurenci iontů, které mají být odděleny a iontů, které jsou obsaženy v mobilní fázi;
- porézní oxid křemičitý nebo polymery používané ve vylučovací chromatografii, kde separace je založena na rozdílech v objemech molekul, odpovídající sterickému vylučování;
- různé druhy chemicky modifikovaných nosičů připravených z polymerů, oxidu křemičitého nebo porézního grafitu, používané v chromatografii s obrácenými fázemi, kde je separace založena hlavně na rozdělování molekul mezi mobilní a stacionární fází;

- speciální chemicky modifikované stacionární fáze, např. deriváty celulosy nebo amylosy, bílkoviny nebo peptidy, cykloextriny atd., používané pro separaci enantiomerů (chirální chromatografie) [5];
- monolitické HPLC kolony tvořené jedním kusem pórovitého materiálu, který zcela zaplňuje vnitřek separační kolony. Největší výhodou jsou jejich hydrodynamické vlastnosti. Monolitické kolony mají dva typy pórů: a) velké póry (makropóry), zajišťují rychlý konvektivní tok mobilní fáze skrz monolit a významně zrychlují přenos hmoty mezi mobilní a stacionární fází, b) středně velké póry (mesopóry), poskytují monolitu dostatečně veliký povrch, a tím vysokou separační kapacitu. Tato struktura umožňuje provozování monolitů při značně vysokých rychlostech mobilních fází bez přílišného zvýšení tlaku a zároveň bez ztráty separační účinnosti, a to i pro separované makromolekuly (bílkoviny, syntetické polymery);
- oxid zirkoničitý, jehož největší výhodou je jeho chemická a tepelná stabilita - je stabilní v celém rozsahu pH při vysokém tlaku a teploty až do 200 °C. Oxid zirkoničitý lze použít v chromatografii normálních i obrácených fází [1].

Pokud není výrobcem uvedeno jinak, předpokládá se, že kolony pro chromatografii s obrácenými fázemi s náplní na bázi silikagelu jsou stabilní v mobilních fázích o zdánlivém pH 2,0 až 8,0. Kolony plněné porézním grafitem nebo částicemi polymerních materiálů, jako je styrendivinylbenzen-kopolymer, jsou stabilní v širším rozsahu pH.

Pro analytické separace se běžně používají stacionární fáze, které mají velikost částic 3 μm až 10 μm. Částice mohou mít kulovitý nebo nepravidelný tvar, různou porozitu a specifický povrch. Tyto parametry přispívají k chromatografickému chování jednotlivých stacionárních fází. V případě obrácených fází jsou doplňujícími charakteristikami stacionární fáze její druh, stupeň navázání vyjádřený např. jako obsah vázaného uhlíku, údaj o případném odstranění povrchových silanolových skupin. Jestliže stacionární fáze obsahuje zbytkové povrchové silanolové skupiny, mohou analyzované látky, zejména bazické, vykazovat chvostování píků.

3.1.4.4. Mobilní fáze

Mobilní fáze konstantně unáší vzorek přes kolonu a stacionární fázi.

V chromatografii s normálními fázemi se používají méně polární rozpouštědla. Aby se dosáhlo reprodukovatelných výsledků, je nutné přísně kontrolovat přítomnost vody v mobilní fázi. V chromatografii s obrácenými fázemi se používají vodné mobilní fáze, jak s organickým rozpouštědlem, tak bez něj.

Složky mobilní fáze se obvykle filtrují, aby z nich byly odstraněny částice větší než 0,45 mm. Vícesložkové mobilní fáze se připravují odměřením požadovaných objemů (pokud nejsou předepsány hmotnosti) jednotlivých složek a jejich smícháním. Jinou možností je přivádět rozpouštědla pomocí jednotlivých čerpadel ovládaných ventily, které umožňují míchání složek v požadovaném poměru. Rozpouštědla jsou před čerpáním do systému obvykle

odplyněna probubláváním heliem, v ultrazvukové lázni, nebo se používají membránová či vakuová zařízení zařazená přímo do systému, která zabraňují tvorbě bublin v cele detektoru.

Rozpouštědla pro přípravu mobilní fáze obvykle neobsahují stabilizátory a jsou propustná pro vlnovou délku používanou při detekci v ultrafialové oblasti spektra. Používaná rozpouštědla a jiné složky mobilní fáze mají mít vhodnou kvalitu. Pokud je nutné nastavení pH, provádí se pouze s vodnou částí mobilní fáze, nikoli s celou směsí. Jestliže se používají tlumivé roztoky, systém se po dokončení chromatografických analýz patřičně promyje směsí vody a organického rozpouštědla použitého v mobilní fázi (5 % (V/V)), aby se zabránilo krystalizaci solí.

Mobilní fáze mohou obsahovat další složky, např. protiionty u chromatografie iontových párů nebo chirální selektor v případě chromatografie s achirální stacionární fází [5].

3.1.4.5. Detektory

Detektory jsou umístěny na konci kolony a analyzují eluent. Detektory zaznamenávají rozdíl mezi průchodem čisté mobilní fáze a mobilní fáze obsahující eluovanou složku celou detektoru.

Na detektor jsou kladeny určité ideální požadavky:

- možnost detekce všech přítomných komponent (univerzálnost)
- odezva detektoru by měla být okamžitá a lineární v co nejširším koncentračním rozmezí (široký lineárně dynamický rozsah)
- vysoká citlivost a nízká úroveň šumu
- robustnost vůči změnám tlaku, průtoku mobilní fáze a teploty
- co nejmenší mimokolonový příspěvek k rozšiřování elučních zón
- umožnit gradientovou eluci

V praxi takový detektor neexistuje a různé typy detektorů se jednotlivým požadavkům víceméně přibližují. Jednotlivé typy detektorů jsou uvedeny v tabulce 1 [1].

Nejběžněji používanými detektory jsou spektrofotometry pro měření v ultrafialové a viditelné oblasti (UV/VIS), včetně detektorů s diodovým polem [5].

Tab. 1 Vlastnosti LC detektorů [1]

	RI	UV-VIS	IR	FLD	ECD	CONDUCT	CORONA	ELSD
typ detektoru	nedestruktivní	nedestruktivní	nedestruktivní	nedestruktivní	destruktivní	nedestruktivní	destruktivní	destruktivní
odezva	univerzální	selektivní	selektivní	selektivní	selektivní	selektivní	selektivní	univerzální
měřená veličina	index lomu	absorbance	absorbance	intenzita fluorescence	elektrický proud	vodivost	elektrický proud	rozptyl světla
typická citlivost (hmotnost/ml)	μg	ng	μg	pg	pg	ng	ng	μg
lineární rozsah	10 ⁴	10 ⁵	10 ⁴	10 ³	10 ⁶	10 ⁶	10 ⁵	10 ²
závislost odezvy na průtoku	ano	ne	ne	ne	ano	ano	ano	ano
teplotní závislost	vysoká (10 ⁻⁴ jed. indexu lomu)	nízká	nízká	nízká	vysoká (1,5%)	vysoká (2,0%)	nízká	vysoká
gradientová eluce	ne	ano	ne	ano	ne	ano	ano	ano (částečně)

3.1.5. Použití HPLC

3.1.5.1. Preparativní HPLC

Proces izolace a purifikace sloučenin. Důležitý je stupeň čistoty rozpuštěných látek a průchodnost, což je množství sloučeniny vyrobené za jednotku času. Tím se odlišuje od analytické HPLC, kde je cílem získat informace o sloučenině vzorku. Získané informace mohou být: identifikace, kvantifikace, rozlišení sloučenin.

3.1.5.2. Chemická separace

Může být doplněním HPLC, využitím rozdílnosti v rozsahu migrace sloučenin na různých kolonách a mobilních fází. Tím dochází k separaci sloučenin; rozsah stupně separace je silně závislý na výběru stacionární a mobilní fáze.

3.1.5.3. Čištění

Odkazuje na proces separace nebo extrakce cílové sloučeniny od ostatních sloučenin nebo kontaminujících látek. V závislosti na tom, co je třeba oddělit a jak úzce jsou si sloučeniny příbuzné, vybírají se podmínky k docílení adekvátní separace. Je zapotřebí takový rozdíl v migraci sloučenin a nečistot skrz kolonu, aby bylo možné shromáždit či extrahovat čistou sloučeninu bez nežádoucích příměsí.

3.1.5.4. Totožnost

Jde o klíčovou část každé HPLC analýzy. Nejdříve je nutné vybrat detektor a jeho optimální nastavení. Parametry separační analýzy musí být takové, aby byl získán čistý pík známého vzorku. Identifikovaný pík musí mít přijatelný retenční čas a být dobře separovaný od ostatních píků. Pro změnu retenčního času sloučeniny je možné měnit parametry chromatografické metody: kolonu, mobilní fázi nebo průtok.

3.1.5.5. Kvantifikace

Stanovení neznámé koncentrace sloučeniny ve známém roztoku [3]. Existuje několik postupů kvantitativní analýzy:

- Metoda vnějšího standardu.

Koncentrace stanovované složky (stanovovaných složek) se určí porovnáním odezvy píku (píků) složky (složek) naměřené pro zkoušený roztok a odpovídající odezvy naměřené pro porovnávací roztok.

- Metoda vnitřního standardu.

Ke zkoušenému a porovnávacímu roztoku se přidají stejná množství látky, kterou lze rozlišit od zkoušené látky, a která s ní nereaguje (vnitřní standard). Koncentrace zkoušené látky se stanoví porovnáním poměru ploch píků nebo výšek píků stanovované látky a vnitřního standardu pro zkoušený roztok a odpovídajícího poměru pro porovnávací roztok.

- Metoda normalizace.

Obsah jedné nebo více složek zkoušené látky v procentech, se vypočítá z plochy nebo ploch jako procento celkové plochy všech píků, s výjimkou píků rozpouštědel nebo přidaných reakčních činidel a píků, které jsou v limitu zanedbatelnosti píků.

- Kalibrační postup.

Stanoví se vztah mezi měřeným nebo vyhodnocovaným signálem (y) a množstvím (koncentrace, hmotnost, atd.) stanovované látky (x) a vypočítá se kalibrační funkce. Výsledky analýzy se vypočítají ze změřeného nebo vyhodnoceného signálu stanovované látky pomocí inverzní funkce [5].

3.2. Validace

Tato část vychází ze směrnice ICH HARMONISED TRIPARTITE GUIDELINE: Validation Of Analytical Procedures: Text and Methology Q2 (R1), 4. verze, 11/2005

3.2.1. Úvod

Cílem validace analytické metody je dokázat, že metoda je vhodná pro zamyšlené použití.

Validace analytické metody je zaměřena na 4 nejběžněji používané analytické postupy:

Totožnost

- Testování totožnosti slouží k identifikaci analyzované látky ve vzorku. Toho je normálně dosaženo porovnáním vlastností vzorku (např. spektra, chromatografických vlastností, chemické reaktivity atd.) k referenčnímu standardu.

Kvantitativní testy pro stanovení obsahu nečistot

Limitní testy pro kontrolované nečistoty

- Testování nečistot může být provedeno jednak kvantitativními testy nebo limitními testy. Oba testy jsou zaměřeny na přesné stanovení čistoty vzorku. Pro kvantitativní a limitní testy jsou požadovány odlišné validační charakteristiky.

Kvantitativní testy pro stanovení aktivní formy ve vzorcích léčivé látky nebo přípravku

nebo jiné vybrané složky v léčivém přípravku

- Proces stanovení obsahu je určen pro stanovení analyzované látky přítomné ve vzorku.

Validační parametry, které by se měly provádět:

- Správnost
- Přesnost
 - Opakovatelnost
 - Mezilehlá přesnost
- Selektivita
- Detekční limit
- Kvantitativní limit
- Linearita
- Rozsah

Revalidace

Revalidace je nutné provádět v následujících případech:

- Změny v syntéze léčivé látky
- Změny složení finálního produktu

- Změny analytické metody

Stupeň požadované revalidace závisí na povaze změn.

Analytický postup

Analytický postup definuje způsob provedení analýzy. Měl by detailně popisovat kroky potřebné k provedení každého analytického testu, např.: informace o vzorku a referenčních standardech, jak připravit reagentia, používat přístroje, vytvořit kalibrační přímkou, uvést všechny vzorce používané pro výpočty atd.

3.2.2. Selektivita

Selektivita je schopnost jednoznačně stanovit analyzovanou látku v přítomnosti složek, u kterých se předpokládá, že jsou přítomné ve vzorku. Nejčastěji se jedná o nečistoty, degradační produkty, nosiče atd.

Nedostatečná selektivita analytické metody může být kompenzována jinými podpůrnými analytickými metodami.

Implikace této definice jsou:

3.2.2.1. Totožnost

Vhodný test totožnosti by měl být schopný rozlišit sloučeniny s podobnou strukturou, které se pravděpodobně budou společně vyskytovat. Rozlišení metody by mělo být potvrzeno získáním pozitivních výsledků (třeba porovnáním se známým referenčním materiálem) ze vzorků obsahujících analyzovanou látku, společně s negativními výsledky ze vzorků, které neobsahují analyzovanou látku. Navíc by měl být identifikační test použit na materiálu strukturálně podobném nebo blízce příbuzném analyzované látce pro potvrzení, že nebude získán pozitivní výsledek. Výběr těchto potenciálně interferujících materiálů by měl být založen na odborných znalostech pracovníka, včetně zřetele k možným interferencím.

3.2.2.2. Stanovení obsahu a zkouška nečistot

Důkazem selektivity u chromatografických metod by měly být reprezentativní chromatogramy s náležitým označením jednotlivých složek.

Důkladně by měly být v chromatografii prostudovány kritické části separace. Selektivita by měla být dokázána rozlišením dvou sloučenin, které se eluují blízko sebe.

- Rozlišení analyzovaných látek, kde nečistoty jsou k dispozici.

Pro stanovení obsahu: zahrnutí důkazu rozlišení analyzované látky v přítomnosti nečistot a/nebo pomocných látek; prakticky je tohoto dosaženo smísením čisté substance (aktivní substance nebo produktu) s přiměřeným množstvím nečistot a/nebo pomocných látek a

důkazem, že výsledek stanovení obsahu není ovlivněný přítomností těchto látek (v porovnání s výsledky stanovení obsahu získanými na nesmíšeném vzorku).

Při zkoušce na nečistoty může být rozlišení stanoveno smísením léčivé substance nebo produktu s přiměřeným množstvím nečistot a důkazem separace těchto nečistot individuálně a/nebo od ostatních složek v nosiči vzorku.

o Rozlišení analyzované látky, kde nečistoty nejsou k dispozici

Pokud standardy nečistot nebo degradačních produktů nejsou k dispozici, selektivita může být prokázána porovnáním výsledků testů vzorků obsahujícího nečistoty nebo degradační produkty s druhou, dobře charakterizovanou procedurou, např. lékopisnou metodou nebo jinou validovanou analytickou metodou (nezávislý postup). Kde je to vhodné, může se provést rovněž skladování vzorků za stresových podmínek: světlo, teplo, vlhkost, hydrolýza kyselinami nebo zásadami a oxidace.

- Při stanovení obsahu by se měly porovnávat dva výsledky.
- Pro zkoušku nečistot by se měl porovnat profil nečistot.

Pík zkoušky na čistotu může být užitečný důkazem, že chromatografické píky analyzované látky nepřipadají více než jedné sloučenině (např.: atomová spektrometrie, diode array).

3.2.3. Správnost

Správnost analytické metody vyjadřuje těsnost shody mezi hodnotou, která je přijatelná jednak jako konvenční správná hodnota nebo akceptovatelná referenční hodnota, a hodnotou zjištěnou.

Správnost by měla být stanovena v celém rozsahu analytické metody.

3.2.3.1. Stanovení obsahu

o Aktivní substance

Je k dispozici několik metod stanovení správnosti:

- aplikace analytického postupu na analyzovanou látku o známé čistotě (např. referenční materiál);
- porovnání výsledků navržené analytické metody s druhou, dobře charakterizovanou metodou - správnost, která je stanovena a/nebo je definována;
- správnost lze odvodit po stanovení přesnosti, linearity a selektivity.

o Léčivý přípravek

Je k dispozici několik metod stanovení správnosti:

- použití analytické metody na syntetickou směs složek produktu, kde je přidáno známé množství analyzované substance;

- v případech, kdy není možné získat vzorky všech složek produktu je akceptovatelné jednak přidání známého množství analyzované látky k produktu, nebo porovnat výsledky získané z druhé, dobře charakterizované metody - správnost, která je uvedena a/nebo definována (nezávislý postup);
 - správnost lze odvodit po stanovení přesnosti, linearity a selektivity.
- Nečistoty (kvantifikace)

Správnost by měla být posuzována na vzorcích (substance/produktu) smíšených se známým množstvím nečistot.

V případech, kdy je nemožné získat vzorky určité nečistoty a/nebo degradačních produktů, je přijatelné porovnat výsledky získané nezávislým postupem. Může být použit faktor odezvy léčivé substance. Jednotlivé nebo celkové nečistoty mají být jednoznačně vyjádřeny: např. hmotnost v hmotnosti nebo procentuálně, ve všech případech s ohledem na hlavní analyzovanou látku.

Doporučení

Správnost by měla být vyhodnocena z minimálně 9 stanovení, při alespoň 3 koncentracích pokrývajících zadaný rozsah (např. 3 koncentrace/3 opakování každé koncentrace)

Správnost by měla být vyjádřena jako procento výtěžnosti stanovením známého přidaného množství analyzované látky do vzorku nebo jako rozdíl mezi průměrnou a akceptovatelnou správnou hodnotou spolu s intervalem spolehlivosti.

3.2.4. Přesnost

Přesnost analytické metody vyjadřuje těsnost shody (stupeň rozptylu) mezi sérií měření získaných z opakovaného vzorkování stejného homogenního vzorku za předepsaných podmínek. Přesnost může být posuzována ve třech stupních: opakovatelnost, mezilehlá přesnost a reprodukovatelnost.

Přesnost by měla být zkoumána použitím homogenního, autentického vzorku. Když není možné získat homogenní vzorek, měl by být použit uměle připravený vzorek nebo roztok vzorku.

3.2.4.1. Opakovatelnost

Vyjadřuje přesnost za stejných podmínek během krátkého časového rozmezí. Opakovatelnost je také nazývána intra-assay přesnost.

Opakovatelnost by měla být posuzována pomocí:

- minimálně 9 stanovení pokrývajících zadaný rozsah metody (např. 3 koncentrace/3 opakování každé koncentrace) nebo
- minimálně 6 stanovení při 100% koncentraci

3.2.4.2. Mezilehlá přesnost

Míra, do jaké by měla být mezilehlá přesnost stanovena, závisí na okolnostech, za jakých má být metoda používána. Pracovník by měl stanovit vliv náhodných odchylek na přesnost analytické metody. Charakteristickými proměnnými jsou dny, analytici, zařízení apod. Je nutné studovat tyto účinky individuálně. Doporučuje se použití experimentálního designu (matrix).

3.2.4.3. Reprodukovatelnost

Reprodukovatelnost se vyhodnocuje pomocí mezilaboratorních studií. Reprodukovatelnost by měla být provedena v případě standardizace analytického postupu, například pro zařazení metod do lékopisů. Tato data nejsou součástí registrační dokumentace.

Doporučení

Pro každý typ testované přesnosti by měla být uvedena směrodatná odchylka, relativní směrodatná odchylka (koeficient variace) a interval spolehlivosti.

3.2.5. Detekční limit (mez detekce)

Detekční limit analytické metody je nejnižší množství analyzované látky ve vzorku, které je možné detekovat, ale ne nutně stanovit kvantitativně jako přesnou hodnotu.

Existuje několik způsobů stanovení limitu detekce, v závislosti na tom, zda jde o instrumentální nebo neinstrumentální metodu.

3.2.5.1. Na základě vizuálního hodnocení

Vizuální vyhodnocení může být použito pro ne-instrumentální i instrumentální metody.

Limit detekce je určen na základě analýzy vzorků se známými koncentracemi analyzované látky, čímž se stanoví nejnižší koncentrace, při které může být analyzovaná látka spolehlivě detekována.

3.2.5.2. Na základě poměru signálu k šumu

Tento postup může být použit pouze u metod, které vykazují šum základní linie.

Stanovení poměru signálu k šumu je provedeno porovnáním naměřených signálů ze vzorků o známých nízkých koncentracích analyzované látky, se signály ze slepých vzorků a určením nejnižší koncentrace, při které může být analyzovaná látka spolehlivě detekována.

Poměr signálu k šumu s hodnotou mezi 3 nebo 2 : 1 je obecně považován za přijatelný pro odhad detekčního limitu.

3.2.5.3. Na základě směrodatné odchylky odezvy a sklonu

Detekční limit může být vyjádřen jako:

$$DL = \frac{3,3\sigma}{S}$$

Kde:

σ - směrodatná odchylka odezvy

S – sklon kalibrační přímky

Sklon S může být odhadnut z kalibrační přímky analyzované látky. Odhad σ může být získán několika způsoby, například:

o Na základě směrodatné odchylky slepého vzorku

Měření velikosti základní odezvy analytické metody se provádí analýzou odpovídajícího počtu slepých vzorků a výpočtem směrodatné odchylky těchto odpovědí.

o Na základě kalibrační přímky

Kalibrační přímka by měla být vyhodnocena pomocí vzorků, obsahujících analyzovanou látku v rozsahu detekčního limitu. Jako směrodatná odchylka může být použita residuální směrodatná odchylka regresivní přímky nebo směrodatná odchylka úseku osy y regresivní přímky.

Doporučení

Detekční limit a metoda použitá pro stanovení detekčního limitu by měly být doloženy. Důkazem detekčního limitu stanoveného na základě vizuálního vyhodnocení nebo poměru signálu k šumu je předložení příslušných chromatogramů.

V případech, kdy je předpokládaná hodnota detekčního limitu získaná výpočtem nebo extrapolací, může být tato hodnota následně ověřena nezávislou analýzou dostatečného množství vzorků, které mají hodnotu nebo jsou připraveny v blízkosti detekčního limitu.

3.2.6. Kvantitativní limit (mez stanovitelnosti)

Kvantitativní limit analytické metody je nejnižší množství analyzované látky ve vzorku, které je možné kvantitativně stanovit s přijatelnou přesností a správností. Kvantitativní limit je parametr kvantitativního stanovení pro nízké hladiny sloučenin v nosiči vzorku a je používán zvláště pro stanovení nečistot a/nebo degradačních produktů.

Existuje několik způsobů stanovení kvantitativního limitu, v závislosti na tom, zda jde o instrumentální nebo neinstrumentální metodu.

3.2.6.1. Na základě vizuálního hodnocení

Vizuální vyhodnocení může být použito pro ne-instrumentální i instrumentální metody.

Kvantitativní limit je obecně stanoven analýzou vzorků o známé koncentraci analyzované látky a stanovením nejnižší koncentrace, při které je možné analyzovanou látku stanovit s přijatelnou správností a přesností.

3.2.6.2. Na základě poměru signálu k šumu

Tento postup může být použit pouze u metod, které vykazují šum základní linie.

Stanovení poměru signálu k šumu je provedeno porovnáním naměřených signálů ze vzorků o známých nízkých koncentracích analyzované látky, se signály ze slepých vzorků a určením nejnižší koncentrace, při které může být analyzovaná látka spolehlivě kvantifikována.

Typický poměr signálu k šumu je 10:1.

3.2.6.3. Na základě směrodatné odchylky signálu a sklonu

Kvantitativní limit (QL) může být vyjádřen jako:

$$QL = \frac{10\sigma}{S}$$

Kde:

σ - směrodatná odchylka signálu

S – sklon kalibrační přímky

Sklon S může být odhadnut z kalibrační přímky analyzované látky. Odhad σ může být získán několika způsoby, například:

- Na základě směrodatné odchylky slepého vzorku

Měření velikosti základní odezvy analytické metody se provádí analýzou odpovídajícího počtu slepých vzorků a výpočtem směrodatné odchylky těchto odpovědí

- Na základě kalibrační přímky

Kalibrační přímka by měla být vyhodnocena pomocí vzorků, obsahujících analyzovanou látku v rozsahu kvantitativního limitu. Jako směrodatná odchylka může být použita residuální směrodatná odchylka regresivní přímky nebo směrodatná odchylka úseku osy y regresivní přímky.

Doporučení

Kvantitativní limit a metoda použitá pro stanovení kvantitativního limitu by měly být doloženy.

Limit by měl být následně ověřen analýzou dostatečného počtu vzorků, které mají hodnotu nebo jsou připraveny v blízkosti kvantitativního limitu.

3.2.7. Linearita

Linearita analytické metody je její schopnost dávat výsledky, které jsou přímo úměrné koncentraci (množství) stanovované látky ve vzorku.

Lineární závislost by měla být vyhodnocena v celém rozsahu analytické metody. Může se provádět přímo s aktivní substancí (ředěním zásobního roztoku standardu) a/nebo samostatnými navážkami syntetické směsi složek produktu, za použití navrženého postupu.

Linearita by měla vizuálně vyhodnotit závislost signálu na koncentraci nebo obsahu analyzované látky. Pokud se získá lineární závislost, výsledky testů mohou být vyhodnoceny příslušnými statistickými metodami, např. výpočtem regresivní přímky metodou nejmenších čtverců. V některých případech je nutné před regresivní analýzou podrobit testovaná data matematické transformaci. Data z regresivní přímky mohou pomoci při matematických odhadech stupně linearitu.

Doložen by měl být korelační koeficient, úsek osy y, sklon regresivní přímky a reziduální součet čtverců. Přiložen by měl být graf dat. Kromě toho může být pro vyhodnocení linearitu rovněž užitečná analýza odchylky datových bodů z regresivní přímky.

Pro stanovení linearitu se doporučuje použití minimálně 5 koncentrací.

3.2.8. Rozsah

Rozsah analytické metody je rozmezí mezi nejvyšší a nejnižší koncentrací (množstvím) analyzované látky ve vzorku (včetně těchto koncentrací), pro které bylo dokázáno, že metoda vykazuje přijatelný stupeň přesnosti, správnosti a linearitu.

Rozsah by měl být:

- pro stanovení obsahu aktivní substance nebo finálního produktu: obvykle 80 až 120% testované koncentrace;
- pro stanovení nečistoty: od předpokládané hodnoty nečistoty do 120% specifikace; pro neobvykle silné nečistoty, nečistoty produkující toxiny nebo ty s neočekávanými farmakologickými účinky, by měl být limit detekce a kvantifikace úměrný s úrovní, na níž se nečistoty musí kontrolovat;
- pokud stanovení obsahu a zkoušky na čistotu je provedeno společně v jednom testu a je použit pouze 100% standard, linearita by měla pokrývat rozsah od očekávaného stupně nečistoty po 120% specifikovaného obsahu.

3.2.9. Robustnost

Robustnost analytické metody je měřítkem její kapacity zůstat neovlivněna malými, ale záměrnými odchylkami v parametrech metody, a poskytuje údaj o její spolehlivosti během běžného používání.

O hodnocení robustnosti by se mělo uvažovat během vývoje metody a v závislosti na jejím typu. Test by měl prokazovat spolehlivost analýzy s ohledem na záměrné odchylky v parametrech metody.

Pokud jsou měření citlivá k změnám analytických podmínek, měly by se podmínky náležitě kontrolovat nebo do metody zahrnout preventivní opatření. Jedním z důsledků

vyhodnocení robustnosti by měla být série parametrů systému způsobilosti (např. test rozlišení) pro zajištění, že platnost analytické metody je zachována vždy, když je použita.

Příklady typických odchylek jsou:

- stabilita analytických roztoků
- doba extrakce

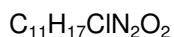
V případě kapalinové chromatografie:

- Vliv různého pH mobilní fáze
- Vliv různého složení mobilní fáze
- Odlišné kolony (odlišné šarže a/nebo dodavatelé)
- Teplota
- Průtok

3.2.10. Test způsobilosti systému

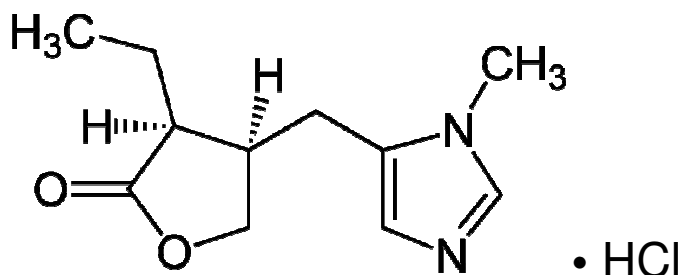
Je nedílnou součástí mnoha analytických metod. Testování je založeno na konceptu, že analyzované zařízení, elektronika, analytické operace a vzorky tvoří jednotný systém, který může být jako takový vyhodnocen. Parametry se volí na základě typu zvolené metody [7].

3.3. Pilokarpin-hydrochlorid



3.3.1. Definice

Je to (3*S*,4*R*)-3-ethyl-4-[(1-methyl-1*H*-imidazol-5-yl)methyl]-4,5-dihydrofuran-2(3*H*)-on-hydrochlorid



Obr. 2. Vzorec pilokarpin-hydrochloridu [5]

3.3.2. Vlastnosti

Pilokarpin je přímo působící parasympatomimetikum. Je to alkaloid z jihoamerického keře *Pilocarpus jaborandi* nebo *Pilocarpus microphyllus* [8].

Vzhled: Bílý nebo téměř bílý krystalický prášek nebo bezbarvé krystaly. Je hygroskopický.

Obsah: 99,0% až 101% sloučeniny $C_{11}H_{17}ClN_2O_2$ počítáno na vysušenou látku.

Rozpustnost: Velmi snadno rozpustný ve vodě a v ethanolu 96% [5].

Pilokarpin ve vodném prostředí podléhá hydrolyze na pilokarpovou kyselinu a epimerizaci na isopilokarpin, který se může hydrolyzovat na isopilokarpovou kyselinu [9].

3.3.3. Farmakologie

Parasympatomimetika jsou nejstarší léčiva používaná k léčbě glaukomu. Pilokarpin byl poprvé použit pro léčbu glaukomu v roce 1877.

Parasympatomimetika jsou léčiva, která napodobují účinky acetylcholinu. Mohou působit jednak přímo, napodobováním účinků acetylcholinu na neuromuskulárních spojích, (přímo působící parasympatomimetika) nebo nepřímo, inhibicí acetylcholinesterázy, čímž zpomalují degradaci acetylcholinu a potencují jeho efekt (inhibitoři acetylcholinesterázy).

V oku parasympatikus inervuje řasnaté tělísko a sfinkter duhovky. Stažením podélného svalu řasnatého tělíska se zvyšuje odtok komorové vody a stimulací kruhového svalu řasnatého tělíska a sfinkteru duhovky dochází k akomodaci a zúžení zornic.

Kromě oka parasympatikus kontroluje mnoho významných funkcí organismu.

3.3.4. Mechanismus snížení nitroočního tlaku

Parasympatomimetika snižují nitrooční tlak zvýšením odtoku komorové vody jako důsledek kontrakce ciliárního svalu zprostředkované muskarinovými receptory.

3.3.5. Dávkování

Studie dlouhodobého používání pilokarpinu prokázaly, že odezva po podání léčiva souvisí s dávkováním od 0,5 do 4% koncentrace pilokarpinu, s redukcí nitroočního tlaku o cca 20%. Maximum redukce nitroočního tlaku nastává během 2 hodin po aplikaci a trvá alespoň 8 hodin. 10-15% redukce nitroočního tlaku přetrvává 12-15 hodin po aplikaci. Většina pacientů užívá pilokarpin 3-4 x denně [8].

3.3.6. Nežádoucí účinky

Oko: bodání, pálení, rozmazané vidění, indukovaná krátkozrakost, zúžení zornic, špatné noční vidění, slzení, zákal čočky, odchlípení sítnice.

Systémové: bolest hlavy (supraorbitální bolest hlavy), hypotenze, změny srdeční frekvence, obtížné dýchání, pulmonální edém, nevolnost, slinění, pocení, křeče a průjem [10].

Mladší pacienti, stejně tak jako někteří starší pacienti s šedým zákalem, špatně snášejí pilokarpin kvůli spazmu ciliárního svalu a vyvolané myopatii.

V dnešní době není pilokarpin léčivem první volby, protože ostatní léčiva mají méně očních nežádoucích účinků nebo výhodnější dávkování. Avšak jeho účinnost, cena a málo systémových účinků dělá z pilokarpinu pro mnoho pacientů vhodné léčivo druhé volby [8].

3.4. Rešerše publikovaných HPLC metod

Bylo vyvinuto a popsáno několik metod pro HPLC stanovení pilokarpin-hydrochloridu v očních kapkách. Metody se liší jak použitou kolonou, tak mobilní fází a průtokem mobilní fáze.

Zde jsou uvedené některé z nich:

3.4.1. Ionovýmienná chromatografie.

Kolona: kolona z nerezavějící oceli o rozměrech 65 x 5,5 mm; stacionární fáze: Aminex A-7

Mobilní fáze: 0,1M fosforečnan disodný v 5% isopropanolu pH 9,0 ± 0,05 (úprava kyselinou fosforečnou)

Průtok: 0,6 ml/min, konstantní tlak

UV detekce: vlnová délka 216 nm

Ředící směs: 0,2M síran sodný

Metoda poskytuje stanovení pilokarpinu, isopilokarpinu a kyseliny pilokarpové.

Obsah kyseliny je stanoven recyklizací na pilokarpin v kyselině sírové. Vzrůst pilokarpinu ve vzorku je použit pro výpočet kyseliny. Obsah kyseliny méně než 2% celkového počtu alkaloidů lze pouze odhadovat [11].

3.4.2. HPLC normálního systému fází

Kolona: kolona o rozměrech 250 x 4,6 mm; stacionární fáze: silikagel 5 µm

Mobilní fáze: 10,0 ml hydroxidu amonného koncentrovaného se zředí na 500 ml 2-propanolem. 300 ml tohoto 2% roztoku se smíchá s 700 ml hexanu

Průtok: 2 ml/min

UV detekce: vlnová délka 220 nm

Ředící směs: methanol

Metoda je vhodná pouze pro analýzu pilokarpinu a isopilokarpinu. Pilokarpin je eluován za 16 minut, isopilokarpin za 20 minut. Metoda dává lineární odpověď. Stanovení kyseliny pilokarpové a isopilokarpové je neproveditelné díky kompletnímu zadržení kyselin v HPLC koloně [12].

3.4.3. Fenylová stacionární fáze

Kolona: µBondpak[®] o rozměrech 300 x 3,9 mm; Fenylová stacionární fáze na bázi silikagelu

Mobilní fáze: 5% (w/v) vodný roztok dihydrogenfosforečnanu draselného, pH 2,5 (úprava kyselinou orthofosforečnou)

Průtok: 1 ml/min

UV detekce: vlnová délka 215 nm

Ředící směs: 0,2M síran sodný

Teplota: 40°C ± 1 °C

Pro nastavení analytických podmínek je nutné pumpovat po dobu 1,5 hodiny mobilní fázi kolonou při průtoku 2 ml/min.

Metoda je vhodná ke stanovení pilokarpinu, isopilokarpinu, kyseliny pilokarpové a isopilokarpové.

Celková doba analýzy je cca 15 minut. Při vývoji metody byl zaznamenán problém: stárnutím mobilní fáze nastal posun ve výsledcích při stanovení isopilokarpinu. Posun byl experimentálně určen a rozdíl vypočítán.

Nevýhodou metody je nízká životnost kolony [13].

3.4.4. CN- stacionární fáze

Kolona: Spherisorb®-CN o rozměrech 250 x 4,6 mm; Cyano-propyl vázaná stacionární fáze 5 µm

Mobilní fáze: Vodný roztok triethylaminu (01% V/V) pH 2,5

Průtok: 1 ml/min

UV detektor s diodovým polem: vlnová délka 220 nm; vlnový rozsah 4 nm a práh 1,0 mAU

Ředící směs: voda R

Metoda je vhodná ke stanovení pilokarpinu, isopilokarpinu, kyseliny pilokarpové a isopilokarpové. Celková doba analýzy je cca 16 minut.

Nevýhodou metody je nízká životnost kolony vlivem kyselé mobilní fáze (pH 2,5) [14].

3.4.5. HPLC obráceného systému fází

Kolona: Lichrosorb® RP C₁₈ o rozměrech 250 x 4,6 mm; stacionární fáze: C₁₈ - 10 µm na bázi silikagelu

Mobilní fáze: 97% vody, 3% methanolu obsahujícího 5% dihydrogenfosforečnanu draselného; pH 2,5

Průtok: 1,5 ml/min

UV detekce: vlnová délka 216 nm

Výhodou metody je její selektivita, citlivost, snadnost, nedestruktivní podmínky a přímé měření. Nejdříve se eluuje isopilokarpin, pak pilokarpin, pilokarpinová kyselina a isopilokarpinová kyselina.

Nevýhodou metody je vysoký zpětný tlak a krátká životnost kolony [9].

3.4.6. Isokratická separace na YMC ODS-AM koloně

Kolona: YMC ODS-AM o rozměrech 15x0,46 cm; stacionární fáze: C₁₈- 5 µm na bázi silikagelu

Mobilní fáze: 980 ml pufru a 20 ml methanolu. Složení pufru: 13,5 ml kyseliny fosforečné 85%, 3 ml triethylaminu, voda 983,5 ml pH 3 (úprava 50% hydroxidem sodným)

Průtok: 1,0 ml/min

UV detekce: vlnová délka 214 nm

Ředící směs: mobilní fáze

Metoda umožňuje stanovit pilokarpin, isopilokarpin, kyselinu pilokarpovou a isopilokarpovou za méně než 20 minut.

Práce testovala použití různých C₁₈ kolon a pouze dvě dávaly spolehlivé výsledky. Nejlepší výsledky byly získány s YMC Pack ODS-AM kolonou. Bylo zjištěno, že lepší rozlišení souvisí s použitím delší kolony (z 12,5 na 15 cm) a snížením velikosti částic (z 6 na 3 μm).

Dobře rozlišené píky a lineární odpověď byla získána v přítomnosti 100 násobně větší koncentrace pilokarpinu.

Metoda je přesná, specifická, senzitivní a obecně dostatečná pro rutinní rozlišení. Kritickou částí je výběr dobré kvalitní kolony [15].

3.4.7. β-cyklodextrinová kolona

Kolona: β-cyklodextrinová kolona Cyclobond I o rozměrech 250 x 4,6 mm (5μm)

Mobilní fáze: 40 g sulfátu amonného a 20 ml triethylaminu se rozpustí v 1000 ml vody; pH 4,0 (úprava kyselinou fosforečnou)

Průtok: 1,0 ml/min

UV detekce: vlnová délka 214 nm

Ředící směs: mobilní fáze - acidické pH a vysoké množství iontů je zodpovědné za schopnost mobilní fáze rozpouštět ophthalmické nosiče

Metoda je vhodná ke stanovení pilokarpinu, isopilokarpinu, kyseliny pilokarpové a isopilokarpové. Pilokarpinová kyselina a isopilokarpinová kyselina se eluují několik minut před pilokarpinem. Celková doba analýzy je cca 10 minut.

Získají se dobře rozlišené píky příbuzných látek ve 100 násobném množství pilokarpinu.

Problematický je výběr dobré kolony (některé kolony neposkytují požadované rozlišení pilokarpinu od isopilokarpinu) [16].

3.4.8. Monolitická kolona

Kolona: 6 monolitických kolon Chromolith Performance RP-18e o rozměrech 100 x 4,6 mm

Mobilní fáze: 980 ml pufru a 20 ml methanolu. Složení pufru: 13,5 ml kyseliny fosforečné 85%, 3 ml triethylaminu, voda 983,5 ml pH 3 (úprava 50% hydroxidem sodným)

Průtok: 4 ml/min

UV-VIS detektor: detekční vlnová délka 214 nm

Ředící směs: mobilní fáze

Teplota: pokojová teplota

Eluování sloučenin v pořadí: isopilokarpin, pilokarpin, pilokarpinová kyselina a isopilokarpinová kyselina, což značí stejnou selektivitu se stacionární fází na bázi oktadecylsiliky. Oproti ní poskytuje lepší rozlišení a symetrii píků v kratším čase při stejném průtoku 1 ml/min [17].

4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1. Chemikálie, standardy, vzorky

- Pilokarpin-hydrochlorid ČL 2009 – Dopl. 2010, č.š.: 73004, Fagron a.s., Olomouc ČR
- Fenylefrin hydrochlorid, č.š. 107K1582, Sigma-Aldrich, Praha, ČR
- Dilthiazem hydrochlorid, č.š. DIL/M-086/2000, Dr. Kulich Pharma, Praha, ČR
- Methyl-4-hydroxybenzoat, č.š.1166641, Fluka, Praha, ČR
- Ethyl-4-hydroxybenzoat, č.š.35129-021, Aldrich, Praha, ČR
- Propyl-4-hydroxybenzoat, č.š. 11345999, Fluka, Praha, ČR
- Butyl-4-hydroxybenzoat, č.š. 426009/1, Fluka, Praha, ČR
- Methanol CHROMASOLV, č.š. UN 1203, Sigma-Aldrich, Praha, ČR
- Kyselina fosforečná 85%, č.š. K35531273602, Merck, Darmstadt, Německo
- Triethylamin, č.š 1319021 40807091, Fluka, Praha, ČR
- Amoniak 26 %, č.š.1503020310, Penta, ČR
- Hydroxid sodný, č.š. 1502010210, Penta, ČR
- Ultračistá voda, čištěná systémem Milli-Q (Millipore, Bedford, MA,USA)
- Coll. pilocarpini hydrochloridi 1%, vzorek k analýze, datum přípravy 10.9.2012
- Coll. pilocarpini hydrochloridi 2%, vzorek k analýze, datum přípravy 10.9.2012
- Coll. pilocarpini hydrochloridi 1%, placebo, datum přípravy 10.9.2012
- Coll. pilocarpini hydrochloridi 2%, placebo, datum přípravy 10.9.2012

4.2. Přístroje, podmínky separace

Kapalinový chromatograf:

- Sestava: Shimadzu LC – 2010C, Shimadzu corp., Japonsko
- Kolona: Discovery HS C₁₈; 25 cm x 4,6 mm, 5 µm Supelco Analytical
Monolitická kolona Chromolith High Resolution RP 18
endcapped 100 x 4,6 mm, Merck, Německo
- Dávkování: 20 µl
- Detekce: 220 nm
- Mobilní fáze: Pufr : methanol (různé poměry)
Složení pufru: 13,5 ml kyseliny fosforečné 85 %, 3 ml
triethylaminu, 983,5 ml vody.
Před použitím se filtruje pomocí filtračního zařízení Millipore,
filtr ze skleněných vláken, velikost pórů 0,7 až 1,3 µm
- Průtok: F_m = 1,0 ml/min; 1,2 ml/min; 1,5 ml/min
- Vnitřní standard: Fenylefrin hydrochlorid
- Ředící směs: Voda R
Voda R : methanol 80:20(V/V)
Mobilní fáze - pufr : methanol 98:2 (V/V)
- Izokratický režim
- Teplota: 25°C
- Vyhodnocení: Chromatografická stanice Class VP, verze 6.13, Shimadzu,
Japonsko
- Ultrazvuková lázeň: Bandelin Sonorex, Německo
- Analytické váhy: Sartorius Cubis,

4.3. Příprava vzorků, standardů a analyzovaných roztoků

4.3.1. Oční kapky s pilokarpin-hydrochloridem 1%

Do 50-ml odměrné baňky bylo odváženo množství očních kapek s pilokarpin-hydrochloridem odpovídající koncentraci $c = 25,0 \text{ mg}/100 \text{ ml}$ pilokarpin-hydrochloridu (asi 1,25 g) a doplněno roztokem vnitřního standardu fenylefrin hydrochloridu v mobilní fázi o koncentraci $c = 1,0 \text{ mg}/100 \text{ ml}$ po značku.

4.3.2. Oční kapky s pilokarpin-hydrochloridem 2%

Do 50-ml odměrné baňky bylo odváženo množství očních kapek s pilokarpin-hydrochloridem odpovídající koncentraci $c = 25,0 \text{ mg}/100 \text{ ml}$ pilokarpin-hydrochloridu (asi 0,625 g) a doplněno roztokem vnitřního standardu fenylefrinu hydrochloridu v mobilní fázi o koncentraci $c = 1,0 \text{ mg}/100 \text{ ml}$ po značku.

4.3.3. Standard pilokarpin-hydrochloridu 0,1%

Do 10-ml odměrné baňky bylo odváženo množství 0,01 g standardu pilokarpin-hydrochloridu a doplněno vodou R po značku.

4.3.4. Příprava roztoku vnitřního standardu o koncentraci 1,0 mg/100ml

Do 100-ml odměrné baňky bylo odváženo množství 1,0 mg vnitřního standardu a doplněno vodou R po značku. Jako vnitřní standard byly testovány sloučeniny: methyl-4-hydroxybenzoat, ethyl-4-hydroxybenzoat, propyl-4-hydroxybenzoat, butyl-4-hydroxybenzoat, diltiazem hydrochlorid, fenylefrin hydrochlorid.

4.3.5. Příprava roztoku vnitřního standardu fenylefrin hydrochloridu v mobilní fázi o koncentraci 1,0 mg/100ml

Do 100-ml odměrné baňky bylo odváženo množství 1,0 mg vnitřního standardu fenylefrin hydrochloridu a doplněno mobilní fází (pufr : methanol 98:2 (V/V)) po značku.

4.3.6. Porovnávací roztok kyseliny pilokarpové č. 1

Kyselina pilokarpová se připravila rozpuštěním 0,01 g standardu pilokarpin-hydrochloridu ve vodě R a zředěním na 10,0 ml. K 5,0 ml roztoku se přidalo 0,1 ml amoniaku 17,5 % RS, roztok se zahřívá 30 minut na vodní lázni a po ochlazení se zředil vodou R na 25,0 ml. 3,0 ml roztoku se zředily vodou R na 25,0 ml [5].

4.3.7. Porovnávací roztok kyseliny pilokarpové č. 2

Kyselina pilokarpová se připravila rozpuštěním 0,01 g standardu pilokarpin-hydrochloridu ve vodě R a zředěním na 10,0 ml. K 5,0 ml roztoku se přidalo 0,1 ml amoniaku 17,5 % RS, roztok se zahříval 30 minut na vodní lázni a po ochlazení se zředil vodou R na 25,0 ml.

4.3.8. Zkušební roztok č. 1

Do 100-ml odměrné baňky bylo odváženo 25,0 mg standardu pilokarpin-hydrochloridu; 2,0 ml porovnávacího roztoku kyseliny pilokarpové č. 1; 1,0 mg vnitřního standardu fenylefrin hydrochloridu a doplněno vodou R po značku.

4.3.9. Zkušební roztok č. 2

Do 100-ml odměrné baňky bylo odváženo 25,0 mg standardu pilokarpin-hydrochloridu; 10,0 ml porovnávacího roztoku kyseliny pilokarpové č. 2; 1,0 mg vnitřního standardu fenylefrin hydrochloridu a doplněno ředící směsí voda R : methanol 80:20(V/V) po značku.

4.3.10. Pracovní standard pilokarpin-hydrochloridu s vnitřním standardem

Do 50-ml odměrné baňky bylo odváženo množství 12,5 mg pilokarpin-hydrochloridu, 0,5 mg vnitřního standardu fenylefrin hydrochloridu a doplněno mobilní fází (pufr : methanol 98:2 (V/V)) po značku.

4.3.11. Pracovní roztok kyseliny pilokarpové s vnitřním standardem

Do 50-ml odměrné baňky bylo odváženo 5,0 ml porovnávacího roztoku kyseliny pilokarpové č. 2, 0,5 mg vnitřního standardu fenylefrin hydrochloridu a doplněno mobilní fází (pufr : methanol 98:2 (V/V)) po značku.

4.3.12. Příprava kalibračních roztoků pilokarpin-hydrochloridu pro test linearity

Byl připraven zásobní roztok pilokarpin-hydrochloridu o koncentraci 500,0 mg/100ml a zásobní roztok vnitřního standardu fenylefrin hydrochloridu o koncentraci 50,0 mg/100 ml v mobilní fází (pufr : methanol 98:2 (V/V)).

Příprava kalibračního roztoku o koncentraci 12,5 mg/100 ml: Do 20-ml odměrné baňky bylo odváženo 0,5 ml zásobního roztoku pilokarpin-hydrochloridu a 0,4 ml zásobního roztoku fenylefrin hydrochloridu a doplněno mobilní fází (pufr : methanol 98:2 (V/V)) po značku.

Příprava kalibračního roztoku o koncentraci 25,0 mg/100 ml: Do 20-ml odměrné baňky bylo odváženo 1,0 ml zásobního roztoku pilokarpin-hydrochloridu a 0,4 ml zásobního roztoku fenylefrin hydrochloridu a doplněno mobilní fází (pufr : methanol 98:2 (V/V)) po značku.

Příprava kalibračního roztoku o koncentraci 37,5 mg/100 ml: Do 20-ml odměrné baňky bylo odváženo 1,5 ml zásobního roztoku pilokarpin-hydrochloridu a 0,4 ml zásobního roztoku fenylefrin hydrochloridu a doplněno mobilní fází (pufr : methanol 98:2 (V/V)) po značku.

Příprava kalibračního roztoku o koncentraci 50,0 mg/100 ml: Do 10-ml odměrné baňky bylo odváženo 1,0 ml zásobního roztoku pilokarpin-hydrochloridu a 0,2 ml zásobního roztoku fenylefrin hydrochloridu a doplněno mobilní fází (pufr : methanol 98:2 (V/V)) po značku.

Příprava kalibračního roztoku o koncentraci 62,5 mg/100 ml: Do 20-ml odměrné baňky bylo odváženo 2,5 ml zásobního roztoku pilokarpin-hydrochloridu a 0,4 ml zásobního roztoku fenylefrin hydrochloridu a doplněno mobilní fází (pufr : methanol 98:2 (V/V)) po značku.

Příprava kalibračního roztoku o koncentraci 75,0 mg/100 ml: Do 10-ml odměrné baňky bylo odváženo 1,5 ml zásobního roztoku pilokarpin-hydrochloridu a 0,2 ml zásobního roztoku fenylefrin hydrochloridu a doplněno mobilní fází (pufr : methanol 98:2 (V/V)) po značku.

4.4. Stanovení obsahu pilokarpinu-hydrochloridu v očních kapkách

- Připraví se 50,0 ml roztoku standardů v mobilní fázi (pufr : methanol 98:2 (V/V)) s obsahem 25,0 mg/100 ml pilokarpin-hydrochloridu a 1,0 mg/100 ml fenylefrin hydrochloridu ze 2 samostatných navážek. Každý roztok se změří šestkrát.
- Provedou s 2 nezávislé analýzy vzorku podle kompletního postu uvedeného v kap. 4.3.1. nebo 4.3.2. Roztok vzorku, odpovídající příslušné navážce vzorku se změří dvakrát.
- Výpočet obsahu pilokarpinu (%) se provede podle vzorce:

$$c_i = \frac{A_V / A_{IS} \cdot m_S \cdot F \cdot 100}{A_S / A_{IS} \cdot m_V \cdot Z}$$

c_i	=	obsah stanovené složky v %
A_V, A_S	=	plocha píku vzorku, standardu
A_{IS}	=	plocha píku vnitřního standardu fenylefrin hydrochloridu
m_V, m_S	=	navážka vzorku, standardu v g
F	=	faktor korekce na obsah referenční látky
Z	=	faktor zředění ($Z = 1$)

4.5. Stanovení obsahu kyseliny pilokarpové v očních kapkách

- Připraví se 50,0 ml roztoku v mobilní fázi (pufr : methanol 98:2 (V/V)) s obsahem 5,0 ml porovnávacího roztoku kyseliny pilokarpové č. 2 a 1,0 mg/100 ml fenylefrinu hydrochloridu ze 2 samostatných navážek. Každý roztok se změří šestkrát.
- Provedou s 2 nezávislé analýzy vzorku podle kompletního postu uvedeném v kap. 4.3.1. nebo 4.3.2. Roztok vzorku, odpovídající příslušné navážce vzorku se změří dvakrát.
- Vyhodnotí se chromatogramy získané proměřením zkoušeného roztoku vzorku a porovnávacího roztoku kyseliny pilokarpové č. 2. Zaznamená se analýza zkoušeného roztoku vzorku po dobu odpovídající 1,5 násobku retenčního času pilokarpin-hydrochloridu.

Obsah kyseliny pilokarpové (% pilokarpin-hydrochloridu) se vypočte podle vzorce:

$$\% = \frac{A_V / A_{IS}}{A_S / A_{IS} \cdot m_V \cdot 2}$$

A_V	=	plocha píku vzorku kyseliny pilokarpové
A_S	=	plocha píku standardu pilokarpin-hydrochloridu
A_{IS}	=	plocha píku vnitřního standardu fenylefrin hydrochloridu
m_V	=	navážka vzorku v g (viz. 4.3.1. nebo 4.3.2.)

5. VÝSLEDKY A DISKUZE

5.1. Vlastní vývoj HPLC metody

Při vývoji HPLC metody pro stanovení pilokarpin-hydrochloridu v očních kapkách v této práci jsem vycházela z metod autorů:

- Fan TY.a kol.: Improved high-performance liquid chromatographic determination of pilocarpine and its degradation products in ophthalmic solutions importance of octadecylsilane column choice [15] a
- El-Deeb S, Schepers U, Wätzig H : Evaluation of monolithic C18 HPLC columns for the fast analysis of pilocarpine hydrochloride in the presence of its degradation products [17].

5.1.1. Měření na C₁₈ koloně

Kolona: Discovery HS C₁₈; 250 x 4,6 mm, 5 µm Supelco Analytical

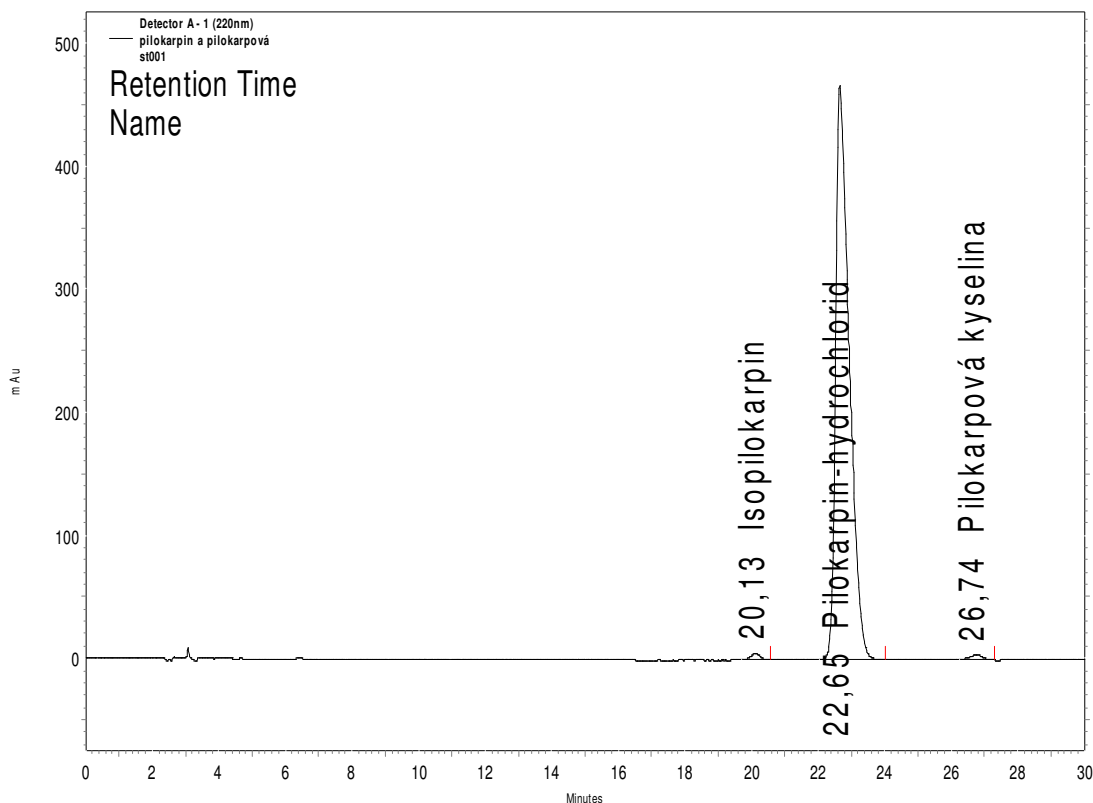
Mobilní fáze: pufr : methanol 98:2 (V/V)

Průtok: 1 ml/min

Ředící směs: voda R

Byly analyzovány vzorky:

- standard pilokarpin-hydrochloridu 0,1% (příprava viz. kap. 4.3.3.)
- porovnávací roztok kyseliny pilokarpové č. 1 (příprava viz. kap. 4.3.6.)
- vzorek směsi pilokarpin-hydrochloridu 0,1% a porovnávacího roztoku kyseliny pilokarpové č.1 v poměru 1:1



Obr. 3. Chromatogram vzorku směsi pilokarpin-hydrochloridu 0,1% a porovnávacího roztoku kyseliny pilokarpové č.1 v poměru 1:1

Sloučeniny byly eluovány v pořadí: isopilocarpin, pilokarpin, kyselina pilokarpová, kyselina isopilocarpová. Pilocarpin-hydrochlorid se eluoval asi v 23 minutě. Prodloužení doby analýzy v porovnání s metodou vyvinutou autorem Fan a kol. [15] bylo způsobeno použitím delší kolony.

Metoda poskytla dobré rozlišení pilokarpin-hydrochloridu od příbuzných látek.

5.1.2. Měření na monolitické koloně

Kolona: Chromolith High Resolution RP 18 endcapped 100 x 4,6 mm

Mobilní fáze: pufr : methanol 98:2 (V/V)

Průtok: 1 ml/min; 1,2 ml/min; 1,5 ml/min

Ředící směs: voda R

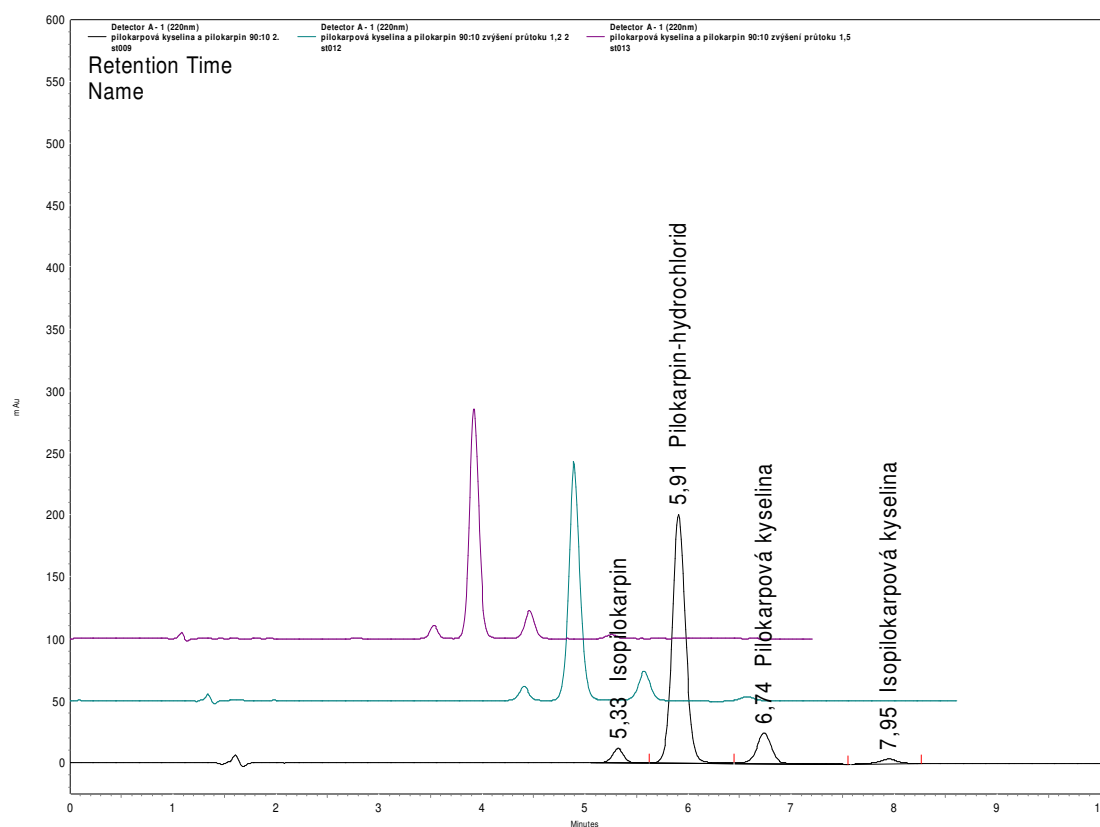
Byly analyzovány vzorky:

- standard pilokarpin-hydrochloridu 0,1% (příprava viz. kap. 4.3.3.)
- porovnávací roztok kyseliny pilokarpové č. 1 (příprava viz. kap. 4.3.6.)

- vzorek směsi pilokarpin-hydrochloridu 0,1% a porovnávacího roztoku kyseliny pilokarpové č.1 v poměru 1:1

Sloučeniny byly eluovány ve stejném pořadí, jako na C₁₈ koloně, v kratším časovém intervalu: isopilokarpin v cca 5,5 minutě, pilokarpin v cca 6 minutě, kyselina pilokarpová v 6,5 minutě, kyselina isopilokarpová v cca 8 minutě. Píky pilokarpinu a jeho příbuzných látek byly dobře rozlišené a symetrické.

Analýza vzorku směsi pilokarpin hydrochloridu 0,1% a porovnávacího roztoku kyseliny pilokarpové č. 1 v poměru 10:90 byla analyzována při 3 různých rychlostech průtoku: 1 ml/min, 1,2 ml/min a 1,5 ml/min. Při každém zvýšení rychlosti průtoku došlo ke zkrácení doby analýzy o cca 1 minutu. Rozlišení se se zvýšením rychlosti průtoku nepatrně snižuje.



Obr. 4. Chromatogram vzorku směsi pilokarpin-hydrochloridu 0,1% a porovnávacího roztoku kyseliny pilokarpové č.1 v poměru 10:90 při průtokové rychlosti 1 ml/min, 1,2 ml/min a 1,5 ml/min

Monolitická kolona byla zvolena za nejvhodnější pro vypracování metody HPLC stanovení pilokarpin-hydrochloridu v očních kapkách.

5.1.2.1. Hledání vnitřního standardu

Za účelem zvolení vhodného vnitřního standardu metody byly testovány následující sloučeniny:

- **Parabeny**

Vzorky methyl-4-hydroxybenzoátu, ethyl-4-hydroxybenzoátu, propyl-4-hydroxybenzoátu, butyl-4-hydroxybenzoátu, byly připraveny postupem uvedeným v kapitole 4.3.4. a nastříknuty na kolonu. Po cca 20 minutách byl proces analýzy zastaven. Parabeny nejsou vhodným vnitřním standardem metody, látky se neeluují v blízkosti pilokarpinu a jeho příbuzných látek.

- **Dilthiazem hydrochloridu**

Byl připraven vzorek dilthiazem hydrochloridu dle postupu uvedeného v kapitole 4.3.4. Dilthiazem hydrochlorid není vhodným vnitřním standardem metody; látka se neeluuje v blízkosti pilokarpinu a jeho příbuzných látek.

- **Fenylefrin hydrochlorid**

Byl připraven vzorek fenylefrin hydrochloridu dle postupu uvedeného v kapitole 4.3.4.

Vzorek fenylefrinu měl retenční čas při průtoku 1,5 ml/min v cca 2 minutě; při průtoku 1,0 ml/min v cca 2,5 minutě.

Fenylefrin hydrochlorid byl vybrán za vhodný vnitřní standard.

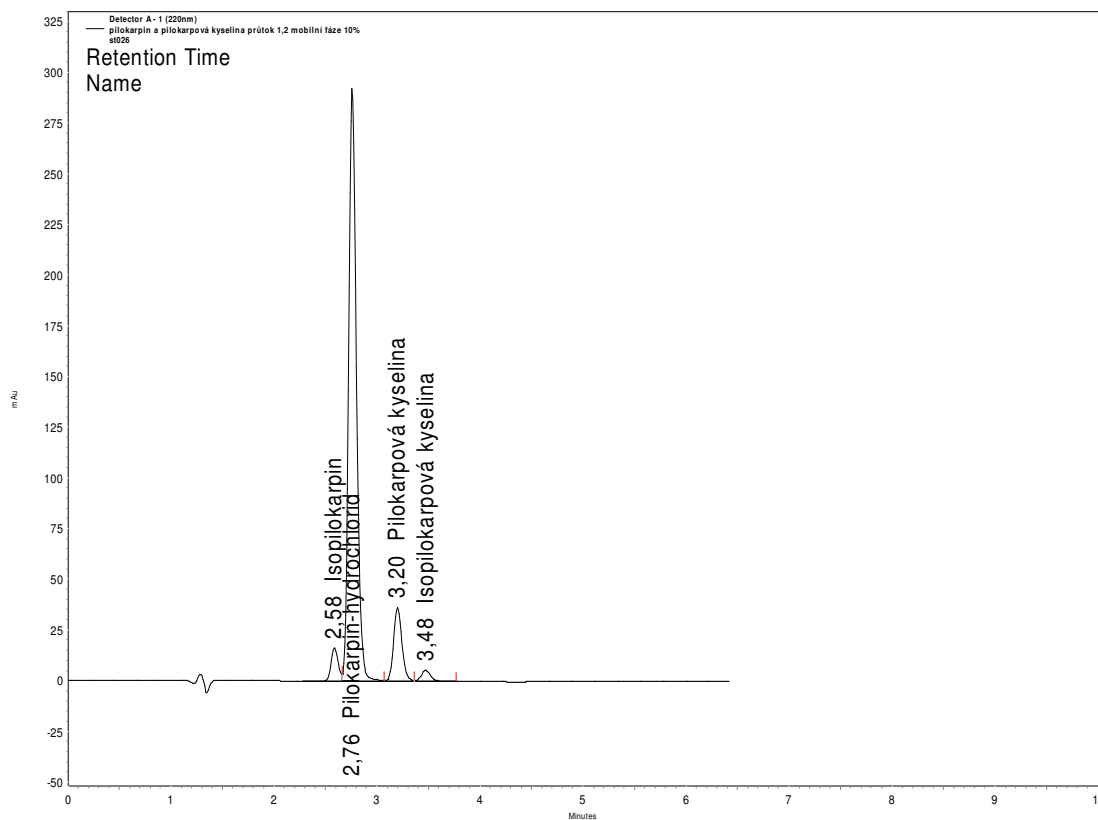
5.1.2.2. Zkouška změny mobilní fáze

Složení mobilní fáze bylo změněno v poměru: 90% pufru: 10% methanolu.

Touto mobilní fází byly analyzovány vzorky:

- fenylefrin hydrochloridu 1 mg/100ml (příprava viz. kap. 4.3.4.)
- vzorek směsi pilokarpin-hydrochloridu 0,1% (příprava viz. kap. 4.3.3.) a porovnávacího roztoku kyseliny pilokarpové č. 1 (příprava viz. kap. 4.3.6.) v poměru 10:90

Změna ve složení mobilní fáze neposkytovala vhodné analytické podmínky: sloučeniny se eluovaly rychleji, ale píky byly nedostatečně rozlišené.



Obr. 5. Chromatogram vzorku směsi pilokarpin-hydrochloridu 0,1% a porovnávacího roztoku kyseliny pilokarpové č.1 v poměru 10:90 v mobilní fázi – pufr : methanol 90:10 (V/V)

Za vhodné bylo zvoleno původní složení mobilní fáze: 980 ml pufru a 20 ml methanolu

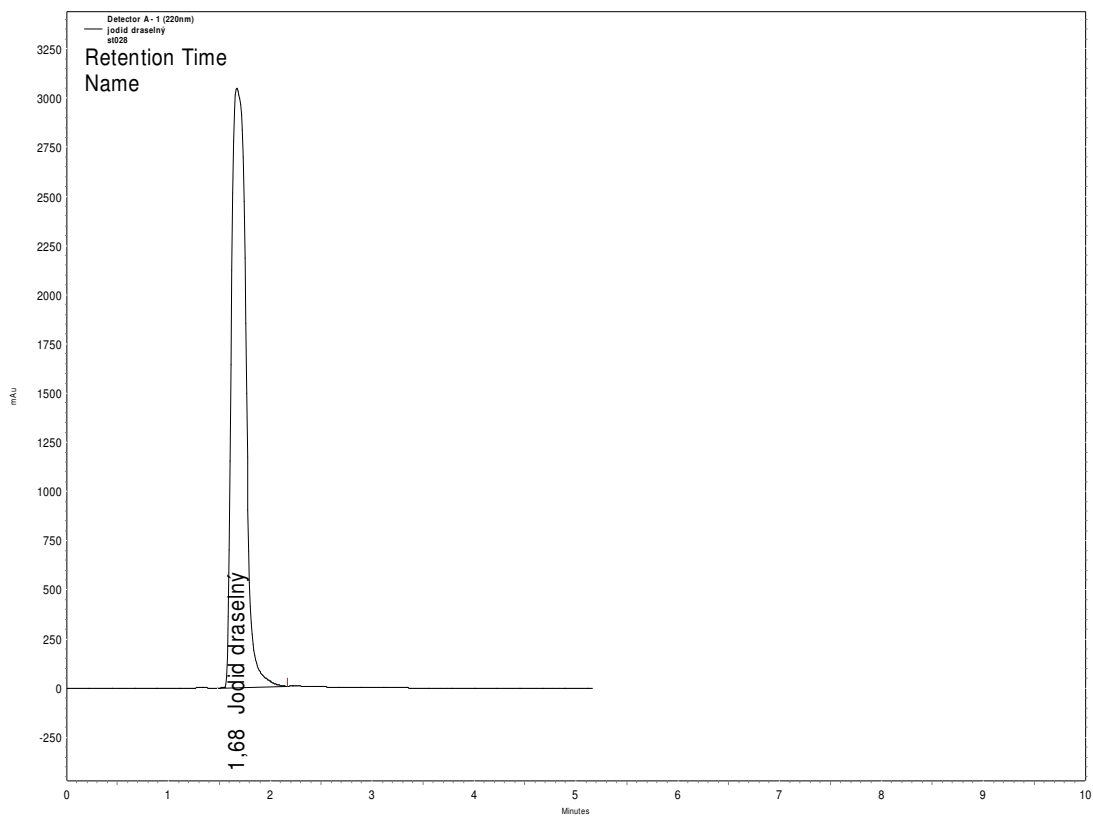
5.1.2.3. Hledání vhodné ředící směsi vzorků a úprava složení kyseliny pilokarpové

Příprava vzorků rozpouštěním a ředěním ve vodě R byla nahrazena ředící směsí o složení 80% vody R : 20% methanolu

V této směsi byl analyzován zkušební roztok č.1 (příprava viz. kap. 4.3.8.) s mobilní fází o složení pufr : methanol 98:2 (V/V). Průtoková rychlost 1 ml/min.

Bylo dosaženo vyhovujícího rozlišení sloučenin.

Pro zkoušku mrtvého objemu kolony byl analyzován vzorek jodidu draselného, který není na koloně zadržen a ihned dochází k jeho vylučování.

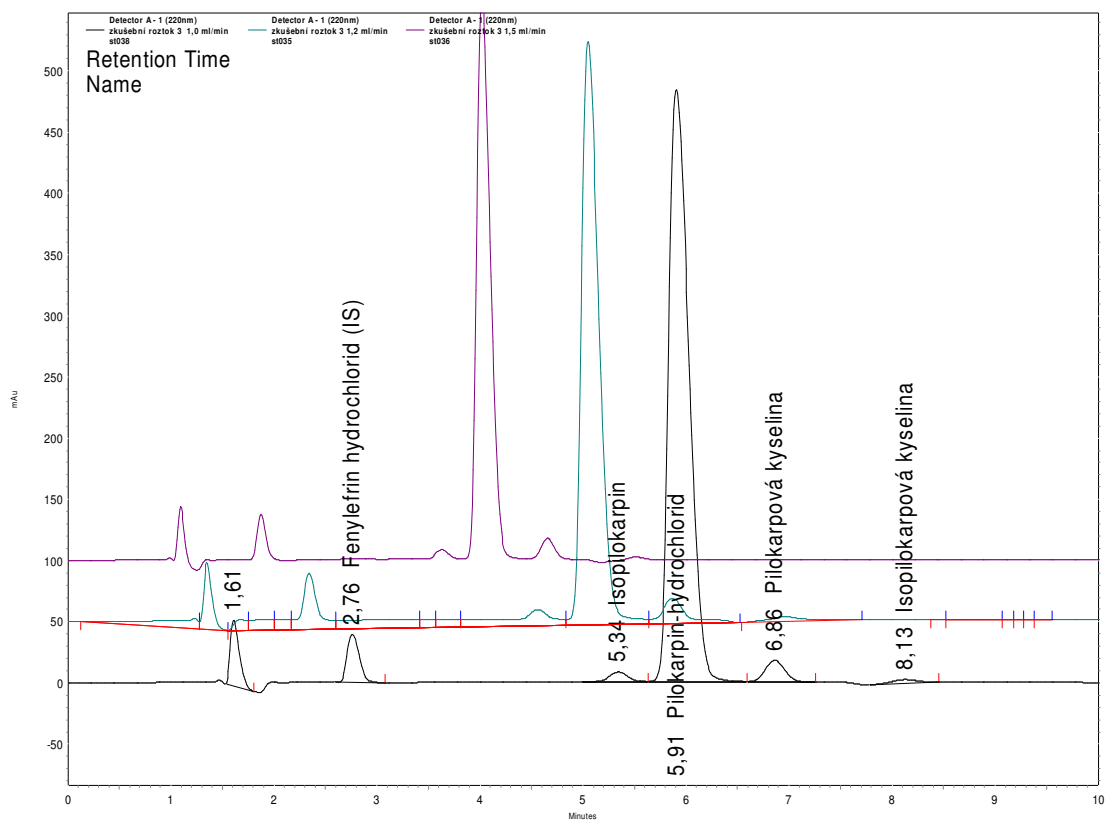


Obr. 6. Chromatogram jodidu draselného

Protože pík kyseliny pilokarpové v analyzovaném vzorku zkušebního roztoku č.1 byl malý, došlo k úpravě postupu přípravy kyseliny pilokarpové a složení zkušebního roztoku: Roztok kyseliny pilokarpové byl připraven postupem uvedeným v kapitole: 4.3.7.

Zkušební roztok č. 2 byl připraven postupem uvedeným v kapitole: 4.3.9. a analyzován s mobilní fází o složení pufr : methanol 98:2 (V/V) při průtokové rychlosti: 1 ml/min, 1,2 ml/min a 1,5 ml/min.

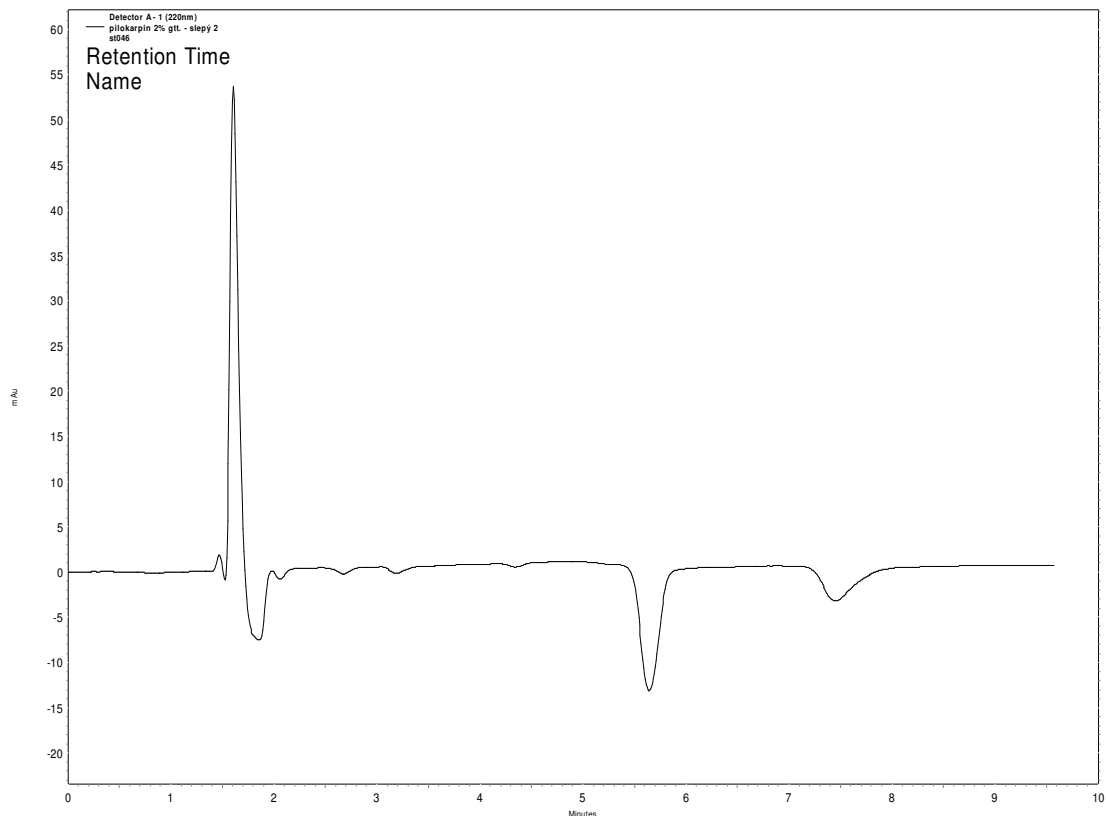
Byl získán větší pík kyseliny pilokarpové.



Obr. 7. Chromatogram zkušební roztoku č. 2 při průtokové rychlosti 1 ml/min, 1,2 ml/min a 1,5 ml/min

Ačkoliv s vyšší rychlostí bylo dosaženo rychlejší analýzy o cca 2 minuty, za nejvhodnější byl zvolen průtok rychlosti 1 ml/min, protože bylo dosaženo nejlepšího rozlišení píků v přijatelném čase analýzy.

Při analýze slepých vzorků očních kapek pilokarpin-hydrochloridu 1 % a 2% se na chromatogramech vzorků objevil negativní pík.



Obr. 8. Chromatogram slepého vzorku očních kapek pilokarpin-hydrochloridu 2% připravené v ředící směsi voda R : methanol 80:20 (V/V)

Pro zjištění příčiny a odstranění tohoto píku se provedl důkladný proplach kolony, pro vymytí případně zadržené sloučeniny. Byla připravena nová mobilní fáze a opětovně se prováděla analýza vzorků pilokarpin-hydrochloridu, kyseliny pilokarpové, vnitřního standardu i zkušebních vzorků. Negativní pík není viditelný při analýze vzorků s pilokarpin-hydrochloridem, neboť je eluován ve stejný retenční čas, jako pilokarpin-hydrochlorid. Bylo zjištěno, že výskyt negativního píku se poprvé projevil při použití ředící směsí vzorků 80% vody: 20% methanolu. Fan T.Y.a kol. [15] a Deeb S .El. a kol. [17] ve své práci používali jako ředící směs vzorků mobilní fázi. Byl proveden nástřik vzorku mobilní fáze pro ověření, zda dojde k odstranění výskytu negativního píku.

Na chromatogramu mobilní fáze nebyl zaznamenán žádný interferující pík.

Mobilní fáze byla zvolena za vhodnou ředící směs vzorků.

5.2. Vyhodnocení optimálních podmínek

Optimální chromatografické podmínky vyvinuté HPLC metody pro stanovení pilokarpin-hydrochloridu v očních kapkách:

Kolona: Chromolith High Resolution RP 18 endcapped 100 x 4,6 mm

Mobilní fáze: Pufr : methanol 98:2 (V/V)

Průtok: 1 ml/min

Vnitřní standard: Fenylefrin hydrochlorid

Objem vzorku: 20 µl

Detekce: 220 nm

Ředící směs: Mobilní fáze

Izokratický režim

Teplota: 25 °C

5.3. Validační zpráva pro oční kapky s pilokarpin-hydrochloridem

5.3.1. Souhrn

Byla vypracována a částečně validována metoda vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC) pro stanovení obsahu účinné látky pilokarpin-hydrochloridu v individuálně vyráběném léčivém přípravku oční kapky s pilokarpin-hydrochloridem.

Složení přípravku je uvedeno v ČL 2009, str. 4334

5.3.2. Podmínky separace

- Kolona: Monolitická kolona Chromolith High Resolution RP 18 endcapped 100 x 4,6 mm, Merck, Německo
- Dávkování: 20 µl
- Detekce: 220 nm
- Mobilní fáze: Pufr : methanol v poměru 98:2 (V/V)
- Průtok: $F_m = 1,0$ ml/min
- Vnitřní standard: Fenylefrin hydrochlorid
- Ředící směs: Mobilní fáze - pufr : methanol 98:2 (V/V)
- Izokratický režim
- Teplota: 25°C

5.3.3. Test způsobilosti chromatografického systému

5.3.3.1. Zdánlivý počet teoretických pater (N)

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

t_R = retenční čas (min)

$W_{0,05}$ = šířka píku v polovině výšky (min)

Tab. 2 Zdánlivý počet teoretických pater (N)

Analyzovaná látka	t_R (min)	N
Pilokarpin-hydrochlorid	5,41	6992

n = 3

5.3.3.2. Faktor symetrie (A_S)

$$A_S = W_{0,01} / 2f$$

$W_{0,01}$ = šířka píku ve vzdálenosti 5 % výšky píku;

f = menší část úsečky $W_{0,01}$, která vznikne protnutím úsečky kolmicí spuštěnou z vrcholu píku;

Tab. 3 Faktor symetrie

Analyzovaná látka	A_S
Pilokarpin-hydrochlorid	1,45

$n = 3$

Požadavek: T 0,8 až 1,5

VYHOVUJE

5.3.3.3. Rozlišení

(Obr. 9)

$$R_{ij} = \frac{1,18(t_{R2} - t_{R1})}{w_{h1} + w_{h2}}, \text{ kdy } t_{R2} > t_{R1}$$

t_R = retenční čas (min)

w_h = šířka píku na základně (min)

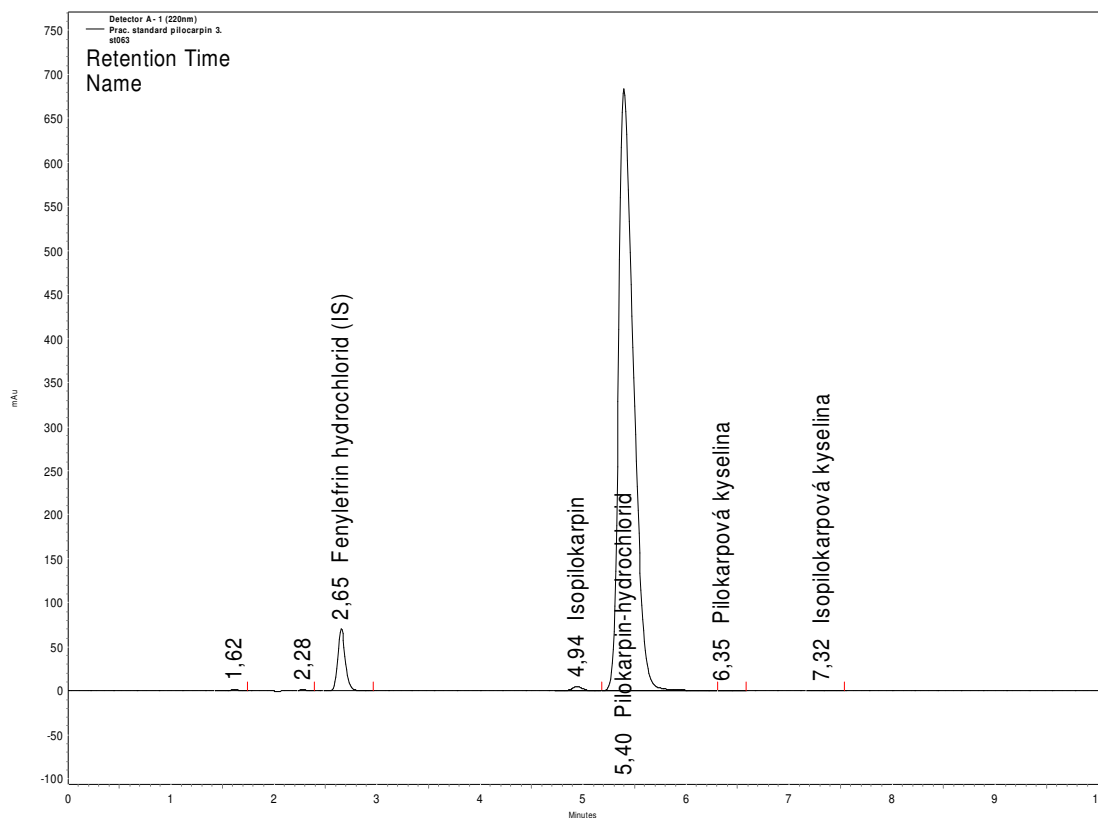
Tab. 4 Rozlišení

Hodnocené látky	R_{ij}
Isopilokarpin-hydrochlorid – Pilokarpin-hydrochlorid	2,10

$n = 3$

Požadavek: $R_{ij} > 1,5$

VYHOVUJE



Obr. 9. Chromatogram pracovního standardu pilokarpin-hydrochloridu s vnitřním standardem fenylefrin hydrochloridem

5.3.3.4. Opakovatelnost

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

Pilocarpin-hydrochlorid 25,30 mg/ 100ml

Fenylefrin hydrochlorid 1,06 mg/100ml

dle postupu uvedeném v kap. 4.3.10.

Tab. 5 Opakovatelnost

Pilocarpin-hydrochlorid		
Číslo pokusu	Retenční čas (t_R) (min)	Plocha píku (A)
1	5,41	6 778 398
2	5,39	6 782 148
3	5,40	6 791 925
4	5,40	6 789 470
5	5,41	6 782 946
6	5,42	6 789 132

n	6	6
\bar{x}	5,41	6 785 670
SD	0,01	5258,46
RSD (%)	0,19	0,08

Požadavek: RSD < 1 % VYHOVUJE

5.3.4. Validace analytické metody

5.3.4.1. Přesnost

Byly analyzovány roztoky vzorku oční kapky s pilokarpin-hydrochloridem, které byly paralelně připraveny samostatným postupem uvedeným v kap. 4.3.1. a 4.3.2. Plochy píků byly přepočteny na navážku 1,250 g 1% očních kapek a 0,625 g 2% očních kapek

Tab. 6 Přesnost 1% oční kapky

Roztok č.	Plocha píku (m = 1,250 g)
	Pilokarpin-hydrochlorid
1	7 090 514
2	6 456 246
3	6 506 210
4	6 482 369
5	6 520 007
6	6 388 731

n	6
\bar{x}	6 574 013
SD	102 900
RSD (%)	3,91

Požadavek: RSD < 5 % VYHOVUJE

Tab. 7 Přesnost 2% oční kapky

Roztok č.	Plocha píku (m = 0,625 g)
	Pilokarpin-hydrochlorid
1	6 593 933
2	6 612 962
3	6 626 040

4	6 825 806
5	6 669 498
6	6 700 506

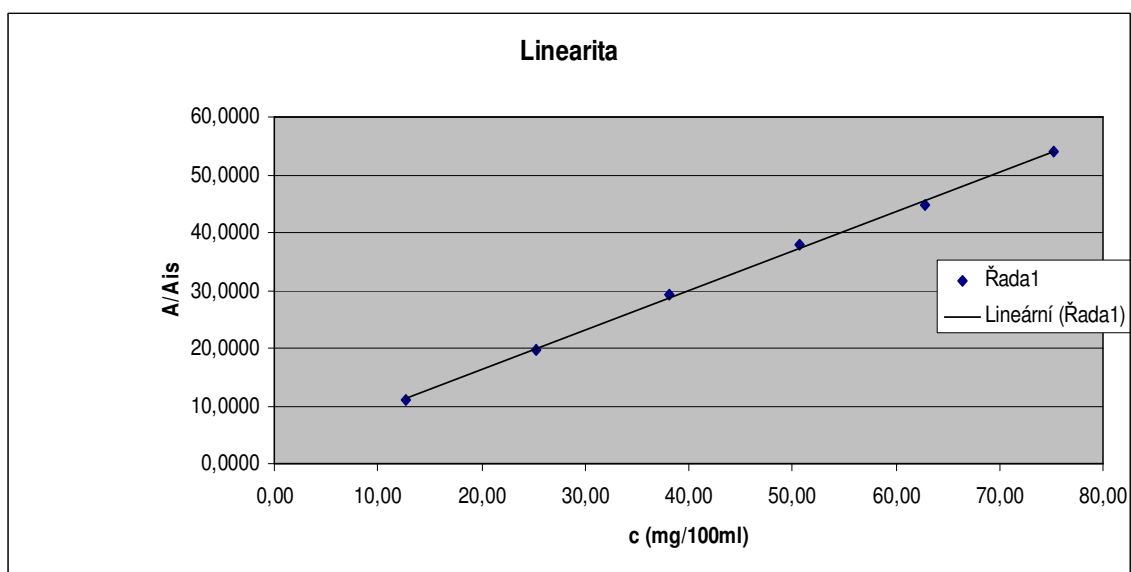
n	6
\bar{x}	6 671 457
SD	68 038
RSD (%)	1,27

Požadavek: **RSD < 5 %** **VYHOVUJE**

5.3.4.2. Linearita

Byla použita metoda vnitřního standardu; jako vnitřní standard (IS) byl použit fenylefrin-hydrochlorid. Bylo připraveno 6 kalibračních roztoků pilokarpin-hydrochloridu (koncentrace jsou uvedeny v tabulce – obr. 10, přídavek IS byl 1,0 mg/ 100 ml) dle postupu uvedeném v kap. 4.3.12. Plocha píku pro každou koncentraci je průměrem ze 3 měření a pro další výpočty byl brán průměr z těchto tří hodnot. Závislost A_{VZOREK}/A_{IS} kalibračních roztoků na jejich koncentraci byla vyhodnocena metodou lineární regrese.

c (mg/100ml)	A/A _{IS}
12,67	11,0031
25,34	19,6232
38,06	29,1357
50,66	38,0541
62,79	44,7993
75,23	54,0667



Obr. 10. Testování linearity

Regresní funkce : $y = kx + q$.	
počet: bodů $n = 6$	
Parametry regresní přímky a odhady jejich směrodatných odchylek	
směrnice	$k = 0,6849 \pm 0,0122$
absolutní člen	$q = 2,5570 \pm 0,5964$
koeficient korelace	$R = 0,9994$
reziduální odchylka	$S_{rez} = 0,6365$
Závislost y na x byla prokázána na hladině významnosti $0,001$	

Požadavek na linearitu vyhovuje.

5.3.4.3. Správnost

Byl změřen roztok standardu: $c_0 = 25,30$ mg/100 ml (pilokarpin-hydrochlorid); $n = 6$.

Byly analyzovány modelové vzorky (placebo + pilokarpin-hydrochlorid), které byly paralelně připravené samostatným postupem uvedeným v kap. 4.3.1. a 4.3.2., s přidavkem roztoku standardu o koncentraci c_0 .

Výtěžnost R_i byla vypočtena podle vzorce: $R_i (\%) = 100 \cdot c_i/c_0$; c_0 je koncentrace vložená, c_i je koncentrace stanovená HPLC.

Tab. 8 Správnost oční kapky 1%

Pilokarpin-hydrochlorid				
Vzorek č.	c_0 (mg/ 100 ml)	A_i	c_i (mg/ 100 ml)	R_i (%)
1	25,30 ($A_0 = 6\ 785\ 670$)	6 574 818	25,36	100,25
2		6 899 597	26,49	104,71
3		6 577 329	25,24	99,77
4		6 588 578	25,41	100,45
5		6 581 249	25,26	99,85
6		6 598 480	25,21	99,65

n 6
 \bar{x} 101,01 %
SD 1,95
RSD (%) 1,93 %

Požadavek: R_i v intervalu 100 ± 5 %
RSD < 5 %

VYHOVUJE
VYHOVUJE

Tab. 9 Správnost oční kapky 2%

Pilokarpin-hydrochlorid				
Vzorek č.	c₀ (mg/ 100 ml)	A_i	c_i (mg/ 100 ml)	R_i (%)
1	25,30 (A ₀ = 6 785 670)	6 576 131	25,06	99,06
2		6 606 455	25,10	99,22
3		6 610 725	25,07	99,11
4		6 604 876	25,08	99,13
5		6 542 507	25,04	98,98
6		6 568 797	25,15	99,41

n	6
\bar{x}	99,10 %
SD	0,15
RSD (%)	0,15 %

Požadavek:	R_i v intervalu 100 ± 5 %	VYHOVUJE
	RSD < 5 %	VYHOVUJE

5.3.4.4. Selektivita

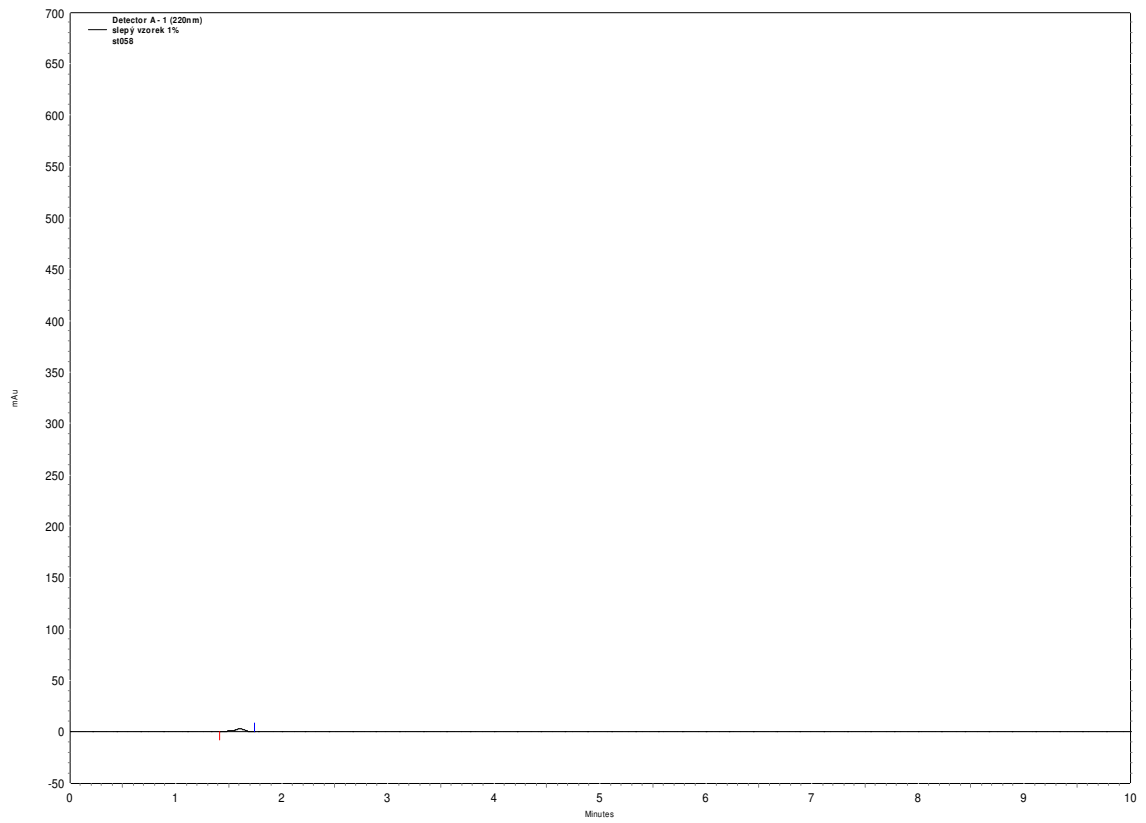
Chromatogram placebo, které bylo zpracováno podle postupu v kap. 4.3.1. a 4.3.2. je na obrázku 11 pro oční kapky obsahující 1% pilokarpin-hydrochloridu a na obrázku 12 pro oční kapky obsahující 2% pilokarpin-hydrochloridu. V retenčním čase odpovídajícímu pilokarpin-hydrochloridu není žádný pík interferující látky.

Chromatogram pracovního standardu pilokarpin-hydrochloridu s vnitřním standardem fenylefrin hydrochloridem je dokumentován na obrázku 13.

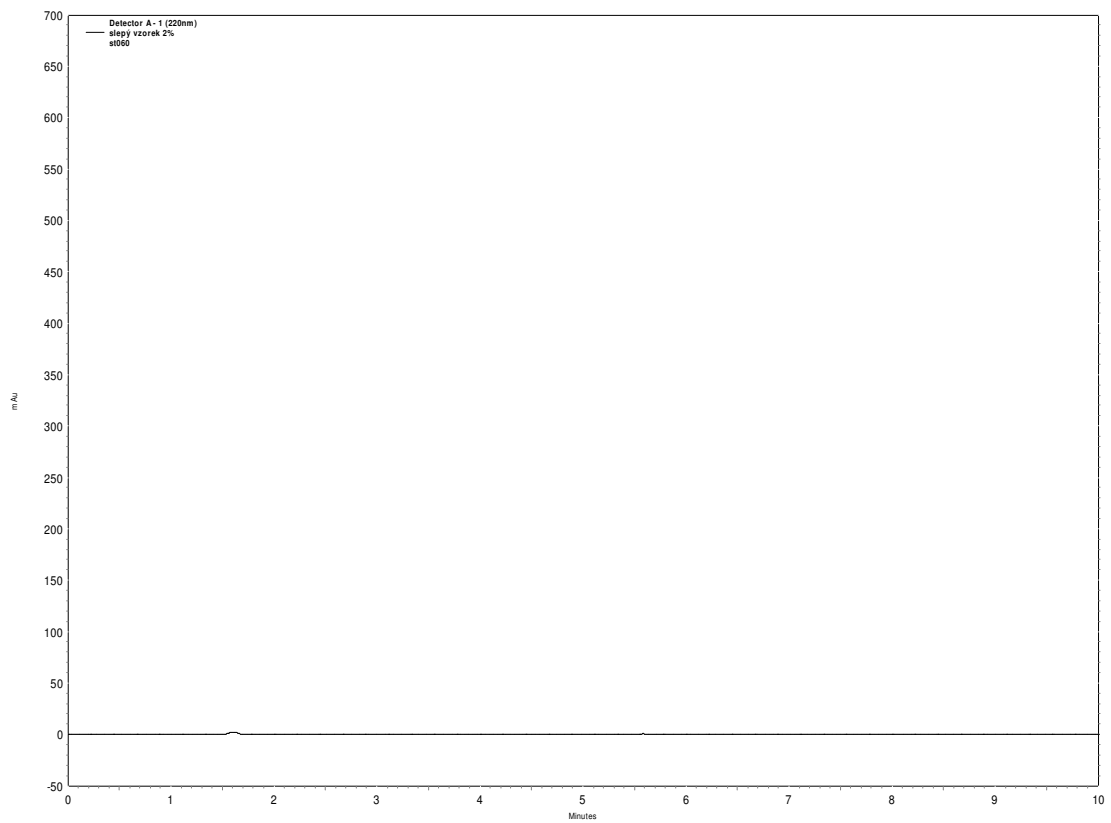
Na obrázku 14 – chromatogram přípravku oční kapky obsahující 1% pilokarpin-hydrochloridu, je znázorněna separace píku pilokarpin-hydrochloridu od píků balastních látek očních kapek a píku vnitřního standardu fenylefrin hydrochloridu.

Na obrázku 15 – chromatogram přípravku oční kapky obsahující 2% pilokarpin-hydrochloridu, je znázorněna separace píku pilokarpin-hydrochloridu od píků balastních látek očních kapek a píku vnitřního standardu fenylefrin hydrochloridu.

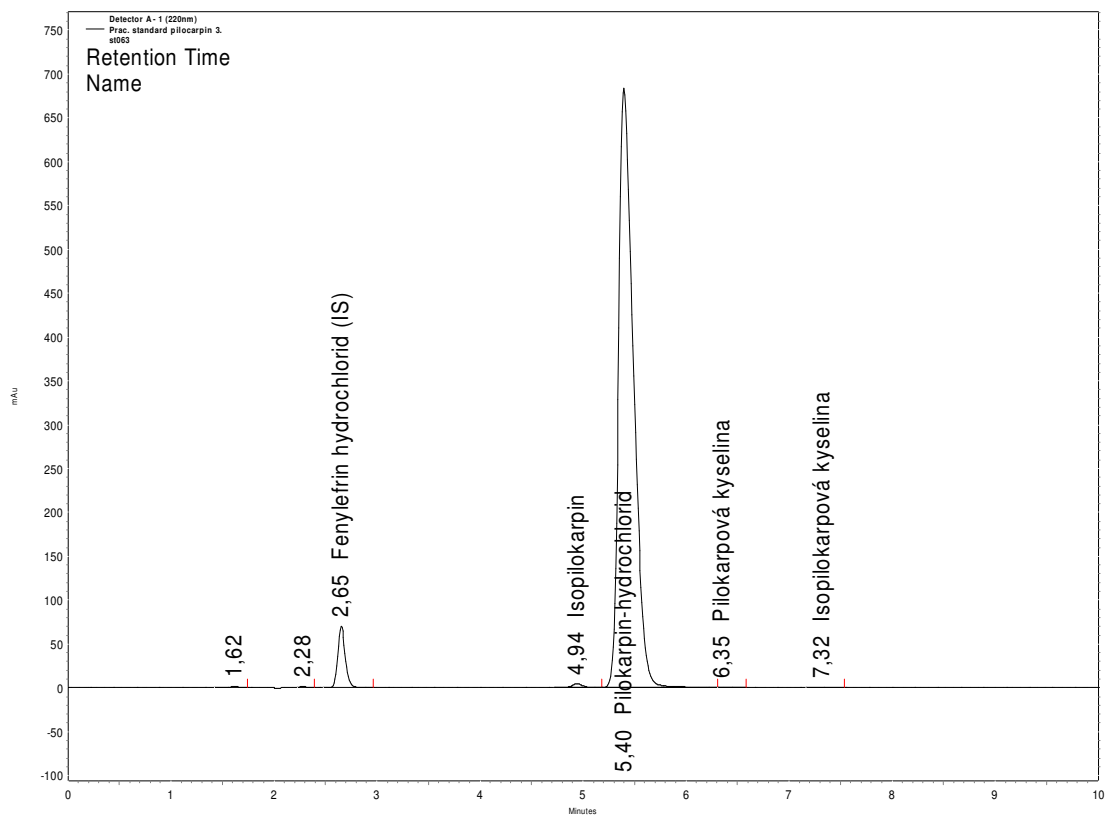
Předložená HPLC metoda umožňuje selektivně změřit plochu píku odpovídající pilokarpin-hydrochloridu.



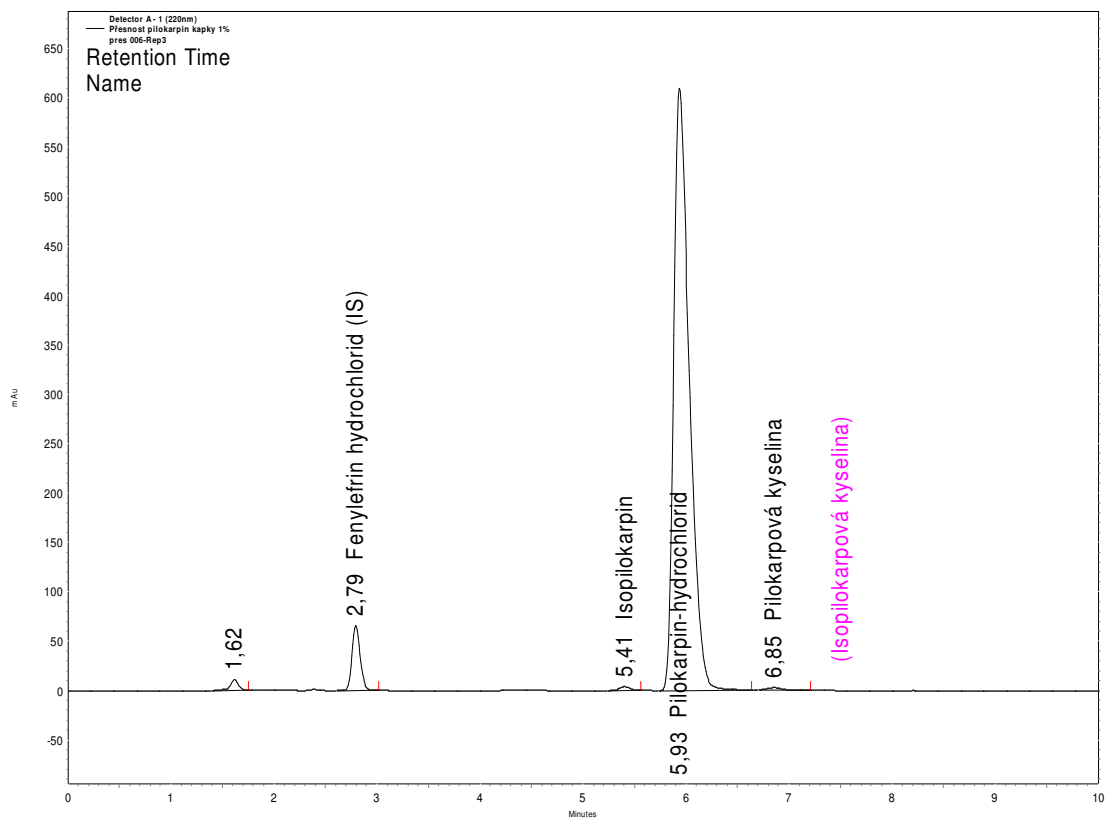
Obr. 11. Chromatogram placeba oční kapky 1% pilokarpin-hydrochloridu



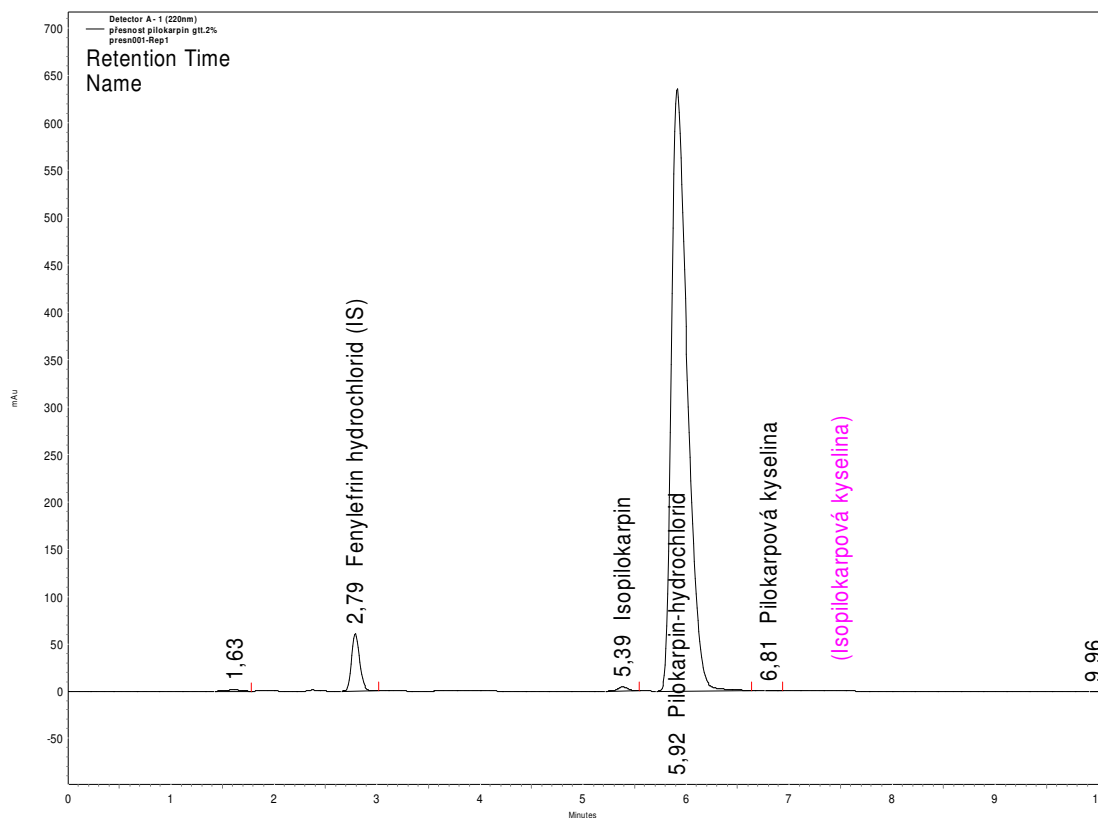
Obr. 12. Chromatogram placeba oční kapky 2% pilokarpin-hydrochloridu



Obr. 13. Chromatogram pracovního standardu pilokarpin-hydrochloridu s vnitřním standardem fenylefrin hydrochloridem



Obr. 14. Chromatogram přípravku oční kapky s 1% pilokarpin-hydrochloridu



Obr. 15. Chromatogram přípravku oční kapky s 2% pilokarpin-hydrochloridu

5.3.4.5. Robustnost

Testování míry vlivu proměnných experimentálních podmínek na stanovení obsahu analytu bylo testováno u roztoku pilokarpin-hydrochloridu o koncentraci $c = 25,30 \text{ mg}/100 \text{ ml}$.

Kvůli nedostatku času, byla z parametrů robustnosti testována pouze stabilita roztoku pracovního standardu pilokarpin-hydrochloridu s vnitřním standardem fenylefrin hydrochloridem

- Stabilita

Stabilita roztoku standardu o koncentraci $c = 25,30 \text{ mg}/100 \text{ ml}$ byla testována při uchovávání:

- za snížené teploty ($4 \text{ }^\circ\text{C}$), chráněn před světlem
- za laboratorní teploty a světla

Výsledky jsou uspořádány v tabulce 10.

Tab. 10 Stabilita roztoku pracovního standardu pilokarpin-hydrochloridu s vnitřním standardem v závislosti na době a způsobu uchování (S_T)

Pilokarpin-hydrochlorid				
t	A (4 °C)	S_T(%)	A (≈ 20 °C)	S_T (%)
0	6790176	0	6790176	0
24 h	6793474	0,05	6761748	0,42
48 h	6456489	4,91	6632159	2,33
72 h	6688344	1,50	6645122	2,14

n = 3

t = čas od přípravy roztoku vzorku

A = plocha píku;

$$S_T (\%) = 100 \cdot |A_i - A_0| / A_0$$

Z tabulky 10 vyplývá, že požadavek na S_T (%) < 1% pro roztok pilokarpin-hydrochloridu je splněn při uchování za snížené i laboratorní teploty pouze během 24 hodin od jeho přípravy. Roztok pilokarpin-hydrochloridu je možné používat při uchování za snížené teploty nebo laboratorní teploty pouze po dobu 24 hodin od jeho přípravy.

5.3.5. Závěr validační zprávy

Vypracovaná HPLC metoda slouží pro stanovení pilokarpin-hydrochloridu v očních kapkách. Na základě provedené částečné validace metody lze konstatovat, že metoda poskytuje přesné a správné výsledky a je vhodná pro stanovení uvedené látky v přípravku oční kapky s pilokarpin-hydrochloridem v obou koncentracích 1% a 2%.

5.4. Validační zpráva pro kyselinu pilokarpovou

5.4.1. Souhrn

Byla vypracována a částečně validována metoda vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC) pro stanovení obsahu nečistoty kyseliny pilokarpové v individuálně vyráběném léčivém přípravku oční kapky s pilokarpin-hydrochloridem

Složení přípravku je uvedeno v ČL 2009, str. 4334

5.4.2. Podmínky separace

- Kolona: Monolitická kolona Chromolith High Resolution RP 18 endcapped 100 x 4,6 mm, Merck, Německo
- Dávkování: 20 μ l
- Detekce: 220 nm
- Mobilní fáze: Pufr : methanol v poměru 98:2 (V/V)
- Průtok: $F_m = 1,0$ ml/min
- Vnitřní standard: Fenylefrin hydrochlorid
- Ředící směs: Mobilní fáze - pufr : methanol 98:2 (V/V)
- Izokratický režim
- Teplota: 25°C

5.4.3. Test způsobilosti chromatografického systému

5.4.3.1. Zdánlivý počet teoretických pater (N)

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

t_R = retenční čas (min)

$W_{0,05}$ = šířka píku v polovině výšky (min)

Tab. 11 Zdánlivý počet teoretických pater (N)

Analyzovaná látka	t_R (min)	N
Kyselina pilokarpová	6,21	12247

n = 3

5.4.3.2. Faktor symetrie (A_S)

$$A_S = W_{0,01} / 2f$$

$W_{0,01}$ = šířka píku ve vzdálenosti 5 % výšky píku;

f = menší část úsečky $W_{0,01}$, která vznikne protnutím úsečky kolmicí spuštěnou z vrcholu píku;

Tab. 12 Faktor symetrie (A_S)

Analyzovaná látka	A_S
Kyselina pilokarpová	1,00

$n = 3$

Požadavek: T 0,8 až 1,5

VYHOVUJE

5.4.3.3. Rozlišení

(Obr. 16)

$$R_{ij} = \frac{1,18(t_{R2} - t_{R1})}{w_{h1} + w_{h2}}, \text{ kdy } t_{R2} > t_{R1}$$

t_R = retenční čas (min)

w_h = šířka píku na základně (min)

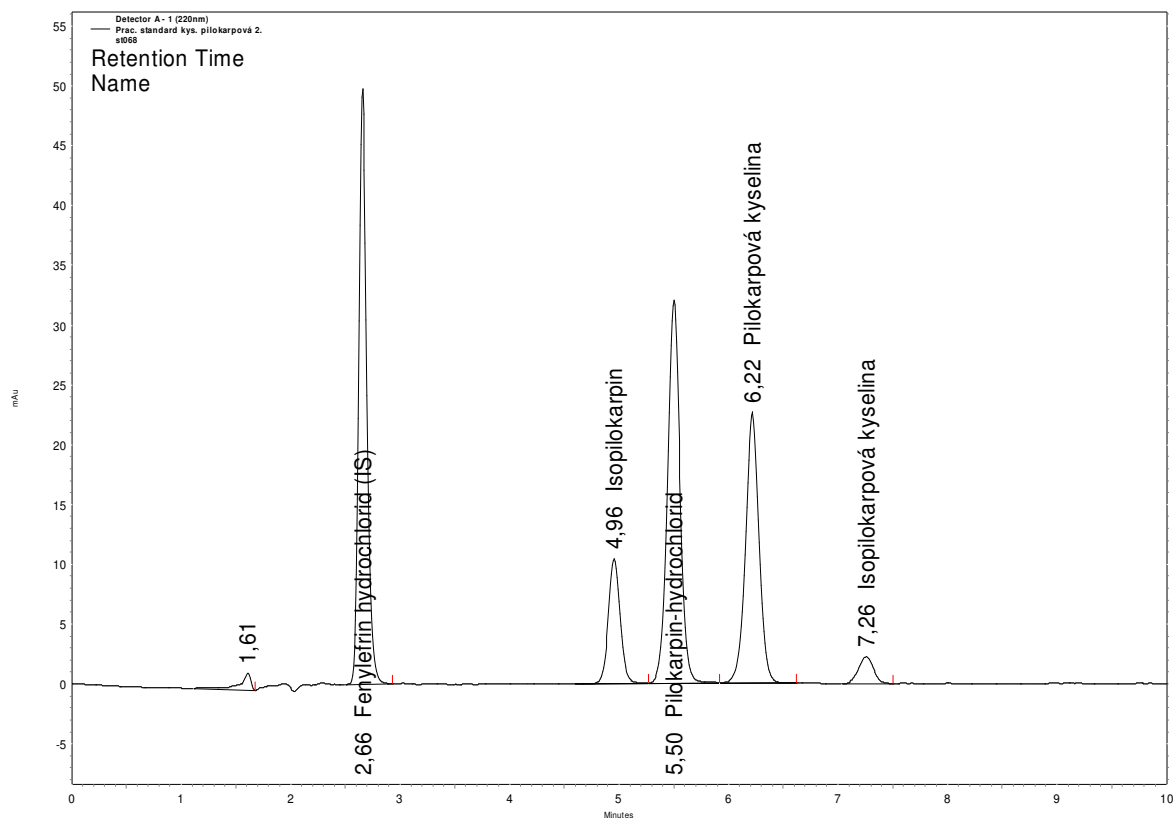
Tab. 13 Rozlišení

Hodnocené látky	R_{ij}
Pilokarpin-hydrochlorid – kyselina pilokarpová	3,34

$n = 3$

Požadavek: $R_{ij} > 1,5$

VYHOVUJE



Obr. 16. Chromatogram pracovního roztoku kyseliny pilokarpové s vnitřním standardem fenylefrin hydrochloridem

5.4.3.4. Opakovatelnost

Byl opakovaně dávkován roztok analyzovaných látek v mobilní fázi:

Porovnávací roztok kyseliny pilokarpové č. 2

Fenylefrin hydrochlorid (IS) 0,998 mg/ 100ml

dle postupu uvedeném v kap. 4.3.11.

Tab. 14 Opakovatelnost

Kyselina pilokarpová		
Číslo pokusu	Retenční čas (t_R) (min)	Plocha píku (A)
1	6,22	197 538
2	6,22	196 518
3	6,21	197 104
4	6,20	196 652
5	6,19	197 059
6	6,17	196 345

n	6	6
\bar{x}	6,20	196 869
SD	0,02	443,57
RSD (%)	0,31	0,23
Požadavek:	RSD < 1 %	VYHOVUJE

5.4.4. Validace analytické metody

Parametry přesnosti, linearity, správnosti, robustnosti a detekčních limitů (DL) a kvantitativních limitů (QL) nebylo možné pro nečistotu kyseliny pilokarpovou zpracovat, protože neexistuje standard kyseliny pilokarpové o přesně známé koncentraci. Porovnávací roztok kyseliny pilokarpové obsahuje kromě pilokarpinu a definovaných nečistot ještě zbytky reagensů a přesná koncentrace jednotlivých složek není známa.

5.4.4.1. Selektivita

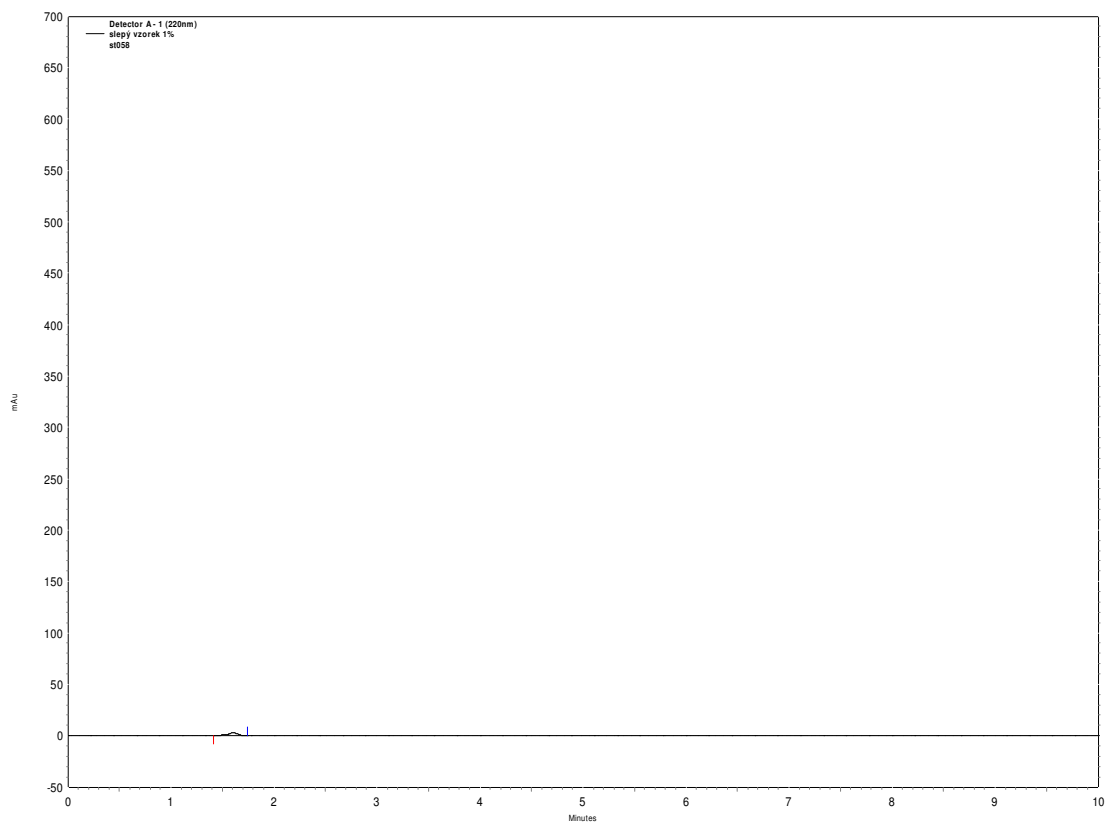
Chromatogram placebo, které bylo zpracováno podle postupu v kap. 4.3.1. a 4.3.2., je na obrázku 17 pro oční kapky obsahující 1% pilokarpin-hydrochloridu a na obrázku 18 pro oční kapky obsahující 2% pilokarpin-hydrochloridu. V retenčním čase odpovídajícímu kyselině pilokarpové není žádný pík interferující látky.

Chromatogram pracovního roztoku kyseliny pilokarpové s vnitřním standardem fenylefrin hydrochloridem je dokumentován na obrázku 19.

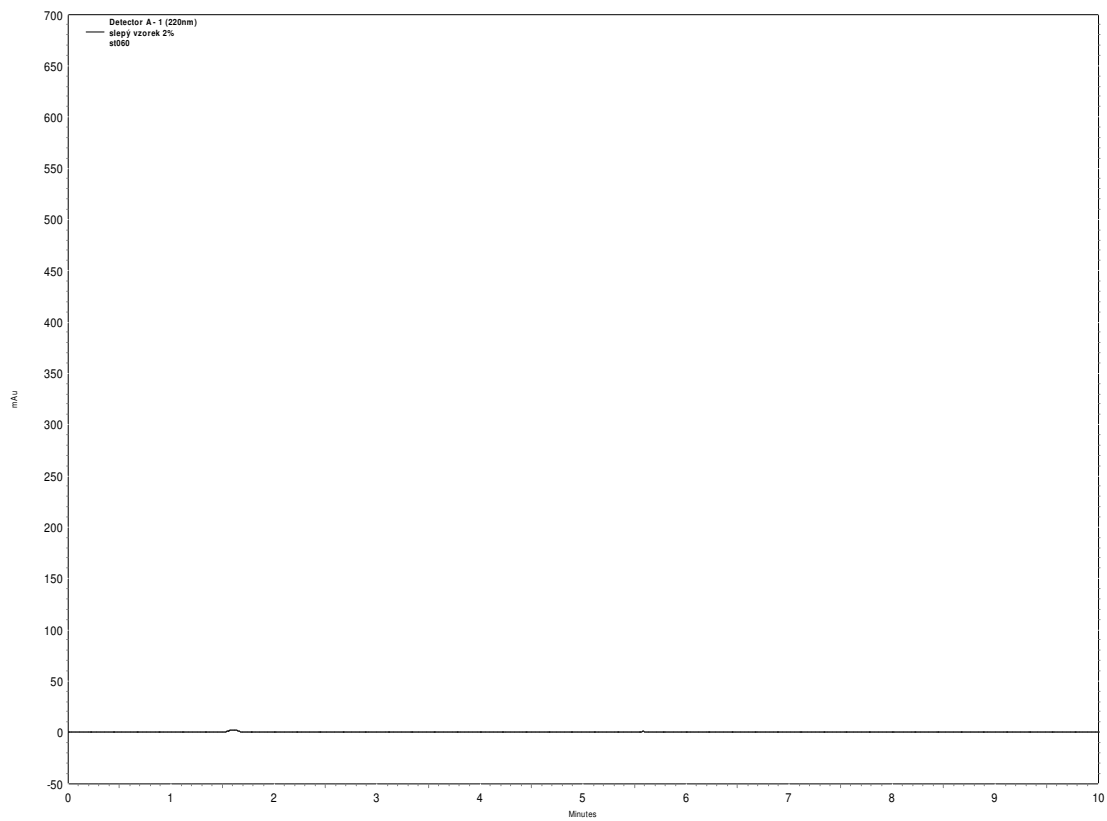
Na obrázku 20 – chromatogram přípravku oční kapky obsahující 1% pilokarpin-hydrochloridu, je znázorněna separace píku kyseliny pilokarpové od píku balastních látek očních kapek a píku vnitřního standardu fenylefrin hydrochloridu.

Na obrázku 21 – chromatogram přípravku oční kapky obsahující 2% pilokarpin-hydrochloridu, je znázorněna separace píku kyseliny pilokarpové od píku balastních látek očních kapek a píku vnitřního standardu fenylefrin hydrochloridu.

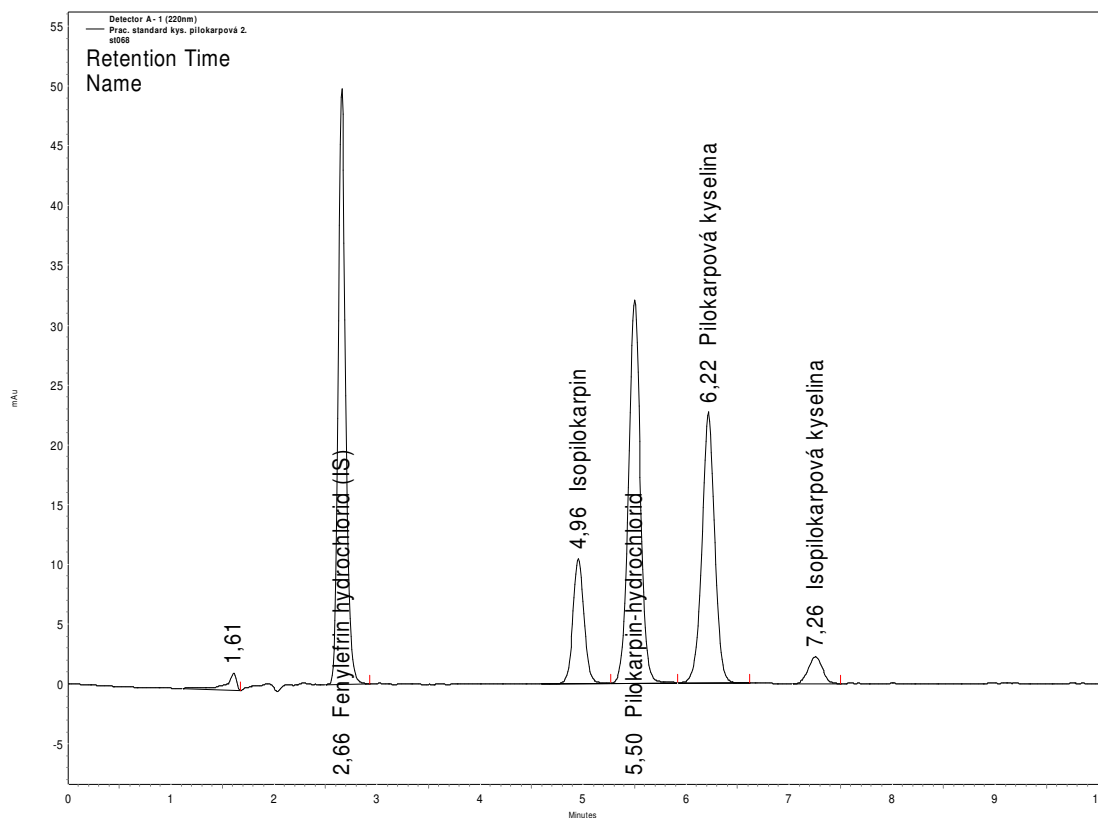
Předložená HPLC metoda umožňuje selektivně změřit plochu píku odpovídající kyselině pilokarpové



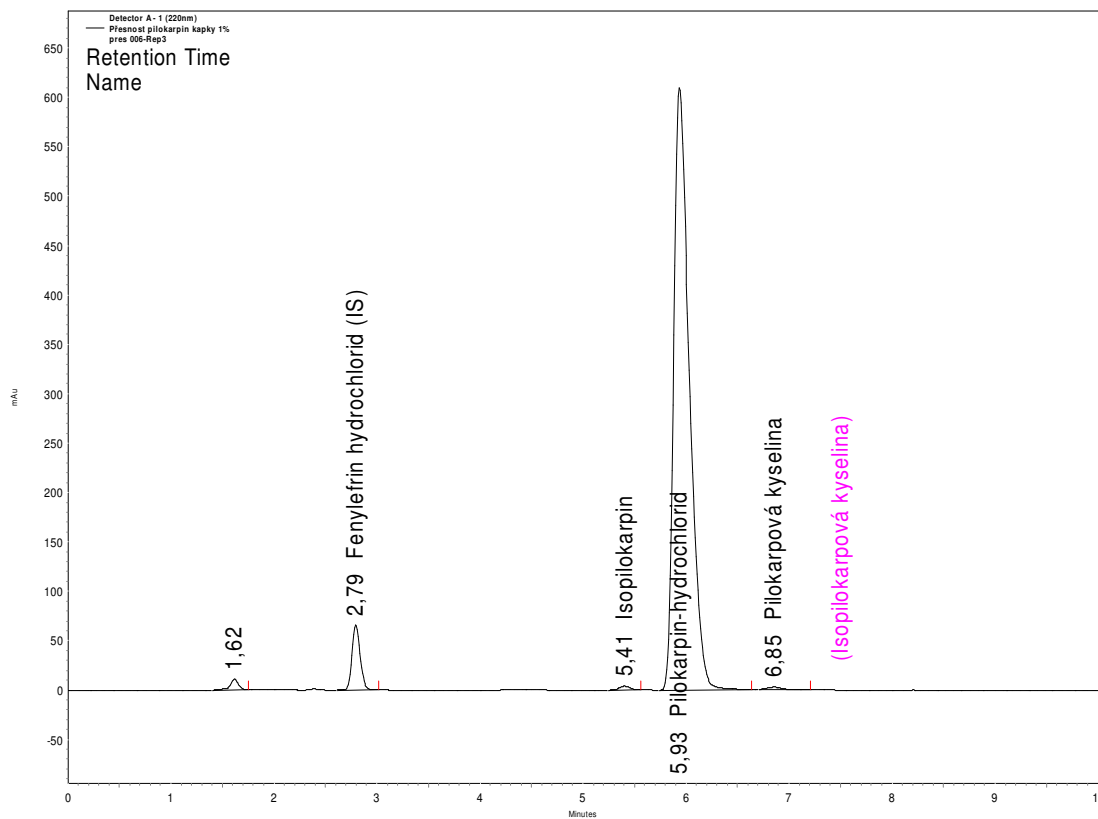
Obr. 17. Chromatogram placeba oční kapky 1% pilokarpin-hydrochloridu



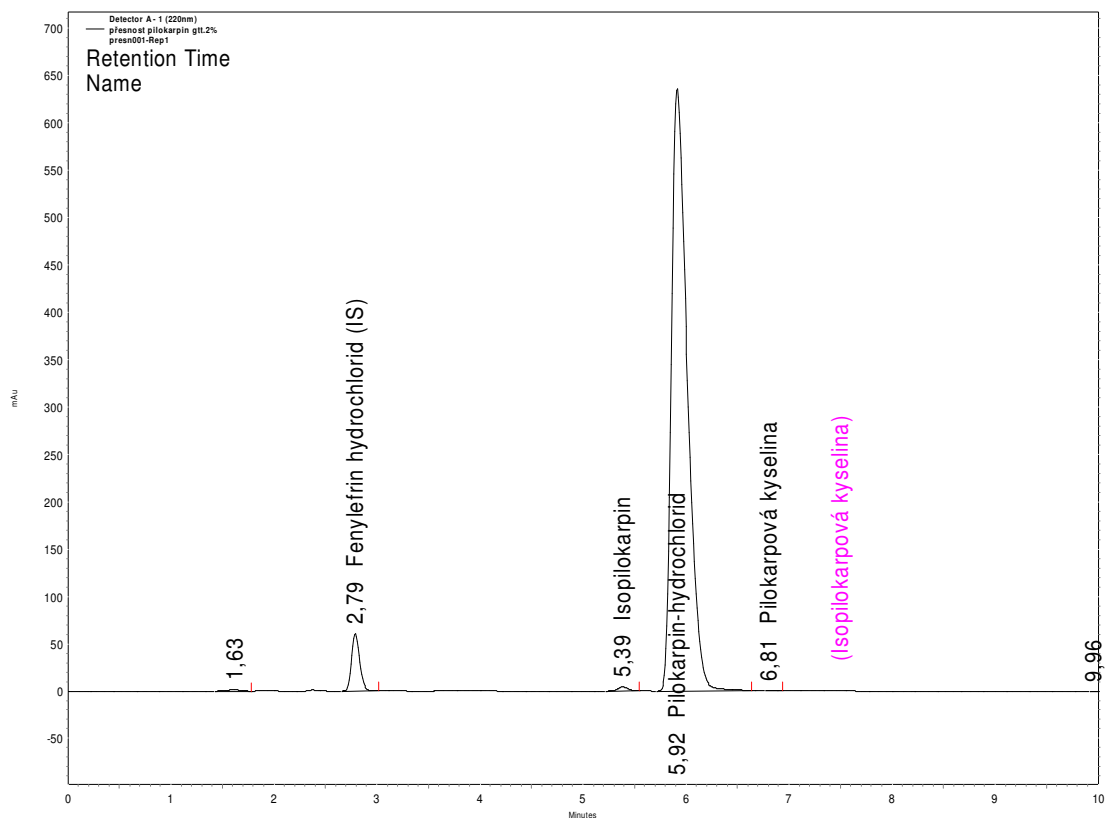
Obr. 18. Chromatogram placeba oční kapky 2% pilokarpin-hydrochloridu



Obr. 19. Chromatogram pracovního roztoku kyseliny pilokarpov s vnitřním standardem fenylefřin hydrochloridem



Obr. 20. Chromatogram připravku oční kapky s 1% pilokarpin-hydrochloridu



Obr. 21. Chromatogram přípravku oční kapky s 2% pilokarpin-hydrochloridu

5.4.5. Závěr validační zprávy

Metoda je vhodná pro sledování hladiny nečistoty kyseliny pilokarpové v přípravku oční kapky s pilokarpin-hydrochloridem v koncentraci 1% a 2%.

6. ZÁVĚR

Cílem této rigorózní práce bylo vyvinout a validovat HPLC metodu vhodnou pro stanovení pilokarpin-hydrochloridu a kyseliny pilokarpové v lékopisných očních kapkách obsahujících 1 nebo 2% pilokarpin-hydrochloridu.

Bylo vyvinuto a v odborné literatuře popsáno několik způsobů HPLC stanovení pilokarpin-hydrochloridu a kyseliny pilokarpové v očních kapkách. Tato práce vychází z publikace autorů: El-Deeb S, Schepers U a Wätzig H.: *Evaluation of monolithic C18 HPLC columns for the fast analysis of pilocarpine hydrochloride in the presence of its degradation products* publikované v roce 2006 v časopisu Pharmazie [17].

Metoda je založena na použití monolitické kolony Chromolith High Resolution RP 18 endcapped 100 x 4,6 mm, Merck, Německo, způsob provedení chromatografie obráceného systému fází.

Mobilní fáze je složena z pufru o pH 3 a methanolu v poměru 98:2 (V/V), rychlost průtoku 1 ml/min. Výsledky byly vyhodnoceny použitím UV-VIS detektoru při vlnové délce 220 nm. Kvantitativní stanovení bylo provedeno metodou vnitřního standardu - fenylefrin hydrochloridu.

Sloučeniny byly eluovány v pořadí: isopilokarpin, pilokarpin, kyselina pilokarpová a kyselina isopilokarpová. Celková doba trvání analýzy byla méně než 10 minut.

Při validaci metody pro pilokarpin-hydrochlorid byly ověřovány následující parametry: způsobilost systému, přesnost, správnost, linearita, selektivita a stabilita roztoku pilokarpin-hydrochloridu za snížené teploty a nepřístupu světla a při laboratorní teplotě a na světle po dobu 72 hodin. Metoda prokázala, že je vhodná pro zamýšlené použití, je selektivní a poskytuje přesné a správné výsledky. Roztok pilokarpin-hydrochloridu je stabilní po dobu 24 hodin. Metoda je lineární ve stanoveném rozsahu 12,5 – 75,0 mg/100 ml pilokarpin-hydrochloridu.

Pro kyselinu pilokarpovou byl proveden test způsobilosti systému a selektivita. I zde metoda prokázala, že je vhodná a selektivní pro zamýšlené použití.

7. POUŽITÁ LITERATURA

- [1] Douša M. *HPLC.cz* [online]. c1999, last modified 24. ledna 2011 [cit. 2012-10-12]. Dostupné z URL:<<http://www.hplc.cz> >
- [2] Manz A, Pamme N, Iossifidis D. *Bioanalytical chemistry*. London: Imperial College Press, c2004. xv, 201 s. ISBN: 1-86094-370-5; ISBN: 1-86094-371-3 (pbk)
- [3] Sagar G. *Instrumental methods of drug analysis*. Hyderabad [India]: PharmaMed Press, 2009. 546 s. ISBN: 81-88449-76-8
- [4] Karlíček R, Polášek M, Pospíšilová M, Solich P. *Analytická chemie pro farmaceuty*. Univerzita Karlova v Praze: Nakladatelství Karolinu, 2001. 282 s. ISBN 80-246-0348-9
- [5] *Český lékopis 2009*. První vydání. Praha: Grada Publishing, a.s., 2009. 3968 s. ISBN: 978-80-247-2994-7
- [6] *3.lékařská fakulta Univerzity Karlovy* [online]. last modified 1. října 2010 [cit. 2012-10-12]. Dostupné z URL:< http://old.lf3.cuni.cz/chemie/cesky/praktika/uloha_B2.htm >
- [7] ICH Harmonised Tripartite Guideline; *Validation Of Analytical Procedures: Text and methodology Q2 (R1)*; Current Step 4 version, Geneva, Switzerland. 11/ 2005
- [8] Morrison JC, Pollack IP. *Glaucoma: science and practice*. New York: Thieme Medical Publishers, 2003, xiii, 530 s. ISBN: 0-86577-915-5 (TMP: alk. paper) – ISBN: 3131246715 (GTV: alk. paper)
- [9] O'Donnell JJ, Sandman R, Drake MV. *Measurement of pilocarpine and its degradation products by high-performance liquid chromatography*. J PHARM SCI-US. 1980 Sep, vol. 69, no. 9, s. 1096-7
- [10] Cassel GH, Billig MD, Randall HG. *The Eye book: a complete guide to eye disorders and health*. Large Print ed. Baltimore, Md: Johns Hopkins University Press, 2000c1998, xx, 593 s. ISBN: 0-8018-7494-7 (eBook)
- [11] Weber JD. *Pilocarpine hydrochloride in ophthalmic solutions: modification of a high-pressure liquid chromatographic determination and survey*. J ASSOC OFF ANAL CHEM. 1976 Nov, vol. 59, no. 6, s. 1409-15
- [12] Dunn DL, Scott BS, Dorsey ED. *Analysis of pilocarpine and isopilocarpine in ophthalmic solutions by normal-phase high-performance liquid chromatography*. J PHARM SCI-US. 1981 Apr, vol. 70, no. 4, s. 446-9
- [13] Kennedy JM, McNamara PE., *High-performance liquid chromatographic analysis of pilocarpine hydrochloride, isopilocarpine, pilocarpic acid and isopilocarpic acid in eye-drop preparations*. J CHROMATOGR. 1981 Aug 7, vol. 212, no. 3, s. 331-8
- [14] Gomez-Gomar A, Gonzalez-Aubert M, Costa-Segarra J. *HPLC method for the simultaneous determination of pilocarpine, isopilocarpine, pilocarpic acid and isopilocarpic acid*. J PHARMACEUT BIOMED Biomed. 1989, vol. 7, no. 12, s. 1729-34
- [15] Fan TY, Wall GM, Sternitzke K, Bass L, Morton AB, Muegge E. *Improved high-performance liquid chromatographic determination of pilocarpine and its degradation products in ophthalmic solutions importance of octadecylsilane column choice*. J CHROMATOGR A. 1996 Aug 2, vol. 740, no. 2, s. 289–295

- [16] Sternitzke KD, Fan TY, Dunn DL. *High-performance liquid chromatographic determination of pilocarpine hydrochloride and its degradation products using a beta-cyclodextrin column.* J CHROMATOGR. 1992 Jan 10, vol. 589, no. 1-2, s. 159-64
- [17] El-Deeb S, Schepers U, Wätzig H. *Evaluation of monolithic C18 HPLC columns for the fast analysis of pilocarpine hydrochloride in the presence of its degradation products.* PHARMAZIE. 2006 Sep, vol. 61, no. 9, s. 751-6.