

Univerzita Karlova v Praze

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra analytické chemie

Diplomová práce

Využití instrumentálních metod v analýze léčivých přípravků

Vedoucí diplomové práce: PharmDr. Ludmila Matysová, Ph.D.

Hradec Králové 2014

Eliška Benešová

Děkuji vedoucí mé diplomové práce paní PharmDr. Ludmile Matysové, Ph.D. a školiteli panu PharmDr. Radkovi Sladkovskému, Ph.D. za odbornou pomoc a podnětné připomínky při vypracování mé diplomové práce.

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.

Abstrakt

Univerzita Karlova v Praze

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra analytické chemie

Kandidát: Eliška Benešová

Konzultant: PharmDr. Ludmila Matysová, Ph.D.

Název diplomové práce: Využití instrumentálních metod v analýze léčivých přípravků

Předkládaná práce popisuje vývoj a validaci nové HPLC metody pro stanovení chloridu vápenatého dihydrátu v injekčním roztoku. Tato metoda je založena na kombinaci iontové výměnné chromatografie a nepřímé spektrofotometrické detekce. Metoda využívá iontově výměnnou chromatografickou kolonu Supelcosil LC-SCX (250 x 4,6 mm; 5 μ m) a isokratické eluce mobilní fází 10mM kyseliny dusičné (HNO₃) upravené ethylendiaminem (EDA) na pH 3.0 s přidavkem UV aktivní látky - proby (síranu mědnatého pentahydrátu), průtoková rychlost mobilní fáze byla 1,0 ml/min. V rámci optimalizace chromatografické metody byly zkoumány jednotlivé dopady na kvalitu separace (pH mobilní fáze, koncentrace kompetenčního iontu, přidavek a koncentrace organického modifikátoru, koncentrace UV aktivní látky – proby).

Klíčová slova: chlorid vápenatý dihydrát, vysokoúčinná kapalinová chromatografie, iontově výměnná chromatografie, nepřímá UV spektrofotometrická detekce

Abstract

Charles University in Prague

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Analytical Chemistry

Candidate: Eliška Benešová

Consultant: PharmDr. Ludmila Matysová, Ph.D.

Diploma Thesis Title: Application of the Instrumental Methods in Analysis of the Pharmaceutical Preparations

The development and validation of a new high performance liquid chromatography method for the determination of calcium chloride dihydrate in the injection solution are described. This method is based on the combination of ion exchange chromatography and indirect spectrophotometric detection. Ion chromatography was performed in a cation-exchange Supelcosil LC-SCX analytical column (250 mm x 4,6 mm; 5 μ m) under isocratic conditions with 10 mM nitric acid (HNO_3)/ethylenediamine (EDA) pH 3,0 with addition of the probe cupric sulfate pentahydrate as mobile phase at flow-rate 1.0 mL/min. The effects of pH mobile phase, concentration of the competing ion, organic modifiers, and concentration of probe were studied.

Keywords: calcium chloride dihydrate, high performance liquid chromatography, ion exchange chromatography, indirect spectrophotometric detection

OBSAH

SEZNAM ZKRATEK.....	9
1. ÚVOD.....	10
2. CÍL A ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE.....	11
3. TEORETICKÁ ČÁST.....	12
3.1. Chlorid vápenatý.....	12
3.1.1. Chemické a fyzikální vlastnosti	12
3.1.2. Použití.....	13
3.1.3. Biologické vlastnosti	14
3.1.4. Problematika chloridu vápenatého dihydrátu dle lékopisných monografií	14
3.2. Chromatografické metody.....	15
3.2.1. Princip chromatografie.....	15
3.2.2. Rozdělení chromatografických metod	15
3.2.3. Vysokoučinná kapalinová chromatografie	16
3.2.3.1. Instrumentace HPLC	16
3.2.4. Iontová chromatografie.....	18
3.2.4.1. Iontově výměnná chromatografie	20
3.2.4.2. Iontově párová chromatografie	20
3.2.4.1. Koordinačně iontová chromatografie	21
3.2.4.2. Zwitterion iontová chromatografie.....	21
3.2.4.3. Chromatofokusace.....	22
3.3. Využití iontové chromatografie v separaci kovových iontů.....	22
3.3.1. Kationtově výměnná chromatografie	23
3.3.2. Koordinačně iontová chromatografie.....	24
3.3.2.1. Slabá komplexační činidla	24
3.3.2.2. Silná komplexační činidla	24
3.3.3. Aniontově výměnná chromatografie	25
3.3.4. Iontově párová chromatografie.....	25
3.4. Validace analytické metody	25
3.4.1. Přesnost.....	26
3.4.2. Správnost.....	27
3.4.3. Linearita	28
3.4.4. Rozsah.....	28
3.4.5. Detekční limit.....	29
3.4.6. Kvantitativní limit.....	29
3.4.7. Selektivita	29

3.4.8.	Robustnost	29
3.4.9.	Test způsobilosti	30
4.	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	31
4.1.	Chemikálie, standardy, vzorky	31
4.1.1.	Chemikálie	31
4.1.2.	Standard	31
4.1.3.	Vzorek.....	31
4.2.	Přístroje, podmínky separace	31
4.2.1.	Přístroje a pomůcky	31
4.2.2.	Podmínky separace	32
4.3.	Příprava vzorku	32
4.4.	Příprava roztoků pro optimalizaci metody	32
4.5.	Příprava mobilní fáze	33
4.6.	Příprava roztoků pro validaci	33
4.6.1.	Příprava roztoku pro měření opakovatelnosti.....	34
4.6.2.	Příprava roztoku pro měření přesnosti	34
4.6.3.	Příprava roztoků pro měření linearitu	34
5.	VÝSLEDKY A DISKUZE	35
5.1.	Optimalizace chromatografických podmínek	35
5.1.1.	Výběr vhodné proby	35
5.1.2.	Optimalizace pH mobilní fáze.....	36
5.1.3.	Optimalizace složení mobilní fáze	38
5.1.4.	Optimální chromatografické podmínky pro separaci vápenatých iontů	39
5.2.	Validace metody.....	40
5.2.1.	Test vhodnosti chromatografického systému	40
5.2.1.1.	Účinnost chromatografického systému – počet teoretických pater (N)	40
5.2.1.2.	Asymetrie chromatografických píků (T)	40
5.2.2.	Opakovatelnost.....	42
5.2.3.	Přesnost.....	43
5.2.4.	Linearita	44
5.2.5.	Správnost.....	45
5.2.6.	Selektivita	46
5.2.7.	Robustnost	46
5.2.7.1.	Vliv pH.....	46
5.2.7.2.	Vliv složení mobilní fáze	47
5.2.8.	Stabilita	50

6. ZÁVĚR	51
7. Citovaná literatura	53
8. PŘÍLOHY	55
8.1. Tabulky	55

SEZNAM ZKRATEK

ACN	acetonitril
DPA	pyridin-2,6-dikarboxylová kyselina
EDA	ethylendiamin
EIC	elektrostatická iontová chromatografie
HPLC	vysokoučinná kapalinová chromatografie
CHAPS	3-[(cholaminopropyl)dimethylamino]-1-propansulfonát
IDA	iminodioctová kyselina
MeOH	metanol
NTA	nitrilotrioctová kyselina
PAR	4-(2-pyridylazo)-resorcinol
UV	ultrafialový

1. ÚVOD

Mezi dnes nejčastěji užívané separační techniky kromě elektromigračních a patří především chromatografické, jež bezesporu zaujímají první místo. A podobně jako objev antibiotik přesněji penicilínu a jeho využití v praxi trval dvě dekády, ne jinak dokonce mnohem déle tomu je i s chromatografickými metodami, jejichž počátek se datuje k roku 1903 připisováno botanikovi *M. S. Cvetovi*.

A takto můžeme dále pokračovat neboť vývoj a použití kapalinové chromatografie i přes svůj dřívější start se brzo opozdil a plynová chromatografie se dostala do popředí. Takže na svojí renesanci kapalinová chromatografie čekala až do 50 a 60 let minulého století, z důvodu mnohem vyšších nároků na používanou instrumentaci. Tento problém našel řešení ve zmenšování částic stacionární fáze a použití bezpulzních vysokotlakých čerpadel a v neposlední řadě i s rozvojem selektivních a vysoce citlivých detektorů.

Naštěstí objev ionexové chromatografie spadá až do 70 let 20. století a tudíž doby, kdy rozkvět vědeckých poznatků ve spolupráci s analytickým průmyslem nabral postupně raketový růst až do dnešních dnů.

Přestože iontová chromatografie nebyla původně určena pro separaci a stanovení kovových iontů, našla své uplatnění i v této oblasti v kombinaci s vodivostní detekcí a později i s UV spektrofotometrickou nebo fluorimetrickou předkolonovou derivatizací případně postkolonovou derivatizací.

2. CÍL A ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

Vzhledem k požadavku vzešlého z lékařenské oblasti – nemocniční lékárny v Ústí nad Labem, Oddělení přípravy sterilních léčiv – bylo cílem této diplomové práce vývoj, optimalizace a validace HPLC metody pro stanovení chloridu vápenatého dihydrátu v injekčním roztoku pro následné stabilitní zkoušky.

3. TEORETICKÁ ČÁST

3.1. Chlorid vápenatý

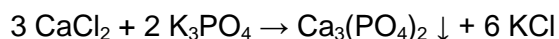
Chlorid vápenatý (CaCl_2) je bílý krystalický prášek. Rozpustný ve vodě, metanolu, etanolu a acetonu. Je hygroskopický. Vyskytuje se ve formě vzácných minerálů. Dá se připravit reakcí uhličitanu vápenatého a kyseliny chlorovodíkové:



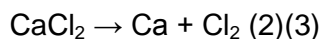
3.1.1. Chemické a fyzikální vlastnosti

Chlorid vápenatý je velmi dobře rozpustný ve vodě. Rozpouštění dihydrátu je doprovázeno velkým nárůstem tepla. Naopak rozpouštění hexahydrátu teplo spotřebovává a voda se ochlazuje. Z důvodu jeho značné hygroskopické vlastnosti musí být bezvodý uchováván v dobře uzavřených a vzduchotěsných obalech. Na vzduchu přechází nejdříve na dihydrát, později na tetrahydrát a hexahydrát. Fyzikální a fyzikálně chemické vlastnosti chloridu vápenatého a jeho hydratovaných forem jsou uvedeny v Tabulce 1.

Chlorid vápenatý může sloužit jako zdroj vápenatých iontů. Tato vlastnost slouží pro vysrážení iontů z roztoku. Například, vysrážení fosfátových iontů z roztoku fosforečnanu draselného:



Elektrolýzou taveniny chloridu vápenatého se může připravit kovový vápník a plynný chlór:



Tabulka 1. Chlorid vápenatý

Chlorid vápenatý	
molekulární vzorec	CaCl ₂
molekulární hmotnost	110,980 g/mol (bezvodý)
	128,999 g/mol (monohydrát)
	147,014 g/mol (dihydrát)
	183,045 g/mol (tetrahydrát)
	219,080 g/mol (hexahydrát)
vzhled	bílý krystalický prášek
hustota	2,15 g/cm ³ (bezvodý)
	1,835 g/cm ³ (dihydrát)
	1,830 g/cm ³ (tetrahydrát)
	1,710 g/cm ³ (hexahydrát)
teplota tání	772 °C (bezvodý)
	260°C (monohydrát)
	176°C (dihydrát)
	45,5°C (tetrahydrát)
	30°C (hexahydrát)
teplota varu	1935°C (bezvodý)
rozpustnost ve vodě	74,5 g/100ml (20°C)
	59,5 g/100ml (0°C)
rozpustnost	rozpustný v acetonu, kyselině octové
pK_a	8 - 9 (bezvodý)
	6,5 – 8,0 (hexahydrát)

3.1.2. Použití

Chlorid vápenatý se díky své hygroskopické vlastnosti používá jako sušící látka. Díky uvolňujícímu teplu při rozpouštění k odstranění ledu a proti zamrznání kapalin až do -52°C. Přidává se do mořských akvárií jako zdroj biologicky dostupného vápníku pro skořápky měkkýšů, jeho výhodou je i minimální ovlivnění pH. V potravinářství se používá jako zpevňující činidlo. Běžně se užívá jako elektrolyt do iontových nápojů. Díky své extrémně slané chuti se používá k dochucení potravin a zároveň nezvyšuje obsah sodíku. V pivovarnictví se přidává do vody k nápravě nedostatku minerálů,

ovlivňuje chuť a chemické reakce v procesu vaření piva a může ovlivnit kvasnice v procesu fermentace. Chlorid vápenatý se někdy přidává do mléka k udržení rovnováhy mezi vápníkem a bílkovinami pro výrobu sýrů. 20% chlorid vápenatý dihydrát se používá na sterilizaci zvířat, hlavně samců. (3)

3.1.3. Biologické vlastnosti

Zvyšuje hladinu vápníků v organismu a usnadňuje práci myokardu při vysokém množství draslíku. Používá se při resuscitaci po zástavě srdce. Používá se pro léčbu intoxikace hořčíkem. Vodný roztok chloridu vápenatého zvyšuje propustnost buněčné membrány, proto se používá v genetické transformaci k snadnějšímu průniku DNA membránou.

Hlavními lékovými formami chloridu vápenatého jsou injekce a infuze. (3) (4)

3.1.4. Problematika chloridu vápenatého dihydrátu dle lékopisných monografií

Chlorid vápenatý dihydrát se v českém lékopise objevuje až od roku 1997, v předešlých lékopisech je pouze chlorid vápenatý hexahydrát.

Lékopisy, jak české, tak zahraniční, definují chlorid vápenatý jako bílý až téměř bílý krystalický prášek, hygroskopický. Snadno rozpustný ve vodě a dobře rozpustný v etanolu 96% a stanovují jeho obsah na 97,0 až 103,0%.

Rovněž se shodují i v ostatních charakteristikách jako jsou zkoušky totožnosti, zkoušky na čistotu, stanovení obsahu, označování a skladování.

Zkoušky totožnosti chloridu vápenatého dihydrátu se provádí zkouškami na chloridy a na vápník. Mezi zkoušky totožnosti se také řadí rozmezí obsahu.

Zkoušky na čistotu se převážně testují na roztoku připraveném rozpuštěním 10,0g chloridu vápenatého dihydrátu ve vodě prosté oxidu uhličitého a doplněné do 100ml. Testuje se vzhled tohoto roztoku, dále přítomnost nečistot, a to kysele nebo zásaditě reagující látek, síranů, hliníku, barya, železa, hořčíku a alkalických kovů a těžkých kovů.

Stanovení obsahu se provádí chelatometrickou titrací vápníku.

Chlorid vápenatý dihydrát se skladuje ve vzduchotěsných obalech, a pokud je to vhodné uvede se na obalu, že látka je vhodná k výrobě dialyzačních roztoků. (2) (5) (6) (7) (8) (9) (10)

3.2. Chromatografické metody

3.2.1. Princip chromatografie

Mezi chromatografické metody můžeme zahrnout všechny separační systémy, u kterých dochází k postupnému, mnohokrát opakovanému vytváření dynamických rovnovážných stavů analyzovaných látek mezi dvěma i více fázemi. Z nichž jedna je umístěna v koloně a nazývá se stacionární fází (sorbentem) a druhá, která přivádí analyty k sorbentu fází mobilní. Díky rozdílným probíhajícím interakcím s mobilní a stacionární fází dochází k separaci. (11) (12) (13)

3.2.2. Rozdělení chromatografických metod

Chromatografické metody můžeme dělit dle různých hledisek:

- **Podle skupenství mobilní fáze**
 - Kapalinová chromatografie, kdy mobilní fází je kapalina.
 - Plynová chromatografie, kde mobilní fází tvoří plyn.
 - Fluidní chromatografie, mobilní fází je látka v nadkritickém stavu
 - Plazmová chromatografie, mobilní fází tvoří proud iontů

- **Podle uspořádání stacionární fáze**
 - Kolonová chromatografie, stacionární fáze je umístěna v trubici (koloně)
 - Papírová chromatografie, stacionární fází je papír nebo upravená celulóza.
 - Tenkovrstvá chromatografie, stacionární fáze je umístěna na pevném podkladě, jako je skleněná deska nebo hliníková fólie a tvoří ji suspenze.

- **Podle děje, který při separaci převládá**
 - Adsorpční chromatografie, stacionární fáze je adsorbent.
 - Iontová chromatografie, stacionární fází tvoří ionex
 - Gelová chromatografie, stacionární fází tvoří neionizovaný přírodní nebo syntetický gel, nazývá se také gelová filtrační chromatografie.
 - Afinitní chromatografie, stacionární fází tvoří zakotvené ligandy, na které se zkoušená látka váže
 - Rozdělovací chromatografie, separace na základě různé rozpustnosti složek v stacionární a mobilní fází.

U dělení chromatografických metod dle jejich převažujícího fyzikálně chemického principu je možné zmíněné jednotlivé chromatografie dále dělit viz v této diplomové práci dělení iontové chromatografie. (11) (14)

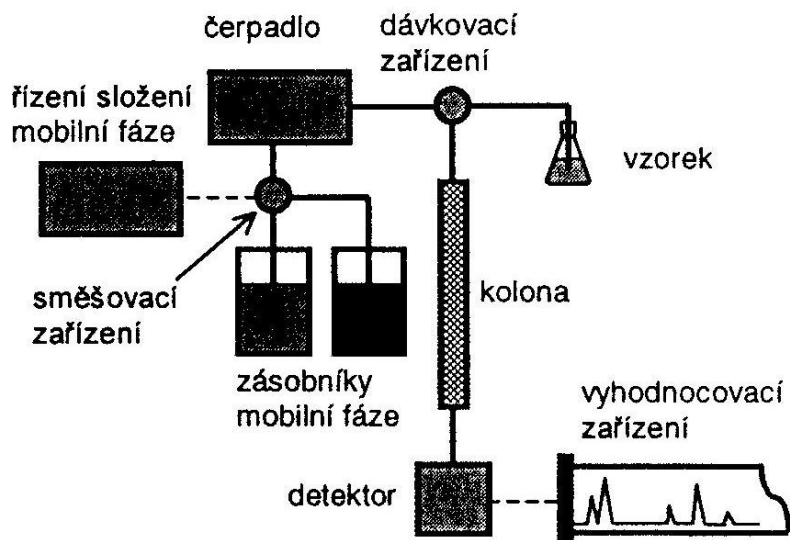
3.2.3. Vysokoúčinná kapalinová chromatografie

Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC) je v dnešní době jedna z nejpoužívanějších separačních metod a její význam neustále roste. Využívá se k analýze prakticky všech anorganických i organických látek v rozpětí relativních molekulových hmotností od stovek do několika set ve farmaceutickém, chemickém i potravinářském průmyslu. (12) (15) (16)

3.2.3.1. Instrumentace HPLC

HPLC sestava se skládá z části zabezpečující transport mobilní fáze (zásobníky mobilních fáze, směšovacího zařízení, odplyňovacího zařízení, vysokotlaká čerpadla), dávkování vzorku, separaci (chromatografická kolona), detekci a vyhodnocovacího zařízení. (11)

Obrázek 1., Schéma kapalinového chromatografu (11)



Čerpadlo

Hlavním úkolem čerpadla neboli pumpy v HPLC je zajistit konstantní průtok mobilní fáze chromatografickou kolonou. Tyto hydraulická čerpadla pracují s řadou solenoidních ventilů a dosahují průtoku od mikrolitrů do několika desítek mililitrů. (11) (17)

Směšovací zařízení

Nejčastěji dnes užívané vysokotlaké směšovače pracují na jednoduchém principu přívodu složek mobilní fáze vysokotlakými pumpami do směšovací komůrky malého vnitřního objemu, odkud je již vedena mobilní fáze v jednom proudu na kolonu. (11)

Dávkovací zařízení

Dávkovací zařízení slouží k nástřiku analyzované látky do chromatografického systému. Nejdříve používané dávkování manuálně injekční stříkačkou pomocí šesticestného dávkovacího kohoutu nahradily automatické dávkovače (autosamplery), kde ze zásobníku vzorků s umístěnými mikronádobky (vialkami) uzavřenými pryžovým septem nebo perforovanou zátkou z polypropylenu jsou automaticky odebírány žádané vzorky injekční stříkačkou. (11) (17)

Chromatografická kolona

Kolona je jednou z nejdůležitějších částí a klíčovým faktorem při určování výkonu a řešení celého procesu separace. Při výběru chromatografické kolony je v první řadě třeba vycházet z charakteru vzorku a z rozdílů ve struktuře jeho složek, viz například Tabulka 2. (11) (17)

Tabulka 2. Stacionární fáze v HPLC a jejich typické použití

Stacionární fáze	Typ chromatografie	Mobilní fáze	Použití
silikagel	normální systém fází	hexan, alkoholy	pesticidy, přírodní produkty
C18	reverzní chromatografie	voda, metanol, acetonitril, pufrý o pH 2-8	peptidy a aminokyseliny
C8	reverzní chromatografie	voda, metanol, acetonitril, pufrý o pH 2-8	léčivé látky
kyanopropyl	normální i reverzní chromatografie	normální fáze (hexan, ether) reverzní fáze (voda, alkoholy)	potraviny, mastné kyseliny
aminopropyl	normální i reverzní chromatografie	normální fáze (hexan, ether) reverzní fáze (voda, alkoholy)	povrchově aktivní látky
fenylglycerolové enantiomery	iontová chromatografie	hexan, modifikátory	pesticidy, herbicity

Detektor

Existuje několik typů detektorů, v dnešní době jsou většinou všechny koncentrační a dělí se na dva typy: selektivní, kde je signál přímo úměrný koncentraci analyzované látky, nebo univerzální, kde je signál závislý na vlastnosti celkového systému (mobilní fáze i zkoušená látka).

Příklady detektorů a jejich vlastnosti jsou znázorněny v Tabulce 3. (18) (19) (20)

Tabulka 3. Vlastnosti detektorů v HPLC

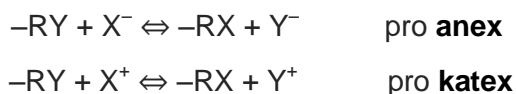
Detektor	Odezva	Měřená veličina
refraktometrický	univerzální	index lomu
spektrofotometrický	selektivní	absorbance
fluorimetrický	selektivní	intenzita fluorescence
elektrochemický	selektivní	elektrický proud
vodivostní	selektivní	vodivost
chemiluminiscenční	selektivní	emitované záření
ELSD (evaporative light scattering detector)	selektivní	rozptyl světla
CORONA (charged aerosol detector)	selektivní	elektrický proud
hmotnostní	univerzální	poměr hmotnosti a náboje iontu

3.2.4. Iontová chromatografie

Za první dohledatelné informace o použití iontových měničů je možné považovat stanovení amoniaku v moči v roce 1917 dvojicí *Folin a Bell*. Avšak za skutečný počátek iontové chromatografie v širším měřítku se datuje od vydání vědeckého článku *Hamishe Smalla a kol.* v roce 1975, kteří chromatografií na měničích iontů ve spojení s vodivostní detekcí vyvinuli analytickou metodu pro rychlé a citlivé stanovení směsi kovových iontů. Tito autoři v následující dekádě popsali jak blíže teoretické základy iontové chromatografie tak ve spolupráci s analytickým průmyslem zavedli celou řadu standardně používaných metodik pro stanovení iontů těžkých kovů.

Princip iontové chromatografie je založen na silných elektrostatických (coulombických) silách mezi ionizovanými funkčními skupinami měniče a ionty v roztoku mobilní fáze. Přítomné ionty opačného náboje nebo molekuly se silným dipolovým momentem v mobilní fázi jsou výše zmíněnými silami přitahovány a zadržovány na povrchu stacionární fáze a vytěsňují ekvivalentní množství kompetičních iontů. Stacionární fáze dle náboje dělíme na anxy nesoucí na povrchu

kladný náboj a katexy se skupinami nabitými záporně. Obecně je možné tento proces popsat následující dvojicí rovnic:



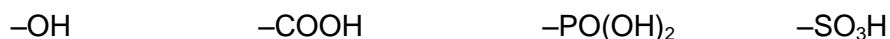
kde Y^- a Y^+ jsou vyměnitelné ionty, které jsou vázány na funkční skupiny ionexu.

Tyto anexy a katexy jako chemicky vázané funkční skupiny seřazené dle vzrůstající síly jsou:

primární aminy < sekundární aminy < terciární aminy < kvartérní amoniové báze



fenolická skupina < karboxylová skupina < fosfátová skupina < sulfátová skupina



Vlastní stacionární fáze ionexu je tvořena organickým nebo anorganickým základem a chemicky vázanou funkční skupinou. V případě anorganického základu se nejčastěji jedná o např. zeolity, fosforečnany, molybdenany, fosfomolybdenany, aj. V praxi se však více setkáme s organickými základy a to především deriváty zesíťovaného polystyrenu, akrylátu, polystyren-divinylbenzenu, ethylenvinylbenzenu s divinylbenzenem, vinylbenzyl chloridu s divinylbenzenem, dále jsou to deriváty polysacharidů např. celulózy, dextranu a agarózy.

Iontovou chromatografií jako velkou skupinu technik využívající mechanismus výše popsaný můžeme dále rozdělit na jednotlivé, viz níže. Záměrem této práce je pouze přiblížení různých možností a pestrosti iontových chromatografických technik.

(13) (20) (21) (22) (23)

Ion – Exchange Chromatography \Leftrightarrow Iontově výměnná chromatografie

Ion – Pair Chromatography \Leftrightarrow Iontově párová chromatografie

Coordination – Ion Chromatography \Leftrightarrow Koordinačně iontová chromatografie

Zwitterion – Ion Chromatography \Leftrightarrow Zwitterion iontová chromatografie

Chromatofocustion \Leftrightarrow Chromatofokusace

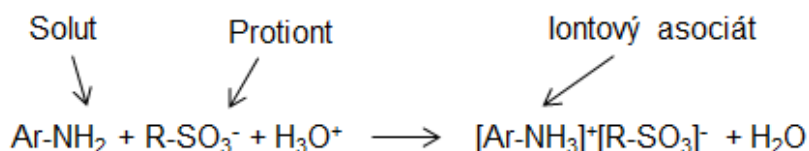
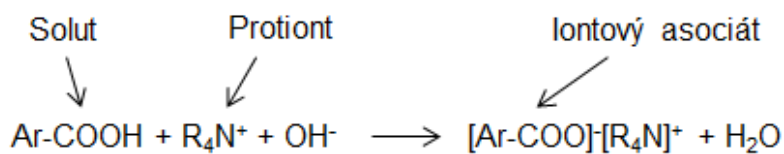
3.2.4.1. Iontově výměnná chromatografie

Jak již bylo zmíněno, jedná se o techniku využívající chemisorpci, lépe řečeno výměnu či odtržení iontu vázaného na stacionární fázi za jiný iont v mobilní fázi. Tato výměna závisí především na síle, která poutá iont v měniči iontů a na volbě vhodné stacionární a mobilní fáze. U daných analytů musí být zajištěna podmínka snadného přístupu k výměnnému místu a iont musí mít vyšší afinitu k vazebnému místu než původně vázaný iont. Podmínka snadného přístupu souvisí s používanými náplněmi (pórovité, povrchově pórovité nebo mikropartikulární). Ohledně afinity ta se řídí soupeřením o daný iont mezi energií solvatace a přitažlivými silami vyvíjenými výměnnou skupinou. Z mechanismu iontové výměny vyplývají následující závislosti, se zvyšujícím se nábojem iontu vzrůstá afinita ($K^+ < Mg^{2+} < Fe^{3+} < Ce^{4+}$), u vodných roztoků nízké koncentrace iontů se afinita zvyšuje s vyšším atomovým číslem ($Li < K < Cs, F < Cl < I$). Otázka vhodnosti volby stacionární a mobilní fáze souvisí s povahou stacionární fáze a iontovou silou a pH mobilní fáze. Mobilní fází v iontové výměnné chromatografii je nejčastěji tlumivý roztok obsahující protiionty. Retenční faktory s vyšší koncentrací tlumivého roztoku klesají a pH mobilní fáze ovlivňuje míru ionizace (pH > 6 pro anex a pH < 6 pro katex). Možný přírůstek organického rozpouštědla (ACN, MeOH) snižuje retenci a přidává se do mobilní fáze i z důvodu lepší rozpustnosti analyzovaných látek. (17) (23)

3.2.4.2. Iontově párová chromatografie

V odborné literatuře se kromě názvu chromatografie iontových párů (ion-pair chromatography) vyskytují i synonyma pro tuto techniku a to iontově interakční chromatografie (ion-interaction chromatography) nebo tzv. mobile phase iontová chromatografie (mobile-phase ion chromatography). Objevení této iontové chromatografie se připisuje *Dr. Gordonu Schillovi* a spol. v roce 1973. Při chromatografii iontových párů se využívá tvorby iontových asociátů mezi separovanými látkami iontové povahy a opačně nabitým iontem. Při nastavení chromatografických podmínek dochází k ustálení dynamické rovnováhy mezi mobilní a stacionární fází výrazně déle než u běžně používaných systémů. A tato rovnováha je kontrolována jednak různým typem a koncentrací iontově-párového činidla ale také poměrem organického rozpouštědla v mobilní fázi. Dnešní nejčastější výklad mechanismu separace předpokládá tzv. dynamickou iontovou výměnu mezi chromatografovanými látkami iontové povahy na základě rozdílné afinity s opačně nabitými částicemi protiiontu, který je dynamicky vázán na povrch stacionární fáze a který je dodáván mobilní fází.

Tvorbu iontového asociátu lze popsat rovnicemi:



K separaci sloučenin kationtového typu se používají sodné soli alkylsulfonových kyselin (pentan-, hexan-, heptan-, oktan- a dodekansulfonáty) a N-alkyl kvartérní amoniové soli (bromidy, sírany nebo chloridy) k separaci sloučenin aniontového typu.

K dosažení optimální separace analytů a tedy jejich retenci závisí v první řadě na koncentraci protiiontu, na velikosti alkylu protiiontu i chromatografovaného iontu (s rostoucí velikostí retence roste) a v neposlední řadě na iontové síle a pH mobilní fáze. (21) (22) (24)

3.2.4.1. Koordinačně iontová chromatografie

V případě koordinačně iontové chromatografie již sám název napovídá spojení mechanismu iontové výměny s přidavkem komplexotvorných činidel a tvorbou komplexotvorných rovnováh mezi analytem a činidlem s výsledkem možného zlepšení selektivity chromatografického systému. Dělení je založeno na rozdílné stabilitě vytvářených komplexů, avšak stabilita komplexů dělených látek nesmí být příliš velká pro důležitost taktéž primárního mechanismu separace. (21)

3.2.4.2. Zwitterion iontová chromatografie

Koncept použití amfionu v iontové chromatografii, iontu, který ve své molekule obsahuje pozitivní i negativní náboj v různé části molekuly, a jehož celkový náboj je ale neutrální se datuje k roku 1981, kdy *Knox a Jurand* popsali novou formu iontové párové chromatografie s zwitterion párovým činidlem (11-aminoundekánová kyselina) pro separaci nukleotidů. V roce 1993 *Hu a kol.* publikovali práci s použitím permanentně vázaným zwitterion činidlem. Tuto metodu nazvali elektrostatickou iontovou chromatografií (EIC). Na reverzní fázi C18 navázali 3-[(cholamidopropyl) dimethylamino]-1-propansulfonát (CHAPS). Separovali směs chloridu sodného, dusitanu sodného, bromidu draselného a dusičnanu sodného 100% vodnou mobilní fází s vodivostní detekcí. V současnosti se nejčastěji setkáváme s dvěma druhy zwitterion vázanými fázemi, sulfobetain nebo hexadecyl fosfocholin. Chromatografické

vlastnosti těchto zwitterion fází se výrazně liší od aniontově nebo kationtově výměnných kolon používaných v konvenční iontové chromatografii. Pro názornou ilustraci je možné nastínit příklad separace dvou kationtů C_1 a C_2 , které můžeme kombinovat s dvěma anionty A_1 a A_2 a při optimálně zvolených chromatografických podmínkách dostaneme záznam tvořený čtyřmi píky: C_1A_1 , C_1A_2 , C_2A_1 a C_2A_2 . Obecně řečeno retenční faktory iontů ve vzorku jsou dány relativní schopností iontových párů vytvářet rozdílné dynamickou interakční rovnováhu mezi mobilní a stacionární fází, primárně svými hydrofobními vlastnostmi než relativní koncentrací elučního činidla a stanovovaných iontů vzorku v mobilní fázi. Na rozdíl od iontově výměnné chromatografie, v které analyt a eluční ionty soutěží o specificky nabitá místa stacionární fáze a kde vyšší koncentrace elučních iontů snižuje retenční faktory analyzovaných iontů. (20)

3.2.4.3. Chromatofokusace

Velmi stručně lze tuto metodu popsat jako variantu ionexové chromatografie umožňující separaci analytů (v praxi se využívá pro dělení proteinů) na základě rozdílu v hodnotě isoelektrického bodu (pI). Využívá pufovacích schopností nabitých skupin ionexů (např. anexů). U dané analýzy je nejprve kolona s ionexem ustálena puforem o vyšší hodnotě pH (8-9) a na kolonu je nanesen vzorek, analyty s opačně nabitými ionty jsou zachyceny a eluce je zahájena puforem, jehož hodnota je nastavena v kyselé oblasti (4-6). Samovolně se vytváří sestupný gradient pH a jednotlivé analyty se postupně uvolňují a dělí se na ostré zóny podle isoelektrických bodů. (25)

3.3. Využití iontové chromatografie v separaci kovových iontů

Vědecký vývoj a analytickým průmyslem dostupná technika v iontové chromatografii zaznamenala v posledních třech dekádách obrovský posun. První práce v analýze alkalických kovů a kovů alkalických zemin kationtově výměnnou chromatografií na koloně se sulfonovanou chemicky vázanou fází s makropórovitým polystyren-divynilbenzenovou maticí vykazovali velmi špatnou selektivitu dělených kationtových iontů. Avšak posun od makroporézních k mikroporézním maticím např. zmíněné polystyren – 4% divinylbenzenové pryskyřice přinesl excelentní separace jednomocných a dvojmocných kationtů. U těchto separací byl většinou použit vodný roztok methansulfonové kyseliny jako mobilní fáze. Zlepšení selektivity bylo také získáno záměnou vázaných funkčních skupin přesněji řečeno místo sulfonace u

makroporézních pryskyřic hydroxymethylovou skupinou. Přítomnost hydroxylových skupin u makroporézních pryskyřic svojí sníženou hydrofobicitou souvisí zvýše uvedenou selektivitou pro separaci hydratovaných kationtů alkalických kovů. Další z možností zlepšení separace kationtů alkalických kovů a kovů alkalických zemin je odklon od sulfonovaných fází směrem k slabým kationtovým měničům jako karboxylové, fosfátové nebo směsné karboxylově/fosfátově/crown etherové funkční skupině. Jiným přístupem k zlepšení separace daných kationtů jsou nosiče na bázi silikagelu a oxidu hlinitého. *Shomburg* kolony, silikagelový nosič s vázaným (polybutadien-maleinovou kyselinou) kopolymerem byly s úspěchem použity k separaci jednomocných a dvojmocných kationtů. Vysoce selektivní analýzy byly dosaženy i u analýz kationtů na silikagelu modifikovaným oxidem hlinitým a zirkoničitým.

Jiným přístupem k řešení problematiky separace alkalických kovů a kovů alkalických zemin je vedle možných iontových měničů spojení s komplexačními procesy. Mezi tyto techniky patří kationtová chromatografie s mobilní fází obsahující komplexační činidlo, koordinační chromatografie s chelatační stacionární fází, iontově výměnná a iontově párová chromatografie aniontově kovových chelátů s vodivostní nebo spektrofotometrickou detekcí, zahrnující postkolonovou derivatizaci. (21) (22) (23) (26)

3.3.1. Kationtově výměnná chromatografie

U kationtově výměnné chromatografie je tedy velmi výhodné pro překonání silných elektrostatických sil, které poutají na stacionární fázi stanovované kovové ionty, přídavek ethylendiaminu (EDA) a taktéž komplexační činidla. Příkladem takových komplexačních činidel je kyselina citronová, šťavelová nebo vinná. Pokud se k eluentu přidá komplexační činidlo, tak se záporně nabitě skupiny karboxylových kyselin kompetitivně váží na kovové ionty, a tím dochází k usnadnění eluce pomocí EDA, což má za následek snížení retenčního času daného kovového iontu. V nepřítomnosti komplexačního činidla jsou kovové ionty pevněji vázané na stacionární fázi a eluce je řízena pouze množstvím EDA. U dvojmocných kationtů se zvyšováním koncentrace komplexačního činidla klesá retenční čas. Pro optimalizaci metody je důležitá i závislost separace na pH mobilní fáze. Zvýšením pH se zvyšuje stabilita komplexu zkoušeného iontu s karboxylovou kyselinou a tím dochází ke snížení vazby iontu na ligandy stacionární fáze a zkracuje se retenční čas. Z toho vyplývá, že separace kovových iontů pomocí kationtově výměnné chromatografie je závislá na kombinaci iontoměniče, separovaného kationtu a elučního činidla s následnou tvorbou komplexů různé stability v mobilní fázi. (21) (22) (26)

3.3.2. Koordinačně iontová chromatografie

Z hlediska kinetiky a specifčnosti tvorby chelátů se jeví jako jedna z nejlepších modifikací použití iontových stacionární fází na bázi silikagelu s dynamicky ukotvenými molekulami iminodioctové kyseliny (IDA). IDA vykazuje pro různé kovové ionty různé komplexotvorné schopnosti, tyto komplexy jsou většinou kineticky labilní až středně stabilní. Tyto vlastnosti zajistí reverzibilní sorpci kovových iontů. Vysoká afinita stacionární fáze s IDA k iontům přechodných kovů, je velkou výhodou pro stanovení kovů ve vzorcích, které obsahují vysoké hladiny iontů alkalických kovů a kovů alkalických zemin. Nejdůležitější parametry určující retenci kationtů v koordinační iontové chromatografii jsou koncentrace komplexačního činidla a pH mobilní fáze. Komplexační činidla se podle komplexační schopnosti dělí na slabá a silná. (21)

3.3.2.1. Slabá komplexační činidla

Patří sem například kyselina citronová nebo vinná. Hlavní funkcí těchto činidel je regulovat retenci kationtů na stacionární fázi svými volnými funkčními skupinami jako míst pro iontovou výměnu v závislosti na změně pH a koncentraci komplexačního činidla. I když ve zkoumaném rozmezí pH (2,5-4,0) jsou důkazy o iontové výměně, probíhají zde i další procesy, které mají vliv na retenční čas a odráží afinitu kovových iontů k IDA. Pořadí eluce kovových iontů odráží stabilitu komplexu kov-IDA, čímž se potvrzuje dominantní postavení komplexotvorné reakce. Z tohoto důvodu se pomocí kyseliny citronové a vinné eluují jen některé kovové ionty, zatímco některé tvoří stabilnější komplexy s IDA, například Cu^{2+} , Ni^{2+} a Pb^{2+} , a zůstávají ireverzibilně zadržovány. (21)

3.3.2.2. Silná komplexační činidla

Vysoká komplexotvorná schopnost IDA vyžaduje u některých kationtů použití silných komplexačních činidel použitých v mobilní fázi. Příkladem silných komplexačních činidel je kyselina pyridin-2,6-dikarboxylová (DPA) nebo kyselina nitrilotrioctová (NTA). Obě kyseliny DPA i NTA mají v molekule tři koordinační centra stejné jako má IDA. Z tohoto důvodu komplexy se stanovovanými ionty vznikají snadněji a dochází k eluci. DPA se ukázala být zvláště užitečná při použití kolony s IDA. Další zlepšení eluce hlavně dvojmocných kovových iontů pomocí DPA se prokázalo při použití směsi s kyselinou dusičnou. DPA je neúčinnější v rozmezí pH 2,5-5,0, protože v tomto rozmezí tvoří nejstabilnější komplexy. (21)

3.3.3. Aniontově výměnná chromatografie

Aniontově výměnná chromatografie předem připravených, stabilních komplexů s kovovými ionty je poměrně nová metoda separace. Komplexy mohou být vytvořeny přímo během separace přidáním komplexačního činidla do mobilní fáze, nebo se daný komplex vstříkne přímo na kolonu před separací.

Anexová kolona se dá použít v kombinaci s UV detektorem za použití komplexačního činidla absorbujícího v UV oblasti světla. Příkladem takového činidla je 4(2-pyridilazo)resorcinol (PAR). Problémem je, že toto činidlo tvoří s kovovými ionty velmi silné komplexy, a proto je výhodné přidat do mobilní fáze organickou složku, například 2-propanol nebo aceton. Pro kompletní disociaci za těchto podmínek je nutné přidat silně alkalické eluční činidlo jako je uhličitan sodný. Vyšší vliv na retenci má v tomto případě zvyšování pH než zvyšování koncentrace elučního činidla. Vysoká stabilita kovových komplexů s PAR v aniontově výměnné chromatografii je způsobena jak iontovou výměnou, tak adsorpčním mechanismem. Tato zvláštnost umožňuje ovlivnění selektivity separace a to buď změnou použitého elučního činidla nebo koncentrací přidané organické složky. Při použití například kyseliny ethylendiamintetraoctové je méně uplatněn mechanismus adsorpce, a proto stačí použití jen slabších elučních činidel, například uhličitanů nebo hydrogenuhličitanů. (21) (22) (26)

3.3.4. Iontově párová chromatografie

Jedná se o další možnou variantou pro separaci kovových iontů. K separaci dochází na reverzních fázích a iontově párové činidlo je přidáno do mobilní fáze, což se jeví jako alternativní způsob stanovení např. komplexů kov-PAR ve srovnání s aniontově výměnnou chromatografií viz výše. I zde probíhají dva mechanismy separace, buď iontová výměna, nebo adsorpce. Upřednostnění jednoho mechanismu lze pomocí použitého elučního činidla a přídavku organické složky. Eluční síla a koncentrace organického modifikátoru jsou nejdůležitější parametry pro eluci a selektivitu v iontově párové chromatografii. (21)

3.4. *Validace analytické metody*

Validace analytické metody je proces, kterým se stanoví všechny důležité charakteristiky, za kterých je postup analýzy vhodný pro dané měření a umožňuje zajistit stejnou spolehlivost při opakovaném měření ve stejné nebo i jiné laboratoři.

Validace se dělá u všech nově vyvinutých metod, v případě změny metody, pokud má být metoda přenesena do jiné laboratoře, nebo při porovnání rovnocennosti dvou metod.

Předmětem validace je jedna vlastnost měření, nazývá se validovaná vlastnost. Může to být koncentrace zkoušené látky, koncentrace nečistoty nebo nějaká fyzikálně-chemická vlastnost.

Validační dokument musí obsahovat následující údaje:

- pracovní postup
- validační parametry
- podmínky revalidace systému
- validační protokol
- literatura (rešerše a konzultace)

Analytická metoda musí splňovat stanovené požadavky, které jsou dány zamýšleným použitím. Podle toho, k čemu má být metoda použita se ověřují následující parametry. (27) (28) (29) (30)

Tabulka 4., Přehled validačních parametrů

	identifikace	testování nečistot		obsah
		kvantitativní	limitní	
přesnost	-	+	-	+
správnost	-	+	-	+
linearita	-	+	-	+
rozsah	-	+	-	+
detekční limit	-	-	+	-
kvantitativní limit	-	+	-	-
selektivita	+	+	+	+
robustnost	-	+	-	+

3.4.1. Přesnost

Přesnost metody udává stupeň shody mezi jednotlivými měřeními za předem stanovených podmínek a se stejně připraveným vzorkem. Obvykle se vzorek takto analyzuje šestkrát, s tím, že se každý vzorek připraví samostatně za shodných podmínek.

Stupeň přesnosti je dán jako směrodatná odchylka, vypočítaná z těchto šesti měření. Pokud není směrodatná odchylka závislá na koncentraci, používá se absolutní

hodnota směrodatné odchylky vyjádřená ve stejných jednotkách jako samotný výsledek měření:

$$s = \sqrt{\frac{1}{n} \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{X})^2}$$

kde x_i jsou jednotlivé naměřené hodnoty, \bar{X} je aritmetický průměr všech naměřených hodnot a n je počet měření.

Pokud je závislá na koncentraci, používá se relativní směrodatná odchylka vyjádřená v procentech.

$$s_R = \frac{s}{\bar{x}} 100\%$$

Podle podmínek měření se přesnost metody může vyjádřit jako opakovatelnost, mezilehlá přesnost a reprodukovatelnost.

Opakovatelnost metody je stupeň shody měření provedený jedním pracovníkem, na stejném přístroji, ve stejné laboratoři, na identickém vzorku, za použití totožných činidel, shodné analytické metody a během kratšího časového období.

Mezilehlá přesnost metody je shoda měření provedená různými pracovníky, na různých přístrojích, za použití rozdílných činidel, v delším časovém období, ale ve stejné laboratoři, za použití shodné analytické metody měření a na identickém vzorku.

Reprodukovatelnost metody jsou výsledky získané měřením za stejných podmínek jako u mezilehlé přesnosti, s rozdílem, že měření se provádí v odlišných laboratořích. (27) (28) (29)

3.4.2. Správnost

Správnost metody udává shodu mezi správnou a naměřenou hodnotou. Získání správné hodnoty může být obtížné. Správná hodnota se dá zjistit jinou, nezávislou validovanou metodou. Nebo pomocí modelového vzorku, který se připraví ze všech součástí přípravku a přidáním známého množství stanovované látky. Pokud nemáme k dispozici všechny součásti přípravku, použije se vzorek s přidáním známého množství standardu.

Rozdíl mezi správnou a naměřenou hodnotou je chyba výsledku. Chyba výsledku může být konstantní, ta se během všech měření nemění. Nebo je chyba

systematická, která se mění očekávaným způsobem. A dále chyba nesystematická, tedy náhodná, která se v průběhu měření mění neočekávaným způsobem a nelze ji nijak odstranit. Odlišnost mezi střední naměřenou hodnotou a správnou hodnotou se nazývá odchylka a spadá mezi chyby systematické. Může nabývat kladných i záporných hodnot.

Správnost se většinou zjišťuje nejméně při šesti analýzách a je vyjádřena jako rozdíl správné a naměřené hodnoty nebo také jako výtěžnost.

$$\text{výtěžnost} = \frac{\text{naměřená hodnota}}{\text{správná hodnota}} \cdot 100 \quad (27) \quad (28)$$

3.4.3. Linearita

Linearita je vymezena jako schopnost poskytovat výsledky měření přímo úměrné určité veličině, hlavně koncentraci. Nejčastěji se měří minimálně pět různých koncentrací v rozsahu 50 – 150% deklarovaného obsahu. Pro měření se používají spíše standardy než samotná zkoušená látka, protože negativní vlivy zkoušené látky jsou měřeny jinými parametry validace.

Pokud jsou výsledky měření lineární, lze učit hodnotu lineární závislosti pouze z jednoho bodu, což je výhodné. Ale pokud jsou výsledky nelineární, dají se, buď převést na lineární, a to popisem funkce, např. exponenciální, nebo speciálními matematickými výpočty, nebo vypočítat hodnoty lineární závislosti ze všech naměřených hodnot kalibrační křivky.

Lineární závislost je vyjádřena matematickým vzorcem

$$y = kx + q$$

kde q určuje, v jakých místech přímka protne osu y , a proměnná k , neboli směrnice, určuje sklon přímky. (27) (28) (31)

3.4.4. Rozsah

Rozsah analytické metody je interval mezi nejnižší a nejvyšší koncentrací zkoušené látky ve vzorku, pro které bylo dokázáno, že analytický postup má vhodnou úroveň přesnosti, správnosti a linearity měření.

Spodní hranicí intervalu je detekční limit. Což je mez, která odpovídá koncentraci, pro kterou je analytický signál statisticky významně odlišný od šumu. A horní hranici tvoří maximální odezva přístroje. To je koncentrace, která, když se překročí, tak přístroj nepracuje správně. (27) (28)

3.4.5. Detekční limit

Vyjadřuje citlivost metody. Je to nejmenší odezva signálu, která jde ještě kvantifikovat. U instrumentálních metod lze určit jako množství zkoušené látky s poměrem signálu k šumu s hodnotou 3. Analýzou odpovídající koncentrace zkoušené látky můžeme ověřit naměřený detekční limit. (28) (29)

3.4.6. Kvantitativní limit

Patří rovněž mezi parametry citlivosti. Udává nejnižší koncentraci, kterou je možno měřit za vyhovující přesnosti a správnosti měření. Kvantitativní limit lze vyjádřit jako množství látky, které lze měřit s maximální směrodatnou odchylkou 10%. Většinou to bývá trojnásobek detekčního limitu. Může se také formulovat jako množství zkoušené látky s poměrem signálu k šumu s hodnotou 10. (28) (29)

3.4.7. Selektivita

Selektivita analytické metody je schopnost změřit správně a přesně kvalitativní i kvantitativní složení stanovované látky i za přítomnosti jiných složek. To mohou být, další složky u vícesložkových přípravků, pomocné látky, rozkladné produkty, nečistoty, které se dostaly do přípravku při výrobě, rozpouštědla a jiné látky, které mohou být v přípravku přítomny.

Selektivita je zjišťována porovnáním výsledků měření vzorku se standardem, a nebo měření vzorku bez analyzované látky obsahující všechny ostatní složky přípravku, pomocné látky, nečistoty, rozkladné produkty. U měření selektivity je pro každý použitý přístroj nutné vypracovat samostatný program prokazování selektivity metody, protože je do jisté míry závislá na použitém zařízení. (27) (28)

3.4.8. Robustnost

Robustnost metody lze charakterizovat několika definicemi. Jako míra vlivu proměnných podmínek na výsledek analytického stanovení. Nebo ji lze definovat jako míra kapacity metody poskytovat stejné výsledky při jejím opakování za mírně změněných podmínek. Změna podmínek může být při změně přístroje, laboratoře, analytika nebo použitých zkoumadlech.

Zahrnuje sběr informací z vývoje metody, kde cílem je poukázat na podmínky, které by mohly ovlivnit výsledky měření. Patří sem například vliv pH, složení mobilní fáze, stabilita analyzovaných vzorků, rozdíl v použitých kolonách, různé šarže nebo výrobci.

Existují dva způsoby měření robustnosti metody. Buď pomocí jednosměrné analýzy, kdy se měří jedna proměnná a ostatní zůstávají konstantní. A potom se přechází na měření dalšího parametru. I přesto, že tento způsob je velice časově náročný a neumožňuje odhalit interakční vlivy, je stále nejužívanější. Další způsob měření robustnosti je vícerozměrná analýza, kdy se robustnost metody proti malým změnám zkouší podle plánovaných zkrácených nebo úplných postupů. (27) (28)

3.4.9. Test způsobilosti

Test způsobilosti zcela patří mezi charakteristiky validace analytické metody. Ne u všech analytických metod lze úplně určit všechny vlastnosti metody, jedná se hlavně o instrumentální fyzikálně-chemické metody, zvláště separační. Pokud nemůžeme určit všechny podmínky, aby daná metoda poskytovala spolehlivé výsledky měření, musí se určit jen nějaká kritéria, která mají být splněna pro každé další použití metody. Nemusí se opakovat celá validace, ale pouze jen pár charakteristik, toto se nazývá test způsobilosti analytického systému. Pokud tyto kritéria odpovídají požadavkům testu způsobilosti, má se za to, že dříve provedená validace je platná. (28)

4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1. *Chemikálie, standardy, vzorky*

4.1.1. Chemikálie

Acetonitril Chromasolv, Sigma Aldrich, Germany
Metanol Chromasolv, Sigma Aldrich, Germany
Kyselina dusičná dýmavá, Merck, Germany
Ethylendiamin p.a., Merck, Germany
Síran měďnatý pentahydrát čistý, Lachema, Brno
Dusičnan hořečnatý hexahydrát, Lachema, Brno
Chlorid draselný čistý, Balex, Pardubice
Dusičnan olovnatý čistý, Lachema, Brno
Dusičnan barnatý čistý, Lachema Brno
Chlorid železitý hexahydrát čistý, Lachema, Brno
Dusičnan hlinitý nonahydrát čistý, Lachema, Brno
Ultračistá voda

4.1.2. Standard

Chlorid vápenatý dihydrát p.a., Merck, Germany

4.1.3. Vzorek

Calcii chloridi dihydrici inj. , č.š. 11-12-2013

4.2. *Přístroje, podmínky separace*

4.2.1. Přístroje a pomůcky

Chromatografická sestava Shimadzu 10AD prominence liquid chromatograph

Degasser:	GU-10A5
Pumpy:	LC-10AD
Autosampler:	SIL-10AC
Termostat:	CTO-10AC
Detektor:	SPD-M10A
Komunikační modul:	CBM-10A
Kolona:	Supelcosil LC-SCX; 25cm x 3mm; 5µm (Sigma–aldrich)

Váhy analytické KERN ALS 220-4N, Germany

pH metr HANNA, Praha

Pipety BIOHIT, Finland

4.2.2. Podmínky separace

Chromatografická sestava Shimadzu 10AD prominence liquid chromatograph

Kolona: Supelcosil LC-SCX; 25cm x 3mm; 5 μ m (Sigma-aldrich)

Mobilní fáze: – kyselina dusičná-síran měďnatý pentahydrát-ethylendiamin

– acetonitril/kyselina dusičná-síran měďnatý pentahydrát-ethylendiamin

– metanol//kyselina dusičná-síran měďnatý pentahydrát-ethylendiamin

Dávkování: 10 μ l

Detekce: 254nm

Průtoková rychlost: 1ml/min

Teplota: 30°C

Typ eluce: izokratický

Vyhodnocení: software LC Solution

4.3. Příprava vzorku

Připraví se 10mM roztok Ca²⁺ a to tak, že se odměří 8,038ml Calcii chloridů dihydrátů inj. do 100ml odměrné baňky a doplní vodou po rysku.

4.4. Příprava roztoků pro optimalizaci metody

Příprava roztoku vápenatých iontů

Připraví se 10mM roztok Ca²⁺. Naváží se 0,5393g standardu chloridu vápenatého dihydrátu, rozpustí ve vodě, převede kvantitativně do odměrné baňky na 100ml a doplní vodou po rysku.

Příprava roztoku měďnatých iontů

Připraví se 10mM roztok Mg²⁺. Naváží se 2,7050g dusičnanu hořečnatého hexahydrátu, rozpustí ve vodě, převede kvantitativně do odměrné baňky na 100ml a doplní vodou po rysku.

4.5. Příprava mobilní fáze

Připraví se 100mM zásobní roztok kyseliny dusičné. Do 500ml odměrné baňky s asi 100ml vody se odměří 2,250ml kyseliny dusičné a doplní vodou po rysku.

Dále se připraví 100mM zásobní roztok síranu měďnatého pentahydrátu. Naváží se 2,4968g síranu měďnatého pentahydrátu, rozpustí ve vodě, kvantitativně převede do odměrné baňky na 100ml a doplní po rysku.

Do odměrné baňky na 500ml se odměří zásobní roztoky kyseliny dusičné a síranu měďnatého pentahydrátu, pomocí ethylendiaminu se upraví na požadované pH a doplní vodou po rysku. Množství zásobních roztoků pro jednotlivé mobilní fáze je uvedeno v následující tabulce.

Tabulka 5. Příprava mobilní fáze

Mobilní fáze	Množství 100mM zásobního roztoku kyseliny dusičné	Množství 100mM zásobního roztoku síranu měďnatého pentahydrátu
10mM HNO ₃ , 0,5mM CuSO ₄ ·5H ₂ O, pH 3,0	50ml	2,5ml
10mM HNO ₃ , 1mM CuSO ₄ ·5H ₂ O, pH 3,0	50ml	5,0ml
10mM HNO ₃ , 5mM CuSO ₄ ·5H ₂ O, pH 3,0	50ml	25ml
10mM HNO ₃ , 10mM CuSO ₄ ·5H ₂ O, pH 3,0	50ml	50ml

Dále se připraví mobilní fáze o pH 2,5; 3,5; 4,0 a 4,5 při složení 10mM kyseliny dusičné a 10mM síranu měďnatého pentahydrátu.

Takto připravené mobilní fáze byly použity, jak pro optimalizaci metody, tak i pro následnou validaci metody.

4.6. Příprava roztoků pro validaci

Zásobní roztok standardu

Připraví se 50ml 200mM roztoku Ca²⁺. Naváží se 5,3926g standardu chloridu vápenatého dihydrátu, rozpustí ve vodě, kvantitativně převede do odměrné baňky na 50ml a doplní vodou po rysku.

Zásobní roztok vzorku

Připraví se 50ml 100mM roztoku Ca²⁺. Odměří se 80,379ml Calcii chloridi dihydraci inj. do odměrné baňky na 50ml a doplní vodou po rysku.

4.6.1. Příprava roztoku pro měření opakovatelnosti

Připraví se 10ml 10mM roztoku standardu. 0,5ml zásobního roztoku standardu se převede do odměrné baňky na 10ml a doplní vodou po rysku.

4.6.2. Příprava roztoku pro měření přesnosti

Připraví se 10ml 10mM roztoku vzorku. 1,0ml zásobního roztoku vzorku se převede do odměrné baňky na 10ml a doplní vodou po rysku.

4.6.3. Příprava roztoků pro měření linearity

Připraví se sada roztoků standardů o koncentracích 1, 5, 10, 50 a 100mM Ca²⁺ iontů. Zásobní roztok se převede do odměrné baňky na 10ml a doplní vodou po rysku. Množství zásobního roztoku pro jednotlivé koncentrace je uvedeno v následující tabulce.

Tabulka 6., Příprava roztoků pro měření linearity

Koncentrace roztoku (mM)	Množství zásobního roztoku standardu (ml)
1	0,05
5	0,25
10	0,5
50	2,5
100	5,0

5. VÝSLEDKY A DISKUZE

5.1. Optimalizace chromatografických podmínek

V rámci optimalizace chromatografických podmínek pro stanovení vápenatých iontů byla vybrána vhodná proba, pH a optimální složení mobilní fáze. Při optimalizaci metody byly pro srovnání ještě kromě vápenatých iontů použity ionty hořečnaté. Roztoky pro optimalizaci byly připraveny podle 4.4. Optimalizace byla provedena s použitím kationtově výměnné chromatografické kolony na bázi silikagelu.

5.1.1. Výběr vhodné proby

Při výběru vhodné proby byla použita mobilní fáze o složení 10mM kyselina dusičná, různé koncentrace dané proby a upravená ethylendiaminem na pH 3,0.

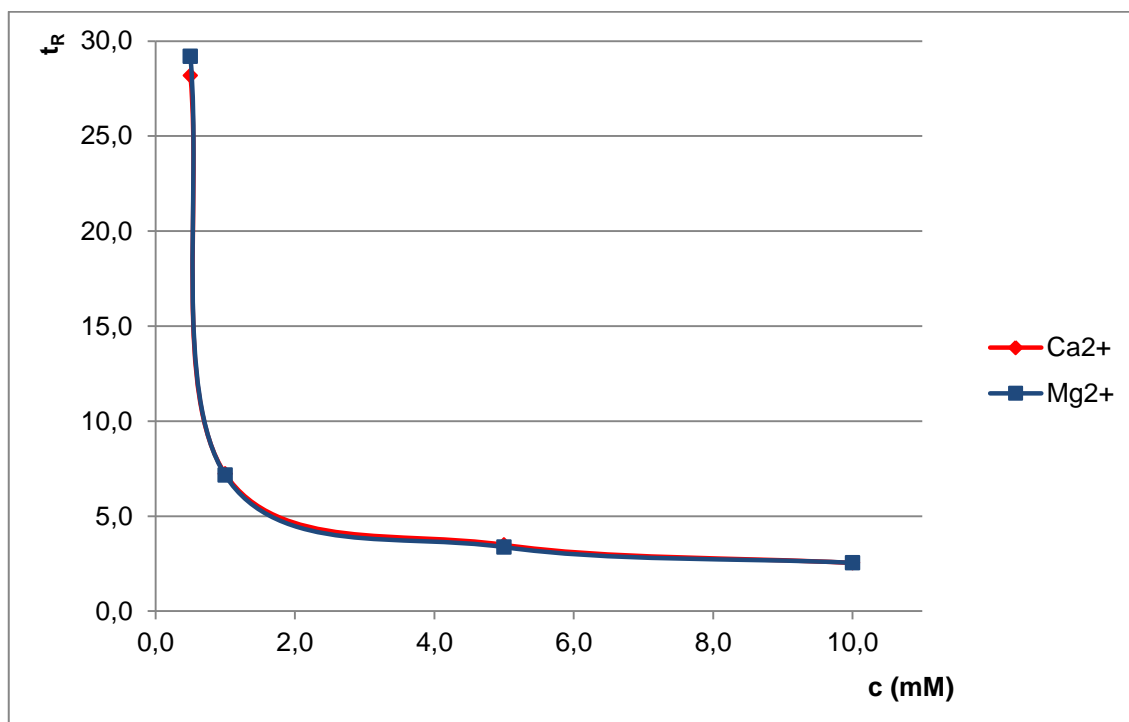
Byla vyzkoušena jak neutrální, tak kationtová proba. Jako neutrální proba byl použit aceton a jako kationtová měďnaté ionty. Z těchto dvou látek se pro stanovení vápenatých iontů více hodí měďnaté ionty.

Při výběru vhodné proby bylo testováno několik koncentrací síranu měďnatého pentahydrátu, který byl použit jako zdroj měďnatých iontů. Byly vyzkoušeny koncentrace 0,5; 1; 5 a 10mM. Z Grafu 1. vyplývá, že se zvyšující koncentrací se zkracuje retenční čas stanovovaných iontů. Pro stanovení vápenatých iontů byla vybrána koncentrace proby 10mM, při které je retenční čas kolem 2,5minut.

Tabulka 7., Retenční časy vápenatých a hořečnatých iontů za použití různých koncentrací proby

Koncentrace síranu měďnatého pentahydrátu (mM)	Retenční čas vápenatých iontů (min)	Retenční čas hořečnatých iontů (min)
0,5	28,19	29,19
1,0	7,22	7,15
5,0	3,49	3,37
10,0	2,53	2,54

Graf 1., Závislost retenčního času na koncentraci probe



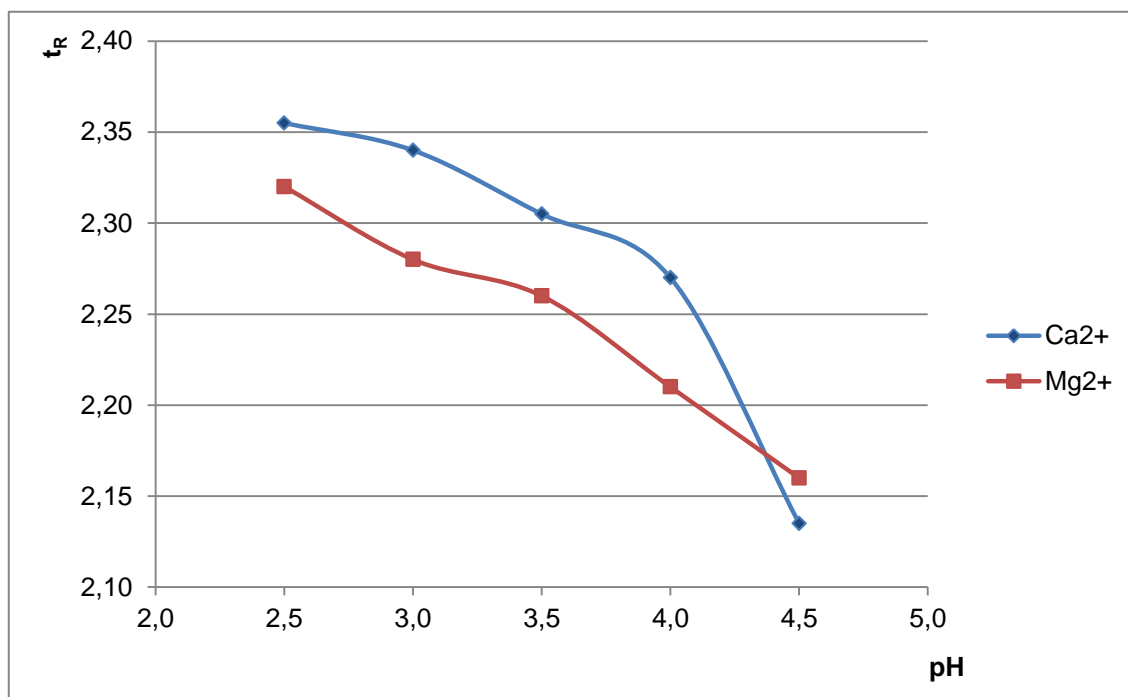
5.1.2. Optimalizace pH mobilní fáze

Při optimalizaci pH byla použita mobilní fáze o složení 10mM kyselina dusičná, 10mM síran měďnatý pentahydrát a upravená ethylendiaminem na požadované pH. Bylo testováno pH v rozmezí 2,5 až 5,5. Z Grafu 2. vyplývá, že vliv pH na retenční čas není výrazný. Ale se zvyšujícím se pH dochází ke zvýšení šumu signálu z detektoru (kolísání odezvy detektoru) a vedle separace iontů se začínají uplatňovat vazby hydroxylových skupin silikagelové matrice a dochází ke zdvojení píku, viz Obrázek 2. Pro stanovení vápenatých iontů proto bylo vybráno pH 3,0.

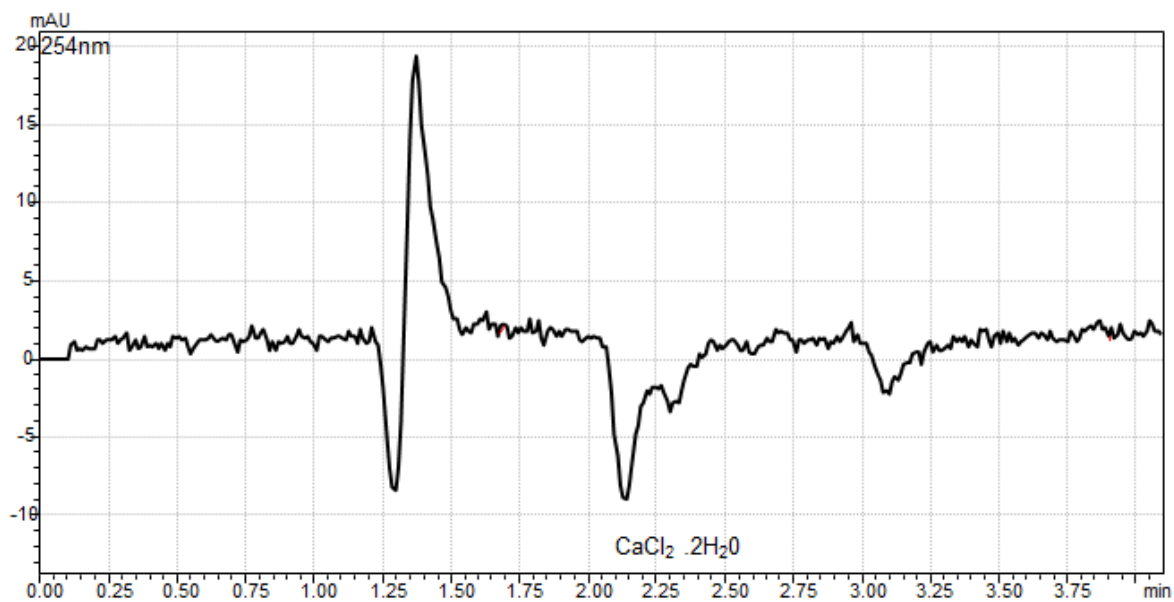
Tabulka 8., Retenční časy vápenatých a hořečnatých iontů za použití různého pH

pH	Retenční čas vápenatých iontů (min)	Retenční čas hořečnatých iontů (min)
2,5	2,35	2,32
3,0	2,34	2,28
3,5	2,30	2,26
4,0	2,27	2,21
4,5	2,13	2,16

Graf 2., Závislost retenčního času na pH mobilní fáze



Obrázek 2., Chromatogram standardu chloridu vápenatého dihydrátu při složení mobilní fáze 10mM kyselina dusičná, 10mM síran měďnatý pentahydrát, upravená ethylendiaminem na pH 5,5



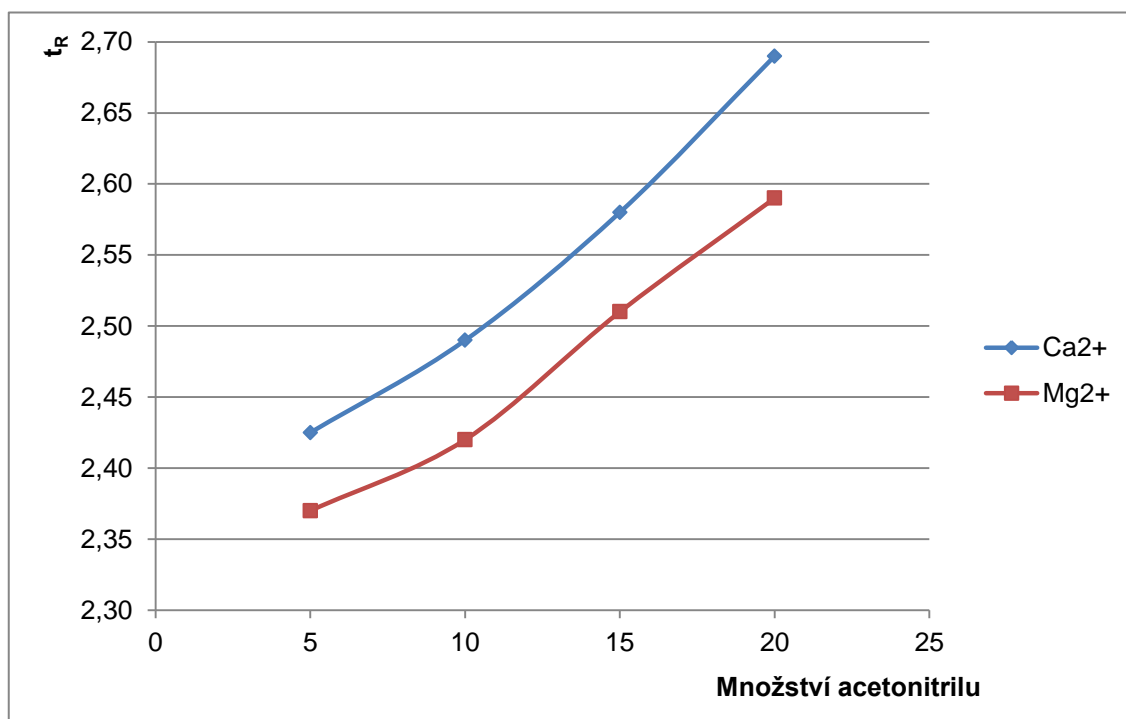
5.1.3. Optimalizace složení mobilní fáze

V rámci optimalizace mobilní fáze bylo testováno přidání organické složky k vodné části mobilní fáze o složení 10mM kyselina dusičná, 10mM síran měďnatý pentahydrát upravená ethylendiaminem na pH 3,0. Testované organické látky byly acetonitril a metanol. Z grafů vyplývá, že přidání organické složky výrazně neovlivňuje retenční čas, z tohoto důvodu byla pro stanovení iontů použita jen vodná složka mobilní fáze.

Tabulka 9. Retenční časy vápenatých a hořečnatých iontů při různém množství acetonitrilu v mobilní fázi

Poměr acetonitrilu k vodné složce mobilní fáze	Retenční čas vápenatých iontů (min)	Retenční čas hořečnatých iontů (min)
5:95	2,42	2,37
10:90	2,49	2,42
15:85	2,58	2,51
20:80	2,69	2,59

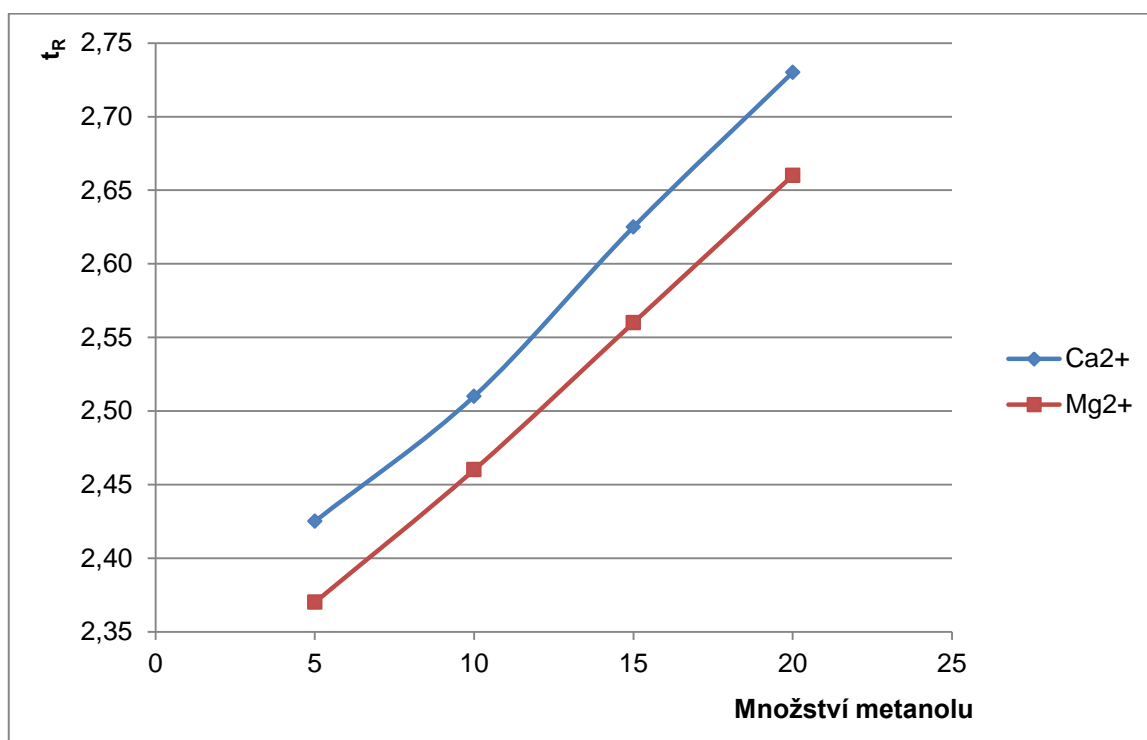
Graf 3. Závislost retenčního času na množství acetonitrilu v mobilní fázi



Tabulka 10., Retenční časy vápenatých a hořečnatých iontů při různém množství metanolu v mobilní fázi

Poměr metanolu k vodné složce mobilní fáze	Retenční čas vápenatých iontů (min)	Retenční čas hořečnatých iontů (min)
5:95	2,43	2,37
10:90	2,51	2,46
15:85	2,63	2,56
20:80	2,73	2,66

Graf 4., Závislost retenčního času na množství metanolu v mobilní fázi



5.1.4. Optimální chromatografické podmínky pro separaci vápenatých iontů

Kolona: Supelcosil LC-SCX; 25cm x 3mm; 5 μ m (Sigma-aldrich)
 Mobilní fáze: 10mM kyselina dusičná, 10mM síran měďnatý pentahydrát, upravená ethylendiaminem na pH 3,0
 Dávkování: 10 μ l
 Detekce: 254nm
 Průtoková rychlost: 1ml/min
 Teplota: 30°C
 Typ eluce: izokratický

5.2. Validace metody

5.2.1. Test vhodnosti chromatografického systému

5.2.1.1. Účinnost chromatografického systému – počet teoretických pater (N)

Účinnost kolony byla ověřena proměřením roztoku standardu o koncentraci 10mM připraveného podle 4.6.1. Pro výpočet byly použity tři výsledky z testu opakovatelnosti a výpočet byl proveden z průměru těchto měření podle vzorce:

$$N = 5,54 \cdot \left(\frac{t_R}{W_{1/2}} \right)^2$$

t_R je retenční čas (min)

$W_{1/2}$ je šířka píku v polovině jeho výšky (min)

Tabulka 11. Počet teoretických pater

Analyzovaná látka	t_R (min)	$W_{1/2}$ (min)	N (min)
Chlorid vápenatý dihydrát	2,525	0,20	884

Požadavek na počet teoretických pater $N > 500$ je splněn.

5.2.1.2. Asymetrie chromatografických píků (T)

Asymetrie chromatografických píků byla ověřena změřením roztoku standardu o koncentraci 10mM připraveného podle 4.6.1. Hodnoty byly získány z testu na opakovatelnost a výpočet byl proveden z průměru tří měření podle následujícího vzorce:

$$T = \frac{w_{0,05}}{2f}$$

$w_{0,05}$ je šířka píku v 5% jeho výšky (min)

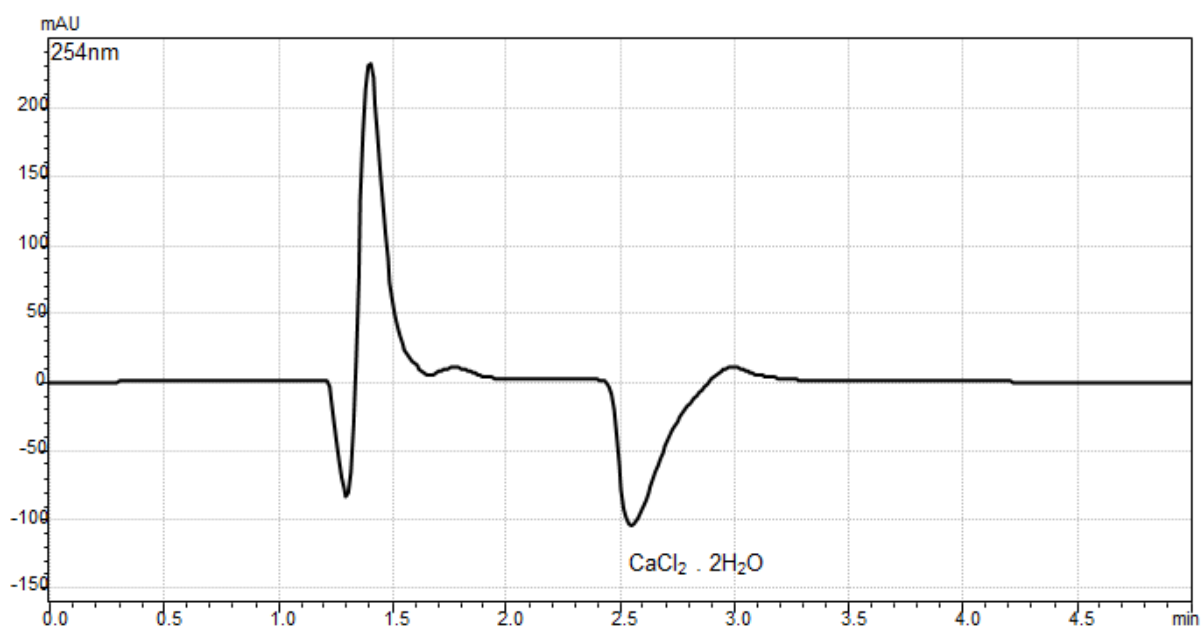
f je vzdálenost mezi kolmicí spuštěnou z vrcholu píku a vzestupnou částí píku v 5% jeho výšky (min)

Tabulka 12. Asymetrie chromatografických píkú

Analyzovaná látka	$w_{0,05}(\text{min})$	$f(\text{min})$	$T(\text{min})$
Chlorid vápenatý dihydrát	0,41	0,11	1,86

Požadavek na symetrii chromatografických píkú < 2 byl splněn.

Obrázek 3. Chromatogram standardu: chlorid vápenatý dihydrát



5.2.2. Opakovatelnost

Byl opakovaně dávkován roztok standardu o koncentraci 10mM připravený podle 4.6.1. Z ploch píku a retenčního času byla vypočítána relativní odchylka. Pro výpočet se použil průměr z šesti měření.

Tabulka 13., Opakovatelnost

Chlorid vápenatý dihydrát		
Číslo pokusu	Plocha píku	Retenční čas (min)
1	1440424	2,52
2	1452564	2,53
3	1453627	2,53
4	1456212	2,52
5	1454681	2,52
6	1456729	2,52

n	6	6
\bar{x}	1452372,8333	2,5233
s	5529,1217	0,0047
s_R (%)	0,38	0,19

Požadavek na relativní směrodatnou odchylku < 1% byl splněn.

5.2.3. Přesnost

Bylo analyzováno šest roztoků vzorku o koncentraci 10mM připravených samostatným postupem podle 4.6.2. Každý roztok byl třikrát změřen a pro výpočet relativní směrodatné odchylky byly použity jejich průměry.

Tabulka 14. Přesnost

Chlorid vápenatý dihydrát	
Číslo pokusu	Plocha píku
1	1451839,000
2	1449764,333
3	1447753,333
4	1438767,667
5	1481574,667
6	1462331,000

n	6
\bar{x}	1455338,3333
s	13617,8596
s_R (%)	0,94

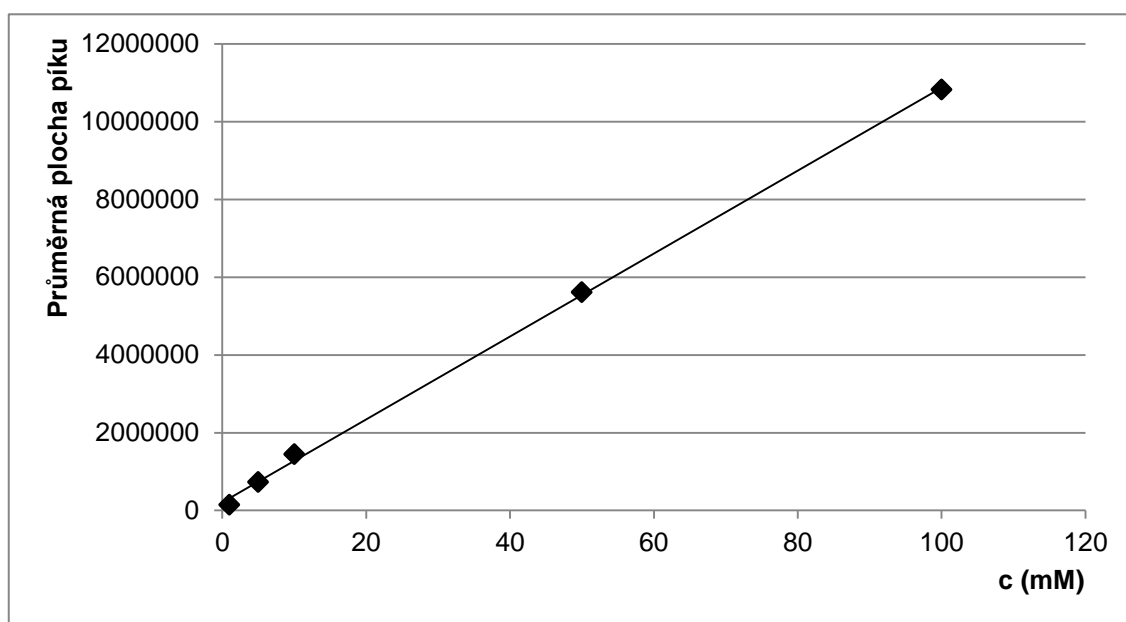
Požadavek na relativní směrodatnou odchylku <1% byl splněn.

5.2.4. Linearita

Pro měření linearity byla použita metoda absolutní kalibrace. Bylo připraveno pět roztoků standardu o koncentracích 1, 5, 10, 50 a 100mM podle 4.6.3. Každý roztok byl třikrát změřen a pro další výpočty byly použity jejich průměry. Závislost průměrných hodnot ploch píků na koncentraci byla vyhodnocena metodou lineární regrese.

Tabulka 15., Linearita

Chlorid vápenatý dihydrát	
Koncentrace Ca ²⁺ (mM)	Průměrná plocha píku
1	175058,333
5	723093,667
10	1443324,000
50	5607105,000
100	10816895,333



počet bodů	n	5	
parametry regresní přímky a odhady jejich směrodatných odchylek			
směrnice	k	106583,037	± 1760,333
absolutní člen	q	207940,569	± 88459,12
koeficient korelace	R	0,999182	
reziduální odchylka	S_{REZ}	148482,774	
hodnota F-statistiky	F	9,9258E-06	
Závislost y na x byla prokázána se spolehlivostí 99,9%			

Požadavek na linearitu $R > 0,9990$ byl splněn.

5.2.5. Správnost

Byl šestkrát změřen roztok standardu o koncentraci 10mM připravený podle 4.6.1. Pro výpočet byl použit průměr ze šesti měření a byly použity výsledky z testu na opakovatelnost.

Vzhledem k tomu, že roztok je složen pouze z chloridu vápenatého dihydrátu a vody pro injekce byly pro výpočet správnosti použity výsledky z měření přesnosti, kde byly roztoky vzorku připraveny podle 4.6.2. Každý roztok byl změřen třikrát a pro výpočet byly použity jeho průměry.

Výtěžnost byla vypočtena podle vzorce:

$$R_i(\%) = 100 \cdot \frac{c_i}{c_0}$$

c_i koncentrace vložená

c_0 koncentrace stanovená HPLC

Tabulka 16., Správnost

Chlorid vápenatý dihydrát				
Číslo pokusu	c_0 (mM)	A_i	c_i (mM)	R_i (%)
1		1451839,000	10,00	99,96
2	10,00	1449764,333	9,98	99,82
3	odpovídá	1447753,333	9,97	99,68
4	A_0	1438767,667	9,91	99,06
5	1452372,833	1481574,667	10,20	102,01
6		1462331,000	10,07	100,69

n	6
\bar{x}	100,2042
s	0,9376
s_R (%)	0,94%

Požadavek na správnost, aby R_i bylo v intervalu $100 \pm 5\%$ a relativní směrodatná odchylka $< 5\%$ byl splněn.

5.2.6. Selektivita

Chromatografické píky nečistot uvedených v lékopisném článku, viz 3.1.4, kromě hořečnatých iontů vykazují jiné retenční časy než vápenaté ionty.

Pro selektivní měření vápenatých iontů by bylo vhodné zařadit ještě metodu pro identifikaci a kvantifikaci hořečnatých iontů nebo danou metodu dále optimalizovat, aby bylo možné selektivně separovat vápenaté ionty.

5.2.7. Robustnost

Testování míry vlivu proměnných experimentálních podmínek na stanovení obsahu analytu bylo testováno na roztoku standardu o koncentraci 10mM, který byl připraven podle 4.4.

5.2.7.1. Vliv pH

Vliv pH byl testován v rozmezí 2,5 až 4,5. Při složení mobilní fáze 10mM kyselina dusičná, 10mM síran měďnatý pentahydrát a upravená ethylendiaminem na požadované pH.

Vliv pH na retenční čas

Roztok standardu byl při každém pH změřen třikrát, v Tabulce 17. jsou uvedeny průměry retenčních časů při každém pH. Retenční časy chloridu vápenatého dihydrátu se v tomto rozmezí pH významně nelišily.

Tabulka 17., Vliv pH na retenční čas

Chlorid vápenatý dihydrát	
pH	t_R
2,5	2,35
3,0	2,34
3,5	2,30
4,0	2,27
4,5	2,15

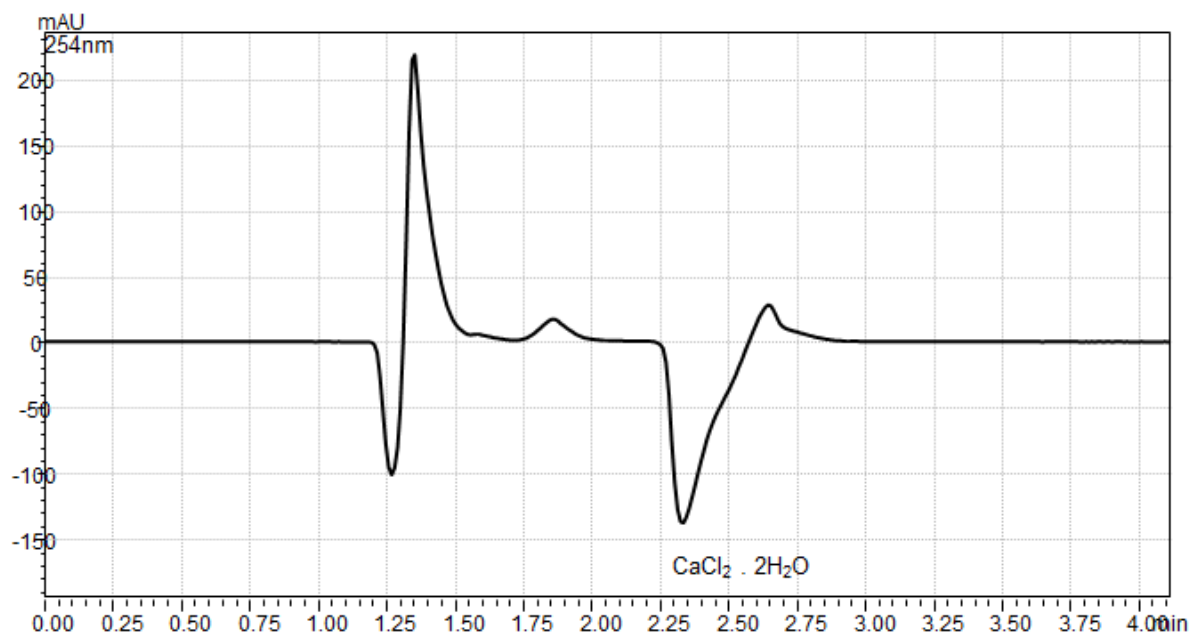
Vliv pH na plochu píku

Vliv pH na plochu píku je uveden v Tabulce 19. Relativní plocha píku vztažená na plochu píku při optimálním složení mobilní fáze se pohybuje v rozmezí 70,85% až 100,37%. Plocha píku se se změnou pH liší, proto je vhodné použít mobilní fázi o složení 10mM kyselina dusičná, 10mM síran měďnatý upravená ethylendiaminem na pH 3,0.

Tabulka 18., Vliv pH na plochu píku

Chlorid vápenatý dihydrát		
pH	A	A _R (%)
2,5	1457714	100,37
3,0	1452373	100,00
3,5	1053227	72,52
4,0	1047805	72,14
4,5	1028965	70,85

Obrázek 4., Chromatogram standardu chloridu vápenatého dihydrátu při složení mobilní fáze 10mM kyselina dusičná, 10mM síran měďnatý pentahydrát, upravená ethylendiaminem na pH 4,0



5.2.7.2. Vliv složení mobilní fáze

Vliv složení mobilní fáze bylo testováno na mobilní fázi 10mM kyselina dusičná, 10mM síran sodný pentahydrát, upravená ethylendiaminem na pH 3,0 s přidavkem organické látky, acetonitrilu nebo metanolu, a to v poměru 5:95 až 20:80.

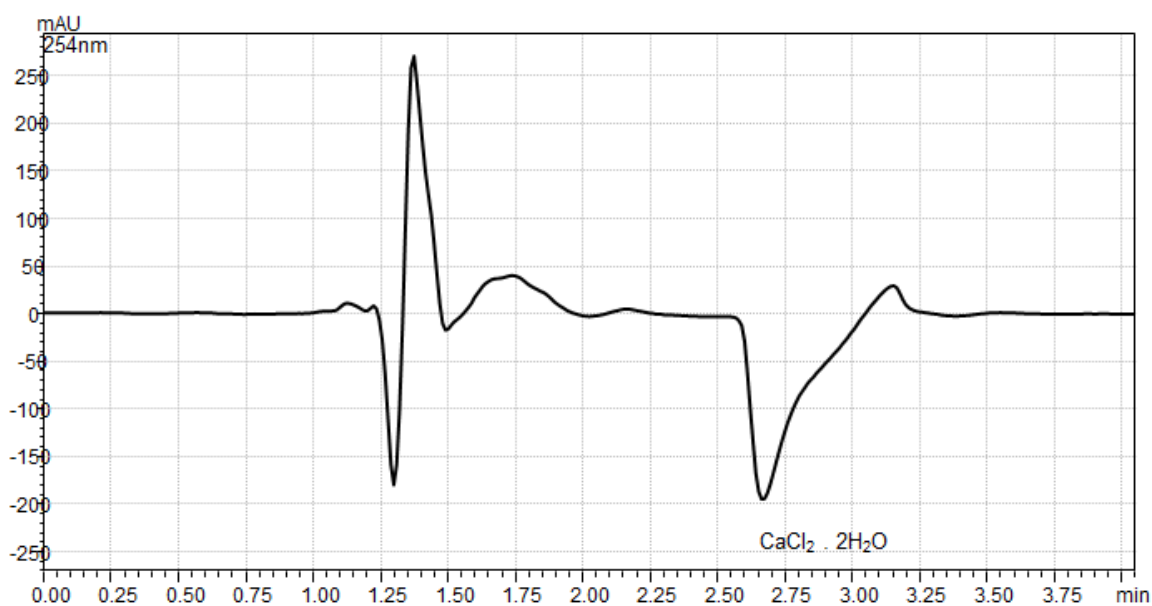
Vliv složení mobilní fáze na retenční čas

Vliv složení mobilní fáze na retenční čas je uveden v následujících tabulkách. S přidáním organické složky do mobilní fáze se retenční čas výrazně nemění.

Tabulka 19. Vliv přidavku acetonitrilu k mobilní fázi na retenční čas

Chlorid vápenatý dihydrát	
Poměr acetonitrilu k vodné složce mobilní fáze	t_R (min)
5:95	2,43
10:90	2,49
15:85	2,58
20:20	2,69

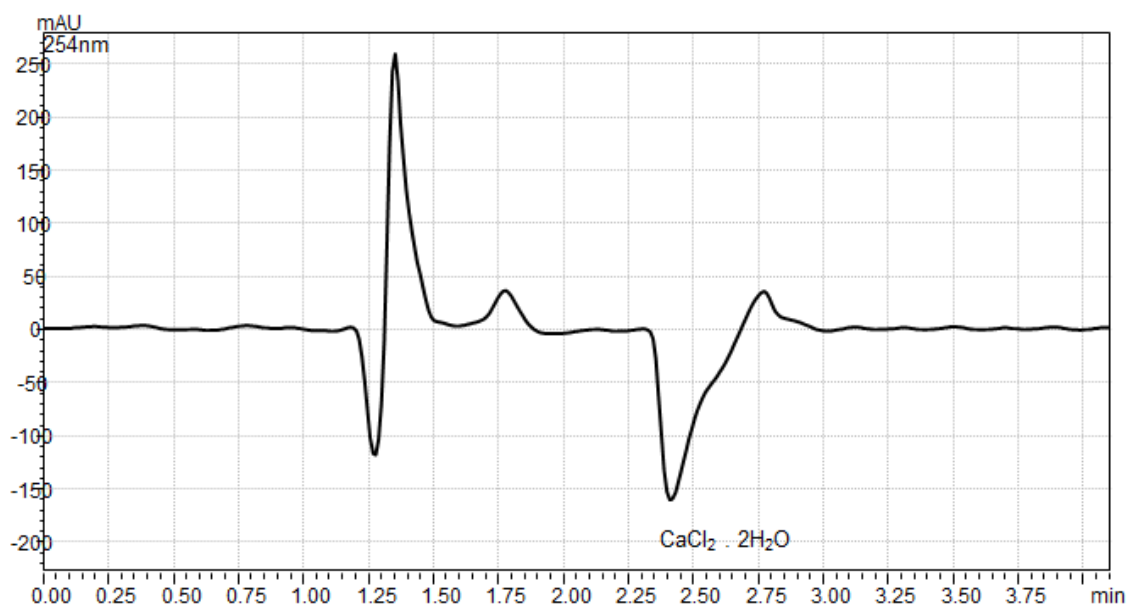
Obrázek 5. Chromatogram standardu chloridu vápenatého dihydrátu při složení mobilní fáze 10mM kyselina dusičná, 10mM síran měďnatý pentahydrát, upravená ethylendiaminem na pH 3,0/acetonitril 80:20



Tabulka 20. Vliv přidavku metanolu k mobilní fázi na retenční čas

Chlorid vápenatý dihydrát	
Poměr metanolu k vodné složce mobilní fáze	t_R (min)
5:95	2,42
10:90	2,51
15:85	2,62
20:80	2,73

Obrázek 6. Chromatogram standardu chloridu vápenatého dihydrátu při složení mobilní fáze 10mM kyselina dusičná, 10mM síran měďnatý pentahydrát, upravená ethylendiaminem na pH 3,0/metanol 95:5



5.2.8. Stabilita

Stabilita byla testována na roztoku standardu o koncentraci 10mM připravený podle 4.4. Tento roztok byl naplněn do dvou vialek a změřen v čase 0, poté jedna z nich byla uchovávána při teplotě 4°C a v temnu a druhý na světle za laboratorní teploty, přibližně 20°C. Takto uchovávané roztoky byly změřeny v časech 24, 48 a 72 hodin a výsledky jsou uvedeny v následující tabulce.

Tabulka 21., Stabilita

Chlorid vápenatý dihydrát				
t	A (4°C)	S_T (%)	A (≈ 20°C)	S_T (%)
0	1440424	0,00	1441967	0,00
24 h	1446762	0,44	1446872	0,34
48 h	1444732	0,30	1451463	0,66
72 h	1448995	0,60	1454625	0,88

Z tabulky vyplývá, že roztok je stabilní po dobu 72hodin, a to jak při uchovávání za snížené teploty a v temnu, tak při laboratorní teplotě a na světle a je možné ho po tuto dobu používat. Požadavek $S_T < 1\%$ byl splněn.

6. ZÁVĚR

Byly optimalizovány chromatografické podmínky pro stanovení vápenatých iontů v přípravku Calcii chloridi dihydrici inj. a následně byla provedena validace analytické metody, včetně testu vhodnosti chromatografického systému.

Byly nalezeny optimální chromatografické podmínky pro stanovení vápenatých iontů pomocí HPLC, a to:

Kolona:	Supelcosil LC-SCX; 25cm x 3mm; 5 μ m (Sigma-aldrich)
Mobilní fáze:	10mM kyselina dusičná, 10mM síran měďnatý pentahydrát upravená ethylendiaminem na pH 3,0
Dávkování:	10 μ l
Detekce:	254nm
Průtoková rychlost:	1ml/min
Teplota:	30°C
Typ eluce:	izokratický
Čas analýzy:	5 min

V rámci validace metody byla testována vhodnost chromatografického systému, a to účinnost chromatografické kolony vyjádřená počtem pater a asymetrie chromatografického píku. Dále byla testována opakovatelnost, přesnost, linearita, správnost, selektivita, robustnost a stabilita.

Počet pater (N) vyjadřující účinnost chromatografické kolony byl N=884, což splňuje požadavek aby N>500.

Asymetrie chromatografického píku (T) s hodnotou T= 1,86 splňuje požadavek na T<2.

Opakovatelnost splňuje podmínky, aby relativní směrodatná odchylka ploch píků a retenčních časů byly menší než 1%. Hodnota relativní směrodatné odchylky pro plochu píku byla 0,38% a pro retenční čas 0,19%.

Relativní směrodatná odchylka při testování přesnosti byla 0,94%, což splňuje požadavek na relativní směrodatnou odchylku menší než 1%.

Požadavek pro testování linearity na hodnotu korelačního koeficientu R>0,9990 byl s hodnotou R=0,999182 splněn.

Správnost metody je vyjádřena veličinou výtěžnosti (R_i), která má být v intervalu 100 \pm 5%, což s hodnotami výtěžnosti v rozmezí 99,06 – 102,01% bylo splněno. Další požadavek na správnost je, aby hodnota relativní směrodatné odchylky byla menší než 5%, což je s hodnotou relativní směrodatné odchylky 0,94% také splněno.

Při měření selektivity bylo prokázáno, že všechny nečistoty, kromě hořečnatých iontů, mají rozdílné retenční časy než vápenaté ionty. Proto pro selektivní stanovení by bylo vhodné jinou metodou identifikovat a kvantifikovat hořečnaté ionty, nebo danou metodu dále optimalizovat.

V rámci robustnosti metody byl testován vliv pH a složení mobilní fáze na retenční čas a plochu píku. Hodnoty retenčních časů se se změnami pH a složení mobilní fáze významně neměnily, na rozdíl od ploch píku, které se lišily v rozmezí 70,85% až 100,37%.

Požadavek na stabilitu menší než 1% byl splněn jak při uchovávání v temnu a za snížené teploty, tak i při uchovávání na světle a při laboratorní teplotě.

Z validace analytické metody vyplývá, že všechny parametry, kromě selektivity, odpovídají daným požadavkům. Proto při použití metody je nutné přihlídnout k uvedeným skutečnostem.

7. Citovaná literatura

1. Calcium chloride. *Wikipedia Free encyclopedia*. [Online] Únor 2014. http://en.wikipedia.org/wiki/Calcium_chloride.
2. **Kolektiv autorů.** *European pharmacopoeia 8.0*. Strasbourg : Druckerei C.H. Beck, 2013. ISBN: 978-92-871-7525-0.
3. Calcium chloride. *Wikipedia The free encyclopedia*. [Online] Únor 2014. http://en.wikipedia.org/wiki/Calcium_chloride.
4. Calcium chloride. *Drugs*. [Online] Únor 2014. <http://www.drugs.com/pro/calcium-chloride.html>.
5. **Kolektiv autorů.** *Český lékopis 2009*. Praha : Grada Publishing a.s., 2009. ISBN: 978-80-247-2994-7.
6. **Kolektiv autorů.** *Český lékopis 2005*. Praha : Grada Publishing a.s., 2005. ISBN: 80-247-1532-5.
7. **Kolektiv autorů.** *Český lékopis 2002*. Praha : Grada Publishing a.s., 2002. ISBN: 80-247-9007-6.
8. **Kolektiv autorů.** *Český lékopis 1997*. Praha : Grada Publishing a.s., 1997. ISBN: 978-80-247-0241-4.
9. **Kolektiv autorů.** *U.S. Pharmacopeia National Formulary 2012*. Rockville : U.S. Pharmacopeia, 2011. ISBN: 978-19-364-2400-9.
10. **Kolektiv autorů.** *British Pharmacopoeia 2012*. místo neznámé : Stationery office, 2011. ISBN: 978-01-132-2869-0.
11. **Klouda, Pavel.** *Moderní analytické metody*. Ostrava : Pavel Klouda, 2003. ISBN: 978-80-86369-07-5.
12. **Nováková, Lucie a Douša, Michal.** *Moderní HPLC separace v teorii a praxi I*. Praha : Europrint a.s., 2013. ISBN: 978-80-260-4243-3.
13. **Churáček, Jaroslav a Jandera, Pavel.** *Úvod do vysokoúčinné kapalinové kolonové chromatografie*. Praha : Nakladatelství technické literatury, 1984. ISBN: 04-607-85.
14. Chromatografie. *Wikipedie otevření encyklopedie*. [Online] Únor 2014. <http://cs.wikipedia.org/wiki/Chromatografie>.
15. HPLC. *Wikipedie otevřená encyklopedie*. [Online] Únor 2014. <http://cs.wikipedia.org/wiki/HPLC>.
16. Vybavení pro vysokoúčinnou kapalinovou chromatografii. *Ústav technologie ropy a alternativních paliv*. [Online] Únor 2014. http://cesmina.vscht.cz/trp/cz/hplc_57.
17. **Bedson, Peter a Prichard, Elizabeth.** *High performance liquid chromatography*. Cambridge : Royal society of chemistry, 2003. ISBN: 9780854044832.

18. Typy detektorů v HPLC. *HPLC.cz*. [Online] Březen 2014.
<http://www.hplc.cz/Teorie/detectors.html>.
19. Hmotnostní spektrometrie. *Wikipedie otevřená encyklopedie*. [Online] Duben 2014.
http://cs.wikipedia.org/wiki/Hmotnostn%C3%AD_spektrometrie.
20. **Fritz, James S.** Factors affecting selectivity in ion chromatography. *Journal of Chromatography A*. 2005, Sv. 1085, stránky 8-17.
21. **Timerbaev, A.R. a Bonn, G.K.** Complexation ion chromatography - an overview of developments and trends in trace metal analysis. *Journal of Chromatography*. 1993, Sv. 640, stránky 195-206.
22. **Sarzanini, Corrado.** Liquid chromatography: a tool for the analysis of metal species. *Journal of Chromatography A*. 1999, Sv. 850, stránky 213-228.
23. **Sarzanini, Corrado a Mentasti, Edoardo.** Determination and speciation of metals by liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*. 1997, Sv. 789, stránky 301-321.
24. Chromatografie iontových párů - principy. *HPLC.cz*. [Online] Květen 2014.
<http://www.hplc.cz>.
25. **Káš, Jan, Kodíček, Milan a Valentová, Olga.** *Laboratorní techniky biochemie*. Praha : VŠCHT Praha, 2006. ISBN: 80-7080-586-2.
26. **Nickless, G.** Trace metal determination by chromatography. *Journal of Chromatography A*. 1985, Sv. 313, stránky 129-159.
27. **Nováková, Lucie a Douša, Michal.** *Moderní HPLC separace v teorii a praxi II*. Praha : Europrint a.s., 2013. ISBN: 978-80-260-4244-0.
28. **Klímeš, Jiří a kol.** *Kontrolně-analytické hodnocení léčiv lékpisnými metodami*. Hradec Králové : Nucleus HK, 2011. ISBN: 978-80-87009-29-1.
29. Validace metod. *HPLC.cz*. [Online] Březen 2014. <http://www.hplc.cz/validace>.
30. **House, Thomas Graham, Park, Science a Road, Milton.** *Valid analytical methods and procedures*. Cambridge, UK : Royal Society of chemistry, 2000. ISBN: 0-85404-482-5.
31. **Chan, Chung Chow.** *Analytical method validation and instrument performance verification*. Hoboken, USA : Wiley, 2004. eISBN: 9780471463719.

8. PŘÍLOHY

8.1. *Tabulky*

Tabulka 1., Chlorid vápenatý (str. 13)

Tabulka 2., Stacionární fáze v HPLC a jejich typické použití (str. 17)

Tabulka 3., Vlastnosti detektorů v HPLC (str. 18)

Tabulka 4., Přehled validačních parametrů (str. 26)

Tabulka 5., Příprava mobilní fáze (str. 33)

Tabulka 6., Příprava roztoků pro měření linearitu (str. 34)

Tabulka 7., Retenční časy vápenatých a hořečnatých iontů za použití různých koncentrací proby (str. 35)

Tabulka 8., Retenční časy vápenatých a hořečnatých iontů za použití různého pH (str. 36)

Tabulka 9., Retenční časy vápenatých a hořečnatých iontů při různém množství acetonitrilu v mobilní fázi (str. 38)

Tabulka 10., Retenční časy vápenatých a hořečnatých iontů při různém množství metanolu v mobilní fázi (str. 39)

Tabulka 11., Počet teoretických pater (str. 40)

Tabulka 12., Asymetrie chromatografických píků (str. 41)

Tabulka 13., Opakovatelnost (str. 42)

Tabulka 14., Přesnost (str. 43)

Tabulka 15., Linearita (str. 44)

Tabulka 16., Správnost (str. 45)

Tabulka 17., Vliv pH na retenční čas (str. 46)

Tabulka 18., Vliv pH na plochu píku (str. 47)

Tabulka 19., Vliv přídavku acetonitrilu k mobilní fázi na retenční čas (str. 48)

Tabulka 20., Vliv přídavku metanolu k mobilní fázi na retenční čas (str. 49)

Tabulka 21., Stabilita (str. 50)