

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ
KATEDRA ANALYTICKÉ CHEMIE



OPTIMALIZACE HPLC METODY PRO STANOVENÍ PROPRANOLOLU
V TEKUTÝCH LÉČIVÝCH PŘÍPRAVCÍCH

Diplomová práce

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

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

Hradec Králové 2016

Tomáš Koval

„Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpal, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci jsou řádně citovány. Práce nebyla použita k získání jiného nebo stejného titulu.“

V Hradci Králové, 7. 9. 2016

.....

Tomáš Koval

Chtěl bych poděkovat své vedoucí diplomové práce paní doc. PharmDr. Ludmile Matysové, Ph.D. za odborné vedení, ochotnou pomoc a cenné rady, které mi pomohly při sepsání této práce.

Abstrakt

Univerzita Karlova v Praze

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra analytické chemie

Kandidát: Tomáš Koval

Školitel: doc. PharmDr. Ludmila Matysová, Ph.D.

Název diplomové práce: Optimalizace HPLC metody pro stanovení propranololu v tekutých léčivých přípravcích.

Obsahem diplomové práce je optimalizace a následná validace HPLC metody pro stanovení propranolol-hydrochloridu v tekutých léčivých přípravcích. Léčivé přípravky s obsahem propranolol-hydrochloridu se používají při terapii infantilních hemangiomů jako magistraliter připravený roztok. Při optimalizaci této metody byly zkoušeny dvě stacionární a různé mobilní fáze. Pro vlastní měření byla vybrána kolona Kinetex[®] C₁₈ (150x4,6 mm, velikost částic 5 μm) a izokratické eluce s mobilní fází fosfátového pufru (c=17,7mM) a acetonitrilu v poměru 30:70, přičemž pH této směsi bylo upraveno na 2,2. Průtok kolonou byl ponechán na hodnotě 1,2 ml/min. Validací bylo dokázáno, že je metoda vhodná a poskytuje přesné a správné výsledky.

Klíčová slova: propranolol, HPLC, optimalizace, tekuté léčivé přípravky, benzoan sodný

Abstract

Charles University in Prague

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Analytical Chemistry

Candidate: Tomáš Koval

Supervisor: doc. PharmDr. Ludmila Matysová, Ph.D.

Title of diploma thesis: Optimization of the HPLC method for determination of propranolol in liquid oral formulations

The purpose of thesis is the optimization and subsequent validation of HPLC method for determination of propranolol - hydrochloride in liquid oral formulations. A medicinal product containing propranolol – hydrochloride is used in the therapy of infantile haemangiomas as extemporaneous prepared solution. For method optimization were chosen Kinetex[®] C₁₈ column (150x4,6 mm, size of particles 5 μm) and isocratic elution of mobile phase containing phosphate buffer (c=17,7 mM) and acetonitrile in 30:70 ratio, with pH adjusted to 2,2. Flow rate was set at 1,2 ml/min. According to results of the validation, was found that this developed method for the analysis of the product is suitable, and provides accurate and precise results.

Keywords: propranolol hydrochloride, HPLC, optimization, Sodium benzoate, liquid oral formulations

Obsah

1. Úvod	9
2. Cíl a popis zadání práce.....	10
3. Teoretická část	11
3.1. Chromatografie	12
3.2. Rozdělení chromatografických metod	12
3.3. Vysokoučinná kapalinová chromatografie	14
3.4. UHPLC	14
3.5. Uspořádání kapalinového chromatografu.....	14
3.5.1. Typy elucí v HPLC	17
3.5.2. Vyhodnocování dat	17
3.6. Validace metody	18
3.6.1. Validace.....	18
3.6.2. Test způsobilosti systému.....	19
3.6.3. Parametry validace	19
3.7. Propranolol	20
4. Experimentální část.....	22
4.1. Chemikálie, standardy, vzorky	23
4.1.1. Analyzované přípravky	23
4.1.2. Standardy	23
4.1.3. Pufry pro kalibraci pH metru.....	23
4.1.4. Chemikálie pro analýzu.....	24
4.2. Přístroje, podmínky separace.....	24
4.2.1. Kapalinový chromatograf.....	24
4.2.2. Analytické váhy	25
4.2.3. Další přístroje.....	25

4.3.	Softwarové vybavení.....	25
4.4.	Pracovní postupy při přípravě vzorků a standardů.....	25
4.4.1.	Příprava zásobních roztoků	25
4.4.2.	Příprava pracovních roztoků.....	26
4.4.3.	Příprava fosforečnanového pufru.....	26
4.4.4.	Příprava octanového pufru	26
5.	Výsledky a diskuze	27
5.1.	Vývoj metody	28
5.1.1.	Měření na koloně Kinetex [®] C ₁₈	28
5.1.2.	Měření na koloně HILIC	37
5.1.3.	Výběr vnitřního standardu.....	42
5.1.4.	Optimální podmínky	44
5.2.	Validace.....	44
5.2.1.	Test vhodnosti chromatografického systému	44
5.2.2.	Opakovatelnost	46
5.2.3.	Linearita.....	47
5.2.4.	Přesnost	50
5.2.5.	Selektivita.....	51
5.2.6.	Stabilita.....	53
5.2.7.	Robustnost	54
6.	Závěr.....	57
7.	Seznam obrázků	58
8.	Seznam tabulek	59
9.	Použitá literatura	60

Seznam zkratek

ACN	acetonitril
BEN	benzoan sodný
BP	butylparaben
CRL	chemická referenční látka (CRS – Chemical Reference Substance)
ČL	Český lékopis
EP	ethylparaben
GC	plynová chromatografie (Gas Chromatography)
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie (High Performance Liquid Chromatography)
IEC	iontově – výměnná chromatografie (Ion Exchange Chromatography)
IH	infantilní hemangiom
LC	kapalinová chromatografie (Liquid Chromatography)
MF	mobilní fáze
MP	methylparaben
PP	propylparaben
PRO	propranolol
RSD	relativní směrodatná odchylka
SF	stacionární fáze
UHPLC	ultra-vysokoúčinná kapalinová chromatografie (Ultra High Performance Liquid Chromatography)
UV	ultrafialová oblast světelného spektra
UV-VIS	ultrafialová/viditelná oblast světelného spektra

1. Úvod

Propranolol je syntetický neselektivní beta blokátor. Jeho hlavní indikace se změnila z terapie kardiovaskulárních onemocnění (hypertenze, arytmie) na léčbu dětských hemangiomů, což je benigní nádor krevních cév. Předpokládá se, že propranolol inhibuje růst cév a zužuje cévy, nacházející se v hemangiomu. Propranolol je jeden z nejnovějších léčiv v terapii dětských hemangiomů a o mechanismech jeho účinku toho není moc známo. Jako možná vysvětlení se uznávají vazokonstrikce, inhibice angiogeneze (novotvorba krevních kapilár) a indukce apoptózy.

Jelikož se jedná o stanovení směsi látek ve vzorku, bylo vhodné využít pro stanovení chromatografickou metodu HPLC, což je vysokoúčinná kapalinová chromatografie. Tato separační metoda je určena k identifikaci, rozdělení a ke stanovení složek a jejich obsahů ve směsi. HPLC se využívá pro svou vysokou citlivost a selektivitu, která nám umožňuje kvalitativně a kvantitativně stanovit látky obsažené ve směsi, a to v krátkém čase.

2. Cíl a popis zadání práce

Cílem diplomové práce je optimalizovat a validovat HPLC metodu pro analýzu tekutého léčivého přípravku s obsahem propranol-hydrochloridu.

Teoretická část je věnována problematice HPLC a farmakologickým vlastnostem propranololu. Experimentální část zahrnuje nejprve optimalizaci složení mobilní fáze, stanovení optimálních chromatografických podmínek, výběr vnitřního standardu a analýzu léčivého přípravku.

Optimalizovaná metoda bude i validována. Vzhledem k požadavkům budou stanoveny následující validační parametry: test vhodnosti systému, linearita, přesnost, selektivita, stabilita a robustnost.

3. Teoretická část

3.1. Chromatografie

Chromatografie nachází v analytické chemii velmi široké využití, jelikož se jedná o jednu z neúčinnějších, fyzikálně-chemických, separačních metod. Podstatou chromatografie je rozdělování jednotlivých složek vzorku mezi dvě fáze. První fází je fáze stacionární (SF), která je nepohyblivá. Druhá fáze je mobilní (MF), tedy pohyblivá a slouží také jako nosič pro stanovovaný vzorek. Tyto dvě fáze se od sebe vzájemně odlišují některou ze základních fyzikálně-chemických vlastností. Při průtoku vzorku a MF chromatografickým systémem dochází k interakcím složek analytu mezi stacionární a mobilní fází. Látky, které se více poutají ke stacionární fázi, jsou zadržovány v koloně delší dobu, než analyty, které se ke stacionární fázi poutají mírně. Z toho důvodu vstupují látky do detektoru postupně a je umožněna jejich přesná a správná analýza. Výsledkem chromatografického měření je chromatogram.[1]

3.2. Rozdělení chromatografických metod

Chromatografické metody se mohou rozdělit podle několika kritérií:

Skupenství MF

- Plynová chromatografie
- Kapalinová chromatografie

Uložení SF

- Kolonová chromatografie
- Plošná chromatografie:
 - Papírová chromatografie
 - Tenkovrstvá chromatografie

Mechanismus separace

- Rozdělovací chromatografie:

Při rozdělovací kapalinové chromatografii se používá jako MF a SF směs dvou vzájemně nemísitelných kapalin. Stacionární fáze je v tomto případě zakotvená na vhodném, inertním nosiči. Retenční charakteristiky analytů závisí na rozdílné rozpustnosti v jednotlivých fázích, lišící se polaritou. Při

této metodě závisí na vzájemné nemísitelnosti SF a MF. Může docházet k postupnému vymývání SF z kolony a tedy k postupnému snižování životnosti kolony. Tomuto problému se zamezilo použitím chemicky vázaných kapalin na vhodný nosič.[1]

- Adsorpční chromatografie

Tato metoda je založená na interakci mezipovrchových přitažlivých sil mezi pevnou stacionární fází a měřeným analytem. Měřený analyt se rozděluje mezi MF a SF na základě střídání adsorpce a desorpce. Stacionární fází bývá v těchto případech silikagel nebo oxid hlinitý. Speciálním příkladem adsorpční chromatografie je chromatografie na tenké vrstvě.[2]

- Gelová chromatografie

Gelová chromatografie je metoda založená na rozdělování analytů podle velikosti jejich molekul. Menší molekuly pronikají hlouběji do pórů gelu, naplněných mobilní fází, zatímco větší molekuly zůstávají více na povrchu stacionární fáze a eluují se dříve. Stacionární fází je tedy gel, jehož vlastnosti se volí podle charakteru stanovovaných látek. Využívá se především pro stanovení biopolymerů.[3]

Gel může být hydrofilní (síťovaný dextran) nebo hydrofobní (kopolymery styrenu a divinylbenzenu).[4]

- Iontově – výměnná chromatografie

U IEC je stacionární fází iontoměnič, obsahující pevně navázané kladně nebo záporně nabitě funkční skupiny, na které je vázán protion s opačným nábojem. Při průtoku MF s analytem dochází k výměně těchto protiontů za ionty vyskytující se v mobilní fází nebo ve vzorku a na základě tohoto mechanismu dochází k separaci jednotlivých, stanovovaných látek. Důležitou charakteristikou při měření je pH mobilní fáze, protože nastavená hodnota pH určuje náboje iontoměniče, mobilní fáze a analytu.[5]

3.3. Vysokoúčinná kapalinová chromatografie

Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC) je druhem kolonové kapalinové chromatografie, využívající vysokotlaká čerpadla, které umožňují průtok MF kolonou menšího průměru, přičemž je v této koloně stacionární fáze vázána na částice mnohem menších rozměrů. [6]

K separaci při HPLC dochází díky interakcím složek vzorku se stacionární fází naplněnou v koloně a pod vysokým tlakem kolonou procházející kapalnou fází mobilní. Jsou zde využitelné všechny dříve popsané možnosti mechanismů separace – adsorpce, rozdělování na základě různé rozpustnosti, iontová výměna či využití pórovitých a síťových vlastností gelů. Po vlastním nástřiku analytu na kolonu, dochází k opakovanému ustavování rovnováhy mezi SF a MF, přičemž dochází postupně k separaci jednotlivých látek ze vzorku. Detekce v systému je prováděna různými typy detektorů. Výsledkem chromatografického měření je pík, což je signál převedený z detektoru do vyhodnocovacího programu. [7]

HPLC má mnoho předností. Jak již bylo řečeno, umožňuje zároveň analýzu kvalitativní i kvantitativní, je k ní potřeba jen minimální množství vzorku a analýza je rychlá, přesná a citlivá. Na rozdíl od plynové chromatografie je HPLC vhodná i k analýze netěkavých či tepelně nestálých vzorků. [7]

3.4. UHPLC

Ultra-High Performance Liquid Chromatography je velmi perspektivní chromatografická metoda, využívající chromatografické kolony, jež obsahují stacionární fázi s částicemi menšími než 2 μm . Při UHPLC se pracuje s vyššími tlaky než při HPLC, což umožňuje ještě rychlejší dobu analýzy stanovovaných vzorků, při stejně dobré separaci jako u HPLC. [8]

3.5. Uspořádání kapalinového chromatografu

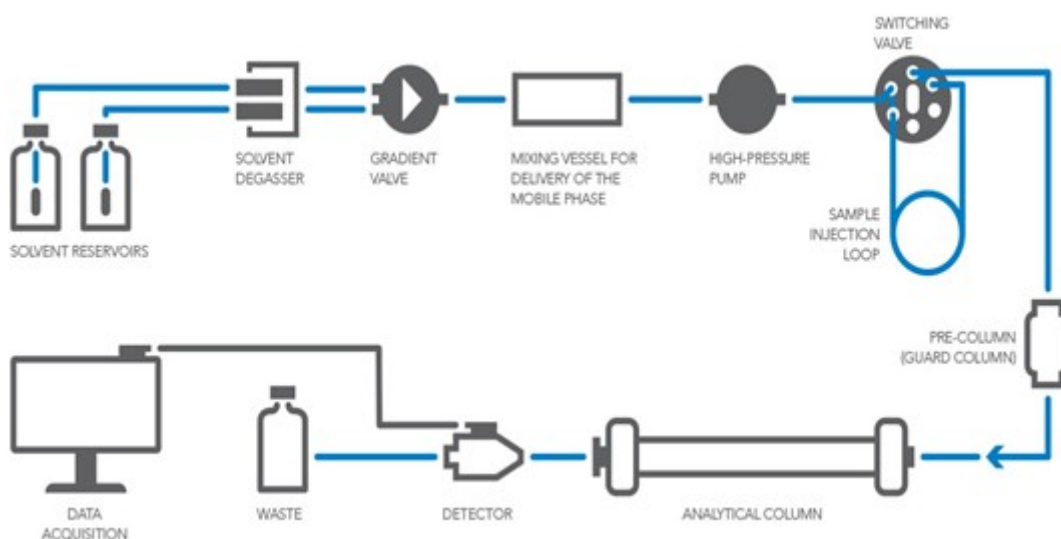
Součástí chromatografu je vždy jeden nebo více zásobníků MF (solvent reservoirs), která se musí degasserem (solvent degasser) odplynit. Požadované složení mobilní fáze zajišťuje řídicí jednotka (gradient valve), která bývá připojena na ovládací softwarový program. Mobilní fáze se do systému kolon dostává pomocí vysokotlakého čerpadla (high-pressure pump). Čerpadla dosahují průtoků od několika mikrolitrů do několika

mililitrů za minutu a pracují při tlaku od 15 až do 40 MPa. Při těchto vysokých hodnotách tlaků je podstatné správné upevnění spojek, aby se předešlo úniku kapaliny ze systému.[9]

Používají se pístová čerpadla, které jsou v zapojená za sebou v sérii nebo čerpadla využívající dvou a více pístů. Dalším typem čerpadel jsou membránová čerpadla, která mají dva pracovní prostory, první s pístem pro hydraulickou kapalinu, druhý pro mobilní fázi, oddělené membránou. Třetím typem čerpadla je čerpadlo typu injekční stříkačky, které sice nepojme velké objemy MF, ale pro změnu nezpůsobuje žádné pulzy, které by mohly ovlivňovat výsledky. [10]

V následujícím kroku dochází k nástřiku vzorku do systému. Děje se tak pomocí dávkování injekční stříkačkou, pomocí dávkovacího ventilu nebo autosampleru (switching valve). [11]

Autosampler se používá v automatizovaných analýzách, kde je zapotřebí dávkovat pravidelně, přesně a správně několik desítek až stovek vzorků denně. Principy nástřiku se mohou v jednotlivých systémech lišit. V HPLC se nejčastěji využívají šesticestné ventily, které poskytují kontinuální oplach dávkovací jehly, nebo několik třicestných ventilů, které zajišťují kontinuální průtok MF kolonou.[6]



Obrázek 1 - Schéma kapalinového chromatografu [12]

Vzorek nesený mobilní fází se poté dostává do předkolony (pre-column). Předkolony řeší dva nejčastější problémy při HPLC. Prvním je skutečnost, že se mohou stanovované chemické látky nevratně vázat na části stacionární fáze, a tím snižovat účinnost analytických kolon. Dále je také třeba počítat s možností přítomnosti nečistot,

kteře by mohly analytickou kolonu znečiřtit, zúžit průtok kolonou, což má za následek prudké zvýšení tlaku v koloně a celkově hlavní kolonu poškodit. Předkolony obsahují většinou stejnou stacionární fázi na stejném nosiči, jsou ale podstatně menší délky a jsou také levnější. Při známce znečiřtění je jednodušší a levnější výměna těchto předkolon. [13]

Z předkolony pokračuje směs do kolony (analytical column). Analytická kolona je trubice nebo kapilára, která je rovnoměrně naplněná nebo pokrytá stacionární fází. V koloně se setkává mobilní fáze se stacionární fází a dochází k separaci jednotlivých látek na základě jejich fyzikálně-chemických vlastností. [14]

Kolony pro HPLC jsou ocelové nebo skleněné, dlouhé 5-30 cm a s vnitřním průměrem 3-5 mm. Požadavek na náplň kolony je homogennost a rovnoměrná distribuce částic. Z toho důvodu se používají kolony plněné a přímo testované samotným výrobcem kolony. [1]

Po separaci v koloně procházejí separované části analytu detekční celou detektoru (detector). Nejpoužívanějšími detektory v HPLC jsou spektrofotometrické detektory, které měří absorpenci elektromagnetického záření zvolené vlnové délky. Detektory využívající spektrofotometrických metod se vyznačují vysokou citlivostí (10^{-9} až 10^{-10} g/ml) a lze je využívat při gradientové eluci. K detekci se využívá především oblast UV spektra, méně poté viditelná oblast. [19]

V praxi jsou nejpoužívanější UV detektory:

- UV detektor s fixní vlnovou délkou (nejčastěji 254, 280 nm),
- UV-VIS detektor s nastavitelnou vlnovou délkou,
- scanning UV detektor (snímá absorpční spektrum v maximu píku hodnocené sloučeniny),
- diode array detektor (hodnotí látku při několika vlnových délkách a porovnává poměry absorpencí).

V HPLC se používají i fluorimetrické detektory, a to v případech, kdy analyt vykazuje fluorescenci. Nefluoreskující látky lze v jiných případech vhodně převést na fluoreskující deriváty. Fluorimetrické detektory jsou citlivější než UV detektory (10^{-9} až 10^{-12} g/ml), selektivnější, použitelné při gradientové eluci, ale jsou méně univerzální. [19]

U HPLC spojené s detekcí pomocí hmotnostní spektrometrie se nejprve musí odstranit mobilní fáze ze vzorku. Molekuly vzorku jsou poté v plynném stavu ionizovány a separovány podle hmotnosti nebo náboje. Hmotností spektrometry jsou vysoce citlivé a selektivní. Jejich nevýhodou je vysoká cena přístroje. [15]

Jako další detektory v HPLC se mohou použít refraktometrické a elektrochemické detektory.

3.5.1. Typy elucí v HPLC

HPLC analýzu můžeme provádět dvěma způsoby, a to izokratickou, nebo gradientovou elucí.

Při izokratické separaci se složení mobilní fáze nemění po celou dobu analýzy. Výhodou je stabilní základní linie výsledného chromatogramu.

Při gradientové eluci se pracuje s mobilními fázemi odlišného složení, které se míchají ve směšovači HPLC podle předem zvoleného programu. Toto uspořádání umožňuje rychlou eluci složek, které bývají silněji zadrženy v koloně a jejich píky v chromatogramu jsou potom užší a ostřejší oproti izokratické separaci. Díky tomu je možné tyto složky detekovat i při nižších koncentracích. Nevýhodou je nezbytný čas na ustanovení rovnováhy v koloně na počáteční složení mobilní fáze a možnost použití jen některých typů detektoru.[16]

3.5.2. Vyhodnocování dat

3.5.2.1. Kvantitativní stanovení

Látka se kvantitativně stanovuje výpočtem plochy chromatografického píku a množstvím látky. Při kvantitativní analýze využíváme tyto metody:

- **Metoda vnějšího standardu** – porovnáváme odezvu píku zkoušené látky s odezvou píku nastříknutého standardu o známé koncentraci. Jako vnější standardy se používají standardy stanovované látky (CRS, CRL) nebo standardy jednotlivých látek ve vzorku. [17]

- **Metoda vnitřního standardu** – porovnáváme poměr ploch píků stanovované látky a vnitřního standardu, který se přidává přímo ke zkoumanému vzorku a také k porovnávacímu roztoku.
Tento vnitřní standard nesmí obsahovat nečistoty s retenčním časem stanovované látky, musí se eluovat v blízkosti stanovované látky a nesmí se vzorkem reagovat.[17]
- **Metoda kalibrační křivky** – obsah stanovované látky stanovíme na základě kalibrační závislosti koncentrací kalibračních roztoků a odezvě. Koncentraci stanovované složky ve vzorku určujeme z vypočtené rovnice kalibrační křivky a odpovídajícího grafu. [16]
- **Metoda normalizace** – jedná se o metodu, při které vypočítáme procentuální obsah analyzované látky z celkové plochy všech píků, kromě píků rozpouštědel, přidaných činidel a zanedbatelných píků.[16]

3.5.2.2. *Kvalitativní analýza*

Při kvalitativní analýze stanovujeme retenční čas zkoumané látky, který odpovídá zadržování látky v systému. Stanovovaná složka stráví v koloně určitou dobu, která se nazývá retenční čas, označovaný jako t_r . Pro každou látku je retenční čas na určité koloně a za daných podmínek specifický. [17]

3.6. *Validace metody*

3.6.1. **Validace**

Validace je soubor procesů sloužící k zajištění metody, která je přesná, správná a vhodná pro svůj zamýšlený účel. Před validací je nejprve nutné zjistit optimální podmínky separace a pomocí experimentálních dat tyto hodnoty ověřit. Zjištěné data se při validaci zapisují do validačního protokolu.

Cílem validace je stanovení jednotlivých podmínek, při kterých je zkušební postup vhodný a při opakovaném stanovení ve stejné laboratoři zajišťuje jeho spolehlivost. Validace se provádí při vývoji každé nové metody, při změně metody již existující a při přenosu metody do jiných laboratoří. [18]

3.6.2. Test způsobilosti systému

Test způsobilosti systému (system suitability test, SST) je soubor měření, který se používá pro ověřování vhodnosti dané chromatografické metody.

Při tomto testu se určují parametry analytického systému jako celku. Zjišťuje se opakovatelnost, faktor symetrie, rozlišení, kapacitní faktor a počet teoretických pater.[19]

3.6.3. Parametry validace

3.6.3.1. *Správnost*

Správnost je definována jako číselná odchylka naměřené hodnoty od hodnoty správné. Správnou hodnotu zjistíme jinou, nezávislou metodou s již ověřenou správností, analýzou placeba s přidavkem standardní látky, nebo analýzou vzorku s přidavkem standardní látky. Správnost lze vyjádřit jako výtěžnost, která by měla být v intervalu $100 \pm 5\%$ s RSD menší než 5%. [9]

3.6.3.2. *Přesnost*

Přesnost je vlastnost, která vyjadřuje míru shody mezi jednotlivými výsledky metody, která je prováděna opakovaně s jedním vzorkem. Přesnost za stejných provozních podmínek, tzn. prováděnou jedním laborantem na stejném přístroji se stejnými činidly, je **opakovatelnost**. Přesnost měření mezi laboratořemi vyjadřuje pojem **reprodukovatelnost**. Výsledky měření přesnosti vyjadřujeme jako relativní směrodatnou odchylku z šesti stanovení a její hodnota by neměla být větší než 5%. [9]

3.6.3.3. *Linearita*

Linearita je schopnost metody poskytovat výsledky přímo úměrné koncentraci stanovované látky ve vzorku. Vyjadřuje se buď graficky, jako závislost výsledků na koncentraci stanovované látky, nebo matematicky pomocí výsledků lineární regresní analýzy. Uvádí se korelační faktor, který je mírou linearity, směrnice přímky, hodnota y a chyby stanovení všech těchto hodnot. Doporučuje se proměření minimálně pěti koncentrací.[19]

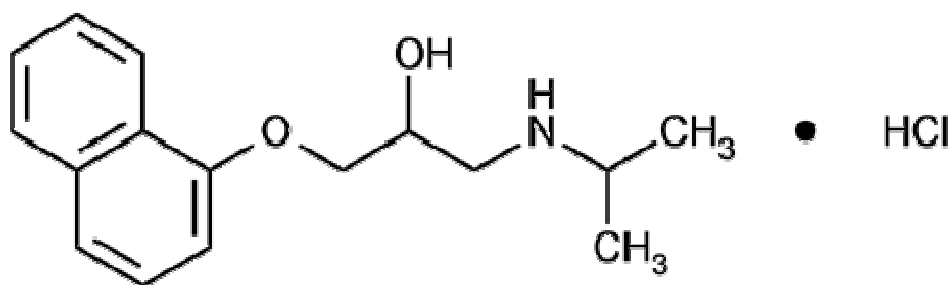
3.6.3.4. *Robustnost*

Robustnost charakterizujeme jako schopnost metody zůstat nedotčena malými, ale záměrnými odchylkami v parametrech metody. Poskytuje údaj o spolehlivosti metody při normálním používání. U metod jako je HPLC sledujeme především vliv složení MF, vliv pH a teploty, či rychlost průtoku. [20]

3.6.3.5. *Selektivita*

Selektivita je schopnost metody změřit správně a specificky stanovovanou látku v přítomnosti jiných látek (např. další účinné látky v kombinovaném přípravku, rozkladné produkty, nečistoty), které lze ve vzorku očekávat. Vyhodnocení se provádí na základě porovnání chromatogramů standardu a vzorku bez analyzované látky, jež ale obsahuje všechny ostatní složky přípravku. [20]

3.7. *Propranolol*



Obrázek 2 - Vzorec propranolol-hydrochloridu [21]

Vzhled: Bílý nebo téměř bílý prášek.

Sumární vzorec: C₁₆H₂₂ClNO₂

(2*RS*)-1-(isopropylamino)-3-(naftalen-1-yloxy)propan-2-ol-hydrochlorid.

Rozpustnost: Dobře rozpustný ve vodě a v ethanolu 96%.

Obsah 99,0 % až 101,0 % sloučeniny C₁₆H₂₂ClNO₂, počítáno na vysušenou látku.

M_r: 295,81

CAS 318-98-9 [22]

Použití: Propranolol patří do skupiny neselektivních beta-blokátorů, nevykazující vnitřní sympatomimetickou aktivitu (ISA). Farmakologicky se řadí mezi antihypertenziva a antiarytmika.

Propranolol se využívá pro léčbu arteriální hypertenze, tachyarytmie, supraventrikulární arytmie, při úzkostných stavech a při profylaxi migrény. V pediatrii našel propranolol využití při léčbě infantilních hemangiomů, což jsou nejčastější cévní tumory u novorozenců.

Podle kazuistiky Leaute-Labreze, et al. (2008, s. 2649 – 2651), ve které byl sledován účinek propranololu na IH, došlo k postupné regresi IH. Při této léčbě vykazoval propranolol velmi dobrý účinek, bezpečnost a dobrou toleranci.[23]

4. Experimentální část

4.1. *Chemikálie, standardy, vzorky*

4.1.1. Analyzované přípravky

Propranololi hydrochloridi solutio cum natrii hydrogenophosphate, ČL 2009, připraveno v Lékárně TN, Praha 4, datum přípravy 16. 01. 2015

Propranololi hydrochloridum	0,20 g
Acidum citricum monohydricum	0,85 g
Natrii hydrogenophosphas dodecahydricus	0,70 g
Natrii benzoas	0,05 g
Sirupus simplex	64,0 g
Aqua pro injectione	ad 114,0 g (ad 100,0 ml)

Propranololi hydrochloridi solutio cum acido citrico, ČL 2009, Připraveno v Lékárně TN, Praha 4, datum přípravy 16. 01. 2015

Propranololi hydrochloridum	0,20 g
Acidum citricum monohydricum	0,20 g
Natrii benzoas	0,05 g
Sirupus simplex	64,0 g
Aqua pro injectione	ad 114,0 g (ad 100,0 ml)

4.1.2. Standardy

Propranolol-hydrochlorid pro test způsobilosti CRL (propranolol hydrochloride for performance test CRS), Reference standard, Ph. Eur., Council of Europe, Batch: 3.1, Code: P3600000

4.1.3. Pufry pro kalibraci pH metru

Technical buffer, WTW[®], pH=4.01, model TPL 4, Bestel Nr. 108800

Technical buffer, WTW[®], pH=7.00, model TPL 7, Bestel Nr. 108802

4.1.4. Chemikálie pro analýzu

Acetonitril (Acetonitrile), CHROMASOLV[®] gradient grade, for HPLC, Sigma Aldrich[®], Německo, šarže STBF5762V

Laurylsíran sodný (Sodium lauryl sulfate), Merck[®] s.r.o., Praha

Propranolol-hydrochlorid (Propranololi hydrochloride), Sigma Aldrich[®], Německo

Benzoan sodný (Natrii benzoas), Sigma Aldrich[®], Německo

Ultračistá voda, čištěno systémem MILLI Q, Millipore, Bedford, MA, USA

Methylparaben (Methyl 4-hydroxybenzoate), ≥ 99%, Aldrich[®], Německo, š.

Ethylparaben (Ethyl 4-hydroxybenzoate), ≥ 99%, Aldrich[®], Německo, š. 35129-021

Propylparaben (Propyl 4-hydroxybenzoate), ≥ 99%, Fluka[®], Německo, š. 33505086

Butylparaben (Butyl 4-hydroxybenzoate), ≥ 99%, Fluka[®], Německo, š. 426009/1

Kyselina fosforečná 85%, Merck KgaA, Německo, šarže: K43367273223

4.2. *Přístroje, podmínky separace*

4.2.1. Kapalinový chromatograf

Sestava: Shimadzu[®] LC – 2010C, Shimadzu[®] corporation, Japonsko

Kolona: Kinetex[®] 5u XB-C₁₈ 100A, vnitřní průměr 4,6 mm, délka 150 mm, velikost částic 5 μm, Phenomenex, Česká republika

HILIC Kinetex[®] 100A, LC Column, vnitřní průměr 4,6 mm, délka kolony 50 mm, velikost částic 2,6 μm, Phenomenex, Česká republika

Detektor: Nexera X2 SPD-M30A Photo-diode array UV-Vis detector

Detekce: UV; 230 nm, 250 nm, 292 nm

Dávkování: 5 μl

Režim: gradientový, izokratický

Průtok: 0,8-1,8 ml/min

Teplota: t=25°C

4.2.2. Analytické váhy

Sartorius® CPA124S, Sartorius Weighing Technology GmbH, Goettingen, Germany

Sartorius® MSE225S – 1CE – DI, Sartorius Weighing Technology GmbH, Goettingen, Germany

4.2.3. Další přístroje

Filtrační zařízení pro přípravu ultračisté vody Milli-Q RG, Millipore, USA

pH metr SCHOTT CG843P, SI Analytics, Německo

4.3. Softwarové vybavení

Microsoft Office Excel 2016

LabSolutions, verze 5.57, Shimadzu® corporation, Japonsko

4.4. Pracovní postupy při přípravě vzorků a standardů

4.4.1. Příprava zásobních roztoků

4.4.1.1. Zásobní roztok standardů

Pro přípravu zásobního roztoku standardů jsem vycházel z níže citované práce autorů Zahálka, Matysová et al. Do 20ml odměrné zkumavky bylo naváženo 40,00 mg propranolol hydrochloridu a 10,00 mg benzoanu sodného. Po rýsku se odměrná baňka doplnila směsí ultračisté vody a ACN v poměru 50:50 (dále jako ředící směs). [24]

4.4.1.2. Zásobní roztok vnitřního standardu

Do 100,00ml odměrné baňky bylo naváženo 120 mg ethylparabenu a doplněno po rýsku ředící směsí. [24]

4.4.2. Příprava pracovních roztoků

4.4.2.1. Pracovní roztok standardů a vnitřního standardu

Do 25ml odměrné baňky bylo přidáno 1,0 ml zásobního roztoku standardů, 1,0 ml zásobního roztoku vnitřního standardu a doplněno po rysku ředící směsí. [24]

4.4.2.2. Roztok nečistot

10,0 mg propranolol-hydrochloridu pro test způsobilosti CRL se rozpustilo v 10,0 ml odměrné baňce v mobilní fázi a bylo doplněno po rysku. [24]

4.4.3. Příprava fosforečnanového pufru

Podle ČL 2009 byl připraven fosforečnanový pufr o koncentraci 17,7 mM. 2,7614 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ bylo rozpuštěno v 1000,0 ml H_2O a jeho pH upraveno kyselinou fosforečnou R na hodnotu 2,2. [22]

4.4.4. Příprava octanového pufru

25,0 g octanu amonného R se rozpustilo ve 25,0 ml vody R a přidalo se 38,0 ml kyseliny chlorovodíkové RS. Dále bylo upraveno pH pufru na 3,5 přidáním amoniaku zředěného RS_1 a doplněno vodou R na 100,0 ml.

5. Výsledky a diskuze

5.1. Vývoj metody

Podmínky pro vývoj této metody jsem zvolil podle Českého lékopisu 2009 a podle práce autorů Zahálka, Matysová et al. [24]

5.1.1. Měření na koloně Kinetex[®] C₁₈

Mobilní fáze:

1,60 g laurylsíran sodný

0,31 g tetrabutylamonium dihydrogenfosfát

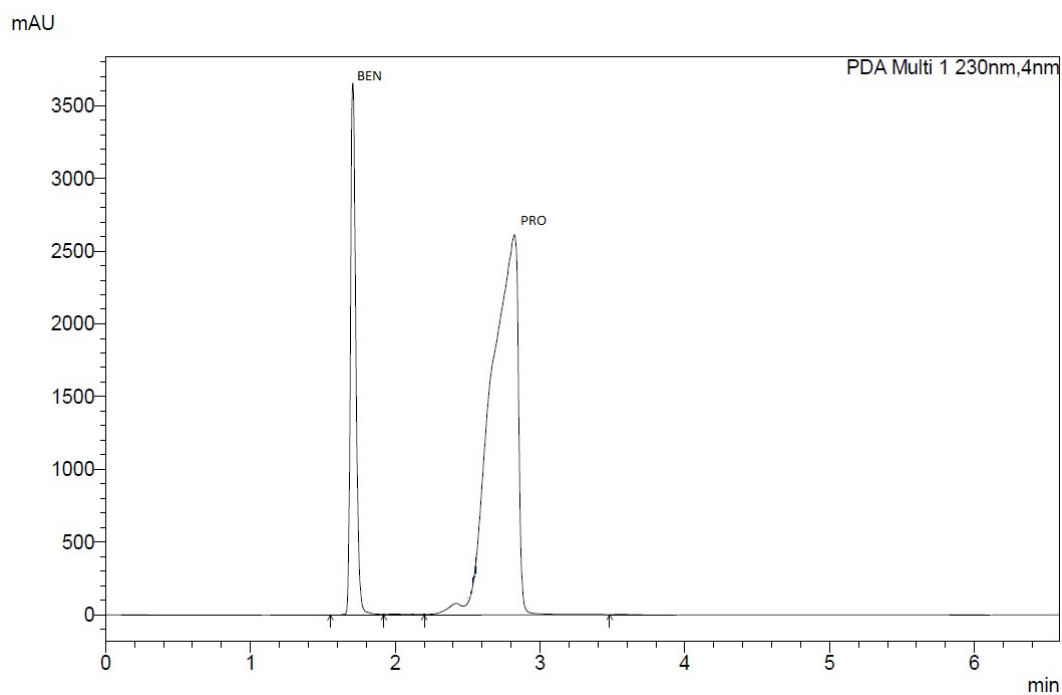
1 ml kyselina sírová koncentrovaná (c=98%)

450 ml vody

550 ml acetonitril

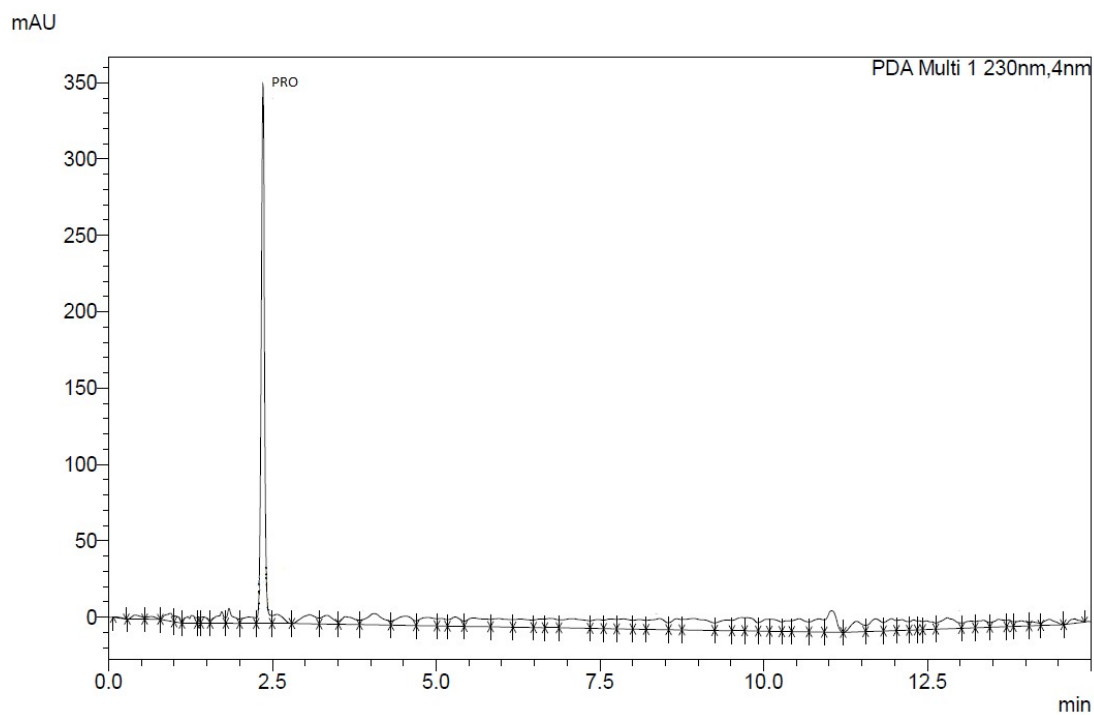
upraveno hydroxidem sodným na pH na 3,3

Při těchto koncentračních poměrech by se kolona mohla znečistit. Pomocí mísení různých poměrů mobilní fáze ve zkumavkách bylo zjištěno, že zákal nevzniká až při poměru MF vodná fáze:ACN 29:71. Při poměru 50:50 vykazuje pík propranololu špatný faktor symetrie, což jde vidět na Obrázku 3.



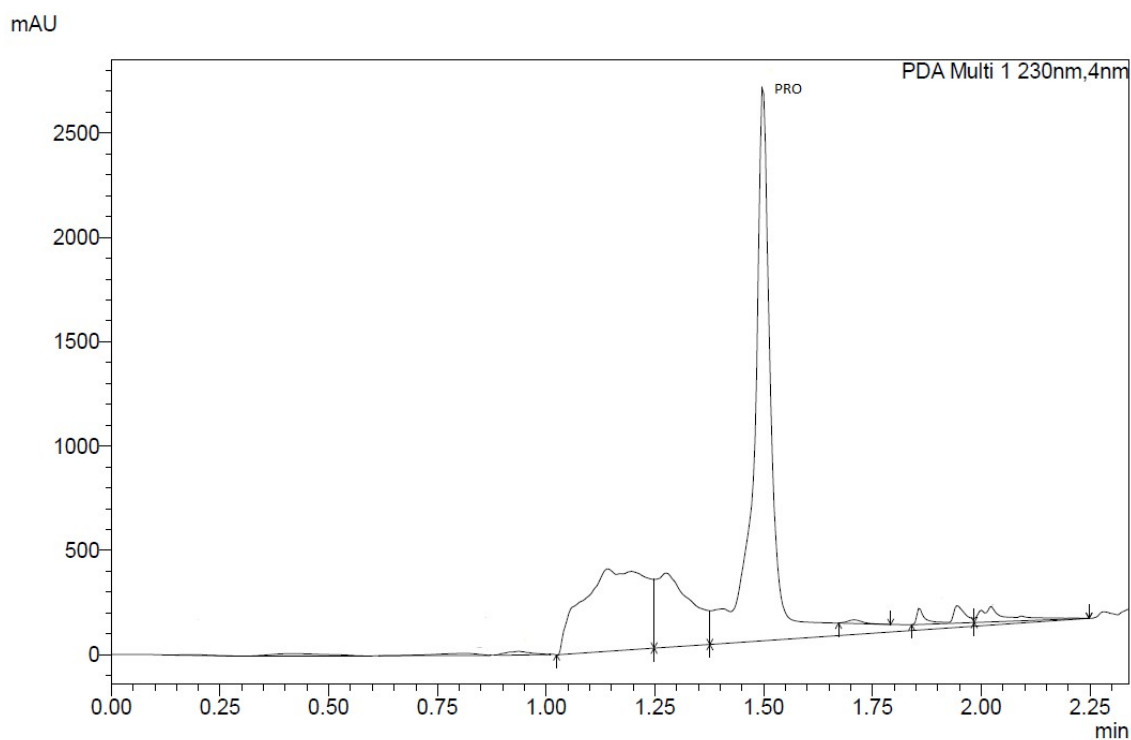
Obrázek 3 – Nástřik propranololu a benzoanu sodného v MF laurylsíran:ACN v poměru 50:50.

Při měření standardu nečistot (Obrázek 4) se na chromatogramu objevil pouze pík propranololu. Dále byl chromatogram bez náznaku jakéhokoliv píku nečistot.



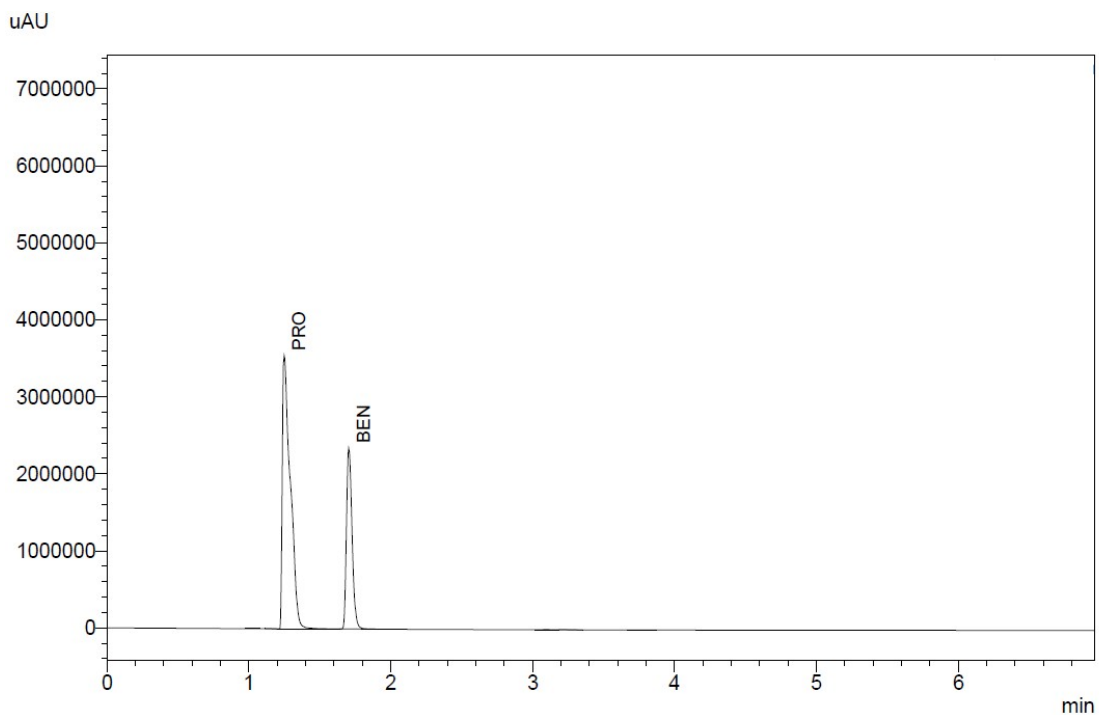
Obrázek 4 - Nástřik standardu nečistot v MF laurylsíran:ACN v poměru 29:71.

Měření roztoku nečistot pouze v acetonitrilu jako MF (Obrázek 5) nepřineslo žádný efekt v podobě vyseparování nečistot, navíc byl přítomen šum základní linie, který mohlo způsobit krátké a nekvalitní promytí kolony.



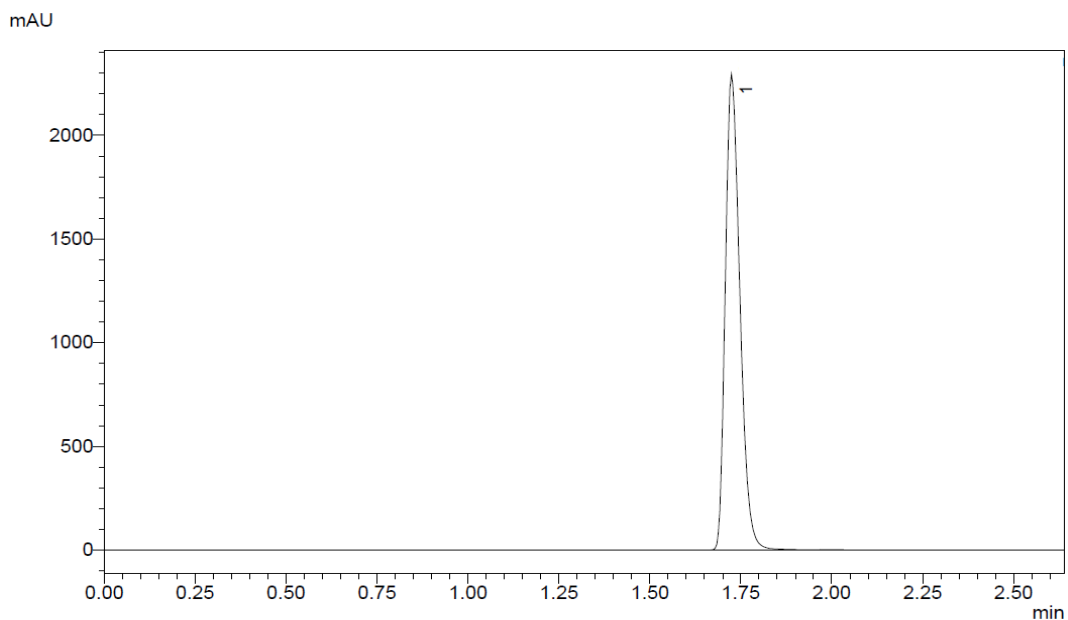
Obrázek 5 - Nástřík standardu nečistot v MF laurylsíran:ACN v poměru 0:100.

Z důvodu špatné, případně žádné, eluce nečistot byla MF změněna na fosforečnanový pufr (pH=2,5; c=17,7mM) : ACN. Na níže přiloženém chromatogramu (Obrázek 6) je nástřík standardů propranololu a benzoanu sodného v této MF v poměru 50:50.



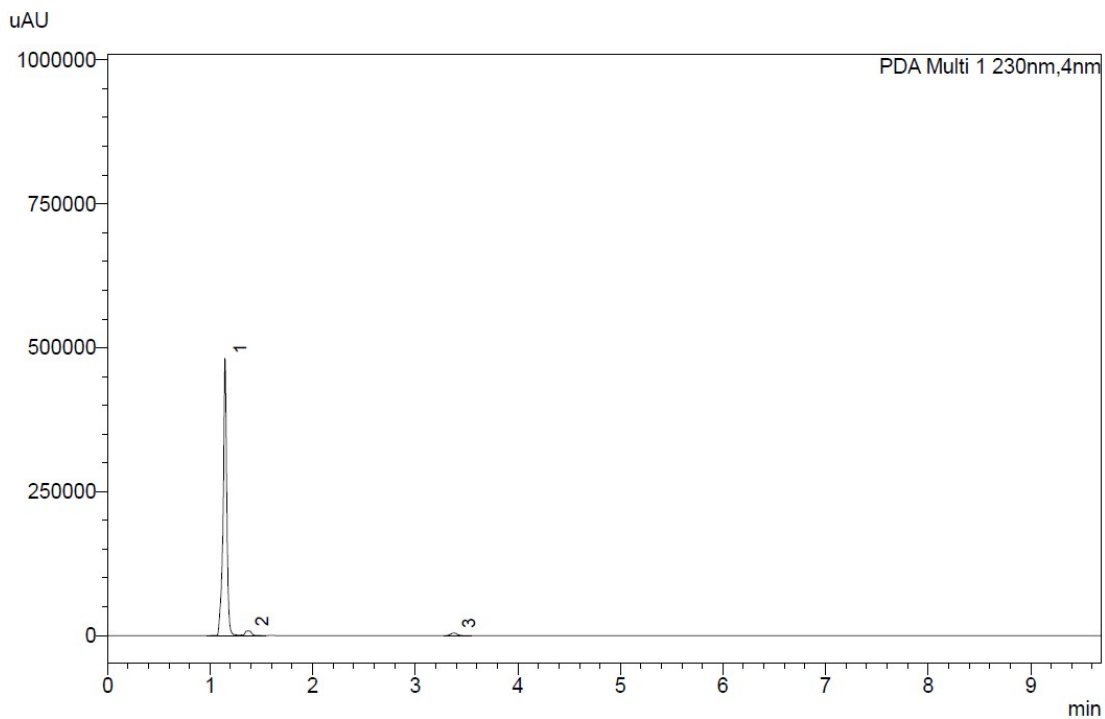
Obrázek 6 - Nástřik propranololu a benzoanu sodného v MF fosforečnanový pufr:ACN 50:50.

Při těchto podmínkách nedošlo k eluci nečistot při měření standardu nečistot (Obrázek 7). Na chromatogramu lze vidět pouze pík propranololu.

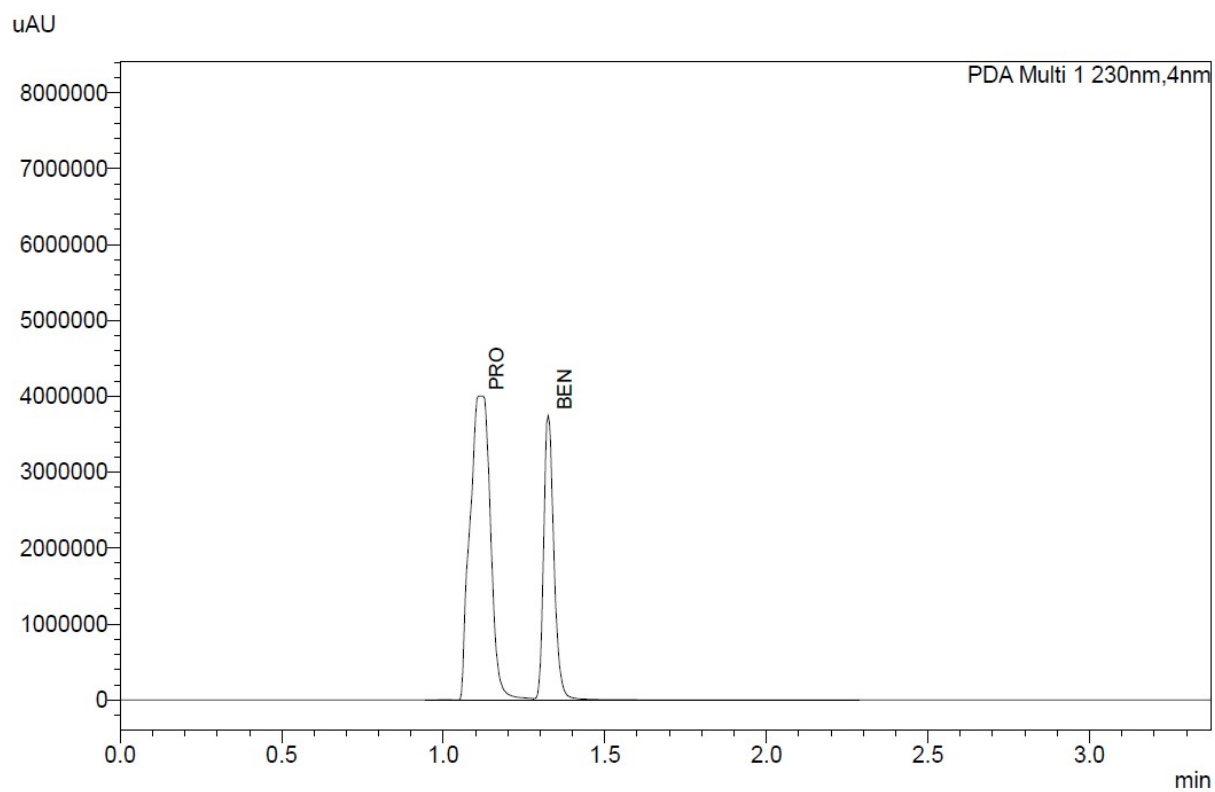


Obrázek 7 – Měření standardu nečistot v MF fosforečnanový pufr:ACN 50:50. Na chromatogramu je zaznamenán pouze pík propranololu (1).

Při změně pH fosforečnanového pufru z 2,5 na 2,2 došlo k eluci dvou nečistot při poměru 25:75 (Obrázek 8). Problémem je překrytí píku nečistoty 2 píkem propranololu a benzoanu sodného (Obrázek 9) při těchto poměrech MF, což vyplývá z porovnání jejich retenčních časů.

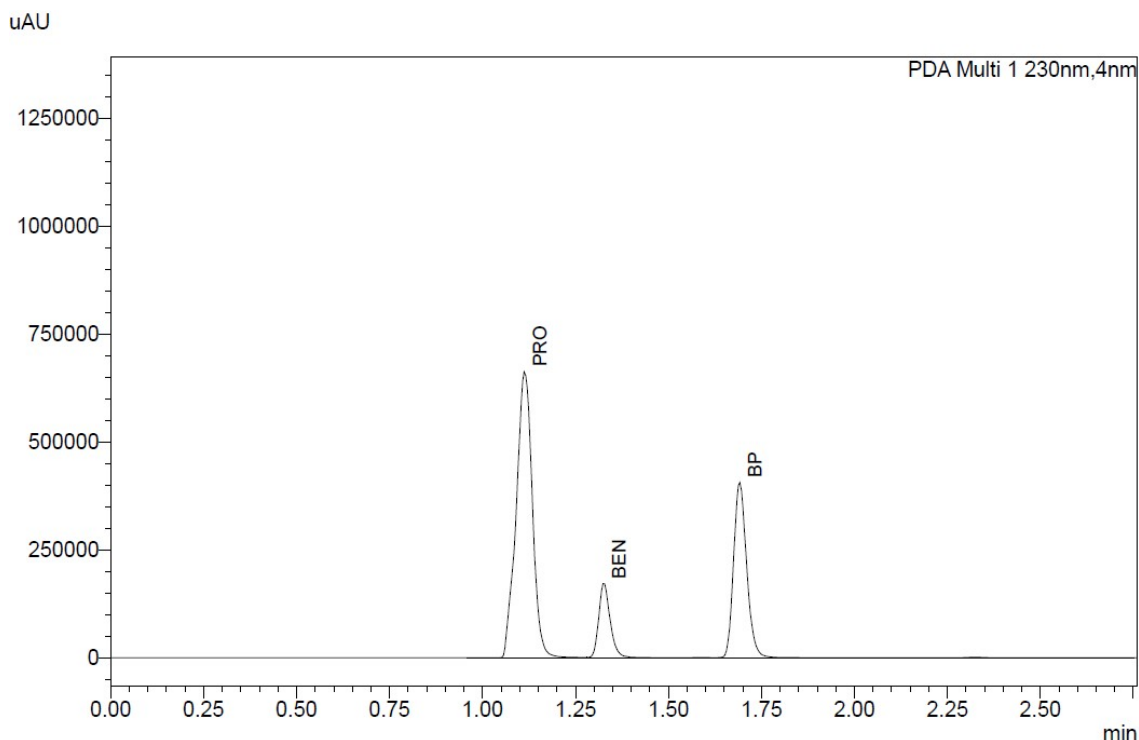


Obrázek 8 – Propranolol (1) a nečistoty (2,3) při nástřiku v MF fosforečnanový pufr:ACN 25:75.



Obrázek 9 – Nástřik propranololu a benzoanu sodného. MF: fosforečnanový pufr:ACN 25:75.

Při nástřiku roztoku standardů, bez nečistot, společně s vnitřním standardem – butylparaben, vznikají tři, jasně oddělené píky (Obrázek 10).

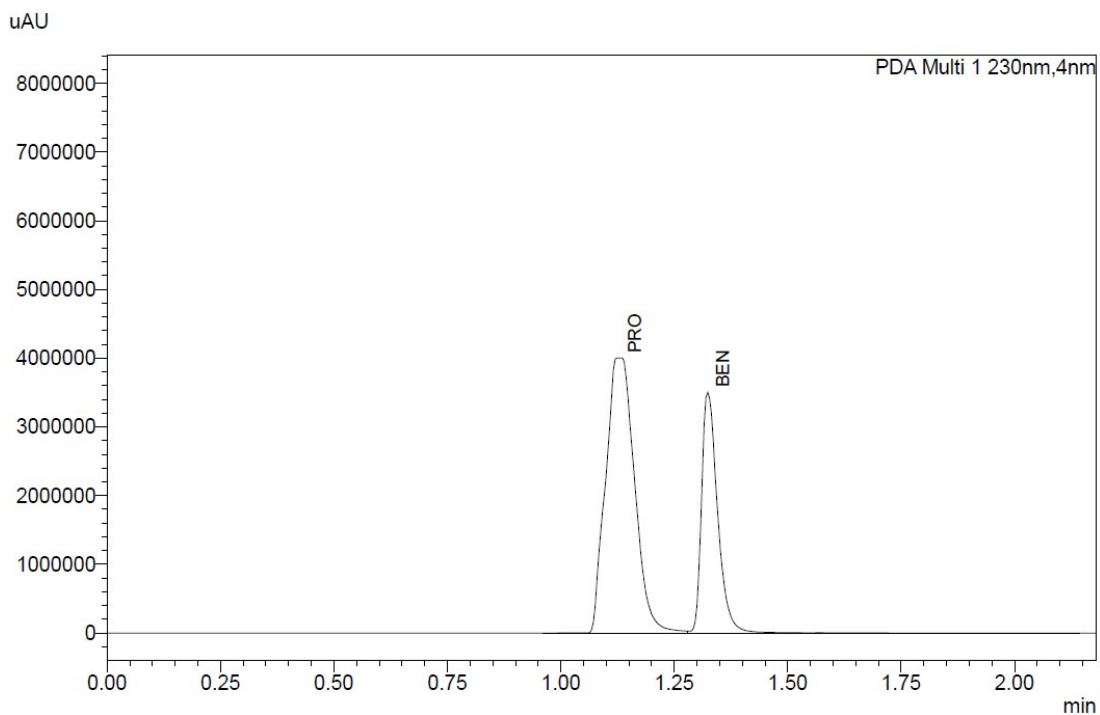


Obrázek 10 – Nástřik propranololu, benzoanu sodného a butylparabenu. MF: fosforečnanový pufr:ACN 25:75.

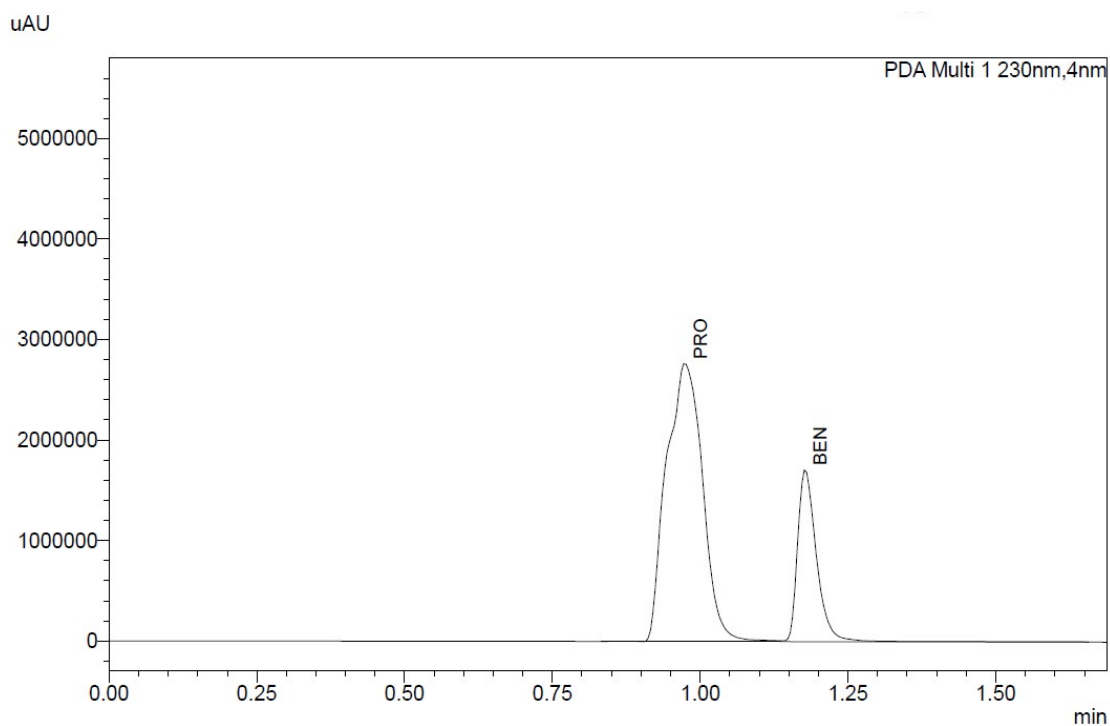
Při měření tří různých průtoků MF (1,2; 1,4; 1,6 ml/min) došlo k nepatrnému zrychlení chromatografické metody a zároveň k nárůstu tlaku v koloně (Tabulka 1). Navíc píky stanovených látek vykazovaly ve vyšších průtocích horší symetrii, než při základním průtoku 1,2 ml/min. Pro optimální podmínky byla rychlost průtoku nastavena na 1,2 ml/min, při kterém je analýza stále dostatečně rychlá.

Tabulka 1 – Měření tří různých průtoků MF.

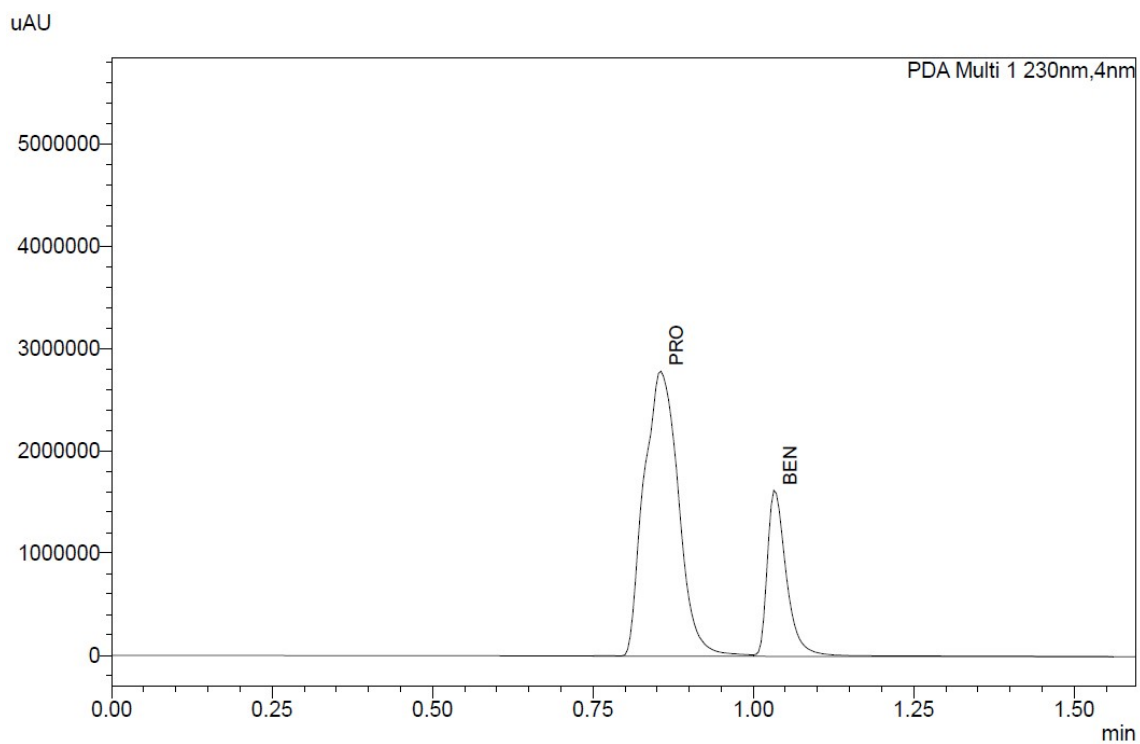
Rychlost průtoku [ml/min]	$t_{r \text{ PRO}}$ [min]	p [MPa]
1,2	1,193	9,7
1,4	0,986	12,5
1,6	0,862	14,4



Obrázek 11 – Nástřik propranololu a benzoanu sodného. MF: fosforečnanový pufr:ACN 30:70, průtok 1,2 ml/min, $p=9,7$ MPa.



Obrázek 12 – Nástřik propranololu a benzoanu sodného. MF: fosforečnanový pufr:ACN 30:70, průtok 1,4 ml/min, $p=12,5$ MPa.



Obrázek 13 - Nástřik propranololu a benzoanu sodného. MF: fosforečnanový pufr:ACN 30:70, průtok 1,6 ml/min, p=14,4 MPa.

5.1.2. Měření na koloně HILIC

Mobilní fáze č. 1: fosforečnanový pufr (c=17,7 mM, pH= 2,2):ACN, různé poměry

Mobilní fáze č. 2:

25,0 g octan amonný

38,0 ml kyseliny chlorovodíkové

doplněno vodou na 100,0 ml

upraveno kyselinou chlorovodíkovou zředěnou RS₁ na pH 2,2

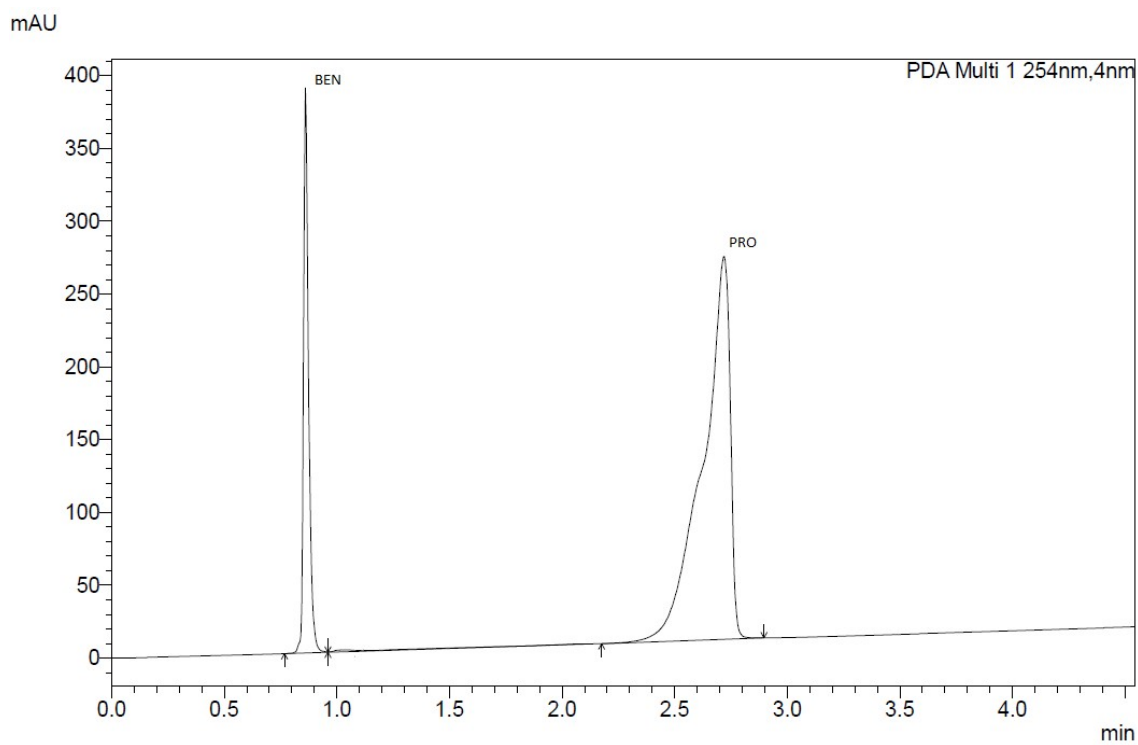
acetonitril

Kolona: HILIC Kinetex[®] 100A, LC Column, vnitřní průměr 4,6 mm, délka kolony 50 mm, velikost částic 2,6 μm, Phenomenex, Česká republika

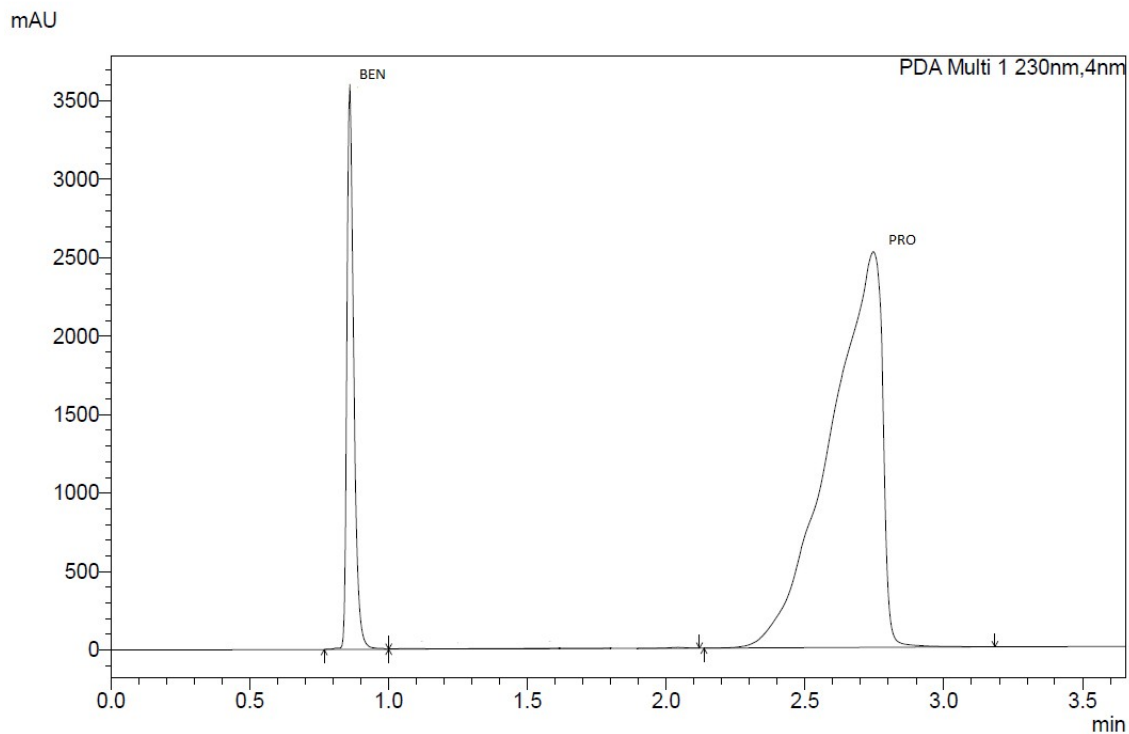
Změna kolony z C₁₈ na kolonu HILIC nepřinesla zlepšení výsledků. Naopak zvýšený šum a nedostatečná separace píků, i přes změny v podmínkách, upřednostnila jako vhodnější kolonu Kinetex[®] C₁₈.

Při měření roztoku standardů propranololu a benzoanu sodného v MF fosforečnanový pufr:ACN v poměru 12:88, došlo sice k separaci obou látek, ovšem pík propranololu má velmi špatný faktor symetrie (Obrázek 14). Toto rozlišení se nezměnilo ani po důkladném, 30 minut trvajícím promytí chromatografického systému mobilní fází, kdy po promytí byl roztok standardů opět proměřen, avšak se stejným výsledkem (Obrázek 15). Rozdíl nebyl pozorován ani při různě měřené vlnové délce v detektoru. Na Obrázku č. 11 je detekce nastavena na 254 nm, zatímco na Obrázku č. 12 je detekce nastavena na 230 nm. Liší se pouze mnohem lepší odezvou v mAU při nastavené detekované vlnové délce 230 nm.

Z toho důvodu byla změněna mobilní fáze na kombinaci octanový pufr o pH 2,2 a acetonitril v různých poměrech.

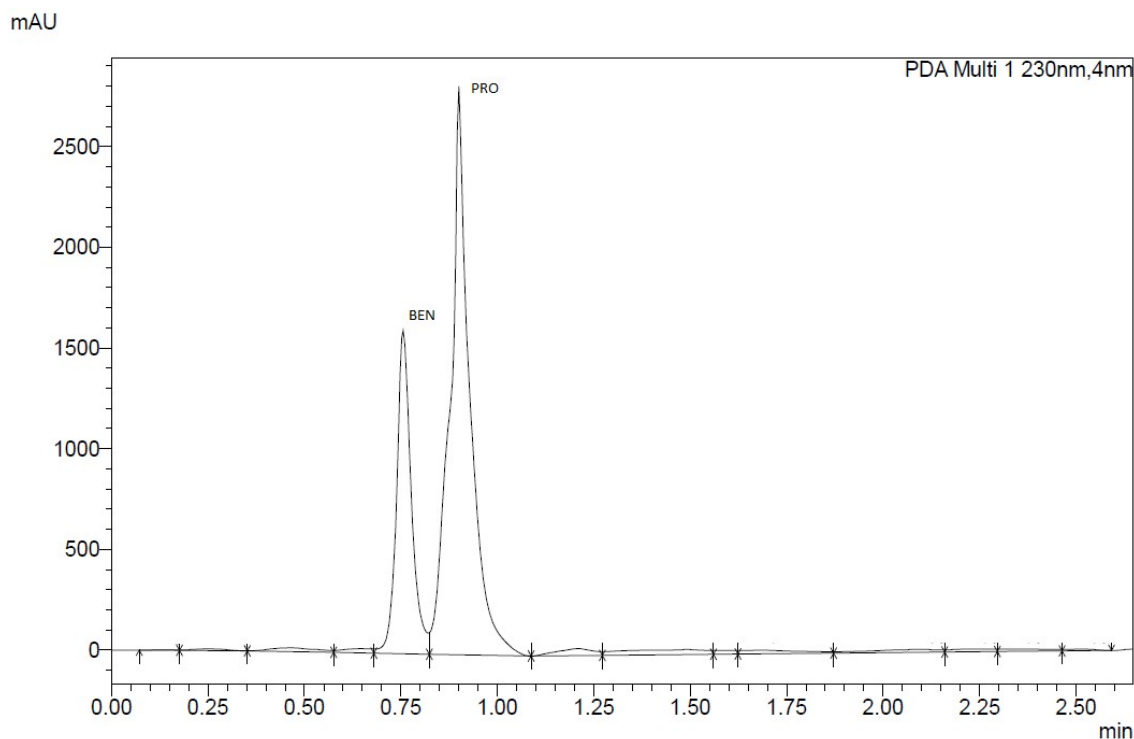


Obrázek 14 – Nástřik propranololu a benzoanu sodného v MF fosforečnanový pufr:ACN v poměru 12:88. Detekce při 254 nm.



Obrázek 15 - Nástřik propranololu a benzoanu sodného v MF fosforečnanový pufr:ACN v poměru 12:88. Detekce při 230 nm.

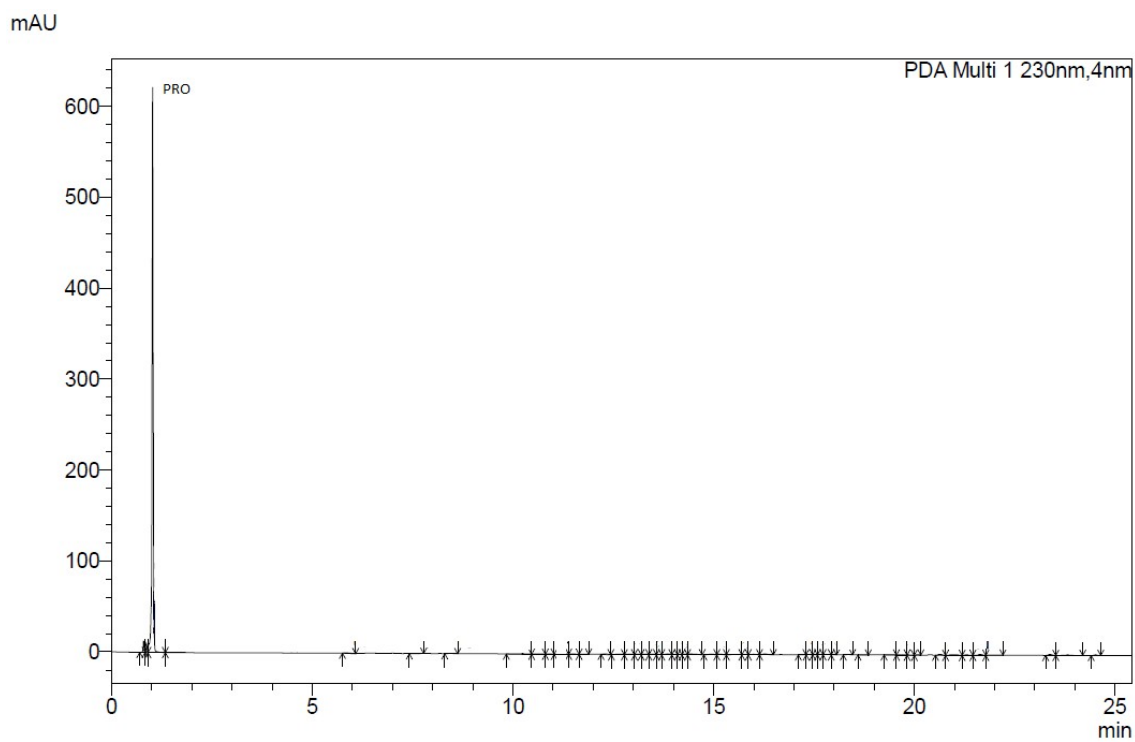
Na níže přiloženém chromatogramu (Obrázek 16) můžeme vidět nástřik roztoku standardů propranololu a benzoanu sodného v MF octanový pufr:ACN v poměru 12:88.



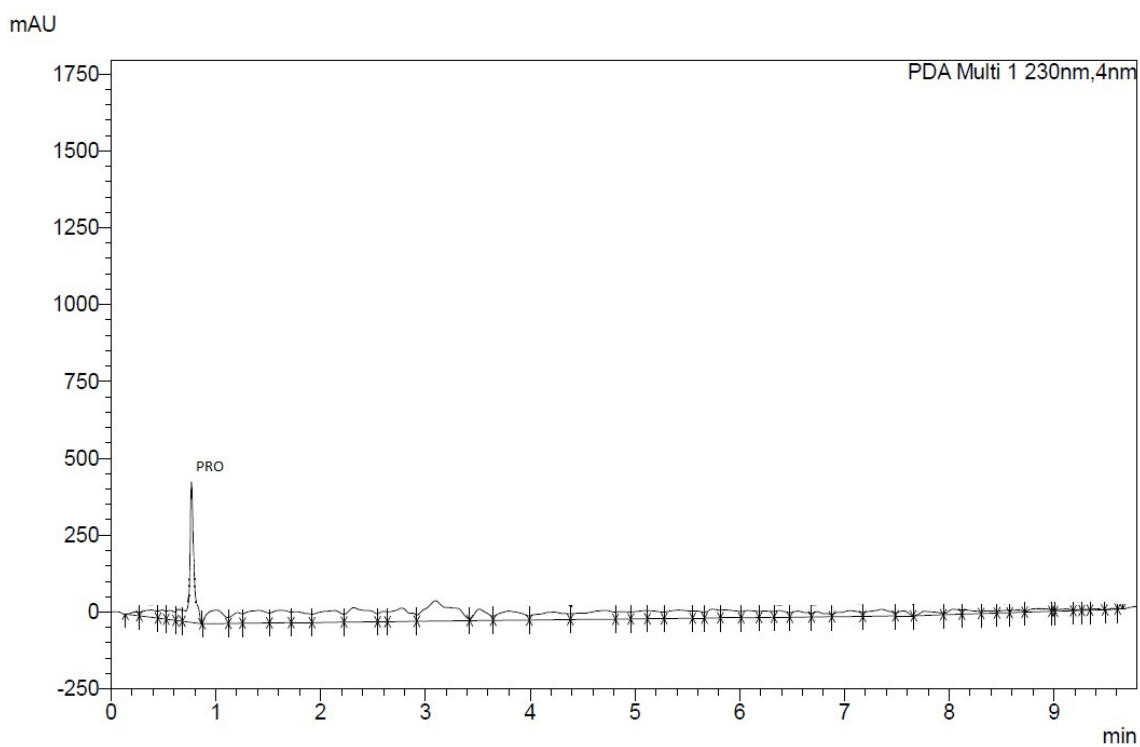
Obrázek 16 – Nástřik propranololu a benzoanu sodného v MF octanový pufr:ACN 12:88.

Jednotlivé píky mají v tomto případě lepší faktor symetrie. Nevýhodou je fakt, že octanový pufr způsobuje větší šum základní linie oproti pufru fosforečnanovému.

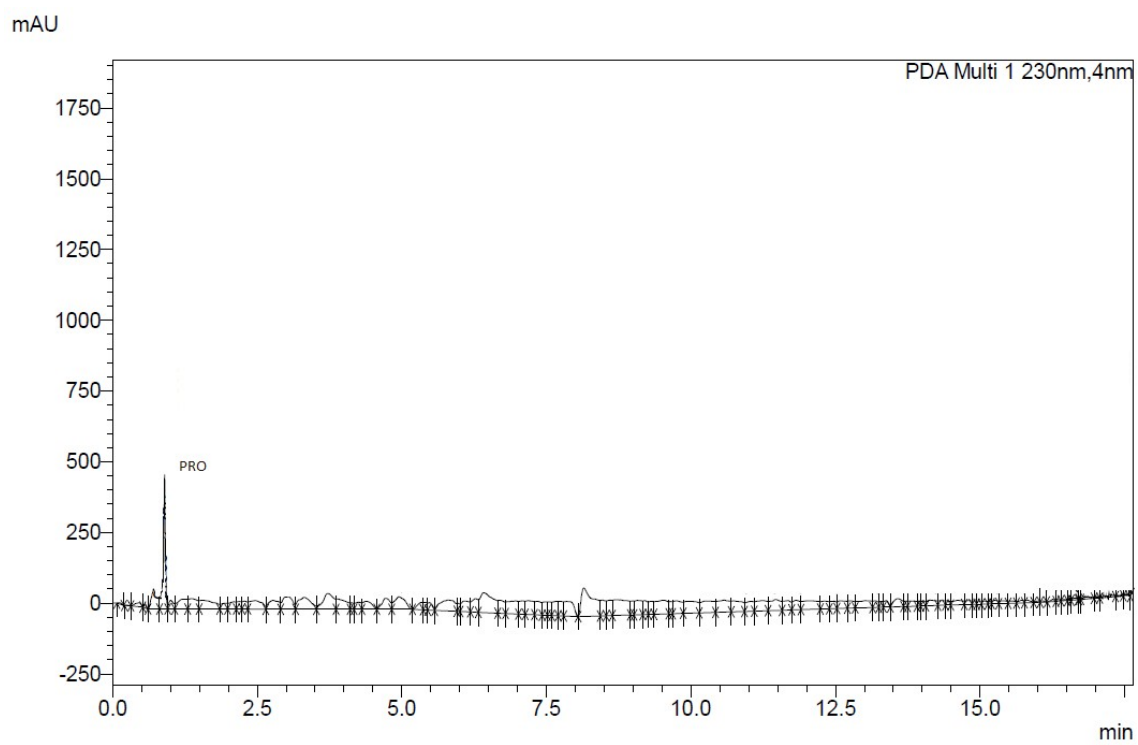
Při nástřiku standardu nečistot se ze vzorku vyseparoval na chromatogramu pouze propranolol, jak lze vidět na níže přiložených grafech (Obrázek 17, 18, 19). Nečistoty nebyly na chromatogramu zaznamenány. Ke změně nedošlo ani při úpravě poměru mobilní fáze. Píky propranololu navíc nebyly příliš reprezentativní v porovnání s Kinetex[®] C₁₈ kolonou. Z toho důvodu byla pro optimální podmínky a následnou validaci zvolena kolona C₁₈.



Obrázek 17 - Nástřík standardu nečistot v MF octanový pufr:ACN 30:70.



Obrázek 18 – Nástřík standardu nečistot v MF octanový pufr:ACN 15:85



Obrázek 19 - Nástřik standardu nečistot v MF octanový pufr:ACN 12:88.

5.1.3. Výběr vnitřního standardu

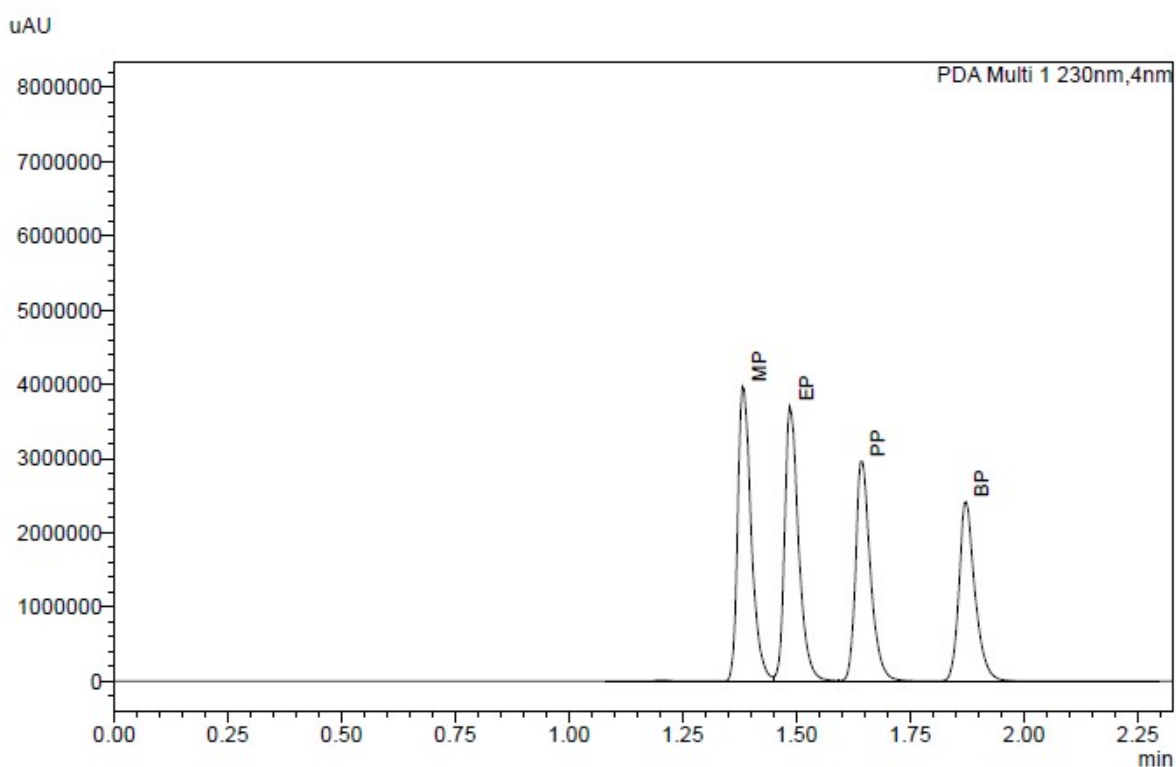
Podle retenčních časů jednotlivých parabenů byl jako vnitřní standard vybrán ethylparaben, viz Obrázek 20.

Kolona: Kinetex[®] 5u XB-C₁₈ 100A, vnitřní průměr 4,6 mm, délka 150 mm, velikost částic 5 μm, Phenomenex, Česká republika

Rychlost průtoku: 1,2 ml/min

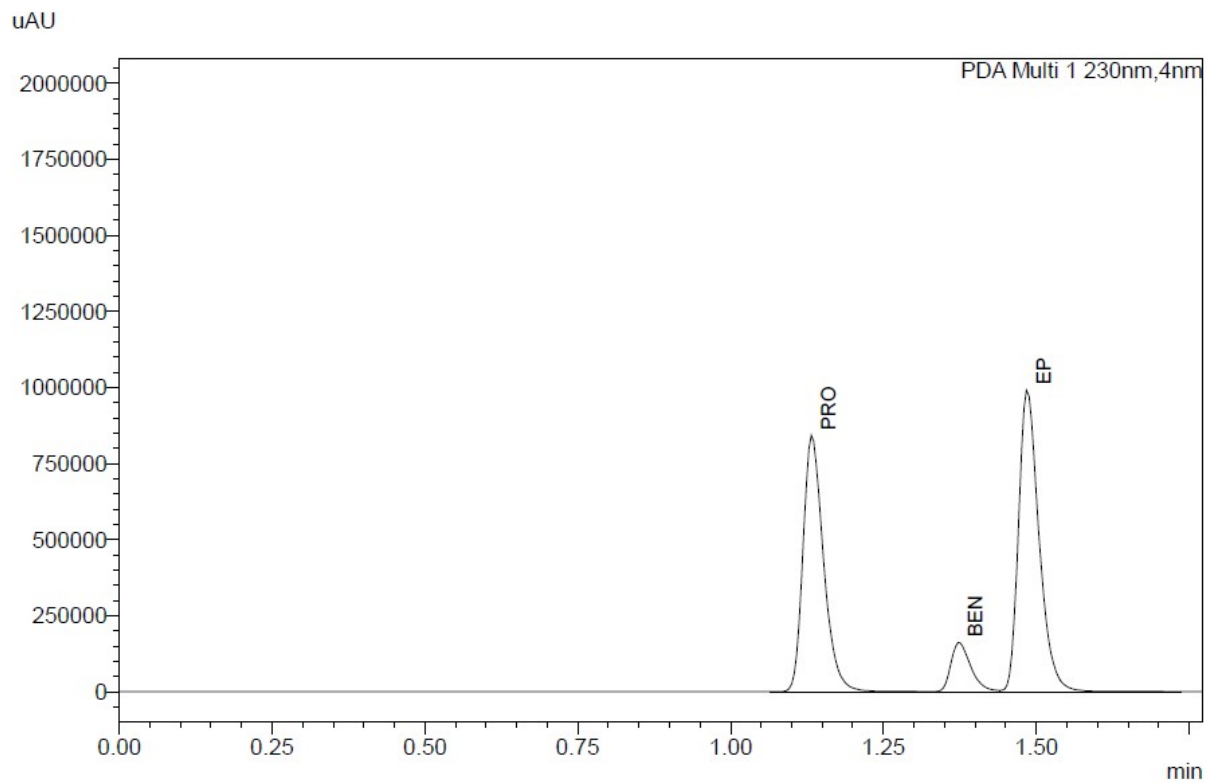
Detekce: UV; 230 nm

Mobilní fáze: fosforečnanový pufr pH=2,2 : acetonitril v poměru 30:70



Obrázek 20 - Chromatogram směsi parabenů. Podmínky separace jsou popsány výše.

Na Obrázku 21 můžeme vidět chromatogram všech tří analyzovaných látek při společném měření.



Obrázek 21 - Chromatogram směsi propranololu, benzoanu sodného a ethylparabenu v roztoku. Podmínky separace jsou popsány výše.

5.1.4. Optimální podmínky

Průtok 1,2 ml/min

MF: fosforečnanový pufr (c= 17,7 mM, pH= 2,2):ACN 30:70

Teplota: t= 20°C

Tlak: p= 9,0-12,0 MPa

Jelikož se nečistoty při zkoušených podmínkách špatně eluovaly, případně se neeluovaly vůbec, bylo přistoupeno k analýze bez standardu nečistot. Důvodem je, že se na měřeném chromatografickém systému nečistoty dostatečně nevyseparovaly a navíc nejsou komerčně dostupné jednotlivě pro samotné měření.

5.2. Validace

5.2.1. Test vhodnosti chromatografického systému

5.2.1.1. Faktor symetrie

$$A = \frac{W_{0,01}}{2 \times d}$$

$W_{0,01}$...šířka píku v jedné dvacetině jeho výšky, d ...vzdálenost mezi kolmicí spuštěnou z vrcholu píku a částí píku v jedné dvacetině jeho výšky

Tabulka 2 – Naměřené faktory symetrie pro propranolol, benzoan sodný a ethylparaben.

Roztok č.	$t_{r \text{ PRO}}$	$t_{r \text{ BEN}}$	$t_{r \text{ EP}}$
1	1,412	1,433	1,303
2	1,410	1,435	1,306
3	1,414	1,435	1,306
4	1,412	1,435	1,308
5	1,411	1,433	1,305
6	1,411	1,438	1,304
Průměr	1,412	1,435	1,305

Požadavek: T= 0,8-1,5

Závěr: Vyhovuje pro propranolol, benzoan sodný i ethylparaben.

5.2.1.2. Počet teoretických pater

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

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

V tabulce zapsané hodnoty jsou vždy průměrem tří měření.

Tabulka 3 – Naměřené hodnoty počtu teoretických pater pro propranolol, benzoan sodný a EP.

Roztok č.	N _{PRO}	N _{BEN}	N _{EP}
1	4 726	6 952	7 730
2	4 768	6 917	7 698
3	4 789	6 924	7 707
4	4 790	6 906	7 691
5	4 785	6 912	7 700
6	4 687	7 121	7 940
Průměr	4757,5	6955,3	7744,3

5.2.1.3. Rozlišení

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

t_{R1} , t_{R2} ...retenční časy (min)

w_{h1} , w_{h2} ... šířka píku v polovině výšky (min)

Tabulka 4 – Naměřené hodnoty rozlišení pro benzoan sodný a ethylparaben.

Roztok č.	R_{ij} (PRO)	R_{ij} (BEN)	R_{ij} (EP)
1	---	3,630	1,669
2	---	3,629	1,668
3	---	3,633	1,670
4	---	3,633	1,669
5	---	3,630	1,669
6	---	3,641	1,696
Průměr	---	3,633	1,674

Požadavek: $R_{ij} > 1,5$

Závěr: Vyhovuje pro benzoan sodný i ethylparaben. Rozlišení propranololu nebylo možné stanovit, protože pík propranololu je prvním píkem na chromatogramu.

5.2.2. Opakovatelnost

Pro stanovení opakovatelnosti byl do chromatografického systému opakovaně dávkován standardní roztok s obsahem propranololu, benzoanu sodného a ethylparabenu, jako vnitřního standardu.

1. Propranolol

Tabulka 5 – Měření opakovatelnosti pro propranolol.

Měření č.	A	t_r [min]
1	1 954 276,00	1,136
2	1 966 168,00	1,136
3	1 978 156,00	1,136
4	1 977 317,00	1,136
5	1 978 548,00	1,137
6	1 981 453,00	1,135
Průměr	1 972 653,00	1,136
Směrodatná odchylka	10430,69	0,00064
Relativní směrodatná odchylka (%)	0,53	0,06

Požadavek: RSD <1%.

Závěr: Vyhovuje u hodnot retenčních časů t_R i u hodnot plochy píků A.

2. Benzoan sodný

Tabulka 6 - Měření opakovatelnosti pro benzoan sodný.

Měření č.	A	t_r [min]
1	354 164,00	1,376
2	354 890,00	1,376
3	353 353,00	1,376
4	353 147,00	1,376
5	351 020,00	1,376
6	352 211,00	1,375
Průměr	353 130,83	1,376
Směrodatná odchylka	1379,38	0,00041
Relativní směrodatná odchylka v %	0,39	0,03

Požadavek: RSD <1%.

Závěr: Vyhovuje u hodnot retenčních časů t_R i u hodnot plochy píků A.

5.2.3. Linearita

K měření linearity byla připravena sada kalibračních roztoků, která obsahovala propranolol hydrochlorid, benzoan sodný a ethylparaben jako vnitřní standard. Koncentrace propranololu a benzoanu sodného jsou zapsány v tabulce. Koncentrace vnitřního standardu ethylparabenu byla 4 mg/100ml.

Každý z šesti vzorků byl proměřen třikrát. Plochy píků pro každou koncentraci látky nebo vnitřního standardu je průměrem ze tří těchto měření.

Pro vyhodnocení metodou lineární regrese byla použita závislost poměrů ploch píků stanovovaných kalibračních roztoků na jejich koncentraci. Regresní funkce měla podobu:

$$y = bx + a$$

Tabulka 7 – Měření kalibračních roztoků.

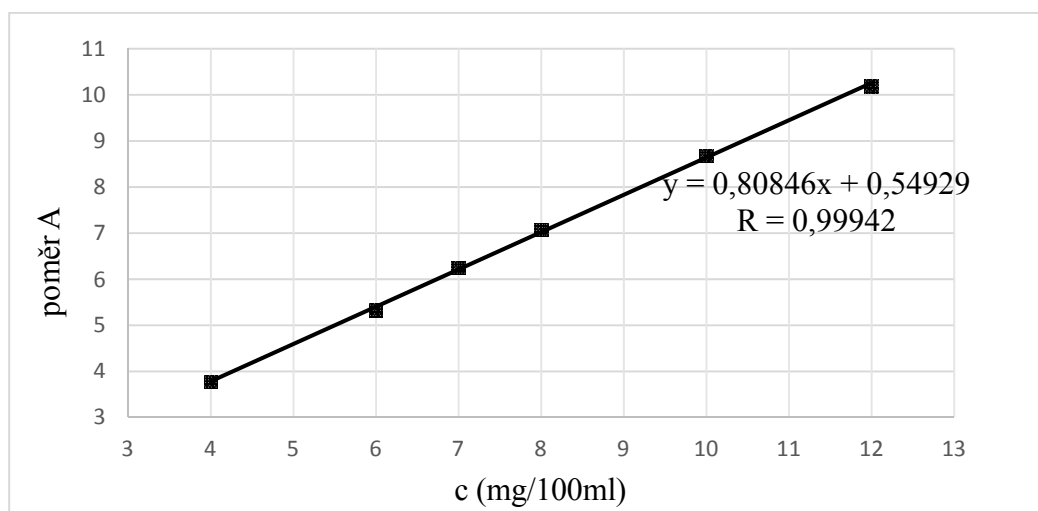
vzorek č.	$\odot A_{PRO}$	$\odot A_{BEN}$	$\odot A_{EP}$
1	1 045 920,33	182 450,67	277 000,67
2	1 488 433,33	258 035,33	279 518,00
3	1 724 379,33	306 314,33	275 994,33
4	1 977 938,00	354 914,33	279 663,33
5	2 429 952,33	442 506,67	280 012,33
6	2 878 269,33	534 680,00	282 355,67

1. Propranolol

Tabulka 8 – Tabulka lineariry pro propranolol.

vzorek č.	c_{PRO} (mg/100ml)	poměr A
1	4	3,775877
2	6	5,325000
3	7	6,247879
4	8	7,072568
5	10	8,678019
6	12	10,193772

Poměr A = poměr ploch píků stanovované látky (propranolol) a vnitřního standardu.



Obrázek 22 – Graf lineární regrese propranololu.

Parametry regresní přímky:

Směrnice přímky: $b=0,80846$

Absolutní člen: $a=0,54929$

Korelační koeficient: $R=0,99942$

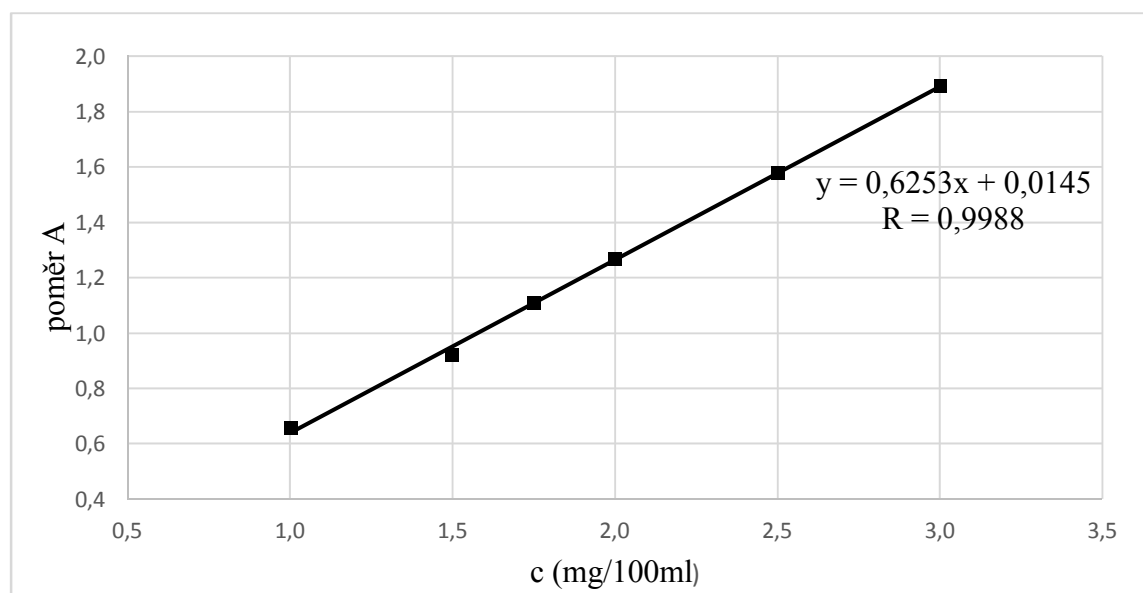
Závěr: Závislost y na x byla prokázána se spolehlivostí 99,9 %.

2. Benzoan sodný

Tabulka 9 – Tabulka linearitu pro benzoan sodný.

vzorek č.	c_{BEN} (mg/100ml)	poměr A
1	1	0,65866508
2	1,5	0,92314389
3	1,75	1,10985733
4	2	1,26907710
5	2,5	1,58031135
6	3	1,89364005

Poměr A = poměr ploch pík stanovované látky (benzoan sodný) a vnitřního standardu.



Obrázek 23 – Graf lineární regrese benzoanu sodného.

Parametry regresní přímky:

Směrnice přímky: $b=0,6253$

Absolutní člen: $a=0,0145$

Korelační koeficient: $R=0,9988$

Závěr: Závislost y na x byla prokázána se spolehlivostí 99,8 %.

5.2.4. Přesnost

1. Propranolol s Na_2HPO_4 ($c_{\text{PRO}}=2$ mg/ml)

Tabulka 10 – Naměřené hodnoty lékopisného přípravku.

Roztok č.	Poměr ploch PRO/EP	Poměr ploch BEN/EP
1	7,761029849	1,740206509
2	7,802245948	1,750606929
3	8,095362279	1,822597409
4	8,116441904	1,833104387
5	8,174391034	1,844420261
6	7,908515758	1,783179433
Průměr	7,98	1,80
Směrodatná odchylka	0,18	0,04
Relativní směrodatná odchylka	2,20	2,46

Požadavek: $\text{RSD}<5\%$.

Závěr: Vyhovuje pro propranolol i benzoan sodný.

2. Propranolol s kyselinou citronovou ($c_{\text{PRO}}=2$ mg/ml)

Tabulka 11 – Naměřené roztoky analyzovaného přípravku.

Roztok č.	Poměr ploch PRO/EP	Poměr ploch BEN/EP
1	7,897267061	1,596194483
2	7,275219673	1,452948928
3	7,296484429	1,457993748
4	7,861977914	1,594583222
5	7,426144122	1,484582843
6	7,72012605	1,560914167
Průměr	7,58	1,52
Směrodatná odchylka	0,28	0,07
Relativní směrodatná odchylka v %	3,72	4,40

Požadavek: RSD <5%

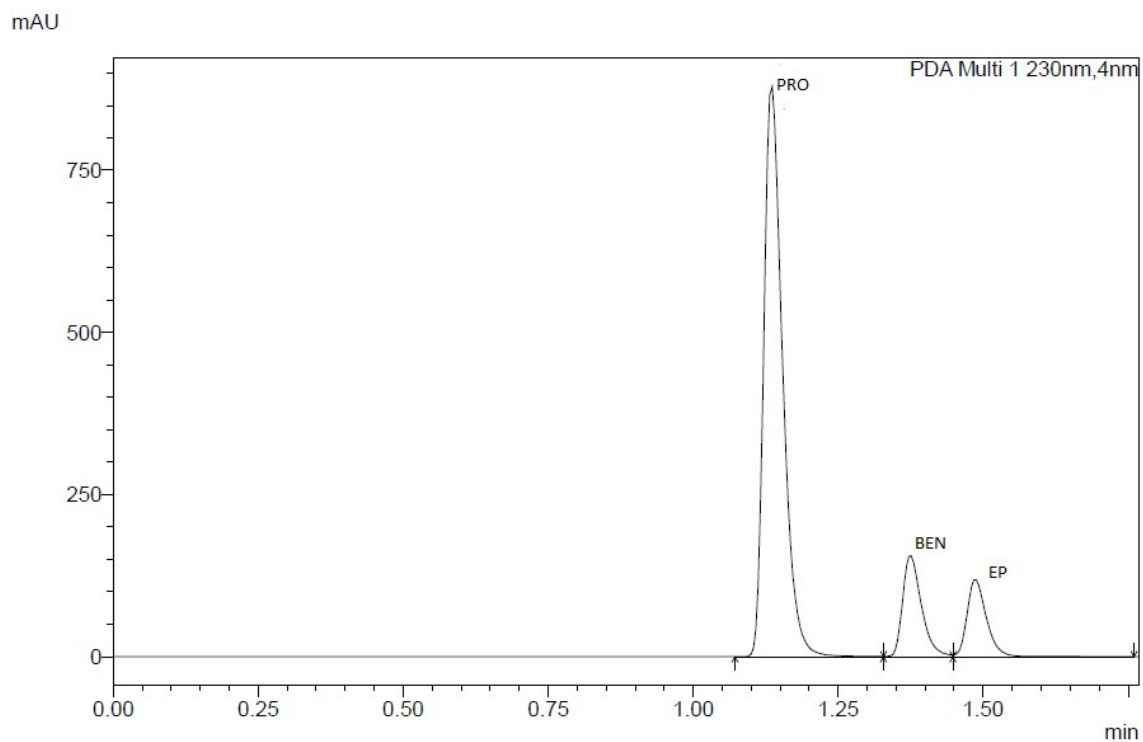
Závěr: Vyhovuje u propranololu i benzoanu sodného.

5.2.5. Selektivita

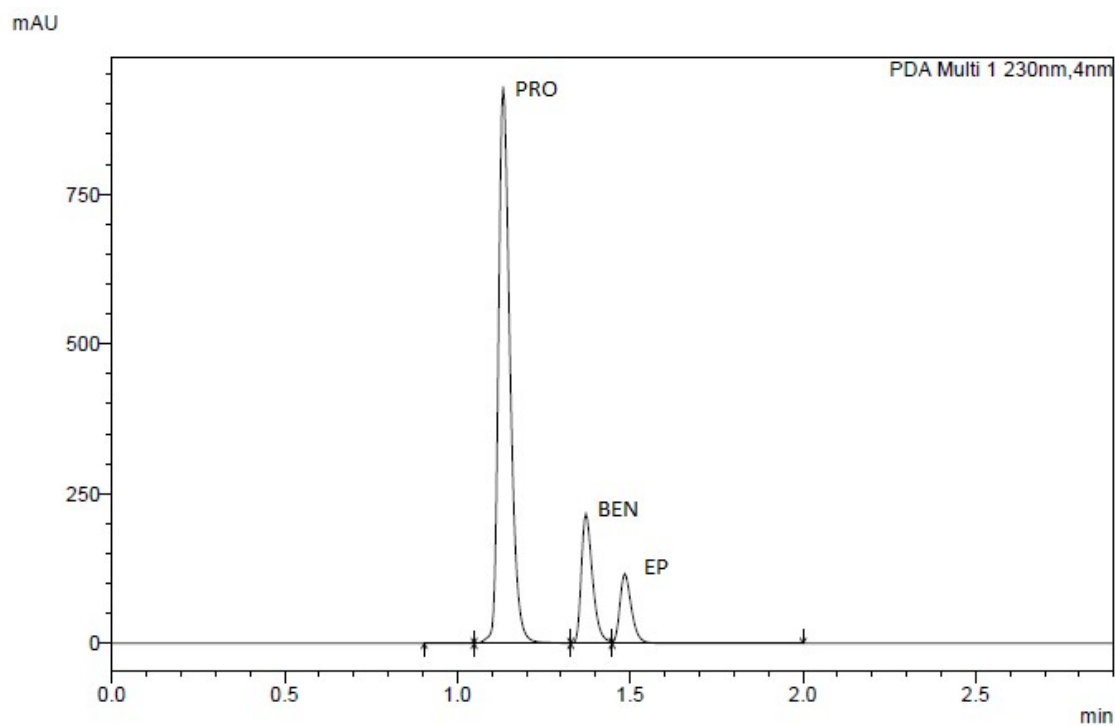
První chromatogram (Obrázek 24) ukazuje analýzu standardního roztoku obsahujícího propranolol, benzoan sodný a vnitřní standard ethylparaben. Postup přípravy standardního roztoku viz kap. 4.4.1.1.

Druhý chromatogram (Obrázek 25) zobrazuje analýzu léčivého přípravku Propranolol-hydrochloridu s Na_2HPO_4 o navážce 0,20 g, s přidavkem vnitřního standardu ethylparabenu.

Z uvedených dvou chromatogramů je patrné, že HPLC metoda je schopna selektivně stanovit obsah propranololu v léčivém přípravku.



Obrázek 24 – Nástřik roztoku standardů propranololu, benzoanu sodného a ethylparabenu v MF fosforečnanový pufr:ACN 30:70.



Obrázek 25 – Nástřik lékopisného přípravku propranololu s Na_2HPO_4 s přidavkem ethylparabenu v MF fosforečnanový pufr:ACN 30:70.

5.2.6. Stabilita

1. Propranolol

Tabulka 12 – Hodnoty stability pro propranolol při teplotách 4°C a 20°C.

t (hod)	A při 4°C	Fz [%]	A při 20°C	Fz [%]
0	1 012 228,5	0,0	1 013 667,5	0,0
24	1 009 630,0	0,3	1 015 260,0	0,2
48	1 004 855,0	0,7	1 017 657,5	0,4
72	1 005 112,0	0,7	1 020 305,5	0,7

2. Benzoan sodný

Tabulka 13 - Hodnoty stability pro benzoan sodný při teplotách 4°C a 20°C.

t (hod)	A při 4°C	Fz [%]	A při 20°C	Fz [%]
0	189 093,0	0,0	188 108,0	0,0
24	188 607,0	0,3	190 072,0	1,0
48	187 878,0	0,6	190 493,0	1,3
72	187 922,0	0,6	190 870,5	1,5

3. Ethylparaben

Tabulka 14 - Hodnoty stability pro ethylparaben při teplotách 4°C a 20°C.

t (hod)	A při 4°C	Fz [%]	A při 20°C	Fz [%]
0	217 622,0	0,0	217 227,0	0,0
24	217 205,0	0,2	219 351,0	1,0
48	217 604,0	0,0	223 163,0	2,7
72	218 728,0	0,5	221 300,0	1,9

Požadavek: Fz < 1%.

Závěr: Standardní roztok propranololu a benzoanu sodného s přídavkem vnitřního standardu ethylparabenu lze uchovávat 72 hodin při snížené teplotě a 24 hodin při teplotě 20°C.

5.2.7. Robustnost

1. Vliv složení mobilní fáze fosforečnanový pufr:ACN

Byl hodnocen vliv experimentálních podmínek na stanovení obsahu propranololu. Při tomto měření byl použit roztok standardů propranololu a benzoanu sodného s přidavkem vnitřního standardu ethylparabenu. Složení mobilní fáze bylo měřeno při pěti různých poměrech (Tabulka 15). Optimální hodnota složení MF fosforečnanový pufr:ACN je 30:70. Hodnota pH (Tabulka 18) se zkoušela při pěti různých hodnotách, přičemž optimální pH bylo stanoveno na 2,2.

Tabulka 15 – Naměřené hodnoty při různých poměrech mobilní fáze.

Složení MF	Propranolol		Benzoan sodný		Ethylparaben	
	A	t _R	A	t _R	A	t _R
40:60	1 019 293,67	1,182	192 192,33	1,507	219 468,67	1,716
35:65	1 008 930,00	1,151	189 879,00	1,433	217 823,67	1,585
30:70	1 013 989,00	1,134	186 174,33	1,376	218 167,00	1,487
25:75	1 010 222,67	1,129	183 907,33	1,334	220 122,33	1,415
20:80	1 010 157,33	1,122	181 089,33	1,300	225 954,33	1,360

a) Vliv na plochu chromatografického píku.

Výpočet relativní plochy píku A_r :

$$A_r = \frac{A_i}{A} * 100$$

A_i ...plocha píku

A ...plocha píku při optimálním poměru MF 30:70

Relativní plocha píku vztažená na plochu píku propranololu při optimálním složení MF se pohybovala v rozmezí 99,50 % až 100,52 %. Plocha píku benzoanu sodného se pohybovala v rozmezí 97,27 % až 103,23 %. Plocha píku ethylparabenu se pohybovala v rozmezí 99,84 % až 103,57 % (Tabulka 16).

Tabulka 16 – Vliv na plochu chromatografického píku při různých poměrech MF.

Složení MF	Propranolol		Benzoan sodný		Ethylparaben	
	A _i	A _r [%]	A _i	A _r [%]	A _i	A _r [%]
40:60	1 019 293,67	100,52	192 192,33	103,23	219 468,67	100,60
35:65	1 008 930,00	99,50	189 879,00	101,99	217 823,67	99,84
25:75	1 010 222,67	99,63	183 907,33	98,78	220 122,33	100,90
20:80	1 010 157,33	99,62	181 089,33	97,27	225 954,33	103,57

b) Vliv na retenční čas

Relativní retenční čas vztažený na retenční čas propranololu při optimálním složení MF se pohyboval v rozmezí 98,92 % až 104,23 %. Relativní retenční čas benzoanu sodného byl v rozmezí 94,48 % až 109,52 %. Relativní retenční čas ethylparabenu se pohyboval v rozmezí 91,50 % až 115,43 % (Tabulka 17).

Tabulka 17 – Vliv na retenční čas látek při různých poměrech MF fosforečnanový pufr:ACN.

Složení MF	Propranolol		Benzoan sodný		Ethylparaben	
	tr _i [min]	tr _r [%]	tr _i [min]	tr _r [%]	tr _i [min]	tr _r [%]
40:60	1,182	104,23	1,507	109,52	1,716	115,43
35:65	1,151	101,50	1,433	104,16	1,585	106,64
25:75	1,129	99,53	1,334	96,91	1,415	95,18
20:80	1,122	98,92	1,300	94,48	1,360	91,50

2. Vliv pH**Tabulka 18** - Naměřené hodnoty při různých hodnotách pH.

pH	Propranolol		Benzoan sodný		Ethylparaben	
	A	t _r [min]	A	t _r [min]	A	t _r [min]
2,2	1 013 989,00	1,134	186 174,33	1,376	218 167,00	1,487
2,4	1 011 571,00	1,147	188 581,50	1,377	220 019,50	1,488
2,6	1 012 112,00	1,154	188 370,00	1,380	221 442,00	1,489
2,8	1 013 095,50	1,161	188 374,50	1,381	221 502,50	1,489
3,0	1 011 931,50	1,172	188 438,50	1,382	222 004,00	1,489

a) Vliv na plochu chromatografického píku

Relativní plocha píku vztažená na plochu píku propranololu při různých hodnotách pH se pohybovala v rozmezí 99,76 % až 99,91 %. Plocha píku benzoanu sodného se pohybovala v rozmezí 101,18 % až 101,29 %. Plocha píku ethylparabenu se pohybovala v rozmezí 100,85 % až 101,76 % (Tabulka 19).

Tabulka 19 - Vliv na plochu chromatografického píku při různých hodnotách pH.

pH	Propranolol		Benzoan sodný		Ethylparaben	
	A _i	A _r [%]	A _i	A _r [%]	A _i	A _r [%]
2,4	1 011 571,00	99,76	188 581,55	101,29	220 019,55	100,85
2,6	1 012 112,00	99,81	188 370,00	101,18	221 442,00	101,50
2,8	1 013 095,55	99,91	188 374,55	101,18	221 502,55	101,53
3,0	1 011 931,55	99,80	188 438,55	101,22	222 004,00	101,76

b) Vliv na retenční čas

Relativní retenční čas, vztažený na retenční čas propranololu při optimální hodnotě pH, se pohyboval v rozmezí 101,15 % až 103,31 %. Relativní retenční čas benzoanu sodného byl v rozmezí 100,07 % až 100,44 %. Relativní retenční čas ethylparabenu se pohyboval v rozmezí 100,07 % až 100,13 % (Tabulka 20).

Tabulka 20 - Vliv různých hodnot pH na retenční čas stanovovaných látek.

pH	Propranolol		Benzoan sodný		Ethylparaben	
	tr _i [min]	tr _r [%]	tr _i [min]	tr _r [%]	tr _i [min]	tr _r [%]
2,4	1,147	101,15	1,377	100,07	1,488	100,07
2,6	1,154	101,72	1,380	100,25	1,489	100,10
2,8	1,161	102,38	1,381	100,36	1,489	100,13
3,0	1,172	103,31	1,382	100,44	1,489	100,13

6. Závěr

Cílem práce byla optimalizace a validace HPLC metody pro stanovení propranololu v tekutých léčivých přípravcích.

Nejprve bylo třeba optimalizovat složení mobilní fáze, jelikož podle podmínek z Českého lékopisu 2009 [22] vodná fáze mobilní fáze s laurylsíranem sodným způsobovala znečištění kolony tvorbou zákalu ve směsi s acetonitrilem. Byl zvolen fosforečnanový pufr o koncentraci 17,7 mM a pH 2,2. Při měření s MF fosforečnanového pufru a acetonitrilu v různých poměrech zůstávala kolona čistá a docházelo k separaci látek. Na koloně C₁₈ ovšem nedošlo k separaci nečistot a tak byla zkoušena kolona HILIC. V této koloně nedošlo ke zlepšení, nečistoty se neeluovaly a navíc byly píky standardů méně reprezentativní než u kolony C₁₈. Další měření a následná validace byla provedena s kolonou Kinetex[®] C₁₈.

Jelikož se nečistoty při zkoušených podmínkách špatně, případně vůbec, neeluovaly bylo upuštěno od současné analýzy nečistot ve vzorku. Nečistoty nejsou komerčně dostupné pro jednotlivé měření, není tedy možné stanovit je samostatně v roztoku.

Metoda pro stanovení propranololu byla následně validována. Na základě validačních výsledků lze usoudit, že metoda poskytuje přesné a správné výsledky a je vhodná pro stanovení obsahu propranololu v tekutých léčivých přípravcích.

7. Seznam obrázků

Obrázek 1 - Schéma kapalinového chromatografu	15
Obrázek 2 - Vzorec propranolol-hydrochloridu	20
Obrázek 3 – Nástřík propranololu a benzoanu sodného v MF laurylsíran:ACN v poměru 50:50.....	29
Obrázek 4 - Nástřík standardu nečistot v MF laurylsíran:ACN v poměru 29:71.....	29
Obrázek 5 - Nástřík standardu nečistot v MF laurylsíran:ACN v poměru 0:100.....	30
Obrázek 6 - Nástřík propranololu a benzoanu sodného v MF fosforečnanový pufr:ACN 50:50.....	31
Obrázek 7 – Měření standardu nečistot v MF fosforečnanový pufr:ACN 50:50. Na chromatogramu je zaznamenán pouze pík propranololu (1).....	31
Obrázek 8 – Propranolol (1) a nečistoty (2,3) při nástřiku v MF fosforečnanový pufr:ACN 25:75.....	32
Obrázek 9 – Nástřík propranololu a benzoanu sodného. MF: fosforečnanový pufr:ACN 25:75.....	33
Obrázek 10 – Nástřík propranololu, benzoanu sodného a butylparabenu. MF: fosforečnanový pufr:ACN 25:75.....	34
Obrázek 11 – Nástřík propranololu a benzoanu sodného. MF: fosforečnanový pufr:ACN 30:70, průtok 1,2 ml/min, p=9,7 MPa.....	35
Obrázek 12 – Nástřík propranololu a benzoanu sodného. MF: fosforečnanový pufr:ACN 30:70, průtok 1,4 ml/min, p=12,5 MPa.....	35
Obrázek 13 - Nástřík propranololu a benzoanu sodného. MF: fosforečnanový pufr:ACN 30:70, průtok 1,6 ml/min, p=14,4 MPa.....	36
Obrázek 14 – Nástřík propranololu a benzoanu sodného v MF fosforečnanový pufr:ACN v poměru 12:88. Detekce při 254 nm.....	38
Obrázek 15 - Nástřík propranololu a benzoanu sodného v MF fosforečnanový pufr:ACN v poměru 12:88. Detekce při 230 nm.....	38
Obrázek 16 – Nástřík propranololu a benzoanu sodného v MF octanový pufr:ACN 12:88.....	39
Obrázek 17 - Nástřík standardu nečistot v MF octanový pufr:ACN 30:70.....	40
Obrázek 18 – Nástřík standardu nečistot v MF octanový pufr:ACN 15:85.....	40
Obrázek 19 - Nástřík standardu nečistot v MF octanový pufr:ACN 12:88.....	41
Obrázek 20 - Chromatogram směsi parabenů. Podmínky separace jsou popsány výše.....	42
Obrázek 21 - Chromatogram směsi propranololu, benzoanu sodného a ethylparabenu v roztoku. Podmínky separace jsou popsány výše.....	43
Obrázek 22 – Graf lineární regrese propranololu.....	48
Obrázek 23 – Graf lineární regrese benzoanu sodného.....	49
Obrázek 24 – Nástřík roztoku standardů propranololu, benzoanu sodného a ethylparabenu v MF fosforečnanový pufr:ACN 30:70.....	52
Obrázek 25 – Nástřík lékopisného přípravku propranololu s Na ₂ HPO ₄ s přísávkem ethylparabenu v MF fosforečnanový pufr:ACN 30:70.....	52

8. Seznam tabulek

Tabulka 1 – Měření tří různých průtoků MF.	34
Tabulka 2 – Naměřené faktory symetrie pro propranolol, benzoan sodný a ethylparaben.	44
Tabulka 3 – Naměřené hodnoty počtu teoretických pater pro propranolol, benzoan sodný a EP.	45
Tabulka 4 – Naměřené hodnoty rozlišení pro benzoan sodný a ethylparaben.	46
Tabulka 5 – Měření opakovatelnosti pro propranolol.	46
Tabulka 6 - Měření opakovatelnosti pro benzoan sodný.	47
Tabulka 7 – Měření kalibračních roztoků.	48
Tabulka 8 – Tabulka linearity pro propranolol.	48
Tabulka 9 – Tabulka linearity pro benzoan sodný.	49
Tabulka 10 – Naměřené hodnoty lékopisného přípravku.	50
Tabulka 11 – Naměřené roztoky analyzovaného přípravku.	51
Tabulka 12 – Hodnoty stability pro propranolol při teplotách 4°C a 20°C.	53
Tabulka 13 - Hodnoty stability pro benzoan sodný při teplotách 4°C a 20°C.	53
Tabulka 14 - Hodnoty stability pro ethylparaben při teplotách 4°C a 20°C.	53
Tabulka 15 – Naměřené hodnoty při různých poměrech mobilní fáze.	54
Tabulka 16 – Vliv na plochu chromatografického píku při různých poměrech MF.	55
Tabulka 17 – Vliv na retenční čas látek při různých poměrech MF fosforečnanový pufr:ACN.	55
Tabulka 18 - Naměřené hodnoty při různých hodnotách pH.	55
Tabulka 19 - Vliv na plochu chromatografického píku při různých hodnotách pH.	56
Tabulka 20 - Vliv různých hodnot pH na retenční čas stanovovaných látek.	56

9. Použitá literatura

- [1] KLOUDA, P., 2003. *Moderní analytické metody*. Ostrava: Pavel Klouda. ISBN 80-86369-07-2.
- [2] CHRISTIAN, G. D., 2004. *Analytical chemistry*. New Jersey: John Wiley. ISBN 0-471-45162-2.
- [3] HOLDING, S. R. *Gel permeation chromatography*. In: Endeavour, 1984 [cit. 2016-08-30]. ISSN 01609327. Dostupné z:
<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0160932784901248>
- [4] RABELO, D. a COUTINHO, F. M. B., 1994. *Structure and properties of styrene-divinylbenzene copolymers* In: Polymer Bulletin. [cit. 2016-08-28]. ISSN 0170-0839. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/BF00293496>
- [5] CAZES, J., 2010. *Encyclopedia of chromatography*. Boca Raton: CRC Press. ISBN 978-1-4200-8480-1.
- [6] BILYK, I. a NĚMEC, R., 1988. *Vybrané laboratorní metody*. Praha: Avicenum.
- [7] SNYDER, Lloyd R., KIRKLAND, J. J. a DOLAN, J. W., 2010. *Introduction to modern liquid chromatography*. New Jersey: John Wiley. ISBN 978-0-470-16754-0.
- [8] CHAWLA, G. a RANJAN, CH., 2016. *Principle, Instrumentation, and Applications of UPLC: A Novel Technique of Liquid Chromatography* In: Open Chemistry Journal. [cit. 2016-08-31]. ISSN 1874-8422. Dostupné z:
<http://benthamopen.com/ABSTRACT/CHEM-3-1>
- [9] NOVÁKOVÁ, L. a DOUŠA M., 2013. *Moderní HPLC separace v teorii a praxi*. Praha [i.e. Hradec Králové]: Lucie Nováková. ISBN 978-80-260-4243-3.
- [10] LOUGH, W. J. a WAINER, I. W., 1995. *High performance liquid chromatography: fundamental principles and practice*, 1995. New York: Blackie Academic & Professional. ISBN 0751400769.
- [11] HOLZBECHER, Z. a CHURÁČEK, J., 1987. *Analytická chemie*. Praha: SNTL.

-
- [12] IDEX H & S. *HPLC center pathway* [obrázek]. IDEX Health & Science [online]. [cit. 2016-08-24]. Dostupné z <https://www.idex-hs.com/media/wysiwyg/hplc-center-pathway.jpg>
- [13] HARVEY, D., 2000. *Modern analytical chemistry*. Boston: McGraw-Hill. ISBN 0071169539.
- [14] KAZAKEVICH, Y. a LOBRUTTO, R., 2007. *HPLC for pharmaceutical scientists*. New Jersey: Wiley-Interscience. ISBN 0471681628.
- [15] ARDREY, R. E., 2003. *Liquid chromatography - mass spectrometry: an introduction*. New York: J. Wiley. ISBN 0471498017.
- [16] KARLÍČEK, R. et al., 2005. *Analytická chemie pro farmaceuty*. Praha: Karolinum. ISBN 80-246-0348-9.
- [17] KLIMEŠ, J. et al., 2006. *Kontrola léčiv I.* Praha: Karolinum. ISBN 80-246-0419-1.
- [18] KLIMEŠ, J. et al., 2007. *Kontrola léčiv II.* Praha: Karolinum. ISBN 978-80-246-1460-1.
- [19] KLIMEŠ, J. et al., 2011. *Kontrolně-analytické hodnocení léčiv lékopisnými metodami*. Hradec Králové: Nucleus HK. ISBN 978-80-87009-29-1
- [20] ŠABARTOVÁ, J., 1994. *Validace analytických metod* In: Věstník SÚKL 1/1994, Státní ústav pro kontrolu léčiv (1993).
- [21] SIGMA-ALDRICH. *(R)-(+)-Propranolol hydrochloride* [obrázek]. Sigma-Aldrich [online]. [cit. 2016-09-05]. Dostupný z <http://www.pharmacopeia.cn/v29240/images/v29240/g-720.gif>
- [22] Český lékopis 2009: Doplněk 2013 = Pharmacopoea Bohemica MMIX: Addendum MMXIII, 2013. Praha: Grada Publishing. ISBN 978-80-247-4679-1.
- [23] LÉAUTÉ-LABRÈZE, CH., DUMAS DE LA ROQUE, E., HUBICHE, T. et al., 2008. *Propranolol for Severe Hemangiomas of Infancy* In: The New England Journal of Medicine. [cit. 2016-08-16]. Dostupné z: <http://www.nejm.org/doi/full/10.1056/NEJMc0708819#t=article>

[24] ZAHÁLKA, L., MATYSOVÁ, L., ŠKLUBALOVÁ, Z., KLOVRZOVÁ, S. a SOLICH, P., 2013. *Simultaneous Determination of Propranolol Hydrochloride and Sodium Benzoate in Oral Liquid Preparations by HPLC* In: *Chromatographia*. [cit. 2016-08-29]. ISSN 0009-5893. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s10337-013-2457-z>