

**UNIVERZITA KARLOVA**  
**FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ**

Katedra analytické chemie

**Vývoj a validace UHPLC metody pro stanovení koncentrace  
omeprazolu v orálních suspenzích**

**DIPLOMOVÁ PRÁCE**

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

Hradec Králové, 2017

Veronika Reiská

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

V Ostravě dne 27.4.2017

Veronika Reiská

Mé poděkování patří doc. PharmDr. Ludmile Matysové Ph.D. a Mgr. Kateřině Kučerové za odborné vedení, pomoc, vstřícné jednání, rady a čas, které mi věnovaly při vypracování diplomové práce.

# Abstrakt

Univerzita Karlova

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra analytické chemie

**Kandidát:** Veronika Reiská

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

**Název diplomové práce:** Vývoj a validace UHPLC metody pro stanovení koncentrace omeprazolu v orálních suspenzích

Byly nalezeny vhodné podmínky pro stanovení omeprazolu a jeho rozkladného produktu v orálních suspenzích.

Analýza byla provedena na koloně Kinetex<sup>TM</sup> 1,7  $\mu\text{m}$ , C18 100 A, 50 x 2,1 mm, (Phenomenex, USA). Jako mobilní fáze byl použit 0,025 mol/l fosforečnanový pufr a acetonitril v poměru 74:26. Jako vhodné pH vodné fáze byla zvolena hodnota 7,6. Byla využita metoda vnitřního standardu, kterým byl methylparaben. Cílové analyty byly detekovány při vlnové délce 300 nm.

Po stanovení optimálních podmínek bylo proměřeno 6 vzorků orálních suspenzí omeprazolu. K rozpouštění vzorků byla využita mobilní fáze.

Metoda byla validována.

**Klíčová slova:** omeprazol, UHPLC, orální suspenze

# Abstract

Charles University

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Analytical Chemistry

**Candidate:** Veronika Reiská

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

**Title of diploma thesis:** Development and validation of UHPLC method for determination of omeprazole in oral suspensions

The aim of the diploma thesis was to find out suitable conditions for method which enables to determine the concentration of omeprazole in oral suspensions.

There was used the column Kinetex™ 1.7 μm, C18 100 A, 50 x 2.1 mm, (Phenomenex, USA) for analysis. The mobile phase was 0.025mol/L phosphate buffer and acetonitrile in ratio 74:26. A suitable pH value of 7.6 was chosen. The internal standard method of methylparaben was applied. The whole analysis was detected on the wavelength of 300 nm.

After finding of optimal conditions, 6 different samples of oral omeprazole suspensions were measured. The solution of the mobile phase was used for dissolution of samples.

The method was validated.

**Keywords:** omeprazole, UHPLC, oral suspensions.

# Obsah

<b>1</b>	<b>ÚVOD</b> .....	<b>8</b>
<b>2</b>	<b>CÍL PRÁCE</b> .....	<b>9</b>
<b>3</b>	<b>TEORETICKÁ ČÁST</b> .....	<b>10</b>
<b>3.1</b>	<b>Funkce žaludeční sliznice</b> .....	<b>10</b>
<b>3.2</b>	<b>Inhibitory protonové pumpy</b> .....	<b>11</b>
3.2.1	Omeprazol.....	12
<b>3.3</b>	<b>Vysokoúčinná kapalinová chromatografie</b> .....	<b>14</b>
3.3.1	Schéma kapalinového chromatografu.....	14
3.3.2	Kolony používané v kapalinové chromatografii.....	15
3.3.3	Mobilní fáze.....	19
3.3.4	Detektory.....	19
<b>3.4</b>	<b>Ultra vysokoúčinná kapalinová chromatografie</b> .....	<b>22</b>
<b>3.5</b>	<b>Validace analytické metody</b> .....	<b>23</b>
3.5.1	Opakovatelnost.....	24
3.5.2	Zdánlivý počet teoretických pater.....	24
3.5.3	Rozlišení chromatografických píků.....	24
3.5.4	Faktor symetrie.....	25
3.5.5	Limit detekce a kvantifikace.....	25
3.5.6	Přesnost.....	25
3.5.7	Správnost.....	26
3.5.8	Linearita.....	26
3.5.9	Selektivita.....	26
3.5.10	Robustnost.....	26
<b>4</b>	<b>EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST</b> .....	<b>27</b>
<b>4.1</b>	<b>Použité chemikálie</b> .....	<b>27</b>
<b>4.2</b>	<b>Přístroje a pomůcky</b> .....	<b>28</b>
<b>4.3</b>	<b>Příprava roztoků</b> .....	<b>29</b>
4.3.1	Tlumivý fosforečnanový roztok.....	29

4.3.2	Mobilní fáze.....	29
4.3.3	Zásobní roztoky standardů.....	30
4.3.4	Pracovní roztoky standardů.....	30
<b>4.4</b>	<b>Přenos metody na UHPLC.....</b>	<b>31</b>
<b>5</b>	<b>VÝSLEDKY A DISKUZE.....</b>	<b>33</b>
<b>5.1</b>	<b>Chromatografické podmínky.....</b>	<b>33</b>
5.1.1	Vlnová délka detekce.....	33
5.1.2	Vnitřní standard.....	33
5.1.3	Mobilní fáze a hodnota pH.....	35
5.1.4	Analytická kolona.....	35
5.1.5	Souhrn optimalizovaných chromatografických podmínek.....	37
<b>5.2</b>	<b>Suspenze omeprazolu.....</b>	<b>37</b>
<b>5.3</b>	<b>Validace metody.....</b>	<b>38</b>
5.3.1	Test vhodnosti systému.....	38
5.3.2	Validace metody.....	40
<b>6</b>	<b>ZÁVĚR.....</b>	<b>48</b>
<b>7</b>	<b>SEZNAM ZKRATEK.....</b>	<b>49</b>
<b>8</b>	<b>LITERATURA.....</b>	<b>51</b>

# 1 Úvod

Omeprazol patří do skupiny léků zvaných inhibitory protonové pumpy neboli blokátory  $H^+/K^+$  ATPázy. Blokováním protonové pumpy může dojít až k úplnému potlačení sekrece kyseliny chlorovodíkové v žaludku. Její nadměrná sekrece způsobuje pálení žáhy, vředy žaludku či duodena, nebo gastroesofageální reflux a Zollinger-Ellisonův syndrom.

Nejen dospělí, ale i děti mohou trpět gastroesofageálním refluxem, pálením žáhy, či vředy. K usnadnění aplikace je pro děti vhodnější léčba tekutou formou, jako jsou suspenze, nebo sirupy. S pevnými lékovými formami mohou mít děti problém při polykání. Dalším problémem je, že hromadně vyráběné léky obsahují v jednotce (kapsli) vysokou dávku omeprazolu. Řešením se jeví rozdělení do více kapslí za pomoci laktózy nebo jiné pomocné látky nebo právě příprava omeprazolových orálních suspenzí ze suroviny, což velmi usnadňuje podávání a přesné dávkování léčiva.

Pro ověření koncentrace omeprazolu a případných rozkladných produktů v orálních suspenzích a sledování jejich stability lze využívat vysokoúčinnou kapalinovou chromatografii v kombinaci s ultrafialovou detekcí. Pro urychlení analýzy se může využít vyšších tlaků u ultra vysokoúčinné kapalinové chromatografie.



## **2 Cíl práce**

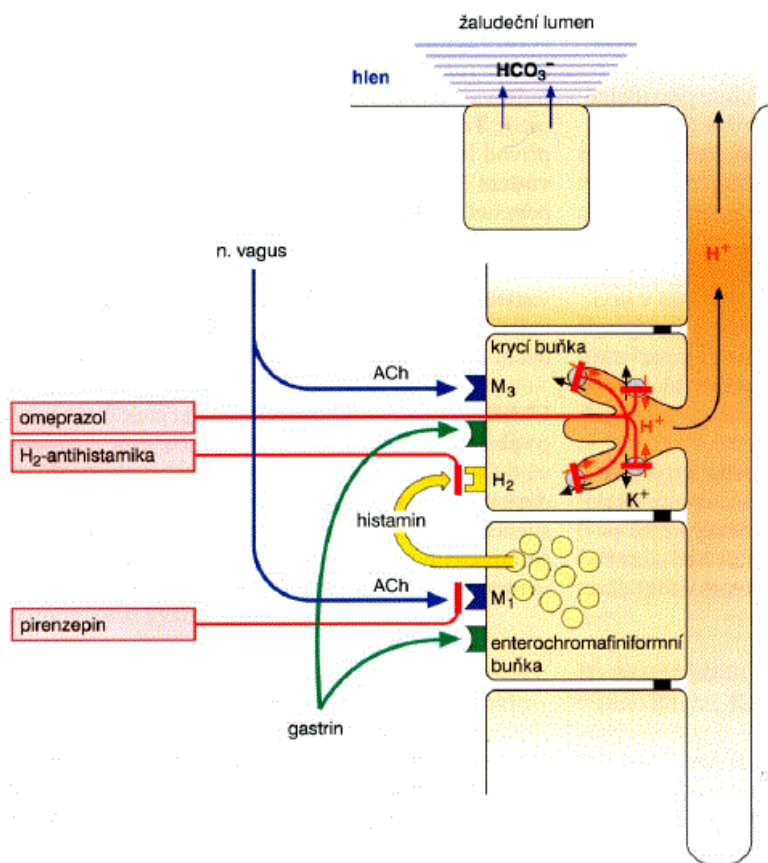
Cílem této diplomové práce bylo nalezení vhodných chromatografických podmínek pro stanovení obsahu omeprazolu, validace a následné využití metody pro měření reálných vzorků orálních suspenzí.

## 3 Teoretická část

### 3.1 Funkce žaludeční sliznice

Sliznice žaludku za normálních podmínek bývá chráněná před vlivem kyseliny chlorovodíkové tvorbou zásaditého hlenu. Občas však může dojít k porušení rovnováhy mezi tvorbou kyseliny chlorovodíkové a hlenu ve prospěch kyseliny. K této poruše může dojít i díky vnějším vlivům, jako je nadměrné pití kávy, kouření, alkohol, kořeněná jídla nebo nadměrné užívání nesteroidních antiflogistik, které snižují tvorbu prostaglandinů. Kyselina pak naleptává sliznici a dochází k tvorbě vředů <sup>[1]</sup> <sup>[2]</sup>.

Hlavní buňky sliznice prostřednictvím prostaglandinů PGE<sub>2</sub>, PGI<sub>2</sub> a NO tvoří žaludeční hlen a ionty HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>. Hlen spolu s ionty tvoří na povrchu sliznice neutrální pH. Naopak krycí neboli parietální buňky mohou do žaludečního lumen vylučovat H<sup>+</sup> pomocí H<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPázy. Pro sekreci kyseliny chlorovodíkové v parietálních buňkách je zapotřebí aktivace M<sub>3</sub>-receptorů acetylcholinem, který se uvolňuje ze zakončení nervu vagu. Dále se musí aktivovat i gastrinový receptor uvolněním gastrinu. Gastrin a acetylcholin dále vedou k sekreci histaminu enterochromafinními buňkami. Histamin se naváže na H<sub>2</sub>-receptor v parietálních buňkách a tím ho aktivuje. Aktivací parietálních buněk se přesune protonová pumpa (H<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPáza) do apikální membrány, kde dochází k výměně H<sup>+</sup> a K<sup>+</sup> <sup>[1]</sup> <sup>[2]</sup>.



**Obrázek 1:** Funkce žaludeční sliznice a farmakologické ovlivnění [2]

Sekrece kyseliny chlorovodíkové se dá ovlivnit na různých místech. Zablokováním muskarinových receptorů pomocí piranzepinu, zablokováním histaminových receptorů pomocí H<sub>2</sub>-antihistaminik nebo zablokováním H<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPázy pomocí inhibitorů protonové pumpy [1] [2].

### 3.2 Inhibitory protonové pumpy

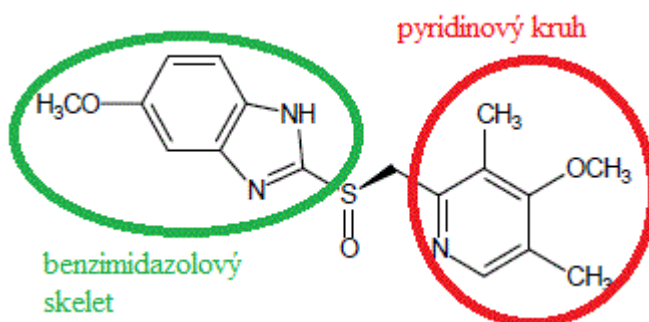
Mezi inhibitory protonové pumpy řadíme léčiva, jako jsou omeprazol, esomeprazol, pantoprazol, lansoprazol. Podávají se ve formě proléčiva a na účinnou látku se aktivují až v těle při kyselém pH. Snižují nebo úplně potlačují vylučování kyseliny chlorovodíkové v žaludku. Inhibitory protonové pumpy na H<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPázu působí ireverzibilně. Proto se tento protein musí nasynthetizovat nový, aby mohla pumpa opět fungovat [3].

Inhibitory protonové pumpy se indikují při onemocněních, jako jsou peptické vředy, u těžších forem gastroesofageálního refluxu, gastropatie vyvolané především NSAID a Zollingerova-Ellisonova syndromu. V kombinaci s antibakteriálními léčivy se využívají k eradikaci *Helicobacter pylori*, který je příčinou primárních peptických vředů. Nejčastěji se používá kombinace omeprazol, amoxicilin a klaritromycin<sup>[3]</sup>.

Inhibitory protonové pumpy snižují sekreci kyseliny chlorovodíkové už za 2-3 hodiny, ale k úplnému potlačení sekrece dochází až po několika dnech. Pro zvýšení efektu se inhibitory protonové pumpy podávají ráno po celonočním lačnění. Po ukončení léčby přetrvává účinek dalších 48-72 hodin<sup>[3]</sup>.

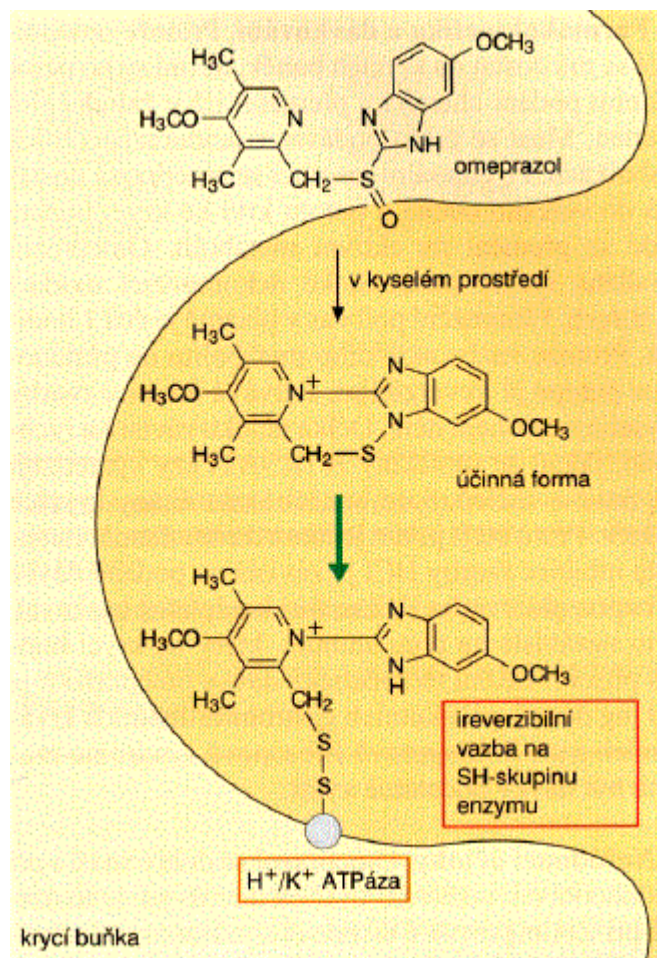
### 3.2.1 Omeprazol

Omeprazol je slabá báze s  $pK_a$  okolo 4. Je nejdéle používaný a nejprostudovanější inhibitor protonové pumpy. Způsobuje nejsilnější inhibici vylučování kyseliny chlorovodíkové. Jeho strukturu tvoří benzimidazolový skelet a substituovaný pyridinový kruh, které jsou spojené methylsulfonylovým můstkem<sup>[2] [4] [5] [6]</sup>.



**Obrázek 2:** Struktura omeprazolu<sup>[7]</sup>

Je stálý v zásaditém prostředí, v kyselém se rozkládá na aktivní metabolit. Proto se omeprazol podává v enterosolventních tobolkách, aby se vstřebávaly až v tenkém střevě. Poté se krevní cestou transportuje do žaludeční sliznice. Hromadí se v silně kyselém kanalikulárním prostředí krycích buněk. Zde vzniká aktivní forma, která se kovalentně váže na protonovou pumpu<sup>[2] [4] [5] [6]</sup>.



**Obrázek 3:** Aktivace omeprazolu na aktivní metabolit <sup>[2]</sup>

V krevním řečišti se omeprazol váže z 95% na plazmatické bílkoviny. Je to středně silný inhibitor CYP450 2C19 a substrát CYP450 3A4, což může vést k interakcím s léky, které jsou také substráty cytochromu P450, jako je např. klopidogrel, R-warfarin, fenytoin a diazepam. Tím, že omeprazol zvyšuje v žaludku pH, může dojít ke snížení biologické dostupnosti léků, vstřebávajících se v kyselém pH. Mezi tyto léky patří antimykotika ketokonazol a itraconazol <sup>[3] [8] [9]</sup>.

V České republice je registrovaných a obchodovatelných mnoho léčivých přípravků s omeprazolem jako léčivou látkou.

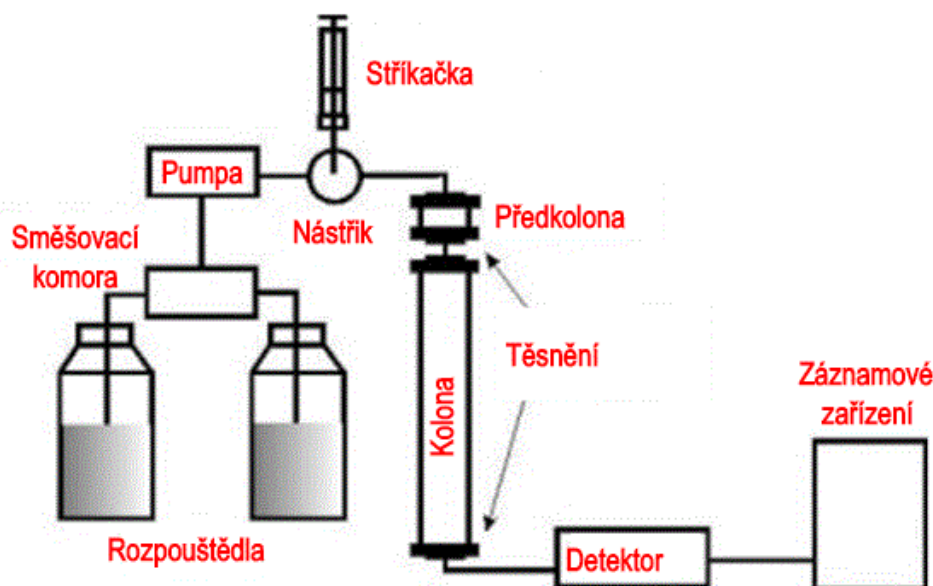
### 3.3 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie

Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC, High Performance Liquid Chromatography) patří mezi separační metody. Dochází při ní k dělení směsi látek mezi dvě nemísitelné fáze, mobilní a stacionární, a vytváření rovnovážných stavů dělených látek mezi těmito fázemi. Mobilní fáze je pohyblivá a tvoří ji kapalina. Tato kapalina protéká chromatografickou kolonou, ve které je umístěná stacionární fáze. Stacionární fáze je naopak nepohyblivá a tvoří ji buď tuhá látka, nebo kapalina zakotvená na tuhém nosiči. Na této fázi dochází k zadržování látek. Důvodem různé retence směsí látek jsou odlišné interakce s fázemi. Díky vysokým tlakům, které vhánějí mobilní fázi do kolony, patří tato metoda mezi rychlé<sup>[10][11][12][13]</sup>.

HPLC je analýza kvantitativní, kdy se měří koncentrace nebo množství sloučeniny ve vzorku pomocí plochy pod píkem, i analýza kvalitativní, kdy lze zjistit totožnost různých látek ve vzorku pomocí retenčního času a porovnání se standardním roztokem látky<sup>[14]</sup>.

#### 3.3.1 Schéma kapalinového chromatografu

Mobilní fáze je do systému vháněná ze zásobních nádob s kapalinami díky čerpadlu (pumpě). Pomocí stříkačky nebo autosampleru dochází k nástřiku vzorku. Ten postupuje spolu s mobilní fází dále až ke koloně, na které je separován. Před kolonou se nachází předkolona, která tuto kolonu chrání před případnými nečistotami. Výsledky jsou zaznamenány na detektoru a přeneseny do počítače, kde díky speciálnímu programu získáme chromatogram daného vzorku<sup>[10][15]</sup>.

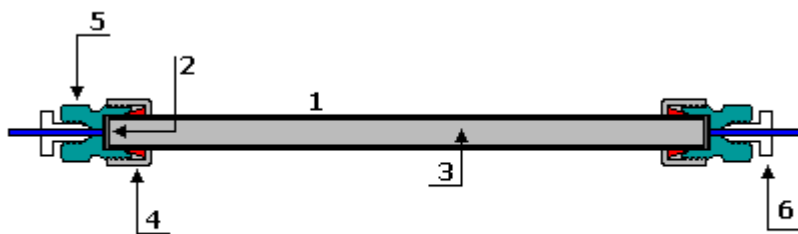


Obrázek 4: Schéma HPLC [15]

### 3.3.2 Kolony používané v kapalinové chromatografii

Kolony používané ve vysokoúčinné kapalinové chromatografii jsou komerčně vyráběny nejčastěji z nerezové oceli, plastu (PEEK – polyetheretherketon) nebo borosilikátového skla. Kolona musí být chemický inertní, odolávat vysokým tlakům a vnitřní povrch musí být hladký. Délka kolony bývá nejčastěji 5-30 cm, vnitřní průměr 2-5 mm a jsou naplněny částicemi o velikosti 1-10  $\mu\text{m}$  [10].

HPLC kolona se skládá z kovového pláště (1) uzavřeného kovovou fritou (2), která zamezuje uvolnění stacionární fáze (3). Na obou koncích je ochranný kroužek (4) a koncová hlavice (5) se vstupem pro kapiláru se šroubem (6) [16].



Obrázek 5: HPLC kolona [16]

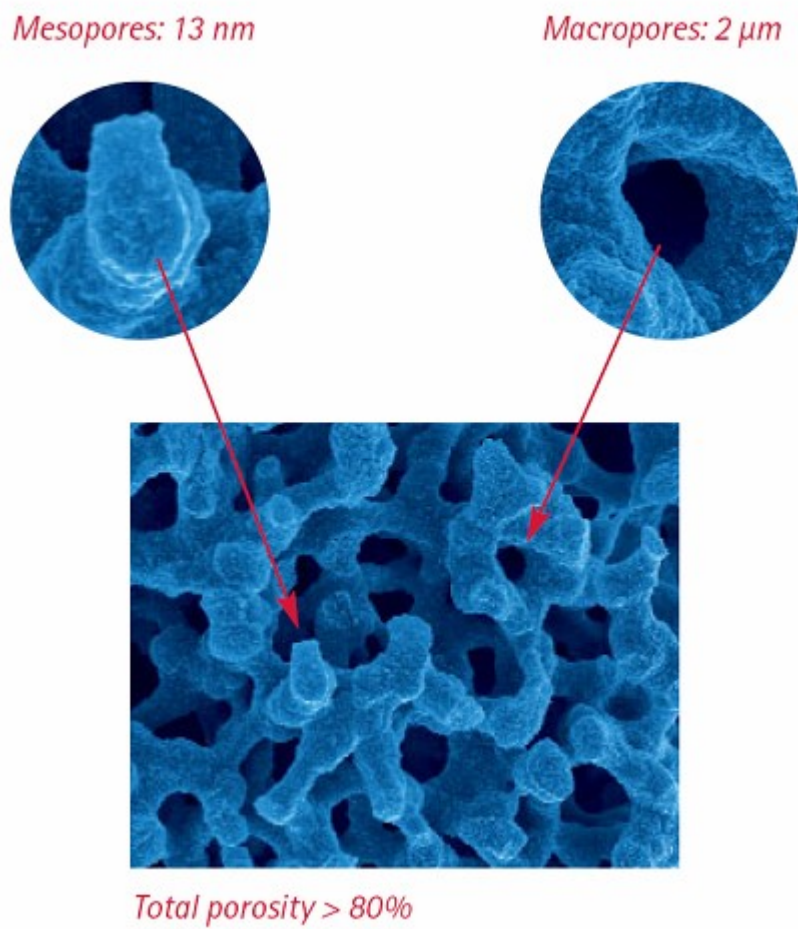
Stacionární fáze v koloně je dosud nejčastěji tvořena silikagelem. Aktivní centra silikagelu tvoří hydroxylové skupiny –OH na povrchu silikagelu. Díky hydroxylovým skupinám je povrch silikagelu mírně kyselý, a proto lépe zadržuje bazické a neutrální látky. Je potřeba, aby hodnota pH mobilní fáze byla maximálně 8, aby nedocházelo k rozpouštění silikagelu. Dále se používá oxid hlinitý nebo chemicky vázané polymery. Nově se jako sorbenty používají malé rigidní porézní částice nebo monolity s velkou plochou povrchu <sup>[16]</sup>.

Podle polaritý mobilní a stacionární fáze rozlišujeme chromatografii s normálními a obrácenými (reverzními) fázemi. Chromatografie s normálními fázemi nastává, když stacionární fáze je polárnější než mobilní a v případě obrácených fází je polárnější mobilní fáze. Mezi ligandy na povrchu stacionárních fází používaných při normální chromatografii patří např. -OH, -NH<sub>2</sub>, -CN, -NO<sub>2</sub> a ligandy používaných při reverzibilní chromatografii např. -C8, -C18, fenyl, amidová fáze, alkyl-, aryl- <sup>[11]</sup>.

### 3.3.2.1 *Monolitní kolona*

Kolony, které jsou tvořeny jedním kusem porézního materiálu a ne částicemi sorbentu, se nazývají monolitické kolony. Monolitické kolony mají dva typy pórů - velké (makropóry), zajišťující rychlý tok mobilní fáze a středně velké póry (mesopóry), poskytující velkou separační kapacitu <sup>[16]</sup>.





**Obrázek 6:** Makropóry a mesopóry <sup>[16]</sup>

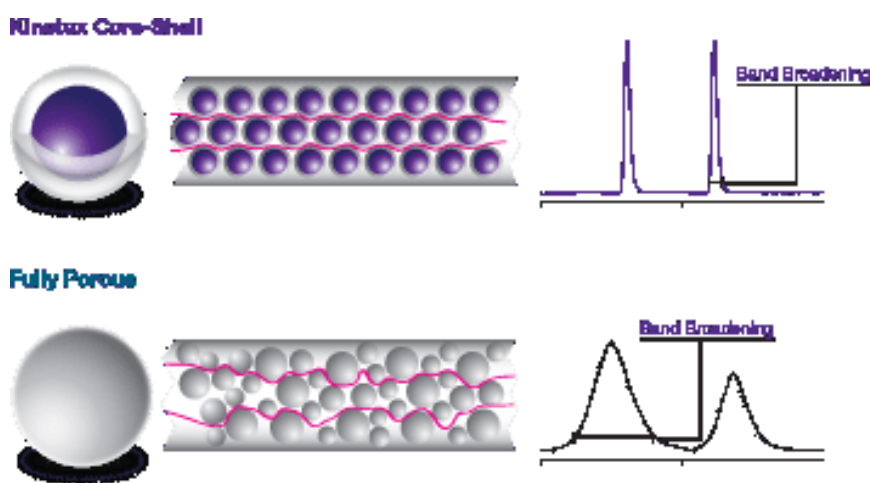


**Obrázek 7:** IonSwift anion-výměnná monolitická kolona <sup>[17]</sup>

### 3.3.2.2 Kolona s porézním povrchem

Tyto kolony využívají tzv. core-shell částice, kdy je vnitřní sorbent tvořen pevným jádrem s porézním obalem. Jádro nejčastěji tvoří oxid křemičitý. Oproti plně porézním částicím dochází k rychlejšímu přenosu hmoty a snížení rozmývání píků<sup>[18][19]</sup>.

Tato technologie se nejčastěji využívá u kolon určených pro ultra účinnou kapalinovou chromatografii. Tyto kolony odolávají vyšším tlakům, čím se významně urychluje doba analýzy. Rovněž se snižuje spotřeba rozpouštědel, zlepšuje se rozlišení, citlivost a účinnost<sup>[18][19]</sup>.



**Obrázek 8:** Porovnání rozmývání píků u core-shell kolony a plně porézní kolony<sup>[19]</sup>

Jedna z předních firem vyrábějící core-shell kolony je firma Phenomenex z USA. Její kolony Kinetex byly využity při vlastní analýze.



**Obrázek 9:** Kolony Kinetex <sup>[19]</sup>

### 3.3.3 Mobilní fáze

Mobilní fáze před vstupem do systému musí být odplyněna, aby nedocházelo k uvolnění bublin. Bubliny mohou způsobit problémy, jako jsou nestabilita základní linie, neopakovatelnost retenčních časů a další. Proto musí být použity velmi čisté mobilní fáze. Jestliže je součástí mobilní fáze voda vyráběná v laboratoři, musí být předem přefiltrována přes membránový filtr <sup>[10]</sup>.

Složení mobilní fáze se během analýzy může, ale i nemusí měnit. Pokud je složení po celou dobu analýzy stejné, hovoříme o isokratické eluci. Mění-li se složení mobilní fáze, jedná se o uvolňování gradientovou eluci. Výhodou gradientové eluce je zrychlení analýzy látek s rozdílnými retenčními vlastnostmi <sup>[11]</sup>.

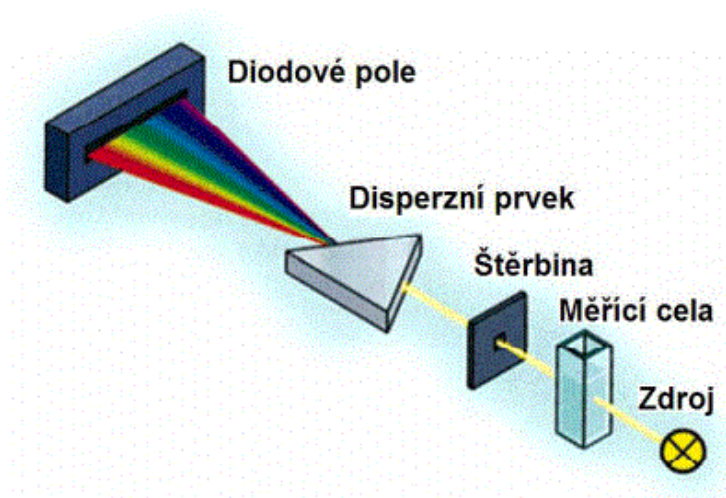
### 3.3.4 Detektory

Detektor je podstatná část HPLC systému. Slouží k identifikaci analytu. Rozeznáváme detektory dvojího typu. Buď mohou být selektivní (např. spektrofotometrický detektor), nebo univerzální (např. refraktometrický). Dále by měl být detektor vysoce citlivý, odolný vůči změnám tlaků, nedestruktivní. Mezi nejčastěji používané detektory patří spektrofotometrické zahrnující i detekci pomocí diodového pole DAD (Diode Array Detector), refraktometrické, fluorometrické a do popředí se nově dostává i hmotnostní spektrometr <sup>[10] [16] [20]</sup>.

### 3.3.4.1 Spektrofotometrické detektory

Spektrofotometrické detektory pracují na principu absorpce záření o vlnové délce v rozmezí od 190 nm, nacházející se v UV (ultrafialové) oblasti, až po 800 nm v oblasti VIS (viditelného světla) <sup>[10] [16] [20]</sup>.

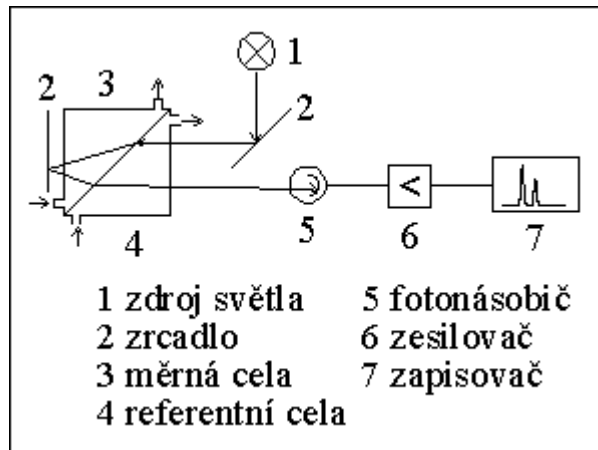
Podle konstrukce je můžeme rozdělit na detektory s fixní vlnovou délkou, měřitelnou vlnovou délkou, programovatelnou vlnovou délkou a detektory diodového pole (DAD). DAD detektory snímají celé spektrum v reálném čase a ukládají je do počítače <sup>[10] [16] [20]</sup>.



**Obrázek 10:** Schéma detektoru s diodovým polem <sup>[21]</sup>

### 3.3.4.2 Refraktometrické detektory

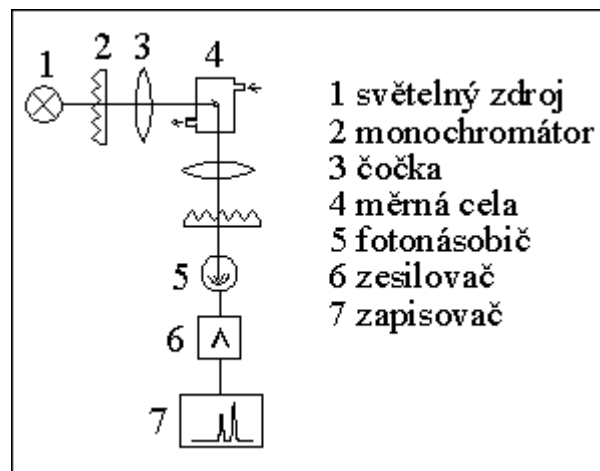
Refraktometrické detektory jsou univerzální. Pracují na principu měření rozdílů mezi indexem lomu eluátu a čisté mobilní fáze. Detektor je tím citlivější, čím je rozdíl v indexech lomu větší. Stabilita detektoru je podmíněná konstantní teplotou, a proto musí být součástí detektoru i termostat. Mezi další nevýhody, kromě teplotní nestability, patří i velmi nízká citlivost <sup>[10] [16] [20]</sup>.



**Obrázek 11:** Schéma refraktometrického detektoru [22]

### 3.3.4.3 Fluorescenční detektory

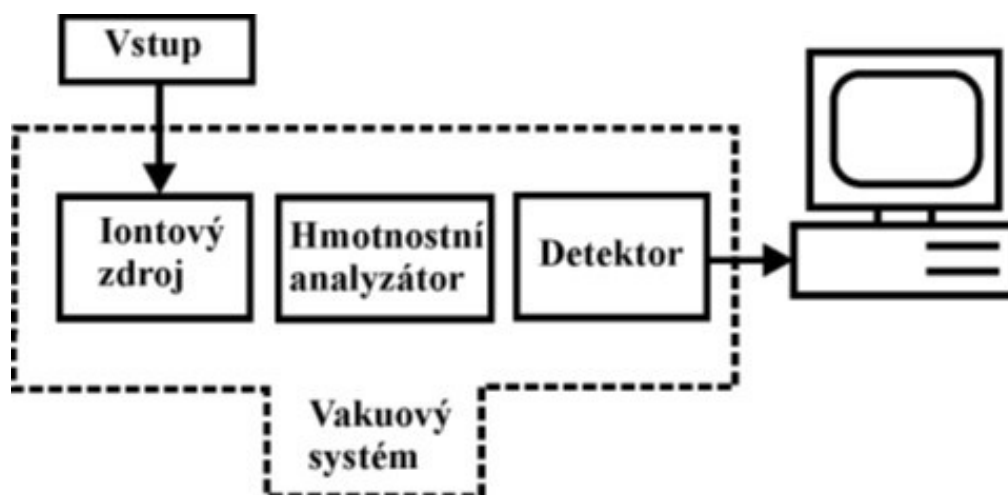
Fluorescenční detektory jsou velmi selektivní a citlivé. Využívají principu fluorescence a měření sekundárního (emisního) záření, které je vydáno látkou po absorpci primárního (excitačního) záření. Lze je použít pouze u látek, které sami fluoreskují nebo které po derivatizaci vhodným činidlem fluoreskují [10] [16] [20].



**Obrázek 12:** Schéma fluorescenčního detektoru [22]

### 3.3.4.4 Hmotnostní spektrometr

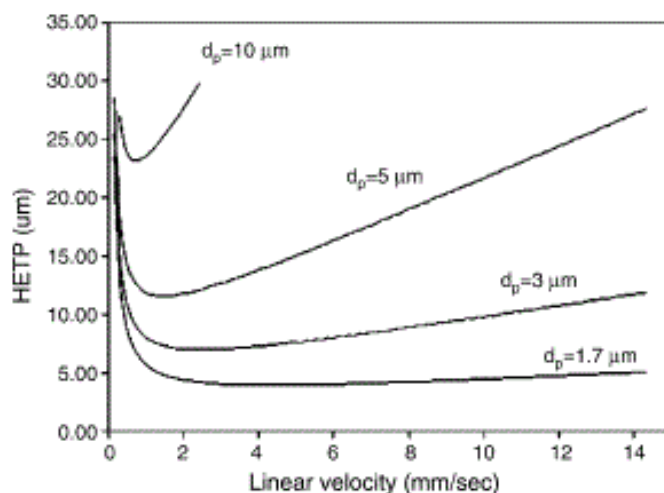
Hmotnostní spektrometr patří mezi specifické detektory. Před samotnou detekcí musí nejprve dojít k ionizaci vzorku, rozdělení iontů podle poměru hmotnost/náboj, urychlení v analyzátoru a až poté dochází k detekci [10] [16] [20].



Obrázek 13: Schéma hmotnostního spektrometru <sup>[23]</sup>

### 3.4 Ultra vysokoučinná kapalinová chromatografie

Ultra vysokoučinná kapalinová chromatografie (UHPLC, Ultra High Performance Liquid Chromatography) je součástí moderních trendů v kapalinové chromatografii. Díky vysokým tlakům, které se během analýzy používají (kolem 100 MPa), se značně urychluje doba celé analýzy (až devětkrát). Pro zvýšení účinnosti separace se využívají částice menší než 2  $\mu\text{m}$ . S klesající velikostí částic roste účinnost separace a rovněž až devětkrát stoupá tlak na koloně. Délka analýzy je přímo úměrná délce kolony a jejímu vnitřnímu průměru. Vztah mezi HEPT (výškový ekvivalent teoretického patra) a lineární průtokovou rychlostí popisuje Van Deemterova rovnice. Vyplývá z ní, že účinnost chromatografického systému je úměrná snížení velikosti částic. Menší průměr částic může výrazně snížit hodnotu HEPT, což vede k vyšší účinnosti a ploššímu tvaru Van Deemterových křivek <sup>[10] [24] [25]</sup>.



**Obrázek 14:** Van Deemterovy křivky pro různé velikosti částic [25]

Kolony používané v UHPLC systémech mají jiné parametry oproti HPLC. Jsou kratší, jejich délka se pohybuje okolo 5-10 cm a vnitřní průměr mají asi 2 mm. Využívají se hlavně kolony s porézním povrchem (core-shell) a kolony se sorbenty připravené Hybrid Particle Technology, která využívá methylenových můstků a spojuje výhodné vlastnosti silikagelu a polymerních sorbentů. V celém UHPLC systému jsou kladeny velké požadavky na šroubení, které musí odolávat vysokým tlakům a teplotám. Vyrábějí se nejčastěji z ocele, vysoce odolného PEEK nebo kombinace ocel-PEEK [10] [24] [25].

Oproti HPLC má UHPLC řadu předností – kratší doba analýzy, vyšší separační účinnost, vyšší citlivost, nižší mez detekce a snížení nákladů. Naopak je zapotřebí součástek odolávajících vysokým tlakům [10] [24] [25].

### 3.5 Validace analytické metody

Validace analytické metody slouží k doložení vhodnosti, přesnosti a spolehlivosti použité metody. Je to série experimentů. Pro spolehlivé výsledky u použité metody je zapotřebí přesně definovat podmínky nebo stanovit kritéria, která umožní bezpečné použití analytického systému. Tato kritéria jsou známá jako test způsobilosti analytického systému. Mezi základní údaje testu způsobilosti patří opakovatelnost a rozlišení chromatografických píků. Dále test způsobilosti může obsahovat i parametry jako je zdánlivý počet teoretických pater a faktor symetrie píku. Mezi obecné parametry

ověřované validací patří limit detekce a kvantifikace, přesnost, správnost, linearita, selektivita a robustnost [7] [26] [27] [28].

### 3.5.1 Opakovatelnost

K vyjádření opakovatelnosti se používá hodnota relativní směrodatné odchylky  $s_r$  (%). Provádí se opakovatelnost pro retenční čas i plochu pod píkem [7] [26] [27] [28].

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

$\bar{y}$ ... průměr jednotlivých hodnot

$y_i$ ... jednotlivé naměřené hodnoty

$n$ ... počet jednotlivých hodnot

### 3.5.2 Zdánlivý počet teoretických pater

Zdánlivý počet teoretických pater  $N$  se používá k vyjádření účinnosti kolony. Čím větší je počet teoretických pater, tím je kolona účinnější [7] [26] [27] [28].

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

$t_R$ ... retenční čas (min)

$W_h$ ... šířka píku v polovině výšky (min)

### 3.5.3 Rozlišení chromatografických píků

Rozlišení  $R_S$  se používá u dvou po sobě jdoucích píků. Hodnoty vyšší než 1,5 odpovídají rozdělení píků na základní linii [7] [26] [27] [28].

$$R_S = \frac{1,18(t_{R2} - t_{R1})}{W_{h1} + W_{h2}}$$

$t_{R1}, t_{R2}$ ... retenční časy píků

$W_{h1}, W_{h2}$ ... šířka píků v polovině výšky



### 3.5.4 Faktor symetrie

Faktor symetrie  $A_S$  určuje symetrii píku. Hodnoty rovné 1,0 značí plně symetrický pík. Hodnoty větší než 1,0 znamenají chvostování píku a hodnoty menší než 1,0 naopak frontující pík [7] [26] [27] [28].

$$A_S = \frac{W_{0,05}}{2d}$$

$W_{0,05}$ ... šířka píku v jeho dvacetině výšky

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

### 3.5.5 Limit detekce a kvantifikace

Limit kvantifikace LOQ (limit of quantitation) a limit detekce LOD (limit of detection) patří mezi parametry citlivosti a provádí se u léčivých přípravků pouze pro rozkladné produkty. Limit detekce je nejnižší detekovatelná koncentrace analytu. Limit detekce se vyjadřuje jako trojnásobek poměru signálu k šumu základní linie. Limit kvantifikace je nejnižší koncentrace analytu stanovitelná s dostatečnou přesností a správností. Limit kvantifikace se vyjadřuje jako desetinásobek poměru signálu k šumu základní linie [7] [26] [27] [28].

### 3.5.6 Přesnost

Přesnost vyjadřuje míru shody mezi jednotlivými měřeními homogenního vzorku. Vyjadřuje se jako relativní směrodatná odchylka  $s_r$  v procentech. Obvykle se z každého analytu připraví 6 vzorků a ty se třikrát proměří [7] [26] [27] [28].

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

$\bar{y}$ ... průměr jednotlivých hodnot

$y_i$ ... jednotlivé naměřené hodnoty

$n$ ... počet jednotlivých hodnot

### 3.5.7 Správnost

Správnost  $R_i$  vyjadřuje těsnost shody získaných hodnot se skutečnou hodnotou. Jedním ze způsobů je vyjádření výtěžnosti v procentech. Hodnota  $R_i$  by se měla pohybovat v rozmezí  $100 \pm 5\%$  a relativní směrodatná odchylka by neměla přesáhnout hodnotu 5% [7] [26] [27] [28].

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

$c_i$ ... stanovená hodnota

$c_0$ ... skutečná hodnota

### 3.5.8 Linearita

Linearita je schopnost metody poskytovat výsledky, které jsou přímo úměrné koncentraci stanovované látky ve vzorku. K vyhodnocení linearity se používá graf závislosti výsledků na koncentraci stanovované látky nebo pomocí korelačního koeficientu, případně hodnota  $R^2$ . Hodnota korelačního koeficientu by se měla, co nejvíce blížit hodnotě 1,0 [7] [26] [27] [28].

### 3.5.9 Selektivita

Selektivita je schopnost změřit vzorek i za přítomnosti jiných látek, které lze v roztoku předpokládat. Tyto látky mohou být příbuzné látky, vedlejší produkty, rozkladné produkty, zbytková rozpouštědla a další [7] [26] [27] [28].

### 3.5.10 Robustnost

Robustnost vyjadřuje změny výsledků analýzy při záměrných změnách podmínek. Mezi podmínky, které mohou ovlivnit výsledky analýzy, patří rozdílná hodnoty pH, teploty, při HPLC změna kolony, složení mobilní fáze a další [7] [26] [27] [28].

## 4 Experimentální část

### 4.1 Použité chemikálie

- Acetonitril (HPLC grade), Sigma Aldrich – Česká republika
- Buthyl 4-hydroxybenzoát (99%), Sigma Aldrich – Česká republika
- Dihydrogenfosforečnan sodný dihydrát, Sigma Aldrich – Česká republika
- Ethyl 4-hydroxybenzoát (99%), Sigma Aldrich – Česká republika
- Hydrogenfosforečnan sodný bezvodý, Sigma Aldrich – Česká republika
- Hydrogenfosforečnan sodný, Sigma Aldrich – Česká republika
- Hydroxid sodný (p.a.), Penta – Česká republika
- Methanol (HPLC grade), Sigma Aldrich – Česká republika
- Methyl 4-hydroxybenzoát (99%), Sigma Aldrich – Česká republika
- Omeprazol (č. šarže 15E12-B11-023793), Nemocniční lékárna Fakultní nemocnice Motol, Praha, Česká republika
- Omeprazole for peak identification CRS – See leaflet, European Pharmacopoeia Reference Standard – Strasbourg, Francie
- Omeprazole impurity D CRS, European Pharmacopoeia Reference Standard – Strasbourg, Francie
- Propyl 4-hydroxybenzoát, Fluka analytical, Sigma Aldrich – Česká republika
- Ultračistá voda (čištěná systémem Milli-Q RG, Millipore, USA)
- Suspenze připravené v lékárně ve Fakultní nemocnici v Motole
  - Suspenze 1 – Omeprazolium 0,2  
Polysorbatum 80 gtt. I  
Na Bic inf. sol. 8,4% ad 105,0
  - Suspenze 2 - Omeprazolium 0,2  
Carmellosum natricum 1,5  
Saccharinum natricum 0,1  
Aurantii dulcis aetheroleum gtt. I  
Na Bic inf. sol. 8,4% ad 105,0
  - Suspenze 3 - Omeprazolium 0,2  
Carmellosum natricum 1,5

	Saccharinum natricum		0,1
	Aurantii dulcis aetheroleum		gtt. I
	Natrium hydrogencarbonas		8,0
	Aqua destilata	ad	105,0
- Suspenze 4 -	Ortanol (HVLP)		0,2 (5 cps. ā 40 mg)
	Carmellosum natricum		1,5
	Saccharinum natricum		0,1
	Aurantii dulcis natricum		gtt. I
	Natrium hydrogencarbonas		8,0
	Aqua destilata	ad	105,0
- Suspenze 5 -	Omeprazolom		0,2
	Carmellosum natricum		1,5
	Saccharinum natricum		0,1
	Natrium edetas		0,01
	Polysorbatum 80		gtt. I
	Aurantii dulcis aetheroleum		gtt. VI
	Natrium hydrogencarbonas		8,0
	Aqua destilata	ad	105,0
- Suspenze 6 -	Omeprazolom		0,2
	SyrSpend SF ALKA unflavoured		dle návodu

## 4.2 Přístroje a pomůcky

- Chromatografické kolony
  - Discovery® HS C18 HPLC Column - 5µm, 150 x 4,6mm, Sigma Aldrich – Česká republika
  - Kinetex™ 1,7 µm – C18 100 A, 50 x 2,1 mm, Phenomenex – USA
  - Kinetex™ 1,7 µm – XB - C18 100 A, 50 x 2,1 mm, Phenomenex - USA
  - Kinetex™ 1,7 µm – Bifenyl, 50 x 2,1 mm, Phenomenex - USA
  - Kinetex™ 1,7 µm – PFP, 50 x 2,1 mm, Phenomenex - USA
  - Kinetex™ 1,7 µm – Phenyl-Hexyl, 50 x 2,1 mm, Phenomenex - USA
- Předkolona – Security Guard ULTRA Cartidges, UHPLC C18, 2,1 mm, Phenomenex – USA

- UHPLC systém LC-30 AD Liquid Chromatograph – Nexera X2 – Shimadzu – Japonsko
  - Vysokotlaké pumpy CTO-20 AC
  - Autosampler SIL-30 AC
  - Degasser DGU-20 A 5R
  - Detektor – detektor s diodovým polem SPD-M30 A
  - Komunikační jednotka s počítačem CBM-20 A (software LC Solution)
  - Kolonový termostat (rozsah 10-85°C)
  - Přepínací ventil
- Analytické váhy Sartorius ME 5- OCE – Německo
- Filtry Syringe filter 4 mm, 0,2 µm PTFE Membrane, Polypropylene Housing, 100 ks, GE Healthcare – USA
- Filtry Nylaflo™, Nylon Membrane Filter 0,2 µm, 47 mm, 100/PK, Pall Life Sciences – USA
- Ultrazvuková lázeň Sonorex Digital, Bandelin – Německo
- pH metr SCHOTT – Česká republika
- Automatické pipety Transferpette S, Brand – Německo

## 4.3 Příprava roztoků

### 4.3.1 Tlumivý fosforečnanový roztok

Na přípravu fosforečnanového pufru bylo použito 2,590 g hydrogenfosforečnanu sodného, 1,825 g dihydrogenfosforečnanu sodného a 475 ml ultračisté vody. Takto připravený roztok byl ředěn ultračistou vodou v poměru 1:1,5 do výsledné koncentrace 0,025 mol/l. Následně bylo pH upraveno hydroxidem sodným na požadovanou hodnotu pH (7,0-7,6). Pufr byl dále filtrován membránovým filtrem o velikosti pórů 0,2 µm<sup>[7]</sup>.

### 4.3.2 Mobilní fáze

Mobilní fáze byla připravena jako poměr acetonitrilu a fosforečnanového pufru. Vzhledem k možnosti tvorby sraženin a ucpání přístroje bylo zapotřebí použít

co nejmenší podíl acetonitrilu. Po vyzkoušení několika různých kombinací byl nakonec zvolen poměr 74:26 (v/v), fosforečnanový pufr:acetonitril.

#### **4.3.3 Zásobní roztoky standardů**

Zásobní roztoky omeprazolu, ortanolu, carmelosy, sacharózy, hydrogenuhličitanu sodného, EDTA, polysorbátu a pomerančové silice, které byly součástí používaných suspenzí, byly nejprve připraveny rozpuštěním v methanolu. Stejně tak byly v methanolu připraveny i roztoky parabenů, z nichž byl nakonec vybrán vnitřní standard methylparaben. K odstranění šumu základní linie, který by mohl případně nastat přítomností methanolu v mobilní fázi, byla po optimalizaci poměru mobilní fáze jako rozpouštědlo při přípravě roztoků 2 mg/ml použita právě mobilní fáze. V mobilní fázi byly poté rozpouštěny i vzorky nečistoty, methylparaben a zkoušené vzorky suspenzí.

Tyto roztoky standardů pomocných látek byly poté proměřeny, aby se zjistily případné nežádoucí shody v retenčních časech s časem omeprazolu. Na chromatogramech těchto zásobních roztoků (ortanolu, carmelosy, sacharózy, hydrogenuhličitanu sodného, EDTA, polysorbátu a pomerančové silice) nebyly v retenčních časech stanovovaných analytů nežádoucí píky, tudíž nijak neovlivňovaly stanovení analytů a nebylo třeba je ze suspenzí před UHPLC analýzou odstraňovat.

Všechny připravené roztoky byly před měřením přefiltrovány do vialky pomocí nylonového filtru Nylaflo™ o průměru pórů 0,2 µm.

#### **4.3.4 Pracovní roztoky standardů**

Pracovní roztok omeprazolu byl připraven do 10 ml odměrné baňky a to tak, že množství 1,900 mg omeprazolu bylo doplněno do 10 ml pracovním roztokem vnitřního standardu. Pracovní roztok vnitřního standardu byl připraven rozpuštěním 1,563 g methylparabenu v 250 ml mobilní fáze. Z takto připraveného roztoku se poté odebral 1 ml a byl doplněn do 25 ml, aby vznikla konečná koncentrace 0,2 mg/ml. Roztoky suspenzí byly připraveny navážením 1 g suspenze a doplněním do 10 ml pracovním roztokem vnitřního standardu. Takto připravené roztoky byly před měřením filtrovány pomocí nylonového filtru Nylaflo™ o průměru pórů 0,2 µm.

#### 4.4 Přenos metody na UHPLC

Pro převedení metody na UHPLC bylo třeba nejprve přepočítat potřebné parametry při měření v HPLC podmínkách. Výpočtem byly získány nové hodnoty pro průtok mobilní fáze a nastříkovaný objem [10].

**Výpočet objemu nástřiku:** 
$$V_2 = V_1 \times \frac{dc_2^2}{dc_1^2} \times \frac{L_2}{L_1}$$

$$V_2 = 3 \times \frac{2,1^2}{4,6^2} \times \frac{50}{150}$$

$$V_2 = 0,21 \mu l$$

$d_{c1}$ ... průměr kolony v HPLC podmínkách (mm)

$d_{c2}$ ... průměr kolony v UHPLC podmínkách (mm)

$L_1$ ... délka kolony v HPLC podmínkách (mm)

$L_2$ ... délka kolony v UHPLC podmínkách (mm)

$V_1$ ... objem nástřiku v HPLC podmínkách ( $\mu l$ )

$V_2$ ... objem nástřiku v UHPLC podmínkách ( $\mu l$ )

Tento objem se jevil jako malý, a proto se raději nejdřív zvolil nástřik větší a to 0,5  $\mu l$ .

**Výpočet průtoku:** 
$$F_2 = F_1 \times \frac{dc_2^2}{dc_1^2} \times \frac{dp_1}{dp_2}$$

$$F_2 = 1 \times \frac{2,1^2}{4,6^2} \times \frac{5}{1,7}$$

$$F_2 = 0,6 ml/min$$

$dp_1$ ... velikost částic v HPLC podmínkách ( $\mu m$ )

$dp_2$ ... velikost částic v UHPLC podmínkách ( $\mu m$ )

$F_1$ ... průtok v HPLC podmínkách (ml/min)

F<sub>2</sub>... průtok v UHPLC podmínkách (ml/min)

Vypočtený průtok 0,6 ml/min byl použit při dalším měření.



## 5 Výsledky a diskuze

### 5.1 Chromatografické podmínky

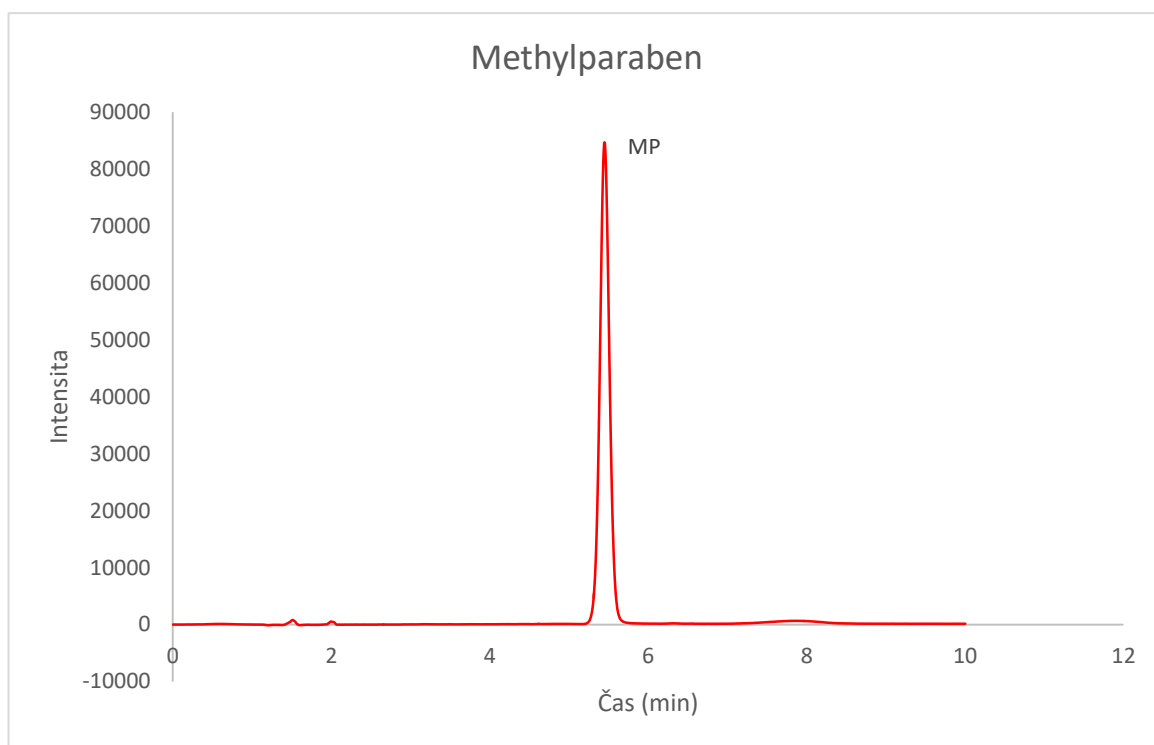
Pro optimalizaci chromatografických podmínek se vycházelo z článku Stability and viscosity of a flavored omeprazole oral suspension for pediatric use autorů Jane E. Burnett a Ethana R. Balkina a Českého lékopisu 2009 [7] [29].

#### 5.1.1 Vlnová délka detekce

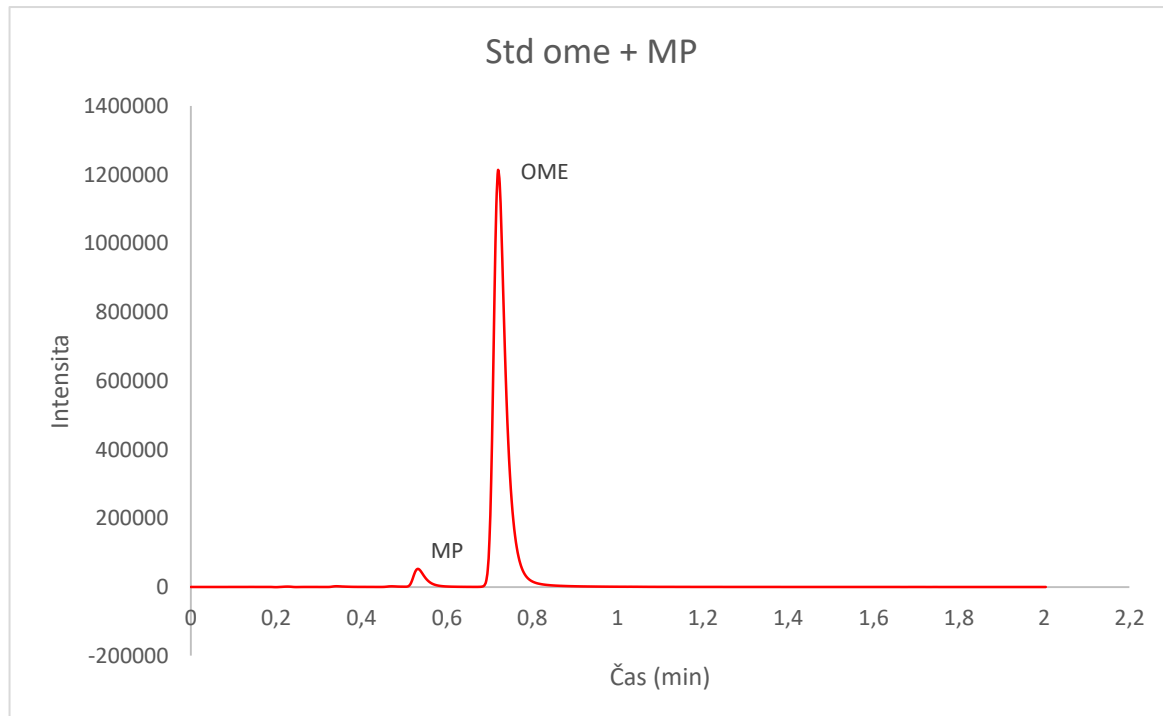
Pro určení vlnové délky pro měření omeprazolu se využily hodnoty dle Burnetta a Balkina, podle kterých tato hodnota činila 300 nm. Tato hodnota byla ověřena i DAD detektorem, který je součástí použitého UHPLC systému. Vlnové délky vhodné k detekci methylparabenu jsou 190 nm a 257 nm, ale dostatečně absorbuje i při hodnotě 300 nm, čehož bylo při měření využito [7] [29].

#### 5.1.2 Vnitřní standard

Při výběru vnitřního standardu bylo přihlíženo k jeho fyzikálně-chemickým vlastnostem a struktuře. Zvažovaly se čtyři možnosti - methylparaben, ethylparaben, propylparaben a butylparaben. Všechny možnosti přicházely do úvahy, protože jejich píky byly odděleny od píku omeprazolu a nijak neinteragovaly. S ohledem na požadovanou rychlost analýzy byl zvolen jako ideální vnitřní standard methylparaben. Jeho retenční čas v HPLC podmínkách se pohyboval okolo 5,45 minut. Zbývající parabeny by analýzu zbytečně prodlužovaly.



Chromatogram roztoku methylparabenu; nástřik 3  $\mu$ l; mobilní fáze: 70:30, pufr:ACN, pH 7,4; průtoková rychlost 1 ml/min; Discovery® HS C18 HPLC Column (5 $\mu$ m, 150 x 4,6mm)



Chromatogram standardu omeprazolu a vnitřního standardu methylparabenu; nástřik 0,5  $\mu$ l; mobilní fáze: 70:30, pufr:ACN, pH 7,4; průtoková rychlost 0,6 ml/min; Kinetex™ 1,7  $\mu$ m C18 (50 x 2,1 mm)

### 5.1.3 Mobilní fáze a hodnota pH

Nejprve bylo ve vialkách vyzkoušeno, jak bude reagovat 0,025 mol/l fosforečnanový pufr a ACN, pro ověření vhodného poměru obou fází. Bylo zjištěno, že při vyšším množství ACN dochází ke srážení fosforečnanů, obsažených v pufru a tyto sráženy by mohly ucpat přístroj. Bylo tedy zvoleno co nejmenší množství ACN. Bylo otestováno několik koncentračních poměrů pufru a ACN. Tyto poměry jsou uvedeny v tabulce 1. Nakonec byl zvolen poměr 26% ACN a 74% fosforečnanový pufr. Při tomto poměru mobilní fáze se nejlépe separoval omeprazol, nečistota D a vnitřní standard.

Tabulka 1: Poměry mobilní fáze

Rozpouštědlo	Poměr mobilní fáze								
	20	25	26	27	27,5	30	32,5	35	40
ACN	20	25	26	27	27,5	30	32,5	35	40
Fosfor. pufr	80	75	74	73	72,5	70	67,5	65	60

Jako první bylo zkoušeno pH 7,0. Ukázalo se, že toto pH není vhodné. Dále bylo testováno pH 7,4, které používali autoři článku. Nakonec bylo zvoleno jako nejvhodnější pH 7,6, které je uvedeno v Českém lékopise. Toto pH je vhodné i s ohledem na stabilitu omeprazolu při vyšších hodnotách pH. Vznikl pík lepšího tvaru a zlepšila se opakovatelnost retenčního času, která u pH 7,0 byla velmi nepřesná [7] [26].

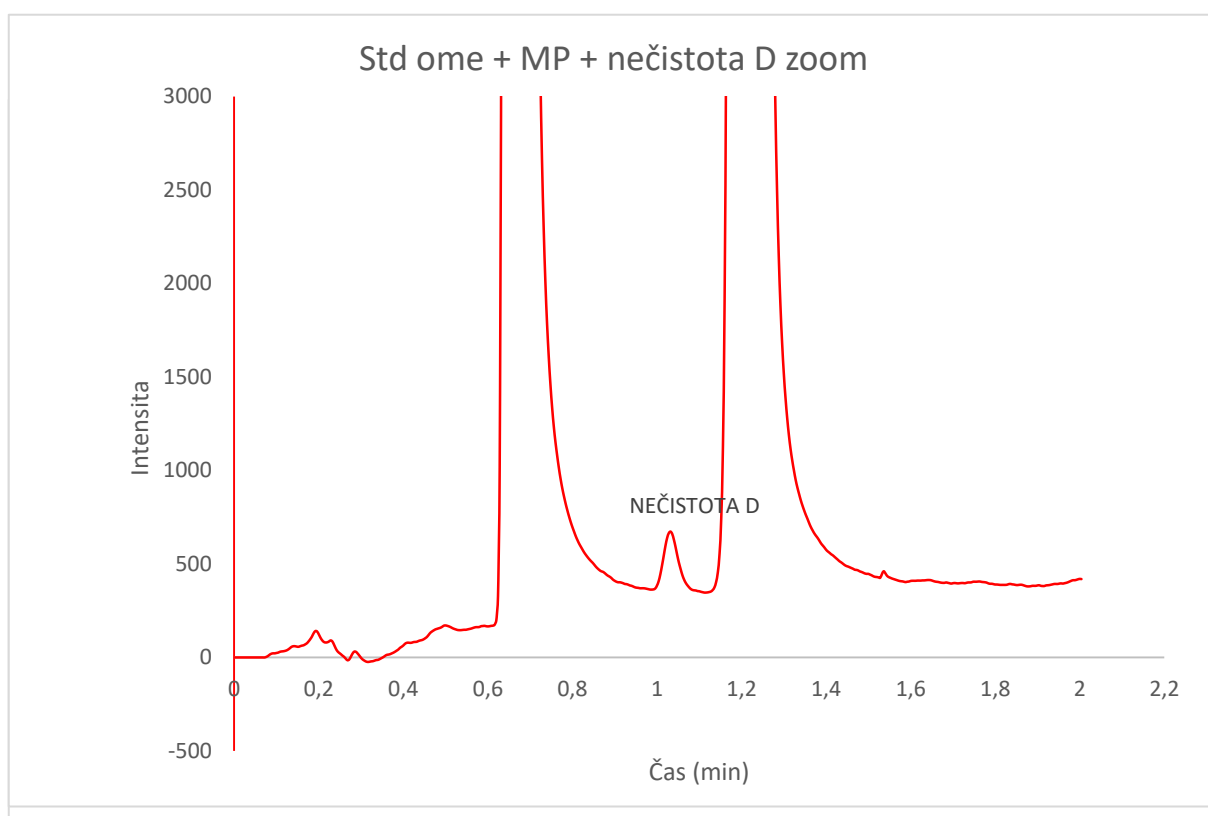
### 5.1.4 Analytická kolona

Bylo testováno několik kolon. Při HPLC podmínkách byla použita kolona Discovery® HS C18 HPLC Column (5µm, 150 x 4,6mm). Po přechodu na UHPLC podmínky byly zkoušeny kolony Kinetex™ 1,7 µm – C18 100 A (50 x 2,1 mm), Kinetex™ 1,7 µm – XB - C18 100 A (50 x 2,1 mm), Kinetex™ 1,7 µm – Bifenyl (50 x 2,1 mm), Kinetex™ 1,7 µm – PFP (50 x 2,1 mm) a Kinetex™ 1,7 µm – Phenyl-Hexyl (50 x 2,1 mm).

Mezi jednotlivými kolonami se neobjevily velké rozdíly. Nakonec byla zvolena kolona Kinetex™ 1,7 µm – C18 100 A (50 x 2,1 mm). Na této koloně byla celková doba analýzy zkrácena na 2 minuty. Omeprazol, methylparaben a nečistota D zde byly

dobře detekovatelné, oddělené a pík omeprazolu měl dostatečnou intenzitu. Tato kolona je vhodná i z důvodu reprodukovatelnosti v jiných laboratořích, kde se kolona se stacionární fází C18 vyskytuje nejčastěji.

Nástřik na koloně v HPLC podmínkách byl vždy 5  $\mu$ l s průtokovou rychlostí 1 ml/min. Na kolonách použitých při UHPLC činil nástřik 0,5  $\mu$ l a průtoková rychlost byla 0,6 ml/min.



Chromatogram standardu omeprazolu, vnitřního standardu methylparabenu a nečistoty D, přibliženo; nástřik 0,5  $\mu$ l; mobilní fáze: 74:26, pufr:ACN, pH 7,6; průtoková rychlost 0,6 ml/min; Kinetex™ 1,7  $\mu$ m C18 (50 x 2,1 mm)

### 5.1.5 Souhrn optimalizovaných chromatografických podmínek

Tabulka 2: Souhrn optimalizovaných chromatografických podmínek

<b>Analytická kolona</b>	Kinetex <sup>TM</sup> 1,7 µm C18 (50 x 2,1 mm)
<b>Mobilní fáze</b>	74% 0,025 mol/l fosforečnanový pufr, 26% ACN
<b>Průtoková rychlost</b>	0,6 ml/min
<b>pH</b>	7,6
<b>Vlnová délka</b>	300 nm
<b>Vnitřní standard</b>	Methylparaben
<b>Nastříknutý objem</b>	0,5 µl
<b>Retenční čas omeprazolu</b>	1,190 min
<b>Tlak</b>	60 MPa

### 5.2 Suspenze omeprazolu

Po vyvinutí metody došlo k její aplikaci na analýzu suspenzí omeprazolu. Ke stanovení výtěžnosti bylo provedeno měření i standardů omeprazolu, vnitřního standardu a nečistoty D. Vzorky suspenzí omeprazolu byly připravovány smícháním navážky 1 g suspenze s 10 ml pracovního roztoku vnitřního standardu o koncentraci 0,2 mg/ml. Po proměření všech suspenzí byla výtěžnost nejlepší u suspenzí číslo 2, 5 a 6. Pouze u suspenze číslo 6 se obsah omeprazolu vešel do limitu  $100 \pm 5\%$ . Obsah omeprazolu ve standardu činil 1,937 mg.

Tabulka 3: Výtěžnost suspenzí

	<b>Reálný obsah omeprazolu (mg)</b>	<b>Výtěžnost (%)</b>
<b>Suspenze 1</b>	0,23	11,78
<b>Suspenze 2</b>	1,60	82,45
<b>Suspenze 3</b>	0,19	9,92
<b>Suspenze 4</b>	1,37	70,55
<b>Suspenze 5</b>	1,63	84,18
<b>Suspenze 6</b>	1,93	99,74

### 5.3 Validace metody

U této metody byl proveden test vhodnosti systému, který zahrnoval měření opakovatelnosti retenčního času i plochy pod píkem, zdánlivý počet teoretických pater, rozlišení chromatografických píků a faktor symetrie píků. Dále byly provedeny parametry validace metody - přesnost, správnost, linearita, selektivita a robustnost. Vše bylo provedeno podle ICH Q2 (R1) doporučených postupů [7] [26] [27] [28].

#### 5.3.1 Test vhodnosti systému

##### 5.3.1.1 Opakovatelnost

Byla prováděna opakovatelnost nástřiků u píků omeprazolu a nečistoty D. U obou byla měřena opakovatelnost retenčního času a plochy pod píkem.

Tabulka 4: Opakovatelnost pro omeprazol

Nástřik	Retenční čas (min)	Plocha pod píkem
1	1,21	4641426
2	1,22	4671557
3	1,21	4644892
4	1,21	4640081
5	1,21	4647549
6	1,20	4608129
<b>Průměr</b>	1,21	4642272,33
<b>s<sub>r</sub> (%)</b>	0,52	0,44

Hodnota relativní směrodatné odchylky by měla být menší než 1%. Hodnoty s<sub>r</sub> pro opakovatelnost retenčního času i plochy pod píkem pro omeprazol vyhovují.

Tabulka 5: Opakovatelnost pro nečistotu D

<b>Nástřik</b>	<b>Retenční čas (min)</b>	<b>Plocha pod píkem</b>
1	1,04	13544
2	1,04	13630
3	1,04	13795
4	1,04	13631
5	1,04	13721
6	1,03	13597
<b>Průměr</b>	1,04	13653
<b>s<sub>r</sub> (%)</b>	0,49	0,66

Hodnota relativní směrodatné odchylky by měla být menší než 1%. Hodnoty s<sub>r</sub> pro opakovatelnost retenčního času i plochy pod píkem pro nečistotu D vyhovují.

#### 5.3.1.2 Zdanlivý počet teoretických pater

Zdanlivý počet teoretických pater byl prováděn pro omeprazol a nečistotu D.

Tabulka 6: Zdanlivý počet teoretických pater omeprazolu a nečistoty D

	<b>Omeprazol</b>	<b>Nečistota D</b>
t <sub>R</sub> (min)	1,21	1,04
W <sub>h</sub> (min)	0,04	0,04
N	5618	4126

#### 5.3.1.3 Rozlišení chromatografických piků

Rozlišení bylo prováděno u píku omeprazolu a nečistoty D.

Tabulka 7: Rozlišení omeprazolu a nečistoty D

	<b>Omeprazol/methylparaben</b>	<b>Nečistota D/omeprazol</b>
<b>R<sub>s</sub></b>	2,44	5,98

Hodnota rozlišení R<sub>s</sub> by měla být minimálně 1,5. Rozlišení mezi omeprazolem a methylparabenem i mezi nečistotou D a omeprazolem vyhovují.

#### 5.3.1.4 Faktor symetrie

Faktor symetrie byl prováděn pro omeprazol a nečistotu D.

Tabulka 8: Faktor symetrie omeprazolu a nečistoty D

	<b>Omeprazol</b>	<b>Nečistota D</b>
W <sub>0,05</sub>	1,20	1,20
d	0,50	0,50
<b>A<sub>s</sub></b>	1,20	1,20

Rozmezí faktoru symetrie je podle Českého lékopisu 0,8 – 1,5 [7]. Hodnoty omeprazolu i nečistoty D vyhovují. Výsledné hodnoty faktoru symetrie značí mírně chvostující píky omeprazolu i nečistoty D.

### 5.3.2 Validace metody

#### 5.3.2.1 Limit detekce a kvantifikace

Limit detekce

$$LOD = 0,031 \mu g/l$$

Limit kvantifikace

$$LOQ = 0,102 \mu g/l$$



### 5.3.2.2 Přesnost

Přesnost byla stanovována u 3 suspenzí, konkrétně u suspenzí 1, 5 a 6. Z každé suspenze bylo připraveno 6 vzorků, které byly proměřovány třikrát. Byla sledována přesnost plochy pod píkem.

Tabulka 9: Přesnost plochy pod píkem u suspenzí 1, 5 a 6

Vzorek č.	Plocha A sus 1	Plocha A sus 5	Plocha A sus 6
1	374520,90	354856,36	348484,85
2	384712,48	353308,13	373428,41
3	384574,83	355669,51	370115,73
4	387069,34	362267,44	361708,59
5	385719,48	359390,73	364578,82
6	386882,56	364946,98	388412,82
<b>Průměr</b>	383910,26	358406,52	367788,42
<b>sr (%)</b>	1,23	1,28	3,61

Přesnost u všech analytů byla menší než 5%.

### 5.3.2.3 Správnost

Správnost byla prováděna u suspenze obsahující nejvíc pomocných látek v suspenzním základu a to u suspenze číslo 5.

Tabulka 10: Správnost omeprazolu

Vzorek č.	c <sub>0</sub> (mg)	Plocha A <sub>i</sub>	c <sub>i</sub> (mg)	R <sub>i</sub> (%)	
1	20,158 odpovídá A <sub>0</sub> : 4642272,33	4512077	19,59	97,20	
2		4333433	18,82	93,55	
3		4502830	19,55	97,00	
4		4522946	19,64	97,43	
5		4546843	19,74	97,94	
6		4487198	19,48	96,66	
				<b>Průměr R<sub>i</sub></b>	96,60
				<b>s<sub>r</sub> (%)</b>	1,71

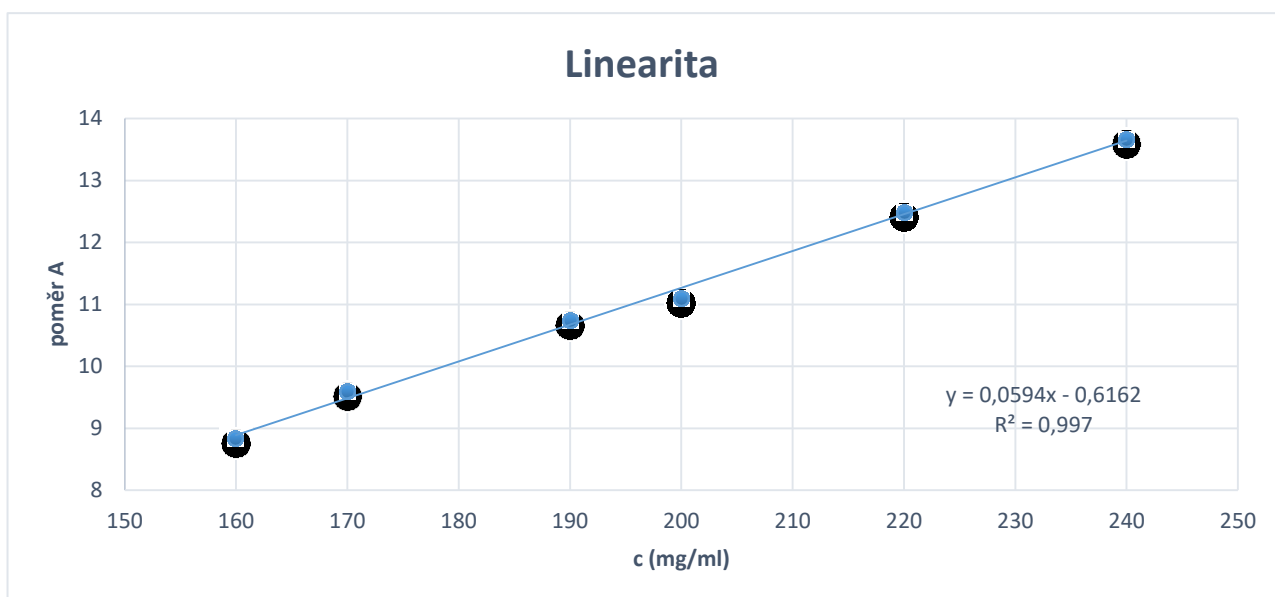
Hodnota výtěžnosti byla průměrně 96,60%, s relativní směrodatnou odchylkou 1,71 %.

#### 5.3.2.4 Linearita

Kalibrační křivka pro omeprazol byla sestavena z 6 bodů, pro nečistotu D z 8 bodů, tvořených hodnotami koncentrací a jim odpovídajícími poměry ploch píků omeprazolu/ nečistoty D a vnitřního standardu v rozmezí 160 – 240 mg/100 ml, respektive 0,137 – 0,732 mg/100ml. Byla použita metoda vnitřního standardu IS.

Tabulka 11: Linearita omeprazolu

c (mg/100 ml)	Plocha omeprazol	Plocha IS	Poměr ploch (A)
160	3455877,00	391223,33	8,83
170	3717422,00	387644,67	9,59
190	4256576,00	396477,67	10,74
200	4287605,67	386318,33	11,10
220	4926282,67	394599,00	12,48
240	5444510,00	398369,33	13,67

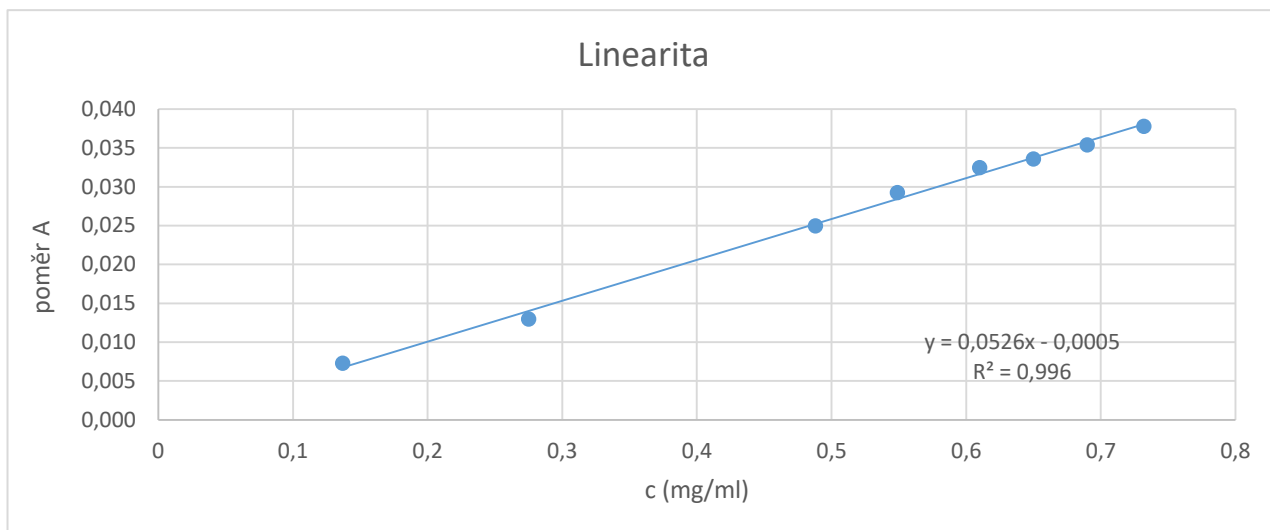


Graf kalibrační křivky pro omeprazol

Korelační koeficient  $R^2$  vyšel 0,997.

Tabulka 12: Linearita nečistoty D

<b>c (mg/100 ml)</b>	<b>Plocha nečistoty D</b>	<b>Plocha IS</b>	<b>Poměr ploch (A)</b>
0,137	2916,67	401481,37	0,01
0,275	5287,00	407551,67	0,01
0,488	9751,33	390610,00	0,02
0,549	11554,00	395033,00	0,03
0,610	13030,00	401276,33	0,03
0,650	13422,33	399897,33	0,03
0,690	14357,67	405618,33	0,04
0,732	15112,33	400131,33	0,04

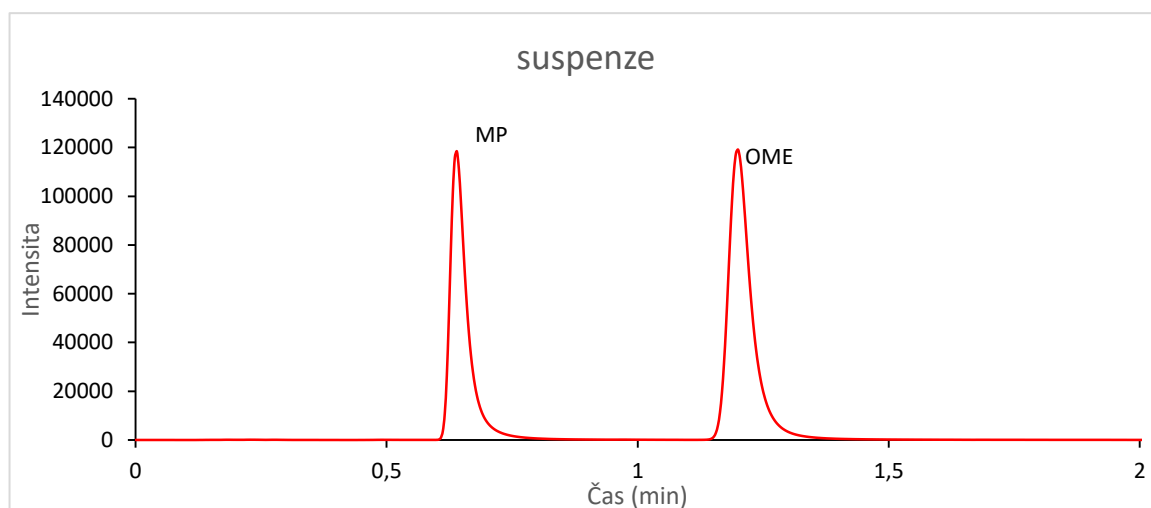


Graf kalibrační křivky pro nečistotu D

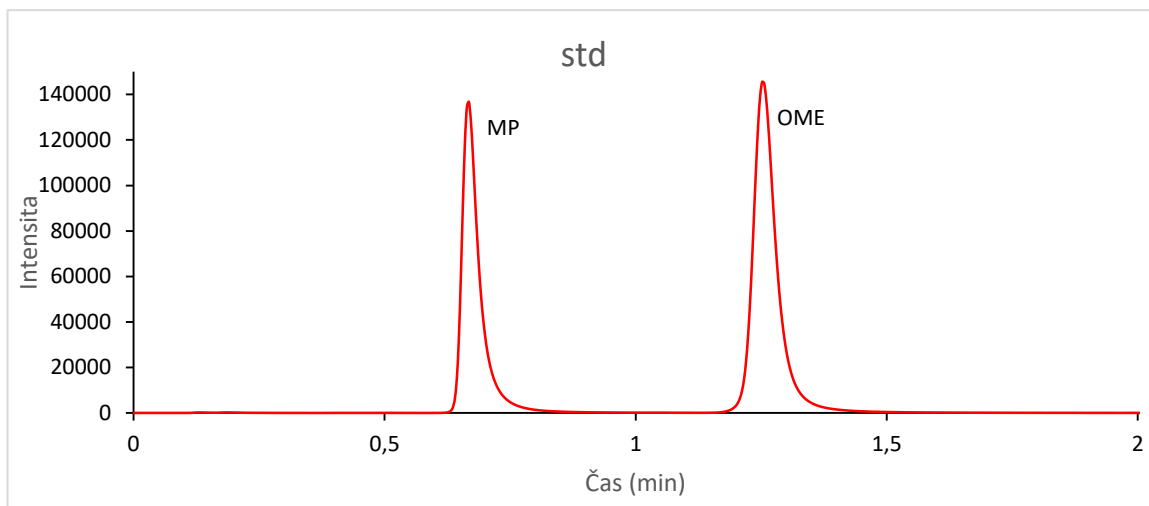
Korelační koeficient  $R^2$  vyšel 0,996.

### 5.3.2.5 Selektivita

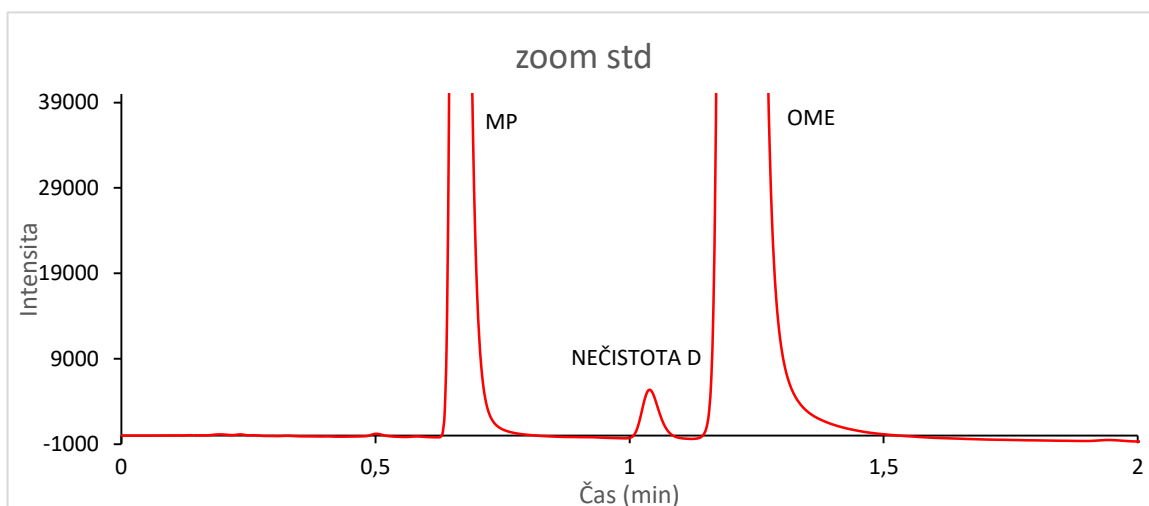
Byly získány chromatogramy vzorku, standardního roztoku a placebo. Z těchto chromatogramů vyplývá, že omeprazol, methylparaben i nečistota D jsou plně separované a jejich analýzu neruší přítomné pomocné látky.



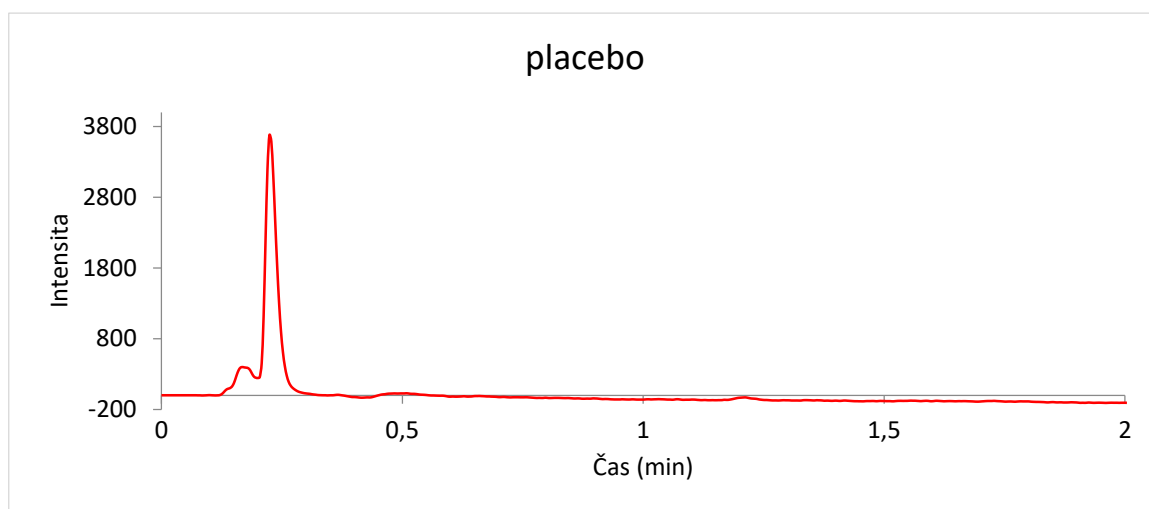
Chromatogram suspenze; nástřik 0,5  $\mu$ l; mobilní fáze: 74:26, pufr:ACN, pH 7,6; průtoková rychlost 0,6 ml/min; Kinetex™ 1,7  $\mu$ m C18 (50 x 2,1 mm)



Chromatogram standardního roztoku; nástřik 0,5  $\mu$ l; mobilní fáze: 74:26, pufr:ACN, pH 7,6; průtoková rychlost 0,6 ml/min; Kinetex™ 1,7  $\mu$ m C18 (50 x 2,1 mm)



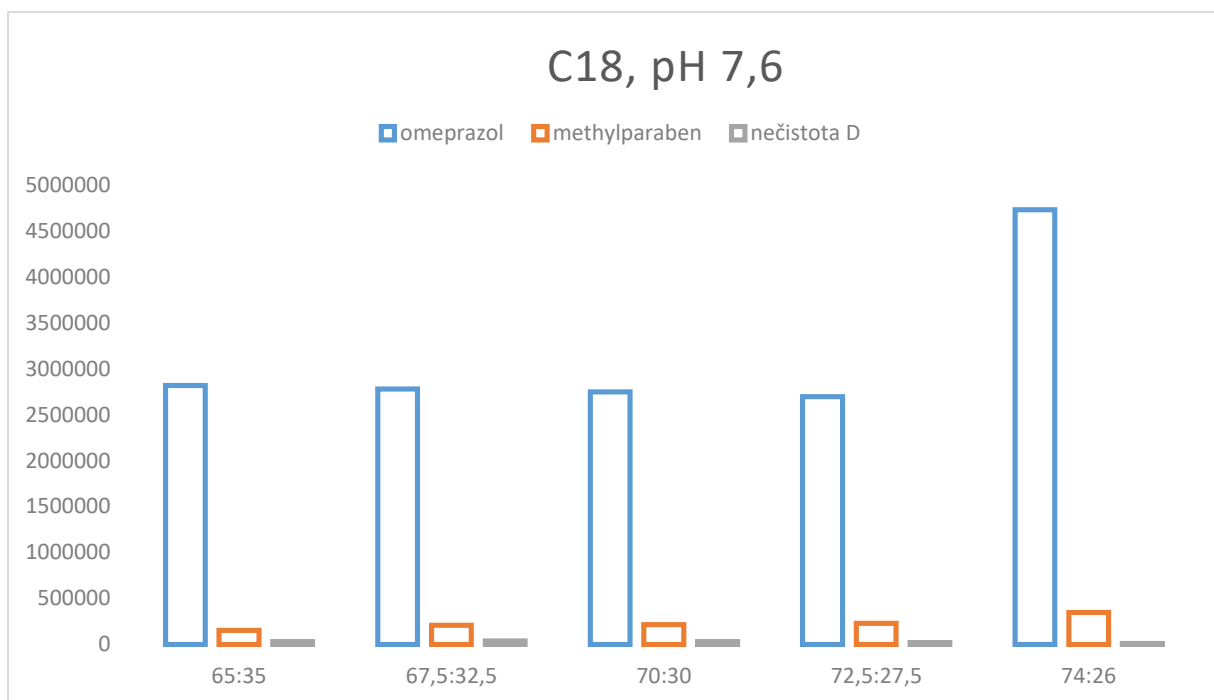
Chromatogram přiblíženého standardního roztoku; nástřik 0,5  $\mu$ l; mobilní fáze: 74:26, pufr:ACN, pH 7,6; průtoková rychlost 0,6 ml/min; Kinetex™ 1,7  $\mu$ m C18 (50 x 2,1 mm)



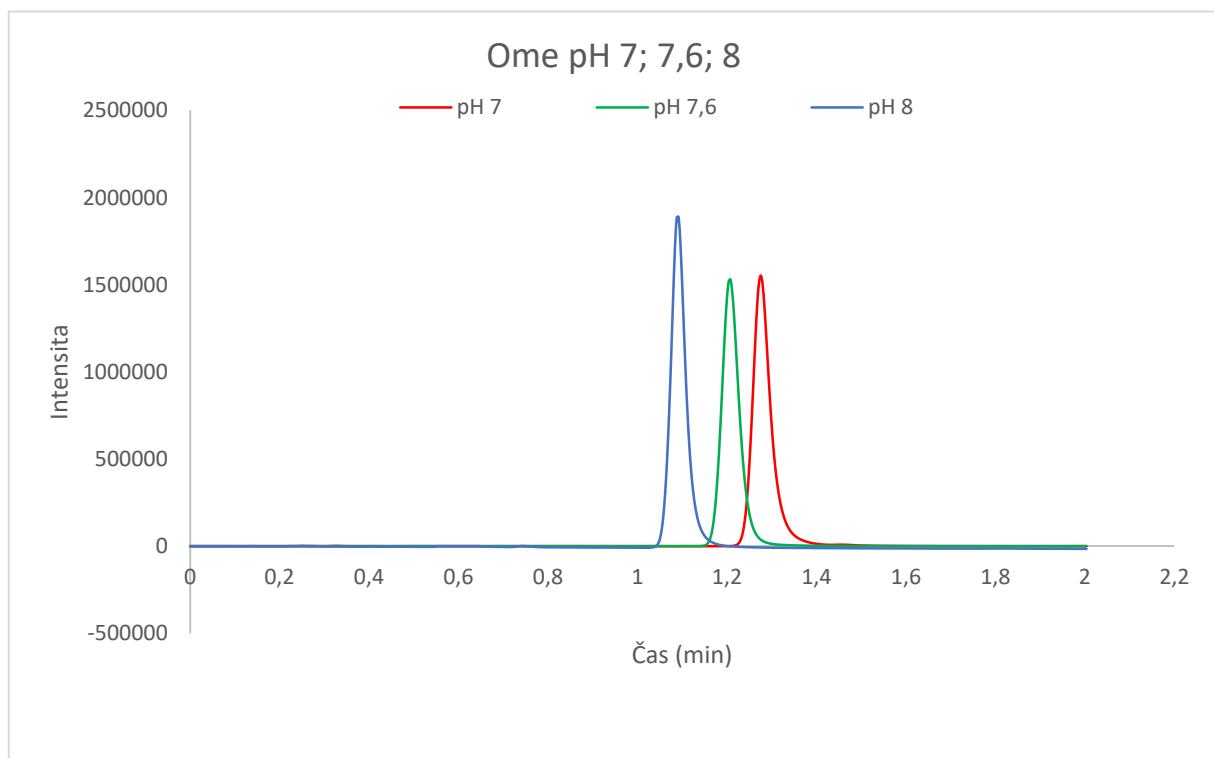
Chromatogram placeba; nástřik 0,5  $\mu$ l; mobilní fáze: 74:26, pufr:ACN, pH 7,6; průtoková rychlost 0,6 ml/min; Kinetex<sup>TM</sup> 1,7  $\mu$ m C18 (50 x 2,1 mm)

#### 5.3.2.6 Robustnost

Byly zkoušeny různé poměry ACN a pufru v mobilní fázi. U fosforečnanového pufru se dále zkoumaly různé hodnoty pH, dále bylo testováno několik kolon. Proměřováním robustnosti bylo zjištěno, že k dokonalé separaci dochází pouze v úzkém rozmezí kolem zvoleného poměru složek v mobilní fázi a pH vodné fáze.



Graf robustnosti plochy pod píkem při různých poměrech ACN a fosforečnanového pufru; nástřik 0,5  $\mu$ l; pH 7,6; průtoková rychlost 0,6 ml/min; Kinetex<sup>TM</sup> 1,7  $\mu$ m C18 (50 x 2,1 mm)



Graf robustnosti při pH 7; 7,6 a 8; nástřik 0,5  $\mu$ l; průtoková rychlost 0,6 ml/min; Kinetex<sup>TM</sup> 1,7  $\mu$ m C18 (50 x 2,1 mm)

## 6 Závěr

Byla vyvinuta chromatografická metoda pro stanovení koncentrace omeprazolu a jeho rozkladného produktu v orálních suspenzích. Tato metoda je moderní, rychlá, správná, přesná a díky běžně dostupné analytické koloně se stacionární fází C18 i snadno reprodukovatelná. Optimální podmínky jsou shrnuty v tabulce č. 12.

Tabulka 12: Souhrn optimálních chromatografických podmínek

<b>Analytická kolona</b>	Kinetex™ 1,7 µm C18 (50 x 2,1 mm)
<b>Mobilní fáze</b>	74% 0,025 mol/l fosforečnanový pufr, 26% ACN
<b>Průtoková rychlost</b>	0,6 ml/min
<b>pH</b>	7,6
<b>Vlnová délka</b>	300 nm
<b>Vnitřní standard</b>	Methylparaben
<b>Nastříknutý objem</b>	0,5 µl
<b>Retenční čas omeprazolu</b>	1,190 min
<b>Tlak</b>	60 MPa

Po proměření všech suspenzí měla nejlepší výtěžnost suspenze 6, kde byl omeprazol rozpuštěn v komerčně vyráběném sirupovém základu.

Metoda byla validována. Byla ověřována opakovatelnost, zdánlivý počet teoretických pater, rozlišení, faktor symetrie, limit detekce a kvantifikace, přesnost, správnost, linearita, selektivita a robustnost. Všechny ověřované hodnoty vyhovovaly požadovaným limitům. Metoda je proto vhodná k analýze léčivých přípravků, obsahujících omeprazol a bude využita pro stabilitní studii uvedeného přípravku.



## 7 Seznam zkratek

ACN	Acetonitril
CYP450 2C19	Cytochrom P450 2C19
CYP450 3A4	Cytochrom P450 3A4
DAD	Detektor s diodovým polem (Diode Array Detector)
EDTA	Kyselina ethylendiamintetraoctová (Ethylendiaminetetraacetic acid)
H <sup>+</sup>	Vodíkový iont
H <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> ATPáza	Protonová pumpa
HCO <sub>3</sub>	Hydrogenuhlíčan
HEPT	Výškový ekvivalent teoretického patra
HPLC	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (High Performance Liquid Chromatography)
ICH	Mezinárodní konference pro harmonizaci technických požadavků pro registraci humánních léčivých přípravků (The International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use)
IS	Vnitřní standard (Internal standard)
K <sup>+</sup>	Draselný iont
LOD	Limit detekce (Limit of detection)
LOQ	Limit kvantifikace (Limit of quantitation)
MP	Methylparaben
NO	Oxid dusnatý
NSAID	Nesteroidní antiflogistika (Nonsteroidal anti-inflammatory drug)
OME	Omeprazol
PEEK	Polyetheretherketon

PGE <sub>2</sub>	Prostaglandin E <sub>2</sub>
PGI <sub>2</sub>	Prostaglandin I <sub>2</sub>
STD	Standard
SUS	Suspenze
UHPLC	Ultra vysokoúčinná kapalinová chromatografie (Ultra High Performance Liquid Chromatography)
UV	Ultrafialové spektrum (Ultra-Violet)
VIS	viditelné spektrum (Visible)

## 8 Literatura

- [1] MARTÍNKOVÁ J. a kolektiv. *Farmakologie pro studenty zdravotnických oborů*. 1. vydání. Praha: Grada, 2007, 229 – 231 s. ISBN 978-80-247-1356-4.
- [2] LÜLLMANN H., MOHR K. a WEHLING M.. *Farmakologie a toxikologie: překlad 15. zcela přepracované vydání*. Vydání 2. české. Praha: Grada, 2004, 269 – 275 s. ISBN 80-247-0836-1.
- [3] SUCHOPÁR J., VALENTOVÁ Š. a kolektiv. *Remedia compendium*. 4. vydání. Praha: Panax, 2009, 6 – 7 s. ISBN 978-80902806-4-9.
- [4] LÜLLMANN H., MOHR K. a WEHLING M.. *Barevný atlas farmakologie: překlad 5. přepracovaného a rozšířeného vydání*. Vydání 3. české. Praha: Grada, 2007, 172 – 175 s. ISBN 978-80-247-1672-5.
- [5] VLČEK J. a VYTRŘÍSALOVÁ M.. *Klinická farmacie II*. 1. vydání. Praha: Grada, 2014, 71 – 82 s. ISBN 978-80-247-4532-9.
- [6] HARTL J., DOLEŽAL M., KRINKOVÁ J., MILETÍN M. a OPLETALOVÁ V.. *Farmaceutická chemie III*. 2., nezměněné vydání. Praha: Karolinum, 2012, 70 – 74 s. ISBN 978-80-246-2131-9.
- [7] *Český lékopis 2009: doplněk 2013*. 1. vydání. Praha: Grada, 2013, 3321-3323 s. ISBN 978-80-247-5193-1.
- [8] LINCOVÁ D. a FARGHALI H.. *Základní a aplikovaná farmakologie*. 2., doplněné a přepracované vydání. Praha: Galén, 2007, 343 – 347 s. ISBN 978-80-7262-373-0.
- [9] Helicid: SPC. *Státní ústav pro kontrolu léčiv* [online]. 2016 [cit. 2016-12-29]. Dostupné z: <http://www.sukl.cz/modules/medication/detail.php?kod=0115308>
- [10] NOVÁKOVÁ L. a DOUŠA M.. *Moderní HPLC separace v teorii a praxi I*. 1. vydání. Praha: Lucie Nováková, 2013, 11 – 12, 33, 49 – 50, 57 – 77, 221 – 229 s. ISBN 978-80-260-4243-3.
- [11] MOTYKA K. a HLAVÁČ J.. *Stručný přehled separačních metod*. 1. vydání. Olomouc: Univerzita Palackého v Olomouci, 2009, 24 – 36 s. ISBN 978-80-244-2304-3.

- [12] KARLÍČEK R.. *Analytická chemie pro farmaceuty*. 4., nezměněné vydání. Praha: Karolinum, 2013, 276 – 281 s. ISBN 978-80-246-2202-6.
- [13] DONG, M.. *Modern HPLC for practicing scientists* [online]. Hoboken, N.J.: Wiley-Interscience, 2006, xvi, [cit. 2017-01-08]. ISBN 04-717-2789-X. Dostupné z: <https://books.google.de/books?id=RYOHFneTy-UC&printsec=frontcover&hl=cs#v=onepage&q&f=false>
- [14] *Getting Started in HPLC* [online]. 2001 [cit. 2017-01-08]. Dostupné z: <http://www.lcresources.com/resources/getstart/section4.htm>
- [15] Obrázek Slide Player *HPLC v analýze potravin a přírodních produktů* [online]. 2017 [cit. 2017-01-08]. Dostupné z: <http://slideplayer.cz/slide/3160943/>
- [16] *HPLC* [online]. 1999 – 2017 [cit. 2017-01-08]. Dostupné z: <http://www.hplc.cz/>
- [17] Obrázek *Pragolab* [online]. 2016 [cit. 2017-01-08]. Dostupné z: <http://www.pragolab.cz/chromatografie-a-ms/spotrebni-material/ic-kolony/hydroxide-selective-anion-exchange-monolithic-columns>
- [18] HAYES R., AHMED A., EDGE T. a ZHANG H.. Core-shell particles: Preparation, fundamentals and applications in high performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A* [online]. 2014, 1357, 36-52 s. [cit. 2017-01-15]. DOI: 10.1016/j.chroma.2014.05.010. ISSN 00219673. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021967314007304>
- [19] Core-Shell technologie. *Phenomenex* [online]. 2017 [cit. 2017-01-15]. Dostupné z: <https://www.phenomenex.com/Kinetex/CoreShellTechnology>
- [20] KLOUDA P.. *Moderní analytické metody*. 2., upravené a doplněné vydání. Ostrava: Pavel Klouda, 2003. 25 – 26 s. ISBN 80-86369-07-2.
- [21] Obrázek CVAČKA J. *Detekce ve vysokoúčinné kapalinové chromatografii* [online]. 24.11.2010 [cit. 2017-01-15]. Dostupné z: <http://web.natur.cuni.cz/~analchem/bosakova/hplc3.pdf>
- [22] Obrázek *High Performance Liquid Chromatography, HPLC* [online]. 2.3.1996 [cit. 2017-01-15]. Dostupné z: <https://web.natur.cuni.cz/~pcoufal/hplc.html>

- [23] Obrázek Slide Player *Hmotnostní spektrometrie* [online]. 2017 [cit. 2017-04-12]. Dostupné z: <http://slideplayer.cz/slide/2523025/>
- [24] GUILLARNE D. a VEUTHEY J.-L.. *UHPLC in life sciences*. Cambridge: Royal Society of Chemistry, 2012. ISBN 978-184-9733-885.
- [25] NOVÁKOVÁ L., MATYSOVÁ L. a SOLICH P.. Advantages of application of UPLC in pharmaceutical analysis. *Talanta* [online]. 2006, 68(3), 908-918 [cit. 2017-01-29]. DOI: 10.1016/j.talanta.2005.06.035. ISSN 00399140. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0039914005003942>
- [26] Validation of analytical procedures: text and methodology Q2(R1) [online]. 2017 [cit. 2016-11-21]. Dostupné z: <http://www.ich.org/products/guidelines/quality/quality-single/article/validation-of-analytical-procedures-text-and-methodology.html>
- [27] NOVÁKOVÁ L. a DOUŠA M.. *Moderní HPLC separace v teorii a praxi II*. 1. vydání. Praha: Lucie Nováková, 2013, 141 - 161 s. ISBN 978-80-260-4244-0.
- [28] ŠABARTOVÁ J. *Věstník SÚKL 1/1994*. 6 – 8 s.
- [29] BURNETT, J. E. a BALKIN E. R.. Stability and viscosity of a flavored omeprazole oral suspension for pediatric use. *American Journal of Health-System Pharmacy* [online]. 2006, 63(22), 2240-2247 [cit. 2016-11-21]. DOI: 10.2146/ajhp060026. ISSN 1079-2082. Dostupné z: <http://www.ajhp.org/cgi/doi/10.2146/ajhp060026>