

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra analytické chemie



Vývoj a validace HPLC metody pro stanovení
ketoprofenu v čípcích

Diplomová práce

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

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

Hradec Králové 2011

Lukáš Zahálka

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

Lukáš Zahálka

Tímto bych chtěl vyjádřit velké poděkování PharmDr. Ludmile Matysové, Ph.D. za odborné vedení mé diplomové práce, za cenné rady, připomínky a vstřícnost. Děkuji také pracovníkům katedry analytické chemie za ochotu a spolupráci při experimentální práci v laboratořích.

Abstrakt

ABSTRAKT

Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra analytické chemie

Kandidát: Lukáš Zahálka

Školitel: PharmDr. Ludmila Matysová, Ph.D.

Název diplomové práce: Vývoj a validace HPLC metody pro stanovení ketoprofenu v
čípcích

Cílem diplomové práce byl vývoj a validace HPLC metody pro stanovení ketoprofenu v přípravku Ketonal[®] 100 mg čípky. Ketoprofen patří mezi NSAID a používá se k symptomatické léčbě zánětlivých, degenerativních a metabolických revmatických onemocnění a ke zmírnění některých akutních i chronických bolestivých syndromů. Při vývoji metody pro stanovení ketoprofenu v čípcích se vycházelo ze dvou metod vyvinutých na Farmaceutické fakultě v Hradci Králové. Metoda pro stanovení diklofenaku v čípcích byla výchozí pro přípravu vzorku a metoda pro stanovení obsahu ketoprofenu, methylparabenu a propylparabenu v gelu byla výchozí pro podmínky HPLC analýzy. Vývoj metody spočíval v modifikaci metody přípravy vzorku, podmínky vlastní HPLC analýzy byly použity nezměněné. Během experimentální práce bylo postupně zjištěno, jaký vliv na stanovení mají jednotlivé kroky přípravy vzorku a teplota při extrakci. Fáze extrakce a centrifugace byly zkráceny na minimum, fáze tavení čípků a homogenizace v ultrazvukové lázni byly z pracovního postupu úplně odstraněny. Z původních 50 minut potřebných pro přípravu vzorku byl čas snížen na 10,5 minut, navíc při teplotě vodní lázně o 10 °C nižší než v původní metodě. Validace metody následně prokázala, že nově vyvinutá metoda poskytuje přesné a správné výsledky a je tedy vhodná pro stanovení obsahu ketoprofenu v léčivém přípravku Ketonal[®] 100 mg čípky. Během hodnocení robustnosti, konkrétně hodnocení vlivu složení mobilní fáze na retenční čas ketoprofenu, bylo pozorováno zkrácení doby analýzy při zvýšení podílu acetonitrilu v mobilní fázi. Další vývoj metody pro stanovení ketoprofenu v přípravku Ketonal[®] 100 mg čípky může tedy spočívat v nalezení takové mobilní fáze, která umožní co nejkratší analýzu při současném zachování vyhovujícího rozlišení chromatografických píků ethylparabenu a ketoprofenu.

Abstract

ABSTRACT

Charles University in Prague, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Analytical Chemistry

Candidate: Lukáš Zahálka

Supervisor: PharmDr. Ludmila Matysová, Ph.D.

Title of Diploma Thesis: Development and validation of HPLC method for the determination of ketoprofen in suppositories

The purposes of diploma thesis were development and validation of HPLC method for the determination of ketoprofen in Ketonal[®] 100 mg suppositories. Ketoprofen belongs to NSAID and it is used for symptomatic therapy of inflammatory, degenerative and metabolic rheumatic diseases and for palliative therapy of some urgent or chronic painful syndromes. During development of determination of ketoprofen in suppositories were used two methods, which were developed at the Faculty of Pharmacy in Hradec Králové. Method for determination of diclofenac in suppositories was default for sample preparation and method of HPLC determination of ketoprofen, methylparaben and propylparaben in gel was basic for conditions of HPLC analysis. Development of method consisted in modification of origin sample preparation method; chromatographic conditions have not been changed. During the experimental work was found to determine what influence has the various steps of sample preparation and extraction temperature. The time of extraction and centrifugation were minimized, the melting of suppositories and the homogenization in ultrasonic bath were totally eliminated. 50 minutes for sample preparation at the beginning were reduced to 10.5 minutes, in addition to temperature of water bath was reduced by 10 °C compared to origin method. Methods validation demonstrated, that developed method provides precise and accurate results and it is suitable for determination of ketoprofen in Ketonal[®] 100 mg suppositories. During robustness testing, influence of variations in mobile phase composition to retention time concretely, it was observed, that increasing of acetonitrile content in mobile phase is shorting the time of analysis. Further development of methods for the determination of ketoprofen in Ketonal[®] 100 mg suppositories may also consist of finding a mobile phase that allows the shortest analysis while maintaining a suitable resolution of chromatographic peaks ethylparaben and ketoprofen.

Obsah

1. Úvod	14
2. Cíl a popis zadání práce	16
3. Teoretická část	18
3.1 Léčivý přípravek Ketonal [®] 100 mg čípky	19
3.1.1 Složení a léková forma	19
3.1.2 Použití	19
3.1.3 Ketoprofen	20
3.2 Chromatografické metody	21
3.2.1 Obecné principy separačních metod	21
3.2.2 Obecné principy chromatografických metod	22
3.3 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC)	24
3.3.1 Obecné vlastnosti a výhody HPLC	24
3.3.2 Princip separace látek	25
3.3.3 Systémy fází pro HPLC	25
3.3.4 Mobilní fáze	28
3.3.5 Typy eluce	28
3.3.6 Přístrojové uspořádání HPLC chromatografu	29
3.3.7 Čerpadla (pumpy)	29
3.3.8 Dávkování roztoku vzorku na kolonu	30
3.3.9 HPLC kolony	30
3.3.10 Detektory používané v HPLC	31
3.3.11 Kvalitativní HPLC analýza	34
3.3.12 Kvantitativní HPLC analýza	34
3.3.13 Validace analytických metod	35
4. Experimentální část	39
4.1 Materiál	40
4.1.1 Vzorky léčivých přípravků	40
4.1.2 Chemikálie	40
4.1.3 Pomůcky a přístroje	40
4.1.4 Laboratorní sklo a pomůcky	41
4.2 Pracovní postup	42
4.2.1 HPLC sestava, podmínky separace	42
4.2.2 Příprava mobilní fáze	42

4.2.3 Příprava zásobního roztoku ethylparabenu (50 mg/100 ml)	43
4.2.4 Příprava standardního roztoku (ketoprofen 125 mg/100 ml, ethylparaben 1mg/100 ml)	43
4.2.5 Příprava pracovního roztoku vnitřního standardu (ethylparaben 1 mg/100 ml).....	43
4.2.6 Příprava vzorku.....	43
4.2.7 Stanovení obsahu ketoprofenu v čípcích.....	44
5. Výsledky a diskuse	45
5.1 Vývoj metody	46
5.1.1 Vývoj metody přípravy vzorku.....	46
5.1.2 Vývoj metody pro vlastní HPLC stanovení	47
5.2 Validace metody.....	48
5.2.1 Test vhodnosti chromatografického systému	48
5.2.1.1 Účinnost chromatografické kolony (počet pater) N	48
5.2.1.2 Faktor symetrie A_S	48
5.2.1.3 Rozlišení chromatografických píků R_S	49
5.2.1.4 Opakovatelnost analýzy	50
5.2.2 Validace analytické metody	51
5.2.2.1 Přesnost	51
5.2.2.2 Linearita	52
5.2.2.3 Správnost.....	54
5.2.2.4 Selektivita.....	55
5.2.2.5 Robustnost.....	57
5.2.3 Závěr	60
6. Shrnutí závěrů práce	61
7. Použitá literatura a další zdroje	63

Seznam zkratek

ACN	Acetonitril
CAS	Chemical Abstracts Service
ČL 2009	Český lékopis 2009
DAD	Diode array detector
EP	Ethylparaben
GC	Plynová chromatografie
GLC	Separace kapalina – plyn
GSC	Separace pevná fáze – plyn
HPLC	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (High Performance Liquid Chromatography)
IEC	Iontově výměnná chromatografie
IR	Infračervená oblast spektra
IS	Vnitřní standard
KP	Ketoprofen
LC	Kapalinová chromatografie
LLC	Separace kapalina – kapalina
LSC	Separace pevná fáze – kapalina
MF	Mobilní fáze
MS	Hmotnostní spektrometrie
NP	Systém normálních fází
NSAID	Nesteroidní antiflogistika
PC	Papírová chromatografie
RP	Systém reverzních fází
RSD	Relativní směrodatná odchylka
SD	Směrodatná odchylka
SF	Stacionární fáze
TLC	Tenkovrstvá chromatografie

UHPLC	Ultraúčinná kapalinová chromatografie
UV	Ultrafialová oblast spektra
UV-VIS	Ultrafialová-viditelná oblast spektra
UZ	Ultrazvuková
3D	Trojrozměrná

1. Úvod

Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (dále HPLC) je v analýze léčiv využívána velice široce. Je to především z toho důvodu, že se jedná o metodu separační, umožňující kvalitativní i kvantitativní analýzu léčivého přípravku. Pro HPLC analýzy je dostačující malé množství vzorku a na rozdíl od klasických např. titračních metod není stanovení rušeno pomocnými látkami léčivého přípravku. Oproti klasickým metodám je však HPLC několikanásobně finančně náročnější na přístrojové vybavení, a proto se u stanovení substancí stále hojně využívají titrační metody.

[1]

Ketonal[®] 100 mg čípky obsahuje účinnou látku ketoprofen. Z chemického hlediska se jedná o derivát kyseliny propionové. Ketoprofen patří mezi NSAID, má analgetický, antipyretický a protizánětlivý účinek. Ketoprofen se používá k symptomatické léčbě zánětlivých, degenerativních a metabolických revmatických onemocnění a ke zmírnění některých akutních i chronických bolestivých syndromů.

[2]

2. Cíl a popis zadání práce

Cílem práce je vývoj a validace HPLC metody pro stanovení ketoprofenu v přípravku Ketonal[®] 100 mg čípky.

Vývoj spočívá v optimalizaci stávajících metod pro přípravu vzorku a stanovení ketoprofenu. Pro přípravu vzorku je výchozí metoda pro stanovení obsahu diklofenaku v přípravku Veral[®] 100 mg čípky [3]; pro vlastní stanovení pak metoda pro stanovení obsahu ketoprofenu, methylparabenu a propylparabenu v přípravku ketoprofen gel 2,5 % (Ketalgen gel) [4].

Teoretická část práce se zabývá chromatografickými metodami (se zaměřením na HPLC) a vlastnostmi přípravku Ketonal[®] 100 mg čípky.

3. Teoretická část

3.1 Léčivý přípravek Ketonal[®] 100 mg čípky

3.1.1 Složení a léková forma

Účinná látka: ketoprofenum 100 mg v jednom čípku

Pomocné látky: adeps solidus (ztužený tuk)

tryglycerida saturata media (střední nasycené triacylglyceroly)

Léková forma: čípky bílé barvy

[2]

3.1.2 Použití

Ketoprofen patří mezi NSAID, má analgetický, antipyretický a protizánětlivý účinek. Ketonal se používá k symptomatické léčbě zánětlivých, degenerativních a metabolických revmatických onemocnění a ke zmírnění některých akutních i chronických bolestivých syndromů.

Přípravek se používá v následujících indikacích:

- revmatoridní artritida
- seronegativní spondylartritida (ankylozující spondylitida, psoriatická a reaktivní artritida)
- dna, pseudodna
- artrózy
- extraartikulární revmatismus (tendinitida, bursitida, kapsulitida ramene apod.)
- pooperační bolesti
- primární dysmenorrhoea
- bolesti skeletu u nádorových metastáz
- poúrazové bolesti.

Dávkování: doporučená dávka je 1-2 čípky denně, přípravek není určen pro děti a mladistvé do 14 let

[2]

3.1.3 Ketoprofen

CAS: 22071-15-4

Definice: Je to kyselina (2RS)-2-(3benzoylfenyl)propanová.

Obsahuje 99,0% až 100,5% sloučeniny $C_{16}H_{14}O_3$, počítáno na vysušenou látku.

Vzhled: Bílý nebo téměř bílý krystalický prášek.

Rozpustnost: Prakticky nerozpustný ve vodě, snadno rozpustný v acetonu, v ethanolu 96% a v dichlormethanu.

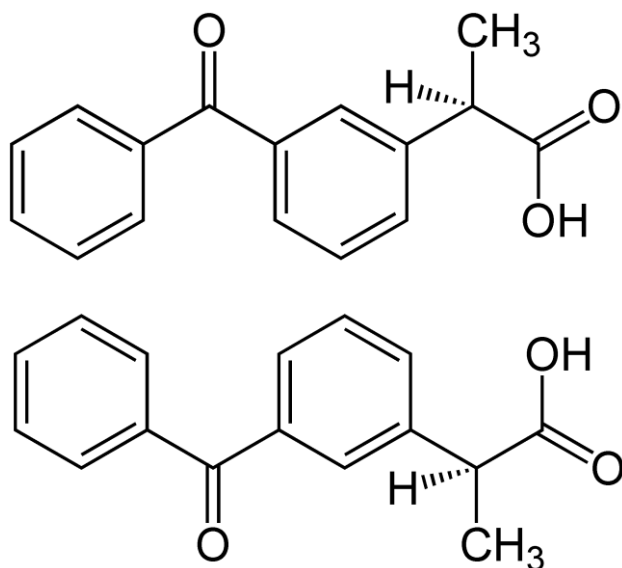
Teplota tání: 94 °C až 97 °C

M_R : 254,28

logP: 2,91

Vzorec: viz. obr. 1

Obr. 1: Chemická struktura obou enantiomerů ketoprofenu [7]



Ketoprofen má svoji monografii s názvem Ketoprofenum v ČL 2009 (evropská část, 2. díl, str. 2428–2430).

[5, 6]

3.2 Chromatografické metody

3.2.1 Obecné principy separačních metod

Chromatografické metody řadíme mezi separační metody. Stanovení jedné složky vzorku obvykle není možné provést přímo po převedení vzorku do roztoku. Většinou je nutné před vlastní analýzou oddělit stanovovanou složku od ostatních nebo oddělit složky, které stanovení ruší. K tomuto účelu se používá separace, kterou můžeme definovat jako operaci, při které se vzorek dělí alespoň na dva podíly odlišného složení.

Separací metody můžeme rozdělit na dvě velké skupiny:

1. Metody založené na rozdílech v rovnovážné distribuci složek mezi dvě fáze – do této skupiny patří např. plynová a kapalinová chromatografie
2. Metody založené na rozdílech v rychlosti pohybu složek – sem patří např. elektroforéza

Od separačních metod používaných v analytické chemii požadujeme, aby umožnily co nejdokonalejší oddělení dané složky a aby se tato složka získala ve formě vhodné k měření. Frakcionační kapacita je parametr, který určuje maximální počet složek, které mohou být určitou metodou separovány v jediné operaci. Chromatografické metody dosahují hodnot frakcionační kapacity 100 a více a používají se proto pro analýzu složitých směsí, např. přírodních materiálů či léčivých přípravků.

[8]

3.2.2 Obecné principy chromatografických metod

Chromatografické metody jsou v analýze biologicky aktivních látek využívány velice široce. Je to především z toho důvodu, že se jedná o vysoce účinné separační metody, umožňující oddělení složek směsi a následnou kvalitativní i kvantitativní analýzu.

U směsí látek nelze většinou použít klasické neseparační metody jako je např. titrace, protože matrice vzorku ruší analýzu samotného analytu.

Vlastním principem všech chromatografických metod je mnohonásobné ustalování rovnováhy součástí analyzované směsi mezi dvěma vzájemně nemísitelnými fázemi.

Nepohyblivá, resp. stacionární fáze (SF), má schopnost různou měrou zadržovat jednotlivé součásti analyzované směsi. Druhá fáze, pohyblivá, resp. mobilní (MF) pak vymývá (eluuje) jednotlivé součásti směsi ze stacionární fáze a odnáší je ve směru toku různou rychlostí, čímž dochází k jejich oddělení. Při styku stacionární a mobilní fáze s dělenými látkami dochází k vzájemným interakcím, které jsou základním předpokladem pro jejich separaci. Míra vymývání látek z mobilní fáze tedy souvisí s různou afinitou dělených látek ke stacionární a mobilní fázi.

Stacionární fáze může být tuhá (sorbet) nebo kapalná. Mobilní fáze může být kapalná (eluent či eluční činidlo) nebo plynná (nosný plyn). Hybnou silou chromatografického systému je tok mobilní fáze, která unáší ionty nebo molekuly. Vlastní dělení látek v systému však závisí na brzdící síle (retenci), která působí selektivně: některá látka je bržděna více, jiná méně. Při chromatografickém procesu se ustavuje dynamická rovnováha mezi vratnou sorpcí na stacionární fázi a desorpcí do mobilní fáze. Rychlost postupu látky závisí na sorpční rovnováze, tj. čím pevněji se látka sorbuje na stacionární fázi, tím pomaleji v chromatografickém systému postupuje.

Dle skupenství mobilní fáze můžeme chromatografické metody rozdělit na kapalinovou chromatografii (LC), kde je mobilní fází kapalina a plynovou chromatografii (GC), kde je mobilní fází inertní plyn.

Kapalinová chromatografie může být realizována v plošném či kolonovém uspořádání. Plošné uspořádání se využívá především u tenkovrstvé chromatografie (TLC) a u dnes již překonané papírové chromatografie (PC). Kolonové uspořádání se využívá nejčastěji u vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC) a u modernější ultraúčinné kapalinové chromatografie (UHPLC).

[1, 8]

Rozdělení chromatografických metod podle podstaty separačního procesu:

1. Adsorpční chromatografie:

Podstatou separace je rozdílná adsorbovatelnost dělených látek na aktivní povrch sorbentu. Jako sorbenty se nejčastěji používají silikagel a oxid hlinitý. V kapalinové chromatografii se jedná o separaci pevná fáze – kapalina (LSC), v plynové chromatografii pevná fáze – plyn (GSC).

2. Rozdělovací chromatografie:

Podstatou separace kapalinové rozdělovací chromatografie je rozdílná rozpustnost dělených látek ve dvou vzájemně nemísitelných kapalinách (LLC), přičemž kapalina použitá jako stacionární fáze je zakotvena na vhodném nosiči. U plynové rozdělovací chromatografie se jedná o separaci v systému kapalina (zakotvená fáze) – plyn (GLC) a podstatou separačního procesu je rozdílná rozpustnost dělených látek unášených nosným plynem v kapalně stacionární fázi.

3. Iontově výměnná chromatografie (IEC):

Lze ji realizovat jen jako kapalinovou chromatografii; stacionární fází jsou iontoměniče (katexy a anexy). Podstatou separace je rozdílná afinita dělených látek, které jsou zpravidla v iontové formě, k iontovýměnným skupinám iontoměniče. Rozdílnost afinity separovaných látek je dána rozdílnými hodnotami disociačních konstant ionogenních skupin, různou velikostí iontů a různým mocenstvím iontů.

4. Gelová chromatografie:

Jedná se o kapalinovou chromatografii, přičemž jsou analyzované látky separovány na základě velikosti molekul. Molekuly látky jsou nesené protékající mobilní fází kolonou naplněnou porézním materiálem (gelem), přičemž pronikají (permeací) do rozpouštědlem naplněných pórů gelu. Malé molekuly pronikají do pórů všech velikostí, větší molekuly jen do větších pórů a velké molekuly, které přesahují průměr pórů, vycházejí z kolony bez jakéhokoliv zdržení. Separace molekul je tedy závislá na rozmezí velikosti pórů zvoleného gelu.

5. Afinitní chromatografie:

Podstatou metod založených na afinitní interakci je tvorba stabilního, specifického komplexu mezi ligandem a bílkovinou (biologicky aktivní látkou a protilátkou). Mezi afinitní páry typu protein–ligand patří např.: enzym–substrát, enzym–inhibitor či protilátka–antigen. Používaný sorbent bývá umístěn v chromatografické koloně nebo je přímo přidán do roztoku vzorku.

Při chromatografické analýze se obvykle nejprve vymyjí balastní bílkoviny a následovně je eluována požadovaná purifikovaná bílkovina. Afinity chromatografie je vysoce selektivní metoda, umožňující separovat velice složité směsi bílkovin. Nevýhodou afinity chromatografie bývá nízká kapacita a vysoká cena afinity sorbentů. Je nepostradatelnou metodou v biomedicíně a v biotechnologiích. V analýze léčiv nachází pouze omezené využití.

[1, 8, 9, 10]

3.3 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC)

3.3.1 Obecné vlastnosti a výhody HPLC

HPLC je vysoce citlivá separační metoda, která je, na rozdíl od plynové chromatografie, vhodná i pro analýzu netěkavých a tepelně labilních látek. HPLC je proto jednou z nejprogresivnějších analytických metod, která nachází široké uplatnění ve všech oblastech analýzy léčiv. Vývoj HPLC začal v 70. letech a stále pokračuje, v nedávné době vedl ke vzniku UHPLC, která umožňuje oproti HPLC několikanásobně zkrátit analýzu a snížit spotřebu mobilní fáze.

HPLC umožňuje podobně jako GC kvalitativní i kvantitativní hodnocení separovaných složek směsi. Pro analýzu pomocí HPLC postačuje minimální množství vzorku. Současné moderní HPLC chromatografy jsou vybaveny autosamplery (automatickými dávkovači), které umožňují automatizaci. V počítačovém programu lze nastavit parametry analýzy a chromatograf pak může provádět desítky analýz bez obsluhy operátora.

Separativní účinnost kapalinové kolonové chromatografie závisí na velikosti částic stacionární fáze. U klasické kapalinové chromatografie přitom mobilní fáze protéká stacionární fází v koloně samospádem. Čím menší a stejnoměrnější jsou jednotlivé částice stacionární fáze, tím větší je účinná plocha a separativní účinnost. Pro dostatečně rychlý průtok mobilní fáze je však zapotřebí ji protlačit kolonou pomocí čerpadla pod vysokým tlakem.

[1, 8]

3.3.2 Princip separace látek

Podobně jako při kapalinové chromatografii v plošném uspořádání (PC a TLC) nastává dělení látek mezi stacionární fází naplněnou v koloně a mobilní fází procházející kolonou, u HPLC navíc za vysokého tlaku. Protože k dělení látek lze přitom využít všech vratných dvoufázových separačních mechanismů (adsorpce, rozdělování, iontová výměna a síťový efekt gelu), je možné nalézt selektivní a účinný chromatografický systém k dělení směsi prakticky všech organických látek rozpustných ve vodě, zředěných kyselinách nebo organických rozpouštědlech.

Předpokladem úspěšné HPLC analýzy, podobně jako u GC, je optimalizace chromatografických podmínek tak, aby jednotlivé separované složky směsi poskytovaly ostré a symetrické chromatografické píky, rozdělené pokud možno až na základní linii.

[1, 8]

3.3.3 Systémy fází pro HPLC

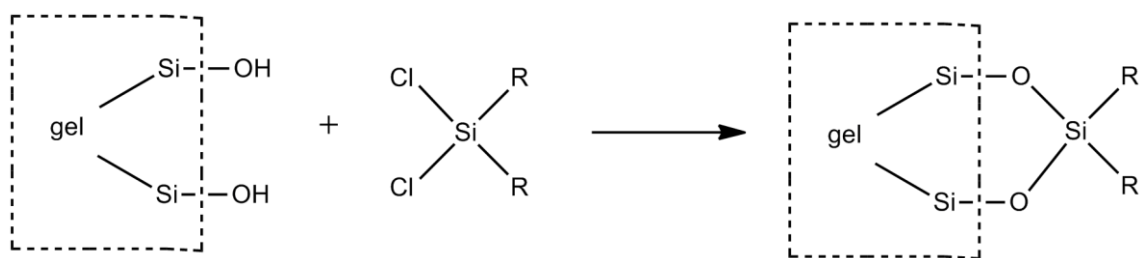
Základní rozdělení systémů fází:

- a) chromatografie s **normálními fázemi (NP)** – stacionární fáze polární a mobilní fáze nepolární
- b) chromatografie s **reverzními fázemi (RP)** – stacionární fáze nepolární a mobilní fáze polární

Pro účinné dělení látek hraje rozhodující roli náplň kolony, tj. kvalita sorbentu, jeho velikost a stejnoměrnost částic, ale i tvar, porozita, struktura. V HPLC se nejčastěji (asi v 90 %) používají tzv. chemicky vázané stacionární fáze (chemicky modifikované stacionární fáze). Na hydroxylové skupiny na povrchu silikagelových zrn (velikost 3, 5 nebo 10 μm) jsou silylací (obr. 2) navázány různé radikály:

- Nejčastěji se jedná o uhlovodíkové řetězce obsahující zpravidla 18 (případně 8) uhlíkových atomů. Jde o nepolární chemicky vázané fáze (RP)
- Radikál obsahuje tříuhlíkatý řetězec zakončený skupinami $-\text{NH}_2$, $-\text{CN}$ aj. Jde o středně polární fáze.

Obr. 2: Chemická modifikace silikagelu pomocí silylace



Komerčně se vyrábějí chemicky modifikované stacionární fáze různých typů v širokém sortimentu a jako nosič, na kterém jsou navázány radikály, se kromě silikagelu používají i jiné materiály. Jako HPLC sorbenty se rovněž používají silikagel a oxid hlinitý (polární sorbenty), i když daleko méně než chemicky modifikované stacionární fáze. Pro iontově výměnné chromatografie se jako sorbenty používají vhodné ionexy. V současné době jsou již běžně komerčně dostupné různé typy chirálních stacionárních fází, umožňující chromatografickou analýzu enantiomerů léčiv. K dělení vysokomolekulárních sloučenin, jako např. bílkovin a polysacharidů, jsou vhodné polymerní gely, jako je dextran (Sephadex).


Pro separaci látek na základě **adsorpce** se využívá **nemodifikovaný silikagel**, na jehož volně přístupné skupiny Si-OH na povrchu se polární látky adsorbují prostřednictvím vodíkových vazeb. Sušením při zvýšené teplotě se silikagel dehydratuje a lze tak získat adsorbent s požadovanou aktivitou. Oxid hlinitý je vhodnějším adsorbentem, zejména pro méně polární látky.

Při **rozdělovací chromatografii** je kapalná stacionární fáze zakotvena na vhodném nosiči. Mechanicky zakotvená kapalná fáze však není pro HPLC příliš vhodná, protože při vysokém tlaku dochází k jejímu narušení. Zde se velmi osvědčily **chemicky modifikované stacionární fáze**. Podle vázané skupiny mají chemicky modifikované fáze různou polaritu od nepolárních (vysoce hydrofobních), používaných pro RP, až po polární (viz. tab. 1).

Pro dělení látek iontového charakteru ve vodě rozpustných léčiv, vitamínů a aminokyselin jsou určeny stacionární fáze s vlastnostmi iontoměničů. (viz. tab. 2)

[1, 8, 11]

Tab. 1: Chemicky modifikované fáze – přehled vázaných skupin dle polarity [8]

Název	Vázaná skupina	Označení	Charakteristika
Oktadecyl	$C_{18}H_{37}$	C_{18} ; RP-18; ODS	nepolární
Oktyl	C_8H_{17}	C_8 ; RP-8	
Ethyl	C_2H_5	C_2 ; RP-2	
Amino	$(CH_2)_3NH_2$		
Cyano	$(CH_2)_3CN$		
Diol	$(CH_2)_3-OCH_2CH(OH)-CH_2(OH)$		
			polární

Tab. 2: Stacionární fáze s vlastnostmi iontoměničů [8]

Název	Vázaná skupina	Charakteristika
Amino	$(CH_2)_3NH_2$	slabě bazický anex
Ethylendiamino	$(CH_2)_3NHCH_2CH_2NH_2$	anex
Kvarterní amin	$(CH_2)_3-N^+-(CH_3)_3$	silně bazický anex
Karboxylová kyselina	$(CH_2)_2COOH$	slabě kyselý katex
Sulfonová kyselina	$(CH_2)_3SO_3H$	silně kyselý katex

3.3.4 Mobilní fáze

Mobilní fáze používané pro HPLC musí být velmi čisté a zbavené rozpuštěných plynů probubláváním heliem nebo působením ultrazvuku za vakua. K získání přiměřených elučních parametrů je nutný výběr vhodné mobilní fáze. Podle rostoucí eluční účinnosti jsou rozpouštědla seřazena do **eluotropní řady** (platí pro chromatografii s normálními fázemi): heptan < cyklohexan < tetrachlormethan < toluen < ether < chloroform < aceton < acetonitril < ethanol < methanol < kyselina octová < voda. Pro zlepšení dělení kyselých a bazických látek se do organického rozpouštědla přidává malé množství kyseliny, zásady nebo pufru.

Při dělení na normálních fázích se nejčastěji používá jako mobilní fáze pentan, heptan, chloroform a jejich směsi.

Při dělení na reverzních fázích se nejčastěji používá jako mobilní fáze voda ve směsi s methanolem, acetonitrilem nebo tetrahydrofuranem; eluotropní řada přitom platí v obráceném pořadí a lipofilní methanol má zde vyšší eluční účinnost než voda.

[8, 11]

3.3.5 Typy eluce

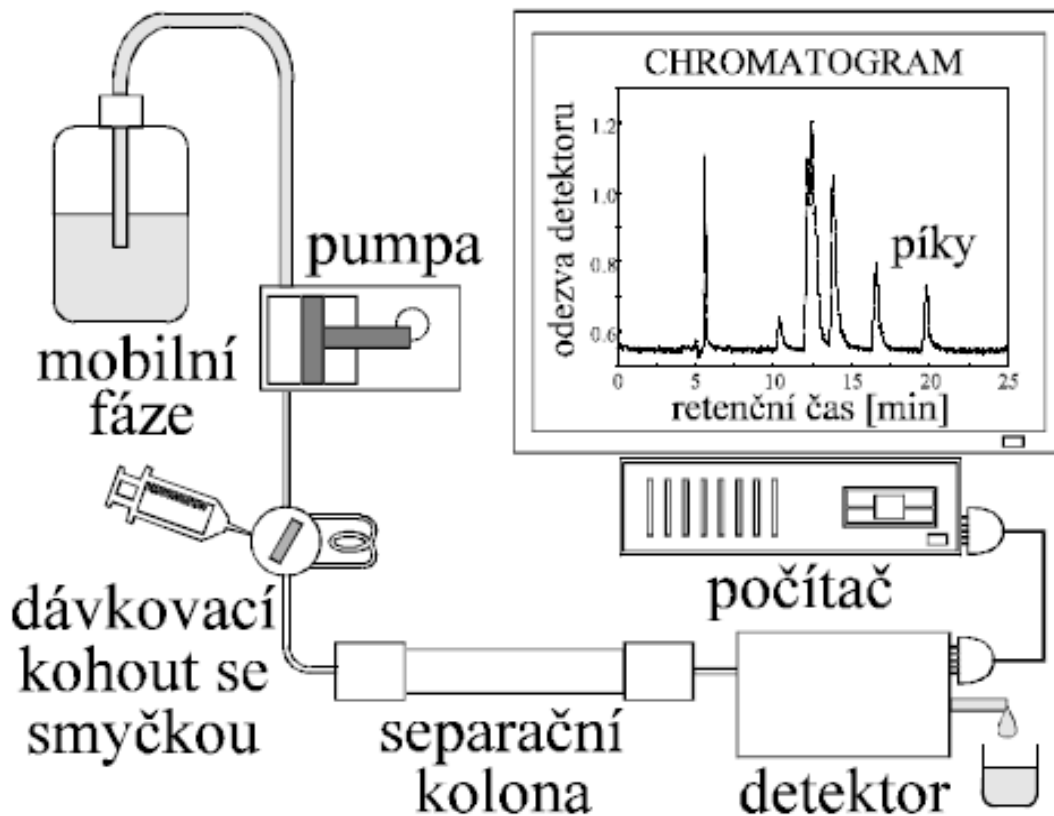
HPLC analýzu lze realizovat za konstantního složení mobilní fáze v průběhu celé analýzy, tzv. **isokratická eluce** (pro analytické účely se používá nejčastěji). Používá se při dělení směsi látek, jejichž eluční parametry se příliš neliší.

U některých směsí látek však nelze tímto způsobem dosáhnout optimálního dělení, zejména jestliže se jednotlivé složky směsi svými elučními parametry významně liší. V tomto případě se s výhodou využívá **gradientová eluce**, při které se k jedné mobilní fázi plynule přimíchává rostoucí množství druhé mobilní fáze s větším elučním účinkem. Vytváří se tak plynulý koncentrační gradient mobilní fáze. Obdobným způsobem lze pro eluci využít i gradient pH.

[1, 8]

3.3.6 Přístrojové uspořádání HPLC chromatografu

Obr. 3: Schéma HPLC chromatografu [11]



3.3.7 Čerpadla (pumpy)

Čerpadla musí být **vysokotlaká** (kolony s velikostí částic okolo 10 μm a menší kladou velký odpor a k dosažení optimálních průtoků jsou nutné vysoké vstupní tlaky, až desítky MPa). Průtok musí být konstantní, reprodukovatelný a bezpulsní. Jeho hodnoty se pohybují kolem 1 ml/min pro běžné náplňové kolony. Nejčastěji se používají pístová dvoučinná (reciprokační) čerpadla. Jejich nevýhoda, pulsni chod, se kompenzuje použitím dvou a více čerpadel současně, přičemž jejich písty se nepohybují rovnoměrně, ale parabolicky s časem a jejich činnost je fázově posunuta. Pro gradientovou eluci se používají v zásadě dva způsoby: směšování mobilních fází za **nízkého tlaku** (levnější, stačí 1 čerpadlo; k mísení dochází daleko od kolony) a za **vysokého tlaku** (vyžaduje 2 čerpadla; složky se mísí těsně před kolonou, takže skutečné složení fáze v koloně odpovídá programovanému složení). Z čerpadla se vede mobilní fáze do dávkovacího zařízení.

[10]

3.3.8 Dávkování roztoku vzorku na kolonu

Dávkování lze provést buď speciální injekční mikrostříkačkou, nebo dávkovacím kohoutem. Jehlou stříkačky se probodne septum ze speciální pryže a lze dávkovat různé objemy roztoku vzorku. Kohoutem lze dávkovat předem daný objem roztoku, avšak mnohem přesněji. V současné době již převládá způsob dávkování pomocí autosamplerů, které umožňují dávkovat různé objemy a navíc dávkování automatizovat. Autosamplery jsou spojené se zásobníkem vzorků, ve kterém jsou umístěny mikronádobky (vialky) uzavřené pryžovým septem nebo perforovanou zátkou z polypropylenu. Existuje několik druhů konstrukčního spojení injekční stříkačky dávkovače:

1. Injekční stříkačka dávkovače je fixní a pohybuje se pouze zásobník vzorků pod zvednutou jehlou injekční stříkačky dávkovače, jejíž píst je ovládán speciálním krokovým motorem. Pohyb zásobníku je buď osový, nebo kruhový (tzv. karusel).
2. Zásobník vzorků je fixní a pohybuje se raménko injekční stříkačky dávkovače ve směru os x-y-z.
3. Zásobník i injekční stříkačka dávkovače jsou fixní, vialka je roboticky dopravena pod zvednutou jehlu injekční stříkačky dávkovače.

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

[1, 8, 12]

3.3.9 HPLC kolony

Kolony pro HPLC jsou zpravidla zhotoveny z nerezové oceli, plastu nebo ze skla. Jejich délka se pohybuje v rozmezí 5 až 30 cm a průměr 2 až 8 mm. Vlastní klasická HPLC kolona se skládá z kovového pláště, který je uzavřen porézní kovovou fritou,

kteřá zabraňuje uvolňování stacionární fáze z kolony a současně umožňuje plynulý průtok mobilní fáze. Oba konce kolony jsou ukončeny převlečným ochranným kroužkem a koncovou hlavicí, ve které je navrtán vstup pro kapiláru se šroubem. Náplň kolony (sorbeht) musí být naprosto homogenní a rovnoměrná, proto se v současné době používají kolony plněné a testované přímo výrobcem. Kolony jsou při skladování a transportu plněné mobilní fází dle údajů výrobce. Spojení mezi kolonou, dávkovacím zařízením a detektorem jsou kapilární (vnitřní průměr 0,5 mm), nejčastěji z nerezové oceli.

Životnost chromatografické kolony závisí na několika aspektech a nízká životnost chromatografické kolony může mít několik příčin. Ve vzorku mohou být přítomny kontaminanty, které se silně adsorbují na sorbeht a snižují tak separační účinnost kolony. Rovněž mohou být ve vzorku (extraktu vzorku) přítomny mechanické nebo koloidní částice, které neprojdou kolonou, zvyšují tak zpětný tlak na koloně a snižují její účinnost. V obou těchto případech se musíme soustředit na úpravu přípravy extraktu vzorku (např. filtrace nebo odstředění extraktu). Řešením je rovněž použití předkolony a kolonového prefiltru, který se umísťuje před kolonu. Zařazením kolonového prefiltru vzniká určitý mrtvý objem, který lze vhodnou konstrukcí minimalizovat na minimum. K odstranění silně se adsorbujících nečistot (regenerace kolony) existují promývací programy. Životnost kolony je snižována slabou mechanickou odolností sorbehtu. To může být zapříčiněno nešetrným zacházením s kolonou během výroby, transportu nebo v laboratoři. K rozpoznání této příčiny by měla být k dispozici v laboratoři porovnávací kolona, se kterou se srovnávají některé chromatografické parametry. Práce v extrémních oblastech pH je další možnou příčinou snížení životnosti kolony. Pro rozmezí pH mimo 2 až 8 lze použít kolony obsahující např. porézní grafitovaný uhlík či oxid zirkoničitý.

[1, 8, 13, 14, 15, 16]

3.3.10 Detektory používané v HPLC

Detektory pro HPLC mají vysokou citlivost, umožňují tak detekci látek v roztoku v koncentracích μg až ng/ml . Mimořádné požadavky jsou kladeny také na reprodukovatelnost analýzy, linearitu, nezávislost odezvy na změně složení mobilní fáze při gradientové eluci a univerzálnost, která umožní detekci všech oddělených složek vzorku.

Spektrofotometrické detektory jsou při HPLC analýze léčiv nejčastěji používány. Proměřují absorbanci elektromagnetického záření určité vlnové délky složkami eluátu protékajícího celou (kyvetou) detektoru o vnitřním objemu 10 μl a menším.

K detekci léčiv se využívá především UV oblast spektra, mnohem méně oblast viditelná a minimálně IR oblast spektra. V praxi se tak uplatňují UV a UV-VIS detektory.

Nejužívanější spektrofotometrické detektory:

- UV detektor s fixní vlnovou délkou – nejčastěji 254 nm, a nebo 280 nm, při nichž absorbuje většina léčiv; poměrně jednoduché konstrukce a cenově nejdostupnější; ukázka chromatogramu viz. obr. 4
- UV-VIS detektor s proměnnou vlnovou délkou (libovolně měnitelná dle potřeb)
- Scanning UV detektor – snímá během několika sekund absorpční spektrum v maximu píku hodnoceného léčiva
- Diode array detector (DAD) – řízený počítačem, trojrozměrná (3D) projekce, snímá celé absorpční spektrum, hodnotí léčivo současně při několika vlnových délkách, porovnává poměry absorbancí; výsledkem je 3D chromatogram jako závislost absorpance na vlnové délce a na čase, ze kterého lze identifikovat eluované látky a posoudit jejich čistotu

Spektrofotometrické detektory se vyznačují značnou citlivostí (10^{-9} až 10^{-10} g/ml) a lze je používat při gradientové eluci.

Fluorimetrické detektory jsou s výhodou použitelné v případech, kdy analyzované léčivo, rozkladný produkt či metabolit vykazují fluorescenci. Látky, které nefluoreskují, lze mnohdy derivatizací s vhodnými činidly převést na fluoreskující deriváty. Fluorimetrické detektory jsou tedy méně univerzální než UV detektory, ale citlivější (10^{-9} až 10^{-12} g/ml), selektivnější a jsou rovněž použitelné při gradientové eluci.

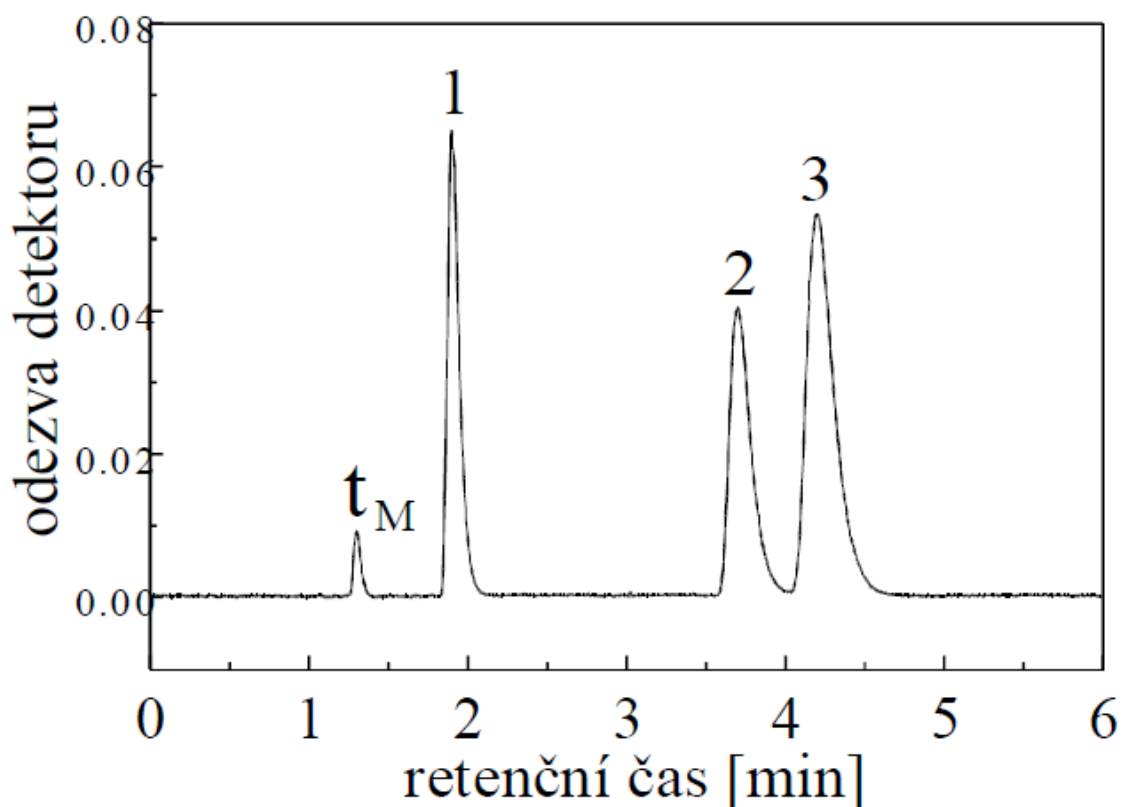
Elektrochemické detektory nachází uplatnění při hodnocení léčiv, u nichž lze využít dějů, souvisejících s elektrochemickou reakcí probíhající na rozhraní elektroda-eluent. Proměřují elektrochemickou veličinu, jejíž hodnota je závislá na koncentraci analyzovaného léčiva. Schopnost elektrochemické redukovatelnosti a oxidovatelnosti léčiv využívá voltametrický, amperometrický a polarografický detektor. Elektrochemické detektory jsou značně citlivé (10^{-9} až 10^{-12} g/ml), jsou však velice citlivé na čistotu mobilní fáze a většinu z nich nelze použít při gradientové eluci.

Refraktometrické detektory měří rozdílný index lomu mezi čistou mobilní fází a eluátem vytékajícím z kolony, obsahujícím analyzovanou látku. Jsou prakticky univerzální (vyhodnotí jakoukoliv látku), ale při analytickém hodnocení léčiv se používají ojedinele pro poměrně velké nevýhody – především výrazně menší citlivost (10^{-6} g/ml), nutnost pečlivého termostátování ($\pm 0,0001$ °C, odezva detektoru je značně závislá na teplotě) a nelze je použít při gradientové eluci.

Pro detekci léčiv je v poslední době využíváno též spojení HPLC s **hmotnostní spektrometrií (MS)**. Po výstupu z HPLC kolony je nutno z eluentu nejprve odstranit mobilní fázi. Molekuly léčiva v plynném stavu jsou v hmotnostním spektrometru ionizovány nárazy elektronů, termoionizací či elektroionizací. Nabité částice (molekulární a fragmentární ionty) jsou v magnetickém nebo vysokofrekvenčním poli separovány podle hmotnosti a náboje a je zaznamenáno hmotnostní spektrum (tj. četnost iontů ve vztahu k poměru: hmotnost/počet nábojů). Spojení HPLC-MS je vysoce selektivní, vysoce citlivé a poskytuje řadu údajů potřebných pro identifikaci léčiv. Hmotnostní detektory jsou finančně náročné.

[1, 8]

Obr. 4: Ukázka chromatogramu z HPLC analýzy derivátů purinu, UV detekce 280 nm, 1 – kofein, 2 – theofylin, 3 – theobromin [11]



3.3.11 Kvalitativní HPLC analýza

Základní kvalitativní charakteristikou v HPLC je **retenční (eluční) čas t_R** , což je čas od nástřiku vzorku na kolonu k maximu chromatografického píku. Nejčastějším důkazem totožnosti je shoda retenčních časů chromatografického píku léčiva v analyzovaném vzorku s retenčním časem píku standardu (obdoba shody retenčního faktoru R_F vzorku zkoušeného léčiva a standardu v TLC). Některé moderní UV detektory umožňují v maximu chromatografického píku sejmout UV spektrum; shoda UV spekter vzorku a standardu je další identifikační charakteristikou.

[1, 8]

3.3.12 Kvantitativní HPLC analýza

Kvantitativní charakteristikou v HPLC je plocha chromatografického píku, kterou pomocí integrace vypočítává počítačový program. Pouze u symetrických píků lze použít pro stanovení i výšku píků. Izokratická eluce poskytuje reprodukovatelnější výsledky než gradientová. Jsou používány 4 následující základní metody ke stanovení obsahu:

- 1) **Metoda vnitřní normalizace** je nejjednodušší, výsledkem je pouze relativní zastoupení jednotlivých složek směsi v %.
- 2) **Metoda absolutní kalibrace** používá buď přímé srovnání ploch píků a hmotnostních koncentrací analyzované látky a standardu, nebo metodu kalibrační křivky, která se používá při sériových analýzách. Metoda absolutní kalibrace je zatížena chybou danou nepřesnostmi v dávkovaných objemech.
- 3) **Metoda vnitřního standardu** eliminuje chybu danou nepřesnostmi v dávkovaných objemech. Ke vzorku se přidá vnitřní standard, tedy látka, která není obsažena ve vzorku. Při následném výpočtu koncentrace se počítá s poměry ploch píků a vnitřního standardu. Při sériových analýzách se využívá kalibrační křivky podobně jako v předchozím případě.
- 4) **Metoda standardního přídávku** se používá pro komplikované matrice, kde chceme stanovit pouze jednu či několik málo složek. Provádí se nástřik samotného vzorku a následně nástřik definovaného objemu vzorku spolu s přídávkem určitého objemu standardního roztoku analytu. Metoda je zatížena chybou způsobenou nepřesnostmi v dávkovaných objemech.

[1, 8, 10]

3.3.13 Validace analytických metod

Validace analytické metody je série experimentů, kterými se zjistí nejdůležitější charakteristiky metody, potvrdí se, že dává reprodukovatelné a spolehlivé výsledky a je vhodná pro zamýšlené použití. Cílem validace je vyšetřit praktické hranice, ve kterých je zkušební postup použitelný, a zajistit, aby při opakovaném použití v jedné nebo různých laboratořích dávala metoda stále stejně spolehlivé výsledky. Validace analytické metody je oddělený akt. Obecně je postup vývoje metody takový, že se nejprve definují požadavky na zkušební metodu (např. selektivní stanovení účinné látky v tabletě s přesností menší než 1% nebo stanovení rozkladného produktu s detekčním limitem menším než 0,1%). Vyvine se metoda, najdou se optimální podmínky a třetím bodem postupu je validace, tj. pomocí experimentálních dat se prokáže, že je metoda vhodná pro daný účel, že splňuje na začátku definované požadavky. Současně je nutné přesně definovat podmínky, za kterých se má metoda použít. Pokud mají být výsledky spolehlivé při každém použití metody, musí být buď jednoznačně dány všechny podmínky, což u instrumentálních fyzikálně-chemických metod (především chromatografických) není v podstatě možné, anebo musí být uvedena kritéria, která musí být splněna, aby bylo možné určitý analytický systém spolehlivě použít. Vytvořit tato kritéria je dalším cílem validačního procesu. Při každém dalším použití nově vyvinuté validované metody se už validace neopakuje, jen se testují právě tato kritéria. Když splňují požadavky, předpokládá se, že platí i dříve provedená validace a výsledky lze považovat za spolehlivé. Tato kritéria se obecně nazývají **test způsobilosti analytického systému**. U chromatografických metod je nutné použít takové podmínky, aby byla zajištěna účinnost a separační schopnost konkrétního chromatografického systému, i kdyby se tyto podmínky trochu lišily od podmínek, popsanych v postupu. Aby bylo možné snadno, rychle a s jistotou nalézt vhodné podmínky, musí být součástí chromatografické metody test způsobilosti, který se provádí při každé změně chromatografického systému, před každou novou sérií měření nebo před použitím metody v jiné laboratoři. Obecně je test způsobilosti popsán v kapitole Chromatografické separační metody v ČL 2009.

Dvěma základními údaji testu způsobilosti jsou požadavky na opakovatelnost (reprodukovatelnost) chromatografického systému a na rozlišení dvou vybraných píků. Je možné udávat i požadavky na další parametry, které jsou důležité pro konkrétní metodu: počet teoretických pater, asymetrie píku, minimální, případně i maximální retenční čas nebo kapacitní poměr stanovované látky nebo také mez detekce. Nelze předepsat jediný možný postup pro test způsobilosti, ale první dva body, tj. opakovatelnost a rozlišení jsou bezpodmínečně nutné.

Parametry ověřované při validaci:

- a) **Přesnost (opakovatelnost, reprodukovatelnost; precision)** analytické metody je míra shody mezi jednotlivými výsledky metody opakovaně prováděné s homogenním vzorkem. Podle podmínek opakování metody se rozlišuje opakovatelnost a reprodukovatelnost. Při stanovení opakovatelnosti se metoda provádí jedním analytikem na tomtéž přístroji, se stejnými činidly, na jednom zhomogenizovaném vzorku. Jde tedy o přesnost uvnitř laboratoře. Při stanovení reprodukovatelnosti se metoda provádí na jednom zhomogenizovaném vzorku, ale v různých laboratořích, různými analytiky, s různými činidly i přístroji. V tomto případě jde o přesnost při přenosu metody z jedné laboratoře do druhé. Přesnost se vyjádří jako relativní směrodatná odchylka a stanoví se minimálně ze 6 nezávislých analýz zhomogenizovaného vzorku, provedených kompletním postupem, počínaje přípravou vzorku. Je třeba zdůraznit, že jde o chybu celého analytického postupu, tedy jak instrumentální části, tak postupu přípravy vzorku. Nestačí proto jen např. 6x nastříknout na kolonu jeden roztok, ale je nutné připravit kompletním postupem 6 roztoků vzorku. SÚKL požaduje jen doložení opakovatelnosti metody, tedy přesnost metody při provedení jedním analytikem na jednom přístroji, se stejnými činidly.
- b) **Linearita (linearity)** je schopnost metody dávat výsledky přímo úměrné koncentraci stanovované látky ve vzorku. Linearita analytické metody se doloží buď graficky, jako závislost výsledků na koncentraci stanovované látky, nebo matematicky pomocí výsledků lineární regrese analýzy. Korelační koeficient je mírou linearity a směrnice mírou citlivosti. SÚKL požaduje potvrzení linearity v rozmezí 50–150 % deklarovaného obsahu a stanovení minimálně 5 různých koncentrací standardní látky.
- c) **Správnost (accuracy)** je odchylka výsledku metody od správné hodnoty. Problémem je zjištění správné hodnoty. Používají se tři možnosti. Správná hodnota se zjistí buď jinou, nezávislou metodou, jejíž správnost je ověřena, nebo analýzou modelového vzorku, tj. placebo s přidaným standardem nebo, není-li k dispozici placebo, analýzou vzorku s přidávkem standardní látky. Vyjadřuje se jako rozdíl hodnot nebo jako výtěžnost (recovery):

$$\text{nalezená hodnota} \times 100 / \text{skutečná hodnota}$$

Pokud se analyzuje modelový vzorek, přidává se standardní látka v množství menším i větším než je deklarovaný obsah. Některé postupy uvádějí 10%, jiné 50%. SÚKL požaduje jen jednu hladinu, tedy stanovení minimálně 6 různých modelových vzorků s přibližně 100% obsahem stanovované látky. Při přidání standardní látky ke vzorku se přidává méně než 100%, aby se výsledek nedostal mimo kalibrační křivku.

- d) Detekční a kvantitativní limit (citlivost metody; limit of detection, limit of quantitation)** jsou parametry, které je nutné doložit u metod pro stanovení nečistot. Detekční limit pro limitní testy, tj. testy zjišťující jen je-li látka nad nebo pod určitou hranicí. Je to nejnižší detekovatelná koncentrace látky, nestanovované kvantitativně. Kvantitativní limit je pro kvantitativní stanovení obsahu nečistot. Je to nejnižší koncentrace látky, stanovitelná s přijatelnou přesností a správností.
- e) Selektivita (selectivity)** je schopnost metody změřit správně a specificky stanovovanou látku v přítomnosti jiných látek. To mohou být další účinné složky u kombinovaných přípravků, pomocné látky v placebo, nečistoty z výroby, rozkladné produkty, zbytková rozpouštědla nebo neznámé látky. SÚKL nepožaduje písemné doložení selektivity, ale je nutné přiložit např. chromatogramy placebo, známých vedlejších rozkladných produktů nebo chromatogramy vzorků po rozkladu teplem, světlem, hydrolýzou, oxidací apod.
- f) Robustnost (robustness)** je míra reprodukovatelnosti výsledků získaných analýzou jednoho homogenního vzorku v různých laboratořích, různými analytiky, na různých přístrojích a s různými činidly. Je to vlastně reprodukovatelnost výsledků z parametru přesnost. Je to míra dát správné a přesné výsledky i při menších změnách pracovních podmínek, ke kterým nutně dochází při provádění metody v jiné laboratoři, i když popsany postup zůstává zachován. Znamená míru vlivu proměnných podmínek při provedení metody na její výsledky. Je možné dokládat robustnost číselně stanovením reprodukovatelnosti. SÚKL nepožaduje číselné doložení, ale je velmi užitečné uvést v dokumentaci poznatky z vývoje metody, tj. upozornit na podmínky, které mohou ovlivnit výsledky, např. vliv pH a teploty, stabilita vzorku v roztoku, vliv různých šarží činidel, u HPLC vliv změny kolony, vliv změny složení mobilní fáze apod. Nelze obecně požadovat konkrétní hodnoty jednotlivých parametrů, záleží na použité metodě, jejím cíli i vzorku, jenž je analyzován. Přijatelnost získaných hodnot validačních parametrů v konkrétním případě musí posoudit příslušný analytik.

Nejsou nutné všechny parametry u každé metody, záleží na účelu použití metody. Budou se lišit pro metodu stanovení obsahu majoritní složky, tj. buď účinné nebo konzervační látky, pro metodu stanovení nečistot nebo zkoušky lékové formy. Obecně se lze při výběru parametrů pro validaci analytické metody řídit tabulkou 3.

[17, 18]

Tab. 3 : Parametry požadované pro validaci analytických metod [18]

	Metoda pro stanovení			
	obsahu účinné nebo konzerv. látky	nečistot		zkouška lékové formy (disoluce)
		test kvantitativní	test limitní	
Přesnost	ano	ano	ne	ano
Správnost	ano	ano	případně	případně
Selektivita	ano	ano	ano	případně
Linearita	ano	ano	ne	případně
Detekční limit	ne	ne	ano	ne
Kvantit. limit	ne	ano	ne	případně
Robustnost	ano	ano	ano	ano

4. Experimentální část

4.1 Materiál

4.1.1 Vzorke léčivých přípravků

- Ketonal[®] 100 mg čípky, šarže: AB1159, AG0270, exp. 04/2013, 03/2014, Lek Pharmaceuticals, Slovinsko

4.1.2 Chemikálie

- Acetonitril pro HPLC CHROMASOLV[®], šarže: SZBA143S, Sigma-Aldrich, Německo
- Dihydrogenfosforečnan draselný p.a., šarže: A585477/724, Merck, Německo
- Ethylparaben 99%, šarže: 35129-021, Sigma-Aldrich, Německo
- Ketoprofen 99%, šarže: 03908KO, Sigma-Aldrich, Německo
- Kyselina fosforečná 85% p.a., šarže: K35531273/602, Merck, Německo
- Pufr pH 4,01 pro kalibraci pH metru, šarže: 09.13.-2, WTW, Německo
- Pufr pH 7,00 pro kalibraci pH metru, šarže: 03.12.-3, WTW, Německo
- Ultračistá voda (čištěná systémem Milli-Q RG, Millipore, USA)

4.1.3 Pomůcky a přístroje

- Analytické váhy 2004 MP, Sartorius, Německo
- Analytické váhy ALS 220-4N, Kern, Německo
- Centrifuga EBA 21, Hettich Zentrifugen, Německo
- Elektrický sekáček Griffin, Eta, Česká republika
- Filtrační papíry Glass Microfibre Filters, Whatman, Velká Británie
- Filtrační sada pro filtraci mobilní fáze, Millipore, USA
- Filtrační zařízení pro přípravu ultra čisté vody Milli-Q RG, Millipore, USA
- HPLC kolona Supelco Discovery[®] C18, 125 mm x 4 mm, 5 μm, Supelco Park, USA
- HPLC sestava: Waters 1525 Binary HPLC Pump, Waters 717 plus Autosampler, Waters 2487 Dual λ Absorbance Detector, PC Dell Optiplex, Breeze[™] Software
- Injekční stříkačky Luer 5 ml, Chirana T. Injecta, Slovensko

- Magnetická míchačka Color squid, Ika Werke, Německo
- Mikropipeta Transferpette 1000 μ l, Brand, Německo
- Mikropipeta Transferpette 5 ml, Brand, Německo
- pH metr pH 212 Microprocessor pH Meter, Hanna instruments, Německo
- Q-Max Syringe Filters, průměr 25 mm, membrána nylon, velikost pórů 0,45 μ m, Frisenette ApS, Dánsko
- Ultrazvuková lázeň Sonorex Digitec, Bandelin, Německo
- Vodní lázeň, Memmert, Německo

4.1.4 Laboratorní sklo a pomůcky

- Centrifugační zkumavky plastové
- Kádinky
- Kovová špachtle
- Nálevky skleněné
- Odměrné baňky
- Odměrné válce
- Pipetovací balónek
- Pipety 20 ml nedělené
- Pipety dělené
- Pipety Pasteur nesterilní
- Plastová lžička
- Svorky kovové
- Špičky pro mikropipety Transferpette 1000 μ l a 5 ml
- Váženka
- Zátky skleněné
- Zátky plastové

4.2 Pracovní postup

4.2.1 HPLC sestava, podmínky separace

Čerpadlo:	Waters 1525 Binary HPLC Pump
Autosampler:	Waters 717 plus Autosampler
Kolona:	Supelco Discovery [®] C18, délka 125 mm, průměr 4 mm, velikost částic 5 μm
Detektor:	Waters 2487 Dual λ Absorbance Detector
Zpracování dat:	Breeze [™] Software
Mobilní fáze:	voda : acetonitril : fosforečnanový pufr pH 3,5 = 58 : 40 : 2 (V/V/V), před použitím přefiltrovaná přes skleněný filtr pomocí sady Millipore
Průtok mobilní fáze:	$F_m = 1,0 \text{ ml/min}$
Typ eluce:	izokratická eluce
Vlnová délka detekce:	$\lambda = 233 \text{ nm}$
Objem nástřiku:	$V = 10 \mu\text{l}$
Teplota:	laboratorní

4.2.2 Příprava mobilní fáze

Mobilní fáze je připravena smísením 58 objemových dílů ultračisté vody, 40 obj. dílů acetonitrilu pro HPLC a 2 obj. dílů fosforečnanového pufru o pH 3,5. Fosforečnanový pufr je připraven rozpuštěním 6,8 g dihydrogenfosforečnanu draselného v ultračisté vodě a doplněním na 100 ml roztoku. Je upraveno pH na pH metru na hodnotu 3,5 ($\pm 0,05$) přidáním několika kapek kyseliny fosforečné. Po smísení vody, acetonitrilu a pufru je provedena filtrace pomocí filtračního zařízení na mobilní fáze Millipore za použití filtru ze skleněných vláken o velikosti pórů 0,45 μm . Mobilní fáze je uchovávána v chladu, v dobře uzavřených skleněných nádobách.

4.2.3 Příprava zásobního roztoku ethylparabenu (50 mg/100 ml)

Přibližně přesně 50,00 mg ethylparabenu je rozpuštěno v acetonitrilu ve 100 ml odměrné baňce a doplněno acetonitrilem po rysku.

4.2.4 Příprava standardního roztoku (ketoprofen 125 mg/100 ml, ethylparaben 1mg/100 ml)

Je naváženo přibližně přesně 125,00 mg ketoprofenu, jsou přidány 2,00 ml zásobního roztoku ethylparabenu (50 mg/100 ml), roztok je doplněn po rysku acetonitrilem ve 100 ml odměrné baňce.

4.2.5 Příprava pracovního roztoku vnitřního standardu (ethylparaben 1 mg/100 ml)

Do 100 ml odměrné baňky jsou pipetovány 2,00 ml zásobního roztoku ethylparabenu (50 mg/100 ml), roztok je doplněn acetonitrilem po rysku.

4.2.6 Příprava vzorku

Jednotlivé čípky jsou zváženy a je zjištěno, zda vyhovují lékopisným požadavkům na hmotnostní stejnoměrnost. Čípky jsou zhomogenizovány elektrickým sekáčkem. Do centrifugační zkumavky je naváženo přibližně přesně 0,50000 g zhomogenizované čípkové hmoty. Pomocí kovových svorek je zkumavka umístěna do vodní lázně o teplotě 60 °C. Nedělenou pipetou je přidáno 20,00 ml pracovního roztoku vnitřního standardu (viz. kap. 4.2.5), zkumavka je zakryta skleněnou zátkou a je ponechána v lázni po dobu 5 minut (platí pro vzorek a pracovní roztok o laboratorní teplotě). Poté je vizuálně zkontrolováno, zda je již všechna čípková hmota roztavena. Pokud by byl

použit vzorek a pracovní roztok z chladničky, je nutné prodloužit dobu zahřívání ve vodní lázni, dokud nebude čípková hmota zcela roztavena. Krouživými pohyby po dobu asi 30 s je obsah zkumavky promísen. Směs je centrifugována 5 minut při rychlosti 6000 ot./min. Supernatant je přefiltrován membránovým filtrem s velikostí pórů 0,45 µm a dávkován autosamplerem na kolonu.

4.2.7 Stanovení obsahu ketoprofenu v čípcích

1. Je připravena mobilní fáze, zásobní roztok, dva roztoky standardů ze samostatných navážek, pracovní roztok. Každý standard je změřen třikrát a pro následný výpočet jsou použity aritmetické průměry ploch píků.
2. Jsou provedeny dvě nezávislé analýzy vzorku dle postupu v kap. 4.2.6. Oba supernatanty jsou změřeny třikrát a pro následný výpočet jsou použity aritmetické průměry ploch píků.
3. Výpočet obsahu ketoprofenu ve vzorku je proveden dle vzorce:

$$C_i = \frac{K_{vz} \cdot E_{st} \cdot m_{st} \cdot m_{sup}}{E_{vz} \cdot K_{st} \cdot Z \cdot m_{nav}}$$

c_i = obsah ketoprofenu v 1 čípku v % (deklarovaný obsah 100 mg ~ 100%)

K_{vz} = plocha píku ketoprofenu v roztoku vzorku

K_{st} = plocha píku ketoprofenu v roztoku standardu

E_{vz} = plocha píku ethylparabenu v roztoku vzorku

E_{st} = plocha píku ethylparabenu v roztoku standardu

m_{st} = navážka ketoprofenu v mg (ve 100 ml standardu)

m_{sup} = průměrná hmotnost čípku v g

m_{nav} = navážka vzorku v g

Z = faktor zředění ($Z = 5$)

5. Výsledky a diskuse

5.1 Vývoj metody

Při vývoji metody pro stanovení ketoprofenu v čípcích se vycházelo ze dvou metod vyvinutých na Farmaceutické fakultě v Hradci Králové.

5.1.1 Vývoj metody přípravy vzorku

Pro přípravu vzorku byla použita metoda pro stanovení diklofenaku v přípravku Veral[®] 100 mg čípky [3], která byla následně modifikována pro stanovení ketoprofenu v přípravku Ketonal[®] 100 mg čípky. Během experimentální práce bylo zkoumáno, jaký vliv na stanovení mají jednotlivé kroky přípravy vzorku a teplota při extrakci.

Původní metoda byla složena z těchto kroků: centrifugační zkumavka se zhomogenizovanou čípkovou hmotou je umístěna na 10 minut do vodní lázně o teplotě 70 °C; poté je přidáno 20,00 ml pracovního roztoku vnitřního standardu a směs je na dalších 15 minut umístěna do vodní lázně; zkumavka je dále umístěna na 10 minut do ultrazvukové lázně; po uplynutí této doby je směs centrifugována 15 minut při rychlosti 6000 ot./min; supernatant je dávkován na kolonu.

Vývoj nové metody: Byly postupně zkracovány časy jednotlivých kroků původní metody a hodnocena výtěžnost stanovení. Bylo zjištěno, že fáze tavení čípků lze z postupu úplně eliminovat, protože při následné fázi extrakce do pracovního roztoku dochází k úplnému roztavení čípkové hmoty. Fázi extrakce do pracovního roztoku bylo možné zkrátit na 5 minut, bez negativního efektu na výtěžnost. Teplotu mobilní fáze bylo možné snížit na 60 °C. Homogenizace v UZ lázni byla postupně zkracována a nakonec úplně eliminována. Bylo zjištěno, že při centrifugaci 6000 ot./min je směs za 5 minut dostatečně ochlazená a je možné odebrat čirý supernatant. Do postupu přípravy vzorku byla zahrnuta navíc krátká (0,5 min) fáze promísení obsahu centrifugační zkumavky krouživými pohyby vzhledem k tomu, že zhomogenizovaná čípková hmota může ulpět na vnitřní stěně zkumavky.

Z původních 50 minut potřebných pro přípravu vzorku byl čas zkrácen na 10,5 minut, navíc při teplotě vodní lázně o 10 °C nižší než v původní metodě. Tabulka 4 názorně ukazuje rozdíly mezi původní metodou přípravy vzorku a nově vyvinutou metodou.

Další snižování teploty vodní lázně či času extrakce již vedlo k výraznému snížení výtěžnosti, tímto směrem již není možné analýzu dále zkracovat. Byla také zkoumána možnost přípravy vzorku, kdy by se místo vodní lázně použila méně energeticky náročná UZ lázeň, při jejímž delším použití dochází také k zahřívání a tím k tavení

čípkové hmoty. Ukázalo se však, že při použití samotné UZ lázně po dobu 10 minut a méně byly výtěžnosti jednotlivých analýz rozkolísané a metoda by nesplňovala požadavek na přesnost. Dostatečná výtěžnost a vyhovující přesnost by vyžadovala minimálně 15 minut použití UZ lázně, tedy třikrát delší dobu než je tomu v případě použití vodní lázně. Delší časová náročnost byla důvodem pro výběr metody, která používá při extrakci pouze vodní lázeň.

Tab. 4: Porovnání časové a teplotní náročnosti námi vyvinuté a původní metody

Původní metoda			Nově vyvinutá metoda		
Krok	Čas (min)	Teplota (°C)	Krok	Čas (min)	Teplota (°C)
Tavení čípků	10	70	Extrakce	5	60
Extrakce	15	70	Promísení	0,5	25
UZ lázeň	10	25	Centrifugace	5	25
Centrifugace	15	25			

5.1.2 Vývoj metody pro vlastní HPLC stanovení

Pro vlastní stanovení ketoprofenu se vycházelo z HPLC metody pro stanovení obsahu ketoprofenu, methylparabenu a propylparabenu v přípravku ketoprofen gel 2,5% (Ketalgen gel) [4]. Pro stanovení byly použity podmínky separace této metody.

5.2 Validace metody

5.2.1 Test vhodnosti chromatografického systému

5.2.1.1 Účinnost chromatografické kolony (počet pater) N

Byl měřen standardní roztok (ketoprofen 125 mg/100 ml, ethylparaben 1 mg/100 ml), připravený dle kap. 4.2.4. Počet pater N byl vypočítán pomocí Breeze™ Software, byl použit výpočet podle Ph. Eur., resp. ČL 2009 [5]:

$$N = 5,545 \cdot \left(\frac{t_R}{w_h} \right)^2$$

t_R = retenční čas (min)

w_h = šířka píku v polovině jeho výšky (min)

Tab. 5: Účinnost chromatografické kolony (počet pater) N

Analyzovaná látka	Počet pater N
Ketoprofen	5 675
Ethylparaben	3 864

Počet měření: n = 3

Požadavek: **N > 1 500**

Závěr: **Vyhovuje**

5.2.1.2 Faktor symetrie A_s

Byl měřen standardní roztok (ketoprofen 125 mg/100 ml, ethylparaben 1 mg/100 ml), připravený dle kap. 4.2.4. Faktor symetrie A_s byl vypočítán pomocí Breeze™ Software, byl použit výpočet podle Ph. Eur., resp. ČL 2009 [5]:

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

$w_{0,05}$ = šířka píku v jedné dvacetině jeho výšky (min)

d = vzdálenost mezi kolmicí spuštěnou z vrcholu píku a vzestupnou částí píku v jedné dvacetině jeho výšky (min)

Tab. 6: Faktor symetrie A_s

Analyzovaná látka	Faktor Symetrie A_s
Ketoprofen	1,26
Ethylparaben	1,43

Počet měření: $n = 3$

Požadavek: **A_s 0,8–1,5** [5]

Závěr: **Vyhovuje**

5.2.1.3 Rozlišení chromatografických píků R_s

Byl měřen standardní roztok (ketoprofen 125 mg/100 ml, ethylparaben 1mg/100 ml), připravený dle kap. 4.2.4. Chromatogram viz. obr. 5. Rozlišení R_s bylo vypočítáno pomocí Breeze™ Software, byl použit výpočet podle Ph. Eur., resp. ČL 2009 [5]:

$$R_s = 1,18 \cdot \frac{t_{R2} - t_{R1}}{w_{h1} + w_{h2}}, \text{ kde } t_{R2} > t_{R1}$$

t_{R1}, t_{R2} = retenční časy nebo vzdálenosti podél základní linie od bodu nástřiku ke kolmicím spuštěným z vrcholů dvou sousedních píků (min)

w_{h1}, w_{h2} = šířky píků v poloviční výšce (min)

Tab. 7: Rozlišení chromatografických piků R_S

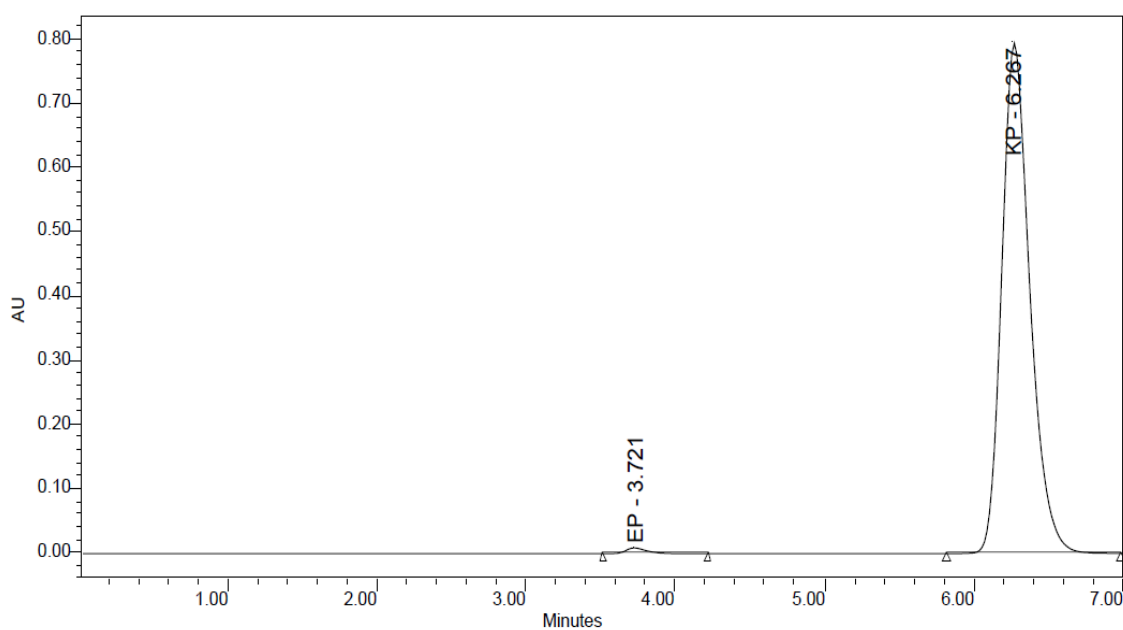
Dvojice látek	Rozlišení R_S
Ethylparaben - ketoprofen	8,90

Počet měření: $n = 3$

Požadavek: $R_S > 1,5$ [5]

Závěr: **Vyhovuje**

Obr. 5: Chromatogram standardního roztoku s obsahem ketoprofenu (KP) a vnitřního standardu ethylparabenu (EP)



5.2.1.4 Opakovatelnost analýzy

Opakovaně byl dávkován roztok analyzovaných látek v acetonitrilu o koncentraci:

Ketoprofen (KP) 125,14 mg/100 ml

Ethylparaben (EP) 1 mg/100 ml

Tab. 8: Opakovatelnost analýzy

Pokus	Poměr ploch KP/EP	Retenční čas t_R (min)
1	122,1552	6,28
2	122,1901	6,29
3	121,5952	6,24
4	120,8859	6,27
5	122,3024	6,27
6	122,1578	6,27

Počet měření n:	6	6
Aritmetický průměr \bar{x} :	121,8811	6,27
SD:	0,5472	0,0167
RSD (%):	0,45	0,27
Požadavek:	RSD < 1%	
Závěr:	Vyhovuje	

5.2.2 Validace analytické metody

5.2.2.1 Přesnost

Byly analyzovány čípky Ketonal[®] 100 mg, šarže AG0270. Vzorky byly paralelně připraveny samostatným postupem dle kap. 4.2.6. Každý roztok byl třikrát dávkován na kolonu. Poměry ploch píků KP/EP byly přepočteny na navážku 0,5000 g čípkové hmoty.

Tab. 9: Přesnost

Pokus	Poměr ploch KP/EP
1	111,4933
2	111,1598
3	112,2666
4	110,5378
5	111,2610
6	112,7914

Počet měření n:	6
Aritmetický průměr \bar{x} :	111,5850
SD:	0,8137
RSD (%):	0,73
Požadavek:	RSD < 5%
Závěr:	Vyhovuje

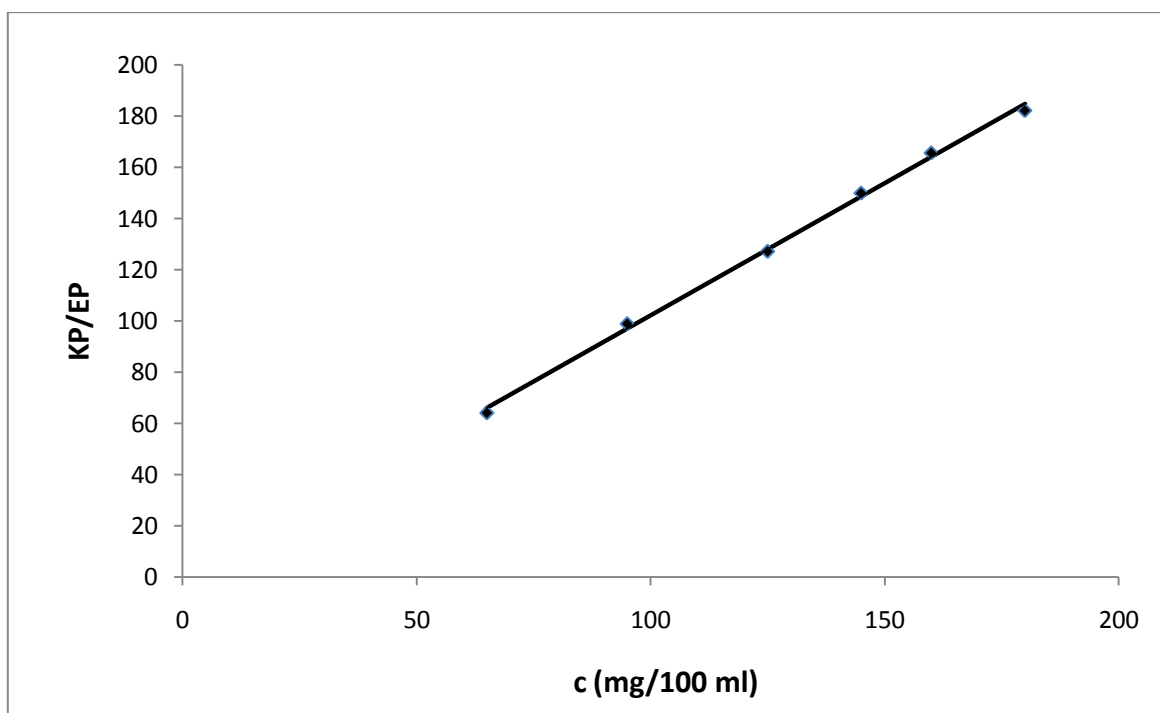
5.2.2.2 Linearita

Pro hodnocení linearity byla použita metoda vnitřního standardu. Jako vnitřní standard (IS) byl použit ethylparaben (EP). Bylo připraveno 6 kalibračních roztoků acetonitrilu s různou koncentrací ketoprofenu a s koncentrací vnitřního standardu 1 mg/100 ml. Každý roztok byl třikrát dávkován na kolonu a pro následný výpočet byly použity aritmetické průměry poměrů ploch KP/EP. Závislost poměru ploch KP/EP na koncentraci ketoprofenu v roztoku byla vyhodnocena metodou lineární regrese za pomoci Excel šablony LinReg [19]. Závislost je vyobrazena na obr. 6.

Tab. 10: Linearita

c (mg/100 ml)	Poměr ploch KP/EP
65	64,1870
95	98,9720
125	127,2145
145	149,9641
160	165,6690
180	182,2249

Obr. 6: Závislost poměru ploch píků KP/EP na koncentraci ketoprofenu v roztoku



Regresní funkce: $y = kx + q$

Počet bodů n: 6

Parametry regresní přímky a odhady jejich směrodatných odchylek:

Směrnice k: $1,032 \pm 0,033$

Absolutní člen q: $- 1,0 \pm 3,0$

Koeficient korelace R: 0,99905

Reziduální odchylka s_{rez} : 2,15

Závislost y na x **byla** prokázána na hladině významnosti 0,001

Závěr: **Vyhovuje**

5.2.2.3 Správnost

Pro testování správnosti byla použita metoda standardního přídatku. Byl šestkrát změřen standardní roztok: ketoprofen 125,14 mg/100 ml, ethylparaben 1 mg/100 ml. Pro následný výpočet byly použity aritmetické průměry poměrů ploch EP/KP. Bylo připraveno 6 vzorků dle kap. 4.2.6, místo pracovního roztoku vnitřního standardu bylo přidáno 20,00 ml standardního roztoku: ketoprofen 125,14 mg/100 ml, ethylparaben 1 mg/100 ml. Každý roztok vzorku byl třikrát dávkován na kolonu a pro následný výpočet byly použity aritmetické průměry poměrů ploch KP/EP. Z naměřených hodnot byl vypočítán obsah ketoprofenu v centrifugační zkumavce dle vzorce:

$$m_i = \frac{K_{vz} \cdot E_{st} \cdot m_{st}}{E_{vz} \cdot K_{st} \cdot Z}$$

m_i = stanovený obsah ketoprofenu v centrifugační zkumavce v mg

K_{vz} = plocha píku ketoprofenu v roztoku vzorku

K_{st} = plocha píku ketoprofenu v roztoku standardu

E_{vz} = plocha píku ethylparabenu v roztoku vzorku

E_{st} = plocha píku ethylparabenu v roztoku standardu

m_{st} = navážka ketoprofenu v mg (ve 100 ml standardu)

Z = faktor zředění ($Z = 5$)

Výtěžnost R_i (%) byla vypočítána dle vzorce:

$$R_i = \frac{m_i}{m_0} \cdot 100$$

m_i = stanovený obsah ketoprofenu v centrifugační zkumavce v mg

m_0 = vložený obsah ketoprofenu v centrifugační zkumavce v mg, vypočítaný jako součet hmotnosti ketoprofenu v navážce čípkové hmoty a hmotnosti ketoprofenu ve standardním přídatku

Tab. 11: Správnost

Pokus	m_i (mg)	m₀ (mg)	R_i (%)
1	46,45	48,15	96,48
2	47,64	50,01	95,27
3	48,93	49,69	98,48
4	48,38	50,56	95,69
5	46,57	48,57	95,89
6	47,97	49,25	97,40

Počet měření n: 6

Aritmetický průměr \bar{R} (%): 96,53

SD: 1,21

RSD (%): 1,25

Požadavek: **R v intervalu 100 ± 5 %; RSD < 5% [4]**

Závěr: **Vyhovuje**

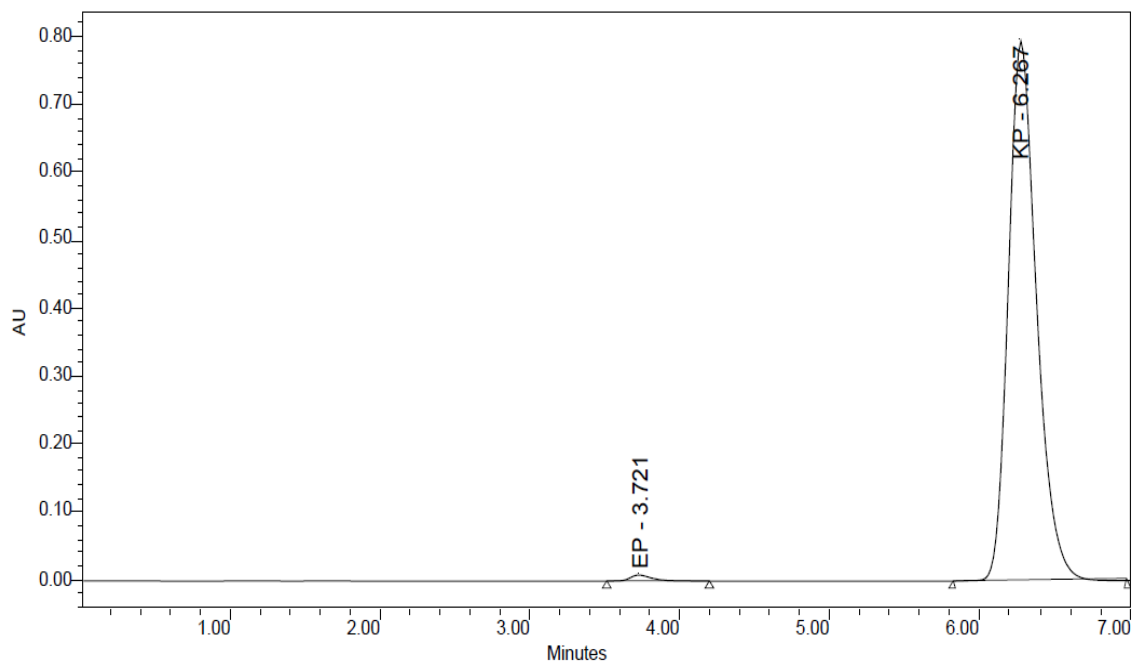
5.2.2.4 Selektivita

První chromatogram (obr. 7) zobrazuje analýzu standardního roztoku obsahujícího ketoprofen (125,14 mg/100 ml) a vnitřní standard ethylparaben (1 mg/100 ml). Postup přípravy standardního roztoku viz. kap. 4.2.4.

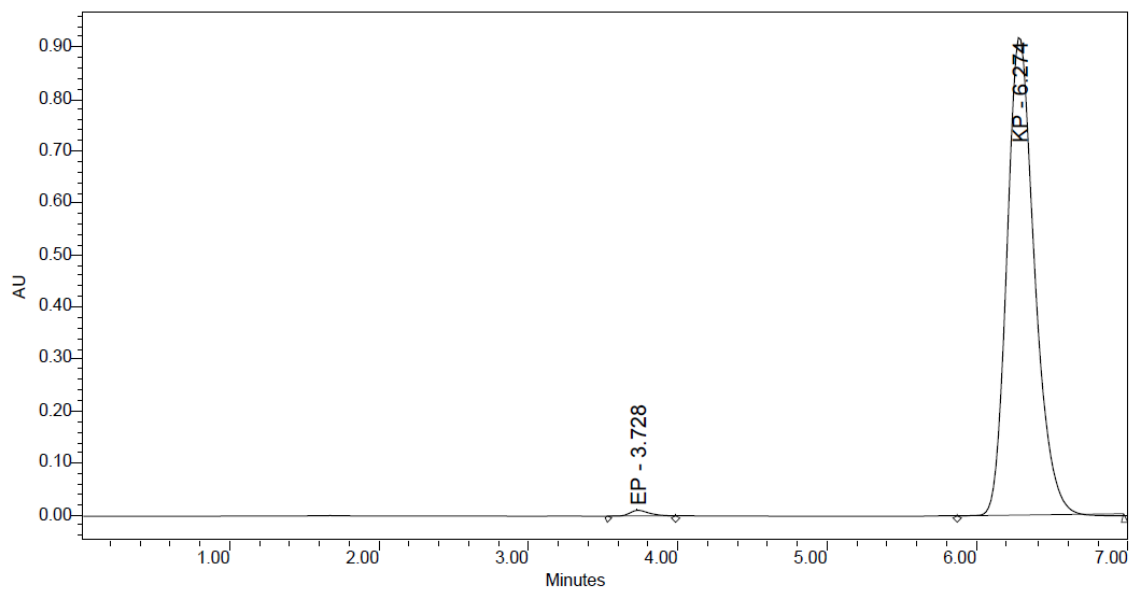
Druhý chromatogram (obr. 8) zobrazuje analýzu léčivého přípravku Ketonal[®] 100 mg čípky o navážce 0,55196 g, s přidavkem vnitřního standardu ethylparabenu (1 mg/100 ml). Postup přípravy vzorku viz. kap. 4.2.6.

Z uvedených dvou chromatogramů je patrné, že HPLC metoda je schopna selektivně stanovit obsah ketoprofenu v čípcích.

Obr. 7: Chromatogram standardního roztoku s obsahem ketoprofenu (KP) a vnitřního standardu ethylparabenu (EP)



Obr. 8: Chromatogram léčivého přípravku Ketonal® 100 mg čípky s přidavkem vnitřního standardu ethylparabenu (EP)



5.2.2.5 Robustnost

Byl hodnocen vliv experimentálních podmínek na stanovení obsahu ketoprofenu. Pro testování byl použit standardní roztok obsahující: ketoprofen (125,14 mg/100 ml) a vnitřní standard ethylparaben (1 mg/100 ml).

5.2.2.5.1 Vliv složení mobilní fáze

Standardní roztok byl měřen s pomocí pěti různých mobilních fází různého složení. Jejich objemové složení bylo následující:

$$\begin{aligned} \text{H}_2\text{O} : \text{ACN} : \text{fosforečnanový pufr pH 3,5} &= 585 : 400 : 15 \\ &= 620 : 360 : 20 \\ &= 580 : 400 : 20 \\ &= 540 : 440 : 20 \\ &= 575 : 400 : 15 \end{aligned}$$

- a) Vliv na poměr ploch chromatografických píků $A_{KP/EP}$. **Relativní plocha A_R (%)**, vztažená na poměr ploch píků při optimálním složení mobilní fáze, byla vypočítána dle vzorce:

$$A_R = \frac{A_{KP/EP}}{A_{580:400:20}} \cdot 100$$

Relativní plocha A_R (%), vztažená na poměr ploch píků při optimálním složení mobilní fáze, se pohybovala v rozmezí 97,72 % až 99,89 % (viz. tab. 12). Všechny uvedené mobilní fáze jsou pro stanovení obsahu ketoprofenu vhodné.

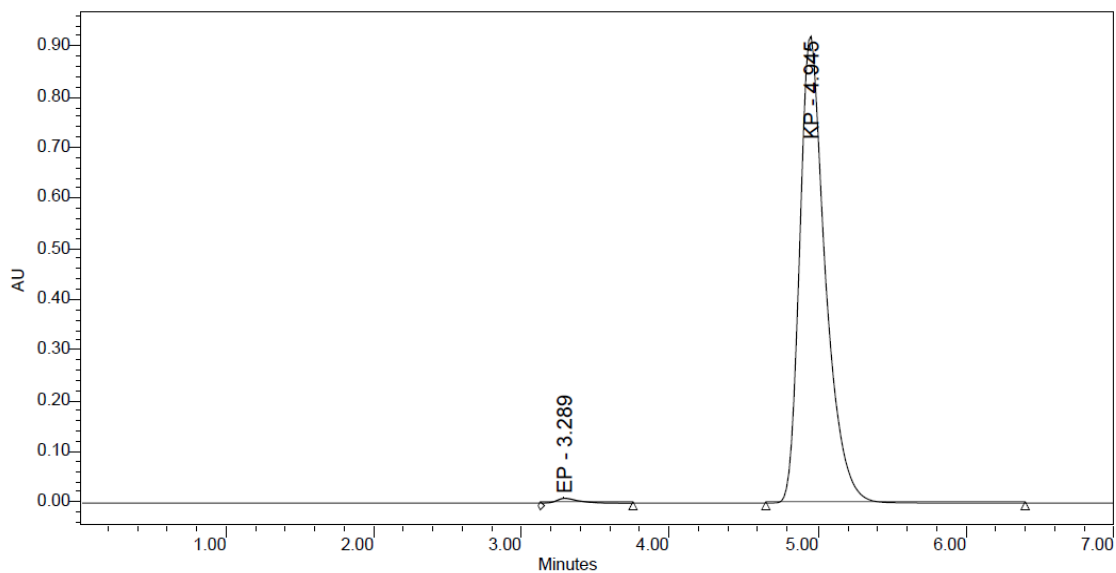
- b) Vliv na retenční čas je zobrazen v tabulce 12. Zvýšení obsahu vody vede k prodloužení analýzy, což není při stanovení žádoucí. Snižování obsahu vody vede naopak ke zkrácení retenčního času ketoprofenu. U mobilní fáze $\text{H}_2\text{O} : \text{ACN} : \text{fosf. pufr} = 540 : 440 : 20$ (obr. 9) je t_R 4,95 min oproti 6,27 min při optimálním složení mobilní fáze, přičemž rozlišení $R = 6,05$

(požadavek $R > 1,5$) [5]. U všech zmíněných mobilních fází dochází k separaci až na základní linii.

Tab. 12 : Vliv složení mobilní fáze na poměr ploch píků a retenční čas ketoprofenu

H₂O : ACN : fosf. pufr	A_{KP/EP}	A_R (%)	t_R (min)
585 : 400 : 15	121,7425	99,89	5,98
620 : 360 : 20	121,3050	99,53	8,52
580 : 400 : 20	121,8811	100,00	6,27
540 : 440 : 20	119,1048	97,72	4,95
575 : 400 : 15	121,6799	99,83	6,42

Obr. 9: Chromatogram standardního roztoku s obsahem ketoprofenu (KP) a vnitřního standardu ethylparabenu (EP) při použití mobilní fáze H₂O : ACN : fosf. pufr = 540 : 440 : 20



5.2.2.5.2 Stabilita standardního roztoku

Pro hodnocení stability standardního roztoku byl použit roztok acetonitrilu s obsahem ketoprofenu 125,14 mg/100 ml a s přidavkem vnitřního standardu ethylparabenu 1 mg/100 ml. Roztok byl uchováván za těchto podmínek:

- 1) za snížené teploty (4 °C), chráněný před světlem
- 2) při laboratorní teplotě, za přístupu světla

Roztoky byly třikrát dávkovány na kolonu vždy po 24, 48 a 72 hodinách od jejich přípravy. Výsledky jsou uspořádány v tabulce 13.

Tab. 13: Stabilita ketoprofenu v roztoku standardu v závislosti na době a způsobu uchování

t (h)	KP/EP (4°C)	S _T (%)	KP/EP (~20°C)	S _T (%)
0	121,8811	0	121,8811	0
24	121,0822	0,66	121,2486	0,52
48	121,6762	0,17	121,9428	0,05
72	122,1272	0,20	121,2843	0,49

S_T = faktor stability v %, výpočet byl proveden dle následujícího vzorce:

$$S_T = \frac{|A_{KP/EP} - A_0|}{A_0} \cdot 100$$

t = čas od přípravy standardního roztoku v h

A_{KP/EP} = poměr ploch ketoprofenu a vnitřního standardu ethylparabenu

A₀ = poměr ploch KP/EP v čase 0 h

Z tabulky 13 je patrné, že požadavek S_T < 1% je splněn při uchovávaní za snížené i laboratorní teploty až do 72 hodin.

Závěr: Standardní roztok ketoprofenu s přidavkem vnitřního standardu ethylparabenu je možno uchovávat po dobu 72 hodin za snížené i laboratorní teploty.

5.2.3 Závěr

Vypracovaná metoda slouží ke stanovení obsahu ketoprofenu v čípcích. Na základě výsledků validace lze konstatovat, že metoda poskytuje přesné a správné výsledky a je tedy vhodná pro stanovení obsahu ketoprofenu v léčivém přípravku Ketonal[®] 100 mg čípky, Lek Pharmaceuticals, Slovinsko.

6. Shrnutí závěrů práce

Cílem práce byl vývoj a validace HPLC metody pro stanovení ketoprofenu v přípravku Ketonol[®] 100 mg čípky.

Cíle bylo dosaženo modifikací metody pro přípravu vzorku [3]. Pro vlastní analýzu byly ponechány podmínky z metody pro stanovení ketoprofenu, methylparabenu a propylparabenu [4]. Metoda pro stanovení ketoprofenu v přípravku Ketonol[®] 100 mg čípky byla následně validována. Na základě výsledků validace lze konstatovat, že metoda poskytuje přesné a správné výsledky a je tedy vhodná pro stanovení obsahu ketoprofenu v léčivém přípravku Ketonol[®] 100 mg čípky, Lek Pharmaceuticals, Slovinsko.

Vyvinutá metoda poskytuje pětinasobné zkrácení přípravy vzorku (z 50 min na 10,5 min) oproti původní metodě [3].

Výsledky robustnosti (viz. kap. 5.2.2.5.1), konkrétně závislost retenčního času na složení mobilní fáze, ukazují na další možnost zkrácení analýzy. Snížení obsahu vody ve prospěch acetonitrilu vede ke zkrácení retenčního času ketoprofenu. Další vývoj metody pro stanovení ketoprofenu v přípravku Ketonol[®] 100 mg čípky může tedy spočívat v nalezení takové mobilní fáze, která umožní co nejkratší analýzu při současném zachování vyhovujícího rozlišení chromatografických píků ethylparabenu a ketoprofenu.

7. Použitá literatura a další zdroje

- [1] KLIMEŠ, Jiří, et al. *KONTROLA LÉČIV I.* 1. vydání. Praha : Karolinum, 2006. 150 s. ISBN 80-246-0419-1.
- [2] *SPC Ketonal čípky*. revize textu 17. 12. 2008. Mikro-verze AISLP verze 2011.1. Praha
- [3] RÁB, Ludvík. Využití HPLC v analýze farmaceuticky významných látek. Hradec Králové, 2006. 66 s. Rigorózní práce. Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové.
- [4] Dvořák J., Hájková R., Matysová L., Nováková L., Koupparis M., Solich P.: *HPLC Determination of Ketoprofen and its Degradation Products in Presence of Preservatives in Pharmaceuticals*, J. Pharm. Biomed. Anal. 36(3), 625-629 NOV 2004
- [5] *Český lékopis 2009*. První vydání. Praha : Grada Publishing, a.s., 2009. 3968 s. ISBN 978-80-247-2994-7.
- [6] SciFinder® [online]. 2011 [cit. 2011-05-10]. Substance Identifier "22071-15-4". Dostupné z WWW: <https://scifinder.cas.org/scifinder/view/link_v1/substance.jsf?l=t7c60yhXV6v3NobWgPiiR4IYO4GVZ812s4RByc_Y4lumwdtw6zkqXUUjD_o8wliE>.
- [7] Ketoprofen. In *Wikipedia : the free encyclopedia* [online]. St. Petersburg (Florida) : Wikipedia Foundation, 12. Dez. 2005, last modified on 7. Apr. 2011 [cit. 2011-05-10]. Dostupné z WWW: <<http://de.wikipedia.org/wiki/Ketoprofen>>.
- [8] KARLÍČEK, Rolf, et al. *ANALYTICKÁ CHEMIE PRO FARMACEUTY*. Dotisk 2. vydání. Praha : Karolinum, 2005. 282 s. ISBN 80-246-0348-9.
- [9] ŠÍMA, Jan. *Vybrané kapitoly z analytické chemie* [online]. 2011 [cit. 2011-05-10]. Vybrané kapitoly a aplikace HPLC. Dostupné z WWW: <http://users.prf.jcu.cz/sima/vybrane_kapitoly/kapal_chrom_vyber.htm>. [webová stránka]
- [10] ŠTULÍK, Karel, et al. *ANALYTICKÉ SEPARAČNÍ METODY*. 1. vydání. Praha : Karolinum, 2004. 265 s. ISBN 80-246-0852-9.
- [11] COUFAL, Pavel. *Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta* [online]. 2004 [cit. 2011-05-10]. High Performance Liquid Chromatography, HPLC. Dostupné z WWW: <<http://web.natur.cuni.cz/~pcoufal/hplc.html>>.
- [12] DOUŠA, Michal. *HPLC.CZ* [online]. 1999-2011 [cit. 2011-05-10]. Autosamplery HPLC. Dostupné z WWW: <<http://www.hplc.cz/Teorie/autosamplers.html>>.

- [13] DOUŠA, Michal. *HPLC.CZ* [online]. 1999-2011 [cit. 2011-05-10]. Chromatografická kolona. Dostupné z WWW: <http://www.hplc.cz/Teorie/hplc_column.html>.
- [14] DOUŠA, Michal. *HPLC.CZ* [online]. 1999-2011 [cit. 2011-05-10]. Chromatografická kolona a kapiláry. Dostupné z WWW: <http://www.hplc.cz/Tip/column_capilar.htm>.
- [15] DOUŠA, Michal. *HPLC.CZ* [online]. 1999-2011 [cit. 2011-05-10]. Životnost chromatografické kolony. Dostupné z WWW: <<http://www.hplc.cz/Tip/lifetime.htm>>.
- [16] DOUŠA, Michal. *HPLC.CZ* [online]. 1999-2011 [cit. 2011-05-10]. Separace na reverzní fázi v extrémních oblastech pH. Dostupné z WWW: <http://www.hplc.cz/Tip/separation_pH.htm>.
- [17] *Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2 (R1)*. International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use, 2005. [cit. 2011-05-10]. 13 s. Dostupné z WWW: <http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q2_R1/Step4/Q2_R1__Guideline.pdf>.
- [18] Šabartová J., *Věstník SÚKL 1/1994*, Státní ústav pro kontrolu léčiv (1993), Validace analytických metod v kontrole léčiv, 6.
- [19] KLEMERA, Petr. *LinReg*. Hradec Králové, 2007. Šablona aplikace Microsoft Office Excel. Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové.