

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

Katedra farmaceutické technologie

Studijní obor: Farmacie



VALIDACE ČISTICÍCH PROCESŮ 1
CLEANING PROCESSES VALIDATION 1

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Autor:	Aneta Hynková
Vedoucí diplomové práce:	Mgr. Pavel Berka
Konzultant:	RNDr. Zdeněk Pavelek, CSc.

Hradec Králové, září 2013

Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem, které jsem vypracovala samostatně a na základě konzultací s vedoucím diplomové práce. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při vypracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány. Práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

Aneta Hynková

PODĚKOVÁNÍ

Tímto bych chtěla poděkovat PharmDr. Aleši Berkovi, RNDr. Zdeňku Pavelkovi, CSc. a Mgr. Lukáši Dvořákovi za umožnění přístupu a realizaci této práce v laboratořích firmy Teva Czech Industries s.r.o. Dále bych chtěla poděkovat Ing. Martině Válové a Ing. Marii Elblové za odborné vedení, čas a ochotu.

Děkuji Mgr. Pavlu Berkovi za ochotu a pomoc při zpracování rukopisu.

ABSTRAKT

Teoretická část pojednává o problematice validace čištění jako jednoho ze základních principů jistění jakosti, který má zajistit produkci bezpečných, účinných a kvalitních léčiv. Validace čistících procesů jsou vyžadovány správnou výrobní praxí především k zamezení kontaminace surovin, meziproduktů, produktů a ostatních materiálů. Práce se zabývá legislativní kontrolou validací, její organizací a formálními náležitostmi. Rovněž pojednává o problematice čistoty ve výrobních zařízeních a jejím hodnocení.

Experimentální část byla provedena ve farmaceutické firmě Teva Czech Industries s.r.o. v Opavě. Byla vyvinuta a validována analytická metoda pro stanovení flutamidu. Analytická metoda bude použita pro validaci čištění zařízení, ve kterém se bude v budoucnosti vyrábět. Validace analytické metody zahrnovala ověření validačních charakteristik jako je přesnost, správnost, specifita, linearita, detekční a kvantifikační limit a stabilita.

Klíčová slova: farmaceutická výroba, validace, čištění

ABSTRACT

The theoretical part deals with the problems of cleaning validation as one of the basic principles of quality assurance, which should secure the production of safe, effective and quality medicines. Validation of cleaning processes is required by good manufacturing practice, particularly to prevent contamination of raw materials, intermediate products, products and other materials. This work deals with the legislative control of validation, its organization and formalities. It also deals with the issue cleanliness in manufacturing facilities and its evaluation.

The experimental part was carried out in a pharmaceutical company Teva Czech Industries s.r.o in Opava. Analytical method for flutamide was developed and validated. The analytical method will be used to cleaning validation of the device in which it will be produced in the future. Validation of the analytical method included verification of validation characteristics such as accuracy, precision, specificity, linearity, detection and the limit of quantification and stability.

Keywords: pharmaceutical manufacturing, validation, cleaning

Obsah

1	Zadání práce	8
2	Úvod	9
3	TEORETICKÁ ČÁST	10
3.1	Validace	11
3.1.1	Historie	11
3.1.2	Předpisy	11
3.2	Organizace a řízení validací	14
3.3	Provedení nové validace čištění	14
3.4	Procedury čištění	15
3.5	Hodnocení čistoty	15
3.5.1	Rezidua API	15
3.5.2	Rezidua detergentů	15
3.5.3	Rezidua MO	15
3.6	Metody testování	16
3.6.1	Extrémně účinná kapalinová chromatografie (UPLC)	16
3.6.2	Srovnání IMS a UPLC	17
3.6.3	Způsobilost chromatografického systému	17
3.7	Validace analytické metody	21
3.7.1	Správnost (Accuracy)	21
3.7.2	Specifita/selektivita (Specificity)	21
3.7.3	Robustnost (Robustness)	21
3.7.4	Linearita (Linearity)	22
3.7.5	Rozsah (Range)	22
3.7.6	Detekční limit (LOD - Limit of Detection)	22
3.7.7	Kvantifikační limit (LOQ - Limit of Quantification)	23
3.7.8	Stabilita (Stability)	23
3.7.9	Přesnost (Precision)	23
3.8	Revalidace	24
3.9	Předmět validace	24
4	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	25
4.1	Vývoj analytické metody	26
4.1.1	Přístrojové vybavení a pomůcky	26
4.1.2	Použité chemikálie	26

4.1.3	Test vhodnosti chromatografického systému	27
4.2	Validace analytické metody	30
4.2.1	Přístrojové vybavení a pomůcky	30
4.2.2	Vzorky povrchů	30
4.2.3	Roztoky pro validaci analytické metody	30
4.2.4	Schéma sekvence dávkování	34
4.2.5	Výpočty	35
4.2.6	Stanovení správnosti (výtěžnosti)	36
4.2.7	Stanovení specifity/selektivity	44
4.2.8	Stanovení robustnosti	48
4.2.9	Stanovení linearity a rozsahu	53
4.2.10	Stanovení a ověření detekčního limitu	56
4.2.11	Stanovení a ověření kvantifikačního limitu	60
4.2.12	Stanovení stability standardu a stability stěru	62
4.2.13	Stanovení přesnosti	71
5	Komentář k výsledkům	74
6	Závěry	76
7	Seznam zkratk	77
8	Literatura	78
9	Seznam tabulek	80
10	Seznam obrázků	83
11	Seznam chromatogramů	83

1 Zadání práce

1. Vyvinout analytickou metodu pro stanovení látky flutamid pro validaci čištění
 - Určit optimální chromatografické podmínky
 - Testovat vhodnost chromatografického systému
 - Srovnat výsledky s požadovanými hodnotami parametrů způsobilosti systému

2. Validovat vyvinutou analytickou metodu pro látku flutamid ověřením validačních parametrů
 - Stanovit správnost (výťažnost) flutamidu pro povrchy z výrobního zařízení a z pracovního prostředí
 - Stanovit specifitu/selektivitu srovnáním flutamidu s očekávanými doprovodnými látkami ve vzorku
 - Stanovit robustnost změnou parametrů metody a změnou postupu přípravy standardu a vzorku
 - Stanovit linearitu a rozsah metody
 - Stanovit a ověřit detekční a kvantifikační limit flutamidu
 - Stanovit stabilitu standardu po dobu 7 dní v autosampleru a v chladničce a stabilitu vzorku stěru po 3 dnech v chladničce
 - Stanovit přesnost metody ověřením opakovatelnosti a mezilehlé přesnosti metody

2 Úvod

Čistota, neposkvrněnost, ryzost a třeba i cudnost. Jediné slovo se spoustou synonym a hlubokými kořeny. Už před pěti tisíci lety ve starém Egyptě můžeme narazit na zákon, který předepisoval, že každý obyvatel si musí denně oblékat čistě vyprané prádlo. Již staří Babyloňané používali na praní přírodní rostlinné produkty, které působily jako detergenty. Později se začalo vyrábět mýdlo zahříváním hydroxidu sodného s živočišným tukem nebo rostlinnými oleji. Již tehdy byl položen základ dnešní hygieně.

Je zcela samozřejmé, že nikdy nebude nic dokonalé, precizní, ryzí a perfektně čisté, ovšem musíme dbát na to, abychom se k té dokonalosti alespoň přiblížili.¹

Čistota ve farmaceutické výrobě hraje velmi důležitou roli. Čištění je nezbytné pro odstranění reziduí nečistot, čisticích prostředků a mikroorganismů a k zabránění křížové kontaminace (tj. přenosu reziduí z výroby předcházejícího produktu do následně vyráběného produktu). S tím, jak rostou nároky národních a mezinárodních zákonů a předpisů, stále více provozů potřebuje prokázat čistotu svého zařízení. K tomu slouží čisticí procesy a procedury vyvinuté přímo pro daná zařízení a prostředí využívající postupů, jejichž účinnost musí být validována. Validace čištění je jedním ze základních principů jistění jakosti.²

Experimentální část diplomové jsem zpracovávala ve farmaceutické firmě Teva Czech Industries s.r.o. po dobu 6 měsíců.

Společnost Teva Czech Industries s.r.o. (TCI), dříve známá jako Galena, je významným farmaceutickým výrobcem s dlouhou historií. Ve svém širokém portfoliu má generické léčivé přípravky - především antiastmatika, cytostatika, imunosupresiva, hypolipidemika, antihypertenziva aj. - v podobě tablet, tobolek a kapalných lékových forem, dále také účinné farmaceutické látky (API) a rostlinné extrakty. Produkty splňují uznávané standardy kvality a jsou exportovány do řady zemí celého světa, včetně USA a západní Evropy. Na úspěších společnosti a plnění náročných cílů se podílí více než 1500 zaměstnanců.

Firma Teva Pharmaceuticals CR, s.r.o., pod kterou spadá i TCI, působí na českém trhu od roku 1997, je dceřinou společností Teva Pharmaceutical Industries Ltd. se sídlem v Izraeli a historií sahající do roku 1901. Teva je přední farmaceutická společnost s celosvětovou působností a s přímým zastoupením ve více než 60 zemích. Je největším světovým výrobcem generických léčiv a aktivních farmaceutických substancí. Globální portfolio společnosti Teva zahrnuje přes 1 300 molekul.

V roce 2006 se Teva spojila se společností IVAX, pod kterou v České republice spadala Galena, a stala se tak jednou z nejvýznamnějších domácích společností. TCI se dělí na dvě divize - divizi Pharma, zabývající se generickými léčivými přípravky v kapalných a pevných lékových formách a divizi Tapi, která vyvíjí a vyrábí účinné farmaceutické látky a rostlinné extrakty.^{3,4}

3 TEORETICKÁ ČÁST

3.1 Validace

Validace (Validation) - zdokumentované ověření, že výrobní a kontrolní procesy splňují předem stanovené parametry. Správně navržený systém jištění jakosti poskytuje vysoký stupeň jistoty, že vyrobený produkt bude splňovat předem stanovené specifikace a atributy jakosti.

Validace čištění (CV - Cleaning Validation) - je dokumentovaný průkaz toho, že schválený postup čištění zajistí zařízení vhodné ke zpracování léčivých přípravků z hlediska jeho čistoty (tj. nepřítomnosti kontaminantů). Validace čistících procesů jsou vyžadovány správnou výrobní praxí především k zamezení kontaminace surovin, meziproductů, produktů a ostatních materiálů. Informace získané v průběhu validace umožňují jednak identifikovat potenciální problémy, ale především zvyšují vlastní důvěru v to, že výroba produkuje bezpečná, účinná a kvalitní léčiva.^{5,6}

3.1.1 Historie

Poprvé byl koncept validace navržen dvěma úředníky FDA (Food and Drug Administration) jako reakce na problematiku sterility u parenterálních léčiv s cílem zlepšit jejich kvalitu. První validační činnost byla zaměřena na procesy související s výrobou těchto produktů (validace sterilizačních a depyrogenizačních postupů), ale rychle se rozšířila i na oblast kontroly prostředí, čistoty zařízení a produkci čištěné vody. Požadavky na validace se dále rozvíjely i na činnosti spojené s výrobou ostatních léků a v poslední době i na oblast automatizovaných elektronických řídicích systémů.⁷

3.1.2 Předpisy

Farmaceutický průmysl je státem regulované odvětví a z toho vyplývá, že k validaci čistících procesů se vztahuje mnoho předpisů, jak českých, tak mezinárodních.

3.1.2.1 Česká legislativa a pokyny Státního ústavu pro kontrolu léčiv (SÚKL)

České právní normy jsou v plném souladu s legislativou EU a USA. Základní normou, která reguluje oblast léčiv je zákon č. 378/2007 Sb. „*O léčivech a o změnách některých souvisejících zákonů*“. S výrobou léčiv souvisí vyhláška Ministerstva zdravotnictví a Ministerstva zemědělství č. 229/2008 Sb. „*O výrobě a distribuci léčiv*“.

Orgánem, jehož úkolem je dohlížet na to, aby se v České republice používaly pouze jakostní, bezpečné a účinné léky, je rovněž Státní ústav pro kontrolu léčiv, který byl zřízen Ministerstvem zdravotnictví. Mezi základní pokyny, které se zabývají problematikou výroby léčiv, patří:

Část 1. - *Základní požadavky pro léčivé přípravky (VYR-32) a Validace aseptických procesů.*⁵

3.1.2.2 Pokyny Správné výrobní praxe (Evropská unie)

Správná výrobní praxe (GMP - Good Manufacturing Practice) je součástí jištění jakosti zaměřenou na sledování toho, zda výrobky jsou trvale vyráběny a kontrolovány v souladu s jejich zamýšleným užitím.

Evropské požadavky pro správnou výrobní praxi vycházejí z pokynů Evropské komise v *Pravidlech pro léčivé přípravky v Evropské Unii, Svazek 4 - Pokyny pro správnou výrobní praxi (Eudralex, The Rules Governing Medicinal Products in the European Community, Volume 4, Good manufacturing practices, Part I: Basic Requirements for Medicinal Products)*

Pokyny pro správnou výrobní praxi“, kapitola 5 - „Výroba“ uvádí, které základní požadavky jsou důležité pro prevenci křížové kontaminace ve výrobě:

5.18 Musí být zabráněno kontaminaci výchozí látky nebo produktu jiným materiálem či produktem.

5.19 Křížové kontaminaci lze předcházet vhodnými technickými nebo organizačními opatřeními, například:

e) jsou používány čistící a dekontaminační postupy, jejichž účinnost byla předem ověřena, protože nedokonalé čištění výrobních zařízení je nejběžnějším zdrojem křížové kontaminace

Doplňek 15 (Annex 15) „*Kvalifikace a validace*“ pro validaci čištění uvádí několik zásad:

- Ověřit účinnost postupu čištění a posoudit limity reziduí produktu, čistící pomůcky, mikrobiální kontaminaci.
- Používat validované analytické metody.
- Validovat čistící postupy vztahující se k povrchům zařízení přicházejících do kontaktu s produktem a validovat intervaly mezi použitím a čištěním a naopak.
- Zvolit reprezentativní skupinu podobných produktů a procesů nebo jednu validační studii *nejhoršího případu*.
- Prokázat obvykle třikrát úspěšný postup čištění.
- „Zkoušení dokud není vyčištěno“ („*Test until clean*“) není považováno za vhodnou alternativu validace čištění.
- Simulovat fyzikálně-chemické vlastnosti toxických či nebezpečných látek je přijatelné.^{2, 5, 8, 9}

3.1.2.3 Další předpisy

Předpisy PDA (Parenteral Drug Association)

- Technical Reports No. 29 „*Points to Consider for Cleaning Validation*“

Pokyny FDA (Food and Drug Administration) :

- „*Guide to Inspections Validation of Cleaning Processes*“
- „*Analytical Procedures and Methods Validation*“

Předpisy PIC/S (Pharmaceuticals Inspection Co-operation scheme)

- PI 006-3 „*Validation Master Plan, Installation and Operational Qualification, Non-Sterile Process Validation, Cleaning Validation*“^{5, 6, 8}

3.2 Organizace a řízení validací

Na celkovém řízení a provádění validačních aktivit se podílí mnoho složek. Nejdůležitější postavení zde zaujímá *Rada jakosti*, která schvaluje validační dokumentaci (celkový validační plán včetně změn a dodatků, řídicí validační plány včetně změn a dodatků, souhrnné validační zprávy včetně změn a dodatků a celkovou validační zprávu).⁶

Oddělení validací Pharma QA (Quality Assurance) připravuje validační dokumentaci a odpovídá za celkovou koordinaci jednotlivých validačních aktivit. *Ředitelé jednotlivých útvarů a vedoucí QC* (Quality Control) jsou odpovědní za zabezpečování všech validací a monitoringu, které souvisí s činnosti daného útvaru, oddělení nebo oblasti. *Řídicí validační týmy* mají na starost kontrolu a schvalování validační dokumentace (validačních plánů, validačních protokolů, validačních zpráv a souhrnné validační zprávy) a rovněž jmenování validačních týmů pro jednotlivé validace. Řídicí validační týmy a validační týmy mohou spolupracovat i s *externími firmami*.⁶

Základním dokumentem je *Řídicí plán validací*, který vymezuje pro danou výrobní jednotku rozsah všech plánovaných aktivit. Pro CV má v něm být popsán výběr *nejhoršího případu pro API A, pro produkt A a pro produkt B*. Také má být v něm uvedeno vymezení kritéria přijatelnosti a limitu čistoty pro API, pro detergent a vymezení limitu čistoty pro mikroorganismy.

Součástí každé validační dokumentace musí být rovněž *Validační protokol, Validační zpráva a Souhrnná validační zpráva*.¹⁰

3.3 Provedení nové validace čištění

Validace není jen jednorázový akt a musí podléhat tzv. *změnovému řízení*. Útvar TSA (Technical and Scientific Affair) nebo výroby musí zavést změnové řízení v systému *TrackWise*. Nová CV se provádí vždy minimálně na třech po sobě jdoucích hlavních čištěních po výrobě vybraného *nejhoršího případu produktu A* na vybraném *nejhorším případě zařízení*.^{2, 6, 10}

Po zkompletování základních informací každého produktu z aktuálního portfolia (název produktu, název API, síla, velikost šarže atd.) se provede jejich vyhodnocení a posoudí se nutnost provedení nové CV, pokud je do portfolia výroby zaveden nový produkt, dojde ke změně výrobního zařízení, nebo dojde ke změně procedury čištění (např. změna čisticího prostředku). Na základě zkompletovaných informací a posouzení nutnosti provedení nové CV se posoudí nutnost analytické metody.¹⁰

Analytická metoda (AM) se vztahuje vždy ke konkrétnímu způsobu provedení vlastní analýzy. Před provedením její validace musí existovat její detailní popis ve formě vydané AM.

V případě, že není k dispozici vhodná analytická metoda, musí se zabezpečit její vývoj, validace a zdokumentování (vydání AM). Validují se pouze nelékopisné metody.^{6, 10, 11}

Před vlastní CV se provede analýza rizik pro potvrzení volby *nejhoršího případu produktu A*, *nejhoršího případu produktu B*, kritéria přijatelnosti a limitu čistoty. Tato analýza rizik je součástí validačního protokolu CV. Následně se připraví vzorkovací pomůcky dle vzorkovacího protokolu. Po provedeném čištění se vzorky odeberou a analyzují se dle schválené analytické metody. Výsledky se vyhodnotí a zanesou do validační zprávy.¹⁰

3.4 Procedury čištění

Slouží k odstraňování reziduí z povrchu zařízení nebo vybavení za účelem dosažení zvoleného kritéria čistoty. Schopnost úspěšně očistit zařízení závisí na rozpustnosti látek, které mají být čištěním odstraněny v průběhu mytí a vyplachování. V rámci CV se ověřují všechny procedury čištění zařízení, jejich části a pomůcek, které jsou používány k výrobě vybraných produktů (tzv. *nejhorších případů* z pohledu CV). Podle způsobu provedení rozlišujeme procedury na manuální, poloautomatické a automatické.^{5, 10}

3.5 Hodnocení čistoty

V praxi je čistota chápána jako „nízká kontaminace“, protože je velmi obtížné prokázat úplnou nepřítomnost reziduí. Je nutné také vysvětlit, jakým způsobem se rezidua dostala na určitý povrch, zařízení nebo prostředí. Rozlišují a hodnotí se rezidua účinné látky (API), rezidua pomocných látek, rezidua detergentů, rezidua mikroorganismů, rezidua pyrogenů aj.⁵

3.5.1 Rezidua API

Abychom stanovili kritérium přijatelnosti pro rezidua API, je nutné vypočítat maximální množství kontaminantu na povrchu zařízení - MAC_{API} (Maximum Allowable Carryover API). Výpočet se provádí na základě znalosti *nejhoršího případu produktu A* a *nejhoršího případu produktu B*.¹⁰

3.5.2 Rezidua detergentů

Pro stanovení kritéria přijatelnosti pro rezidua detergentu je nutné vypočítat tzv. maximální přenos množství detergentu (MAC_{CA}). Stejně jako pro rezidua API je potřeba znát *nejhorší případ produktu A* a *nejhorší případ produktu B*.

3.5.3 Rezidua MO

Hodnota limitu čistoty pro mikrobiologické stěry zařízení je stanovena maximálně 1 CFU/cm². Tento limit platí pro výrobu nesterilních lékových forem.¹⁰

3.6 Metody testování

Metoda musí být validována, jinak nelze zaručit důvěryhodnost dosažených výsledků a z nich plynoucích závěrů. Testovací metoda pro vyhodnocení rozsahu kontaminace je volena vždy podle povahy sledovaných reziduí:

- **Stanovení obsahu** - jedná se o specifické a citlivé metody (HPLC - vysoce účinná kapalinová chromatografie, UPLC - extrémně účinná kapalinová chromatografie, GC - plynová chromatografie, MS - hmotnostní spektrometrie aj.
- **Stanovení celkového C, N, apod.** - odhad sumy látek, nutná korelace s jinými metodami
- **Spektrální metody** - UV, VIS, IR, fluorescence, jednoduché testy pro stanovení organických látek
- **pH nebo iontové selektivní elektrody** - stanovení iontových látek v posledním oplachu
- **Měření osmózy nebo konduktivity** - vhodné metody pro nízké koncentrace iontových látek⁵

3.6.1 Extrémně účinná kapalinová chromatografie (UPLC)

UPLC je jednou z běžně používaných testovacích metod, které slouží k vyhodnocení kontaminace ve farmaceutické výrobě. Je to především z toho důvodu, že jde o separační metodu, která umožňuje kvalitativní i kvantitativní hodnocení separovaných složek směsi.¹²

Metoda je založena na separaci analytů na základě jejich distribuce mezi stacionární a mobilní fází, která je vždy kapalná. Stacionární fáze je zakotvená v chromatografické koloně. Během separace dochází k mnoha typům interakcí. Vzorky jsou dávkovány dávkovacím ventilem do mobilní fáze. Ta unáší jednotlivé složky vzorku na kolonu, kde dochází k opakovanému ustanovení rovnováhy mezi mobilní a stacionární fází a k separaci analytů dle fyzikálně-chemických vlastností. Po průchodu separační kolonou jsou analyty v mobilní fázi detekovány v průtokové cele detektoru. Metoda je plně automatizovatelná a pro analýzu postačuje pouze malé množství vzorku.^{12, 13}

Z UPLC záznamu - chromatogramu, který znázorňuje jednotlivé analyty nejčastěji ve formě tzv. chromatografických píků oddělených navzájem základní linií, lze získat informace o identitě, obsahu i čistotě analyzovaného léčiva. Od vysoce účinné kapalinové chromatografie (HPLC) se především liší typem sorbentů. Separační proces UPLC využívá sorbentů připravených patentovou technologií „bridged hybrid particle“, které vynikají svojí mechanickou pevností a mimořádnou separační účinností. Celý proces probíhá za velmi vysokých tlaků (100 MPa, 1000 bar, tj cca 15000 psi).^{12, 14, 15}

Pro stanovení jednotlivých složek ve směsi se nejčastěji používá metoda vnějšího standardu a metoda vnitřního standardu.

3.6.1.1 Metoda vnějšího standardu

Metoda vnějšího standardu spočívá ve dvou krocích. V prvním kroku se na kolonu nastříkne roztok analyzovaného vzorku a po registraci chromatografického záznamu se v druhém kroku nastříkne roztok vnějšího standardu a opět se registruje jeho chromatogram. Jako vnější standard se zpravidla používá standard stanovované látky. Koncentrace stanovovaných složek směsi se vypočítá z poměru ploch píků jednotlivých stanovovaných látek a plochy píku vnějšího standardu.

3.6.1.2 Metoda vnitřního standardu

Ke známému objemu roztoku vzorku se přidá definovaný objem roztoku vhodného vnitřního standardu a po promíchání se nastříkuje na kolonu. Koncentrace stanovovaných látek se opět vypočítá z poměru ploch píků jednotlivých separovaných složek a plochy píku vnitřního standardu.¹²

3.6.2 Srovnání IMS a UPLC

IMS (Iontová mobilní spektroskopie) je specifická metoda, která byla původně použita k testování analytické metody určené ke stanovení substance *flutamidum* (viz. Experimentální část). Dnes se tato metoda využívá velmi vzácně pro validaci čištění ve výrobních zařízeních.

IMS je hmotnostně - spektrometrická technika, která ionty v plynné fázi dělí nikoliv podle hmotnosti a náboje, ale podle rychlosti průchodu určitým regionem, který je naplněn kolizním plynem. Na rozdíl od UPLC je technika je relativně rychlá a méně nákladná, ale nestačí k úplné identifikaci látky. Pouze výrazně zužuje okruh hledané látky.^{16, 17}

3.6.3 Způsobilost chromatografického systému

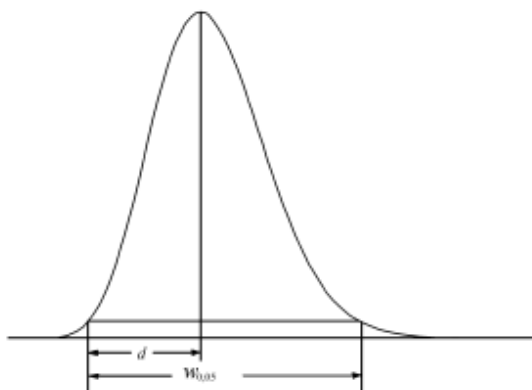
Před vlastní analýzou se zjišťuje způsobilost chromatografického systému. Test způsobilosti systému představuje nedílnou součást metody a slouží k zajištění přiměřené účinnosti chromatografického systému. Zjišťuje se, zda předepsané parametry jsou na požadované úrovni pro správné provedení daných zkoušek. V případě, že některý parametr nebo více parametrů neodpovídá, upraví se chromatografické podmínky v rozsahu, aby byla splněna kritéria způsobilosti, aniž by přitom došlo k podstatnému pozměnění metody. Rozsah povolených změn je uveden v příslušné lékopisné monografii. Při vývoji metody v experimentální části se postupovalo dle Amerického lékopisu (USP).^{12, 18}

3.6.3.1 Parametry způsobilosti systému

Mezi obecné parametry patří faktor symetrie, kapacitní faktor, počet teoretických pater, rozlišení mezi píkem analytu a nečistotami a rozlišení mezi neznámými píky. Pík může být definován plochou (A) píku nebo výškou píku (H) a šířkou píku v polovině výšky (w_h).¹⁹

Faktor symetrie (Tailing factor)

Parametr sloužící k posouzení tvaru píku se nazývá symetrie píku, resp. asymetrický faktor (**obr. 1**).



Obr. 1 - Faktor symetrie¹⁸

Výpočet se provádí dle vzorce:

$$T = \frac{w_{0,05}}{2 \times d} \quad (1)$$

$w_{0,05}$... šířka píku v 5 % výšky píku

D ... vzdálenost mezi kolmicí spuštěnou z vrcholu píku a vzestupnou částí píku v 5 % jeho výšky píku

Kapacitní faktor

Je rovněž znám jako retenční faktor nebo jako hmotnostní distribuční objem.

Vypočte se ze vztahu:

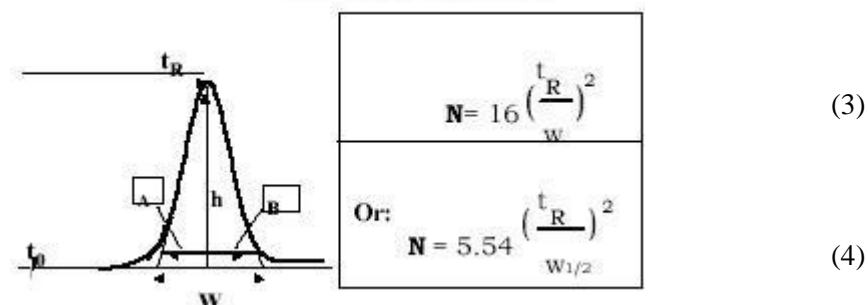
$$k' = \frac{t - t_0}{t_0} \quad (2)$$

t ... retenční čas dané látky (čas, který složka potřebuje k průchodu chromatografickým systémem)

t_0 ... mrtvý čas kolony

Počet teoretických pater

Pomocí tohoto faktoru se zjišťuje účinnost chromatografické kolony. Na **obr. 2** je znázorněn výpočet dle Amerického a Evropského lékopisu (EP).^{14, 18, 19}



Obr. 2 - Počet teoretických pater a výpočty dle USP a EP²⁰

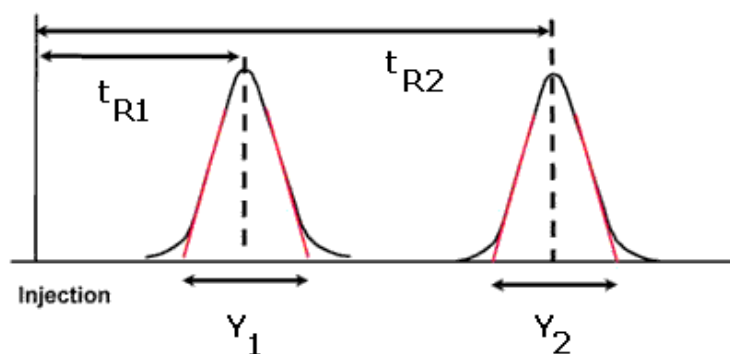
t_R ... retenční čas

W ... šířka píku měřená extrapolací v místě relativně rovné základní linie

$W_{1/2}$... šířka píku v polovině výšky píku

Rozlišení

Hlavním cílem chromatografické metody je dosáhnout dobrého rozdělení analyzovaných látek v přijatelném čase. Rozdělení látek může být dokonalé nebo nedokonalé a je vhodné tento stupeň kvantitativně vyjádřit. Rozlišení je pak nejpoužívanější vyjádření míry kvality separace dvou sousedních elučních křivek (**obr. 3**).²¹



Obr. 3 - Grafické vyjádření rozlišení dvou píků²¹

Výpočet rozlišení se provádí podle tohoto vzorce:

$$R = \frac{2x(t_{R1} - t_{R2})}{(Y_2 + Y_1)} \quad (5)$$

t_{R1} , t_{R2} ... retenční časy nebo vzdálenosti podél základní linie od bodu nástřiku ke kolmicím spuštěným z vrcholu dvou sousedních píků ($t_{R1} < t_{R2}$)

Y_1 , Y_2 ... šířky píku měřené extrapolací v místě relativně rovné základní linie ²¹

V **tabulce 1** jsou uvedeny limity, které musí dle vnitřních předpisů firmy splňovat sledované parametry.

Tabulka 1 - Limity parametrů způsobilosti systému

Faktor symetrie (Tailing factor) dle USP	$\leq 2,0$
Kapacitní faktor	$k' \geq 2$
Počet teoretických pater (Plate count)	$N \geq 2000$
Rozlišení mezi píkem analytu a nečistotami	$R \geq 2,0$
Rozlišení mezi neznámými píky ($S/N \geq 10$)	$R \geq 1,0$

3.6.3.2 Úprava chromatografických podmínek

Seznam a hodnoty povolených úprav dle USP jsou uvedeny v **tabulce 2**.

Tabulka 2 - Povolené úpravy chromatografických podmínek

Složení mobilní fáze	Množství minoritní složky rozpouštědla může být upraveno v rozsahu ± 30 % relativních, podle toho, která hodnota je větší. Žádnou složku nelze změnit o ± 10 % absolutních.
pH vodné složky mobilní fáze	$\pm 0,2$ hodnoty pH
Koncentrace solí v tlumivém roztoku	Pokud je tlumivý roztok součástí mobilní fáze, lze koncentraci solí upravovat ± 10 %.
Vlnová délka detektoru	Není povolena žádná změna.
Průtoková rychlost	± 50 %
Teplota kolony	± 10 %
Délka kolony	± 70 %
Vnitřní průměr kolony	Lze upravit za předpokladu, že lineární rychlost je udržována jako konstantní.
Velikost částic	Zmenšení o 50 %, zvětšení není povoleno.
Nastříkovaný objem	Může být zmenšen za předpokladu, že detekce píku a opakovatelnost vyhovují.

3.7 Validace analytické metody

Validace analytické metody je proces, kterým se zjišťují nejdůležitější charakteristiky metody. Smyslem validace je demonstrovat její vhodnost pro zamýšlený účel. Cílem je určit podmínky, za kterých je postup použitelný, a zajistit stejnou spolehlivost při opakovaném použití.

Validace se provádí při vývoji nové metody, jestliže byla metoda změněna či při průkazu rovnocennosti dvou metod. Specialisté provádí validace analytických metod dle validačního protokolu. Všechna data a výsledky jsou dokumentovány tak, aby byly dohledatelné a zpracovatelné ve formě validační zprávy.^{11, 12}

3.7.1 Správnost (Accuracy)

Správnost analytické metody představuje míru shody skutečné hodnoty analytu s hodnotou stanovenou. Správnou hodnotu lze zjistit pomocí přípravku se známým přírůvkem standardu. Správnost se obvykle zjistí analýzou nejméně šesti vzorků a vyjádří se jako rozdíl správné a získané hodnoty nebo jako výtěžnost:

$$\text{výtěžnost (recovery)} = \frac{100 \times \text{nalezená hodnota}}{\text{správná hodnota}} \quad [\%] \quad (6)$$

3.7.2 Specifita/selektivita (Specificity)

Specifita (neboli specifická) analytické procedury představuje její schopnost stanovit správně analyt v přítomnosti očekávaných komponent zkušební vzorku. To mohou být další účinné látky u složených přípravků, pomocné látky, nečistoty z výroby, rozkladné produkty, zbytková rozpouštědla. Tento parametr se doloží výsledky analýzy standardu, a dále např. vzorků bez analyzované látky obsahujících všechny složky přípravku, rozkladné produkty, nečistoty.^{11, 12}

3.7.3 Robustnost (Robustness)

Robustnost analytické metody je míra schopnosti metody poskytovat spolehlivé výsledky i při provedení malých, úmyslných změn parametrů metody. Sbírají se poznatky z vývoje metody a cílem je upozornit na podmínky, které mohou ovlivnit výsledky. Například se jedná o tyto vlivy: složení mobilní fáze, pH vodné složky mobilní fáze, teplota na koloně, rychlost průtoku, změna parametrů přípravy zkušebních vzorků aj.

3.7.4 Linearita (Linearity)

Linearita představuje schopnost analytické metody prokázat vztah mezi nalezenými výsledky a koncentrací (množstvím) analytu ve vzorku. Výsledky by měly být přímo úměrné koncentraci stanovované látky. Obvykle se stanovuje minimálně pět různých koncentrací v rozmezí 50 - 150 % deklarovaného obsahu. Je umožněno pracovat s roztoky standardů, neboť rušivé vlivy u reálných vzorků jsou hodnoceny jinými parametry validace. Výsledky jsou vyhodnoceny regresní analýzou.

K prokázání lineární závislosti jsou využívány následující rovnice:

$$y = a + b \times x \quad \text{regresní přímka} \quad (7)$$

$$a = \frac{\sum x_i^2 \times \sum y_i - \sum x_i \times \sum x_i \times y_i}{n \times \sum x_i^2 - (\sum x_i)^2} \quad \text{úsek na ose y (intercept)} \quad (8)$$

$$b = \frac{n \times \sum x_i \times y_i - \sum x_i \times \sum y_i}{n \times \sum x_i^2 - (\sum x_i)^2} \quad \text{směrnice regresní přímky (slope)} \quad (9)$$

$$r = \frac{\sum x_i \times y_i - n \times \bar{x} \times \bar{y}}{\sqrt{(\sum x_i^2 - n \times \bar{x}^2) \times (\sum y_i^2 - n \times \bar{y}^2)}} \quad \text{korelační koeficient} \quad (10)$$

$$S_R = \sum (y_i - a - b \times x_i)^2 = \sum y_i^2 - a \times \sum y_i - b \times \sum x_i \times y_i \quad \text{reziduální odchylka} \quad (11)$$

$$SD_a = \frac{100 \times a}{y_{100\%}} \quad \text{odchylka interceptu (a)} \quad (12)$$

3.7.5 Rozsah (Range)

Rozsah analytické metody představuje interval mezi nejvyšší a nejnižší koncentrací analytu ve vzorku. Tento parametr se obvykle odvozuje z linearity metody. Dolním limitem může být detekční limit a horní může být určen maximální odezvou, při jejímž překročení už přístroj nepracuje přesně.^{11, 12}

3.7.6 Detekční limit (LOD - Limit of Detection)

Vyjadřuje citlivost metody. Je to nejnižší detekovatelná koncentrace látky, nestanovované kvantitativně. U instrumentálních metod se může určit jako koncentrace analyzované látky s poměrem signálu k šumu s hodnotou 3. Nalezený detekční limit se ověří 6 analýzami příslušné koncentrace vzorku.

3.7.7 Kvantifikační limit (LOQ - Limit of Quantification)

Nejnižší množství/koncentrace analytu ve vzorku, kterou lze stanovit s přijatelnou přesností a správností. Je rovněž parametrem citlivosti metody. Za limitující relativní směrodatnou odchylku se považuje 10 %, proto je možné kvantitativní limit vyjádřit jako koncentraci, při jejíž analýze se dosáhne této relativní směrodatné odchylky. Obvykle to bývá trojnásobek detekčního limitu. Často se také vyjadřuje jako koncentrace s poměrem signálu k šumu s hodnotou 10.

3.7.8 Stabilita (Stability)

Analytické metody používané při provádění stabilitních testů musí být schopny indikovat stabilitu. To znamená, že musí být doložena schopnost metody postihnout rozkladné produkty.^{11, 12}

3.7.9 Přesnost (Precision)

Přesnost analytické metody představuje míru shody mezi sérií výsledků získaných mnohonásobnou analýzou homogenního vzorku za předepsaných podmínek. Obvykle se tento vzorek nezávisle šestkrát analyzuje kompletním postupem včetně přípravy vzorku. Přesnost se vyjádří jako relativní směrodatná odchylka těchto šesti stanovení. Podle podmínek opakování se rozlišují tři úrovně přesnosti:

3.7.9.1 Opakovatelnost (Repeatability)

Vyjadřuje variabilitu výsledků analýz provedených za stejných podmínek (stejná laboratoř, stejný analytik, stejný přístroj, stejný den, stejné chemikálie) v krátkém časovém intervalu.

3.7.9.2 Mezilehlá přesnost (Intermediate Precision)

Vyjadřuje variabilitu výsledků v rámci laboratoře (různé přístroje, analytici, dny, chemikálie apod.)

3.7.9.3 Reprodukovatelnost (Reproducibility)

Provedení je stejné jako u mezilehlé přesnosti s tím rozdílem, že probíhá v různých laboratořích.^{11, 12}

3.8 Revalidace

Při rozhodování o nutnosti revalidace analytických metod se posuzuje rozsah původně provedené validace. V případě, že původní provedená validace analytické metody nevyhoví požadavkům, musí být provedena její revalidace.

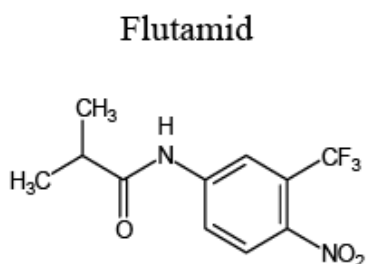
Revalidace analytické metody se provádí rovněž v případě, že došlo k některé z následujících změn:

- Změna v technologii výroby účinné látky
- Rozšíření profilu nečistot resp. rozkladných produktů
- Změna ve složení produktu
- Významná změna analytické metody ¹¹

3.9 Předmět validace

Předmětem validace v experimentální části této diplomové práce je farmaceutická substance *Flutamidum* sumárního vzorce $C_{11}H_{11}F_3N_2O_3$, molekulové hmotnosti $M_r = 276,21$, CAS 13311-84-7.

Chemicky se jedná o 2-methyl-*N*-[4-nitro-3-(trifluormethyl)fenyl]propanamid (**obr. 4**).¹⁸



Obr. 4 - Strukturní vzorec flutamidu ¹⁸

Vzhled: světle žlutý krystalický prášek.

Rozpustnost:

Je prakticky nerozpustný ve vodě a snadno rozpustný v acetonu a etanolu 96%.²⁴

Farmakologické a biologické vlastnosti

Jedná se o nesteroidní antiandrogen. Inhibuje vazbu androgenů na androgenní receptory, inhibuje zpětné vychytávání androgenů a v játrech se metabolizuje na účinný hydroxyflutamid a dalších 5 metabolitů. Flutamid brání účinku testosteronu na pohlavní orgány. Používá se jako hormonální cytostatikum k léčbě rakoviny prostaty.²²

4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 Vývoj analytické metody

Experimentální část jsem prováděla v laboratoři na oddělení *Kontroly kvality QC-TSA*, kde jsem se podílela na vývoji a validaci analytické metody.

Analytickou metodu pro CV bylo nutné vyvinout a validovat, protože došlo k zavedení nového produktu do portfolia výroby (*Flutamid 250 mg tablety*). Rovněž nebylo možné převzít stávající analytickou metodu z jiného závodu, z důvodu potřeby alternativní metody testování k *IMS - Iontová mobilní spektroskopie*. Novou alternativní metodou testování analytické metody se stala metoda *UPLC - Extrémně účinná kapalinová chromatografie*. Vývoj a validace analytické metody byla provedena s čistou látkou - substancí *flutamidum*, která je obsažena v přípravku *Flutamid - 250 mg tablety*.

Při vývoji metody jsem vycházela z USP a z firemních předpisů (standardní operační postupy a pracovní instrukce). Při validaci metody jsem vycházela z validačního protokolu QDP0042864 V. 1,0.

4.1.1 Přístrojové vybavení a pomůcky

- extrémně účinný kapalinový chromatograf Waters Acquity UPLC H - Class LC_P45 a LC_P44_UV; software: Empower Pro verze 2 (Waters Corporation, Milford, USA)
- analytické váhy 0,001 mg Mettler Toledo, VA_P20
- vodní lázeň s termostatem, Julabo, VL024
- bezpečnostní box pro práci s práškovými látkami, Labconco, 111 251 815 D
- ultrazvukové lázně Sonorex, Bandelin, UZL - 017
- vialky šroubovací, National Scientific, C 4000 - S2W
- parafilm M, Bemis
- membránový filtr NYLON 0,45 μm
- laboratorní sklo
- automatické pipety
- horkovzdušný fén

4.1.2 Použité chemikálie

- flutamid - č. standardu 451-4, šarže 1334414
- acetonitril - šarže I 638730219, K 39350056843, Merck
- metanol - I 624918206, Merck
- čištěná voda - šarže Model 7144, Thermo Scientific

4.1.3 Test vhodnosti chromatografického systému

Výběr vhodné kolony

Při výběru kolony bylo postupováno dle doporučení USP. Byla vybrána kolona kratší - 50 mm (v USP - 250 mm), z důvodu potřeby úspory času zrychlením analýzy. Jako typ kolony byla doporučena kolona Kinetex s částicemi o velikosti 2,6 μm .

Složení mobilní fáze

V USP je uveden poměr acetonitril/voda 45 : 55. Tento poměr byl zachován.

Průtoková rychlost

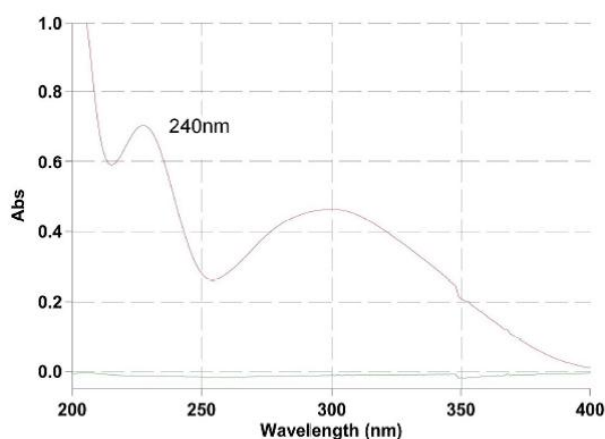
Průtoková rychlost byla snížena na 0,9 ml/min (v USP 1,0 ml/min), z důvodu provádění analýzy za vyšších tlaků.

Složení diluentu

Jako diluent byl vybrán metanol místo acetonitrilu uvedeného v USP. Acetonitril není vhodný jako diluent pro stírání a vůbec se nevyužívá ve farmaceutické výrobě. Metanol se také lépe odstraňuje. Pro experiment byl nejprve vybrán diluent o 50% koncentraci metanolu ve vodě. Pro další měření se osvědčil větší poměr vodné složky (75%), který vykazoval lepší parametry separace (větší počet teoretických pater).

UV detekce

Test UV detektoru je uveden na **obr. 5**, flutamid vykazuje maximum při 240 nm.



Obr. 5 - Test UV detektoru

4.1.3.1 Roztoky pro vývoj metody

Mobilní fáze pro UPLC (MF)

450 ml acetonitrilu se smísilo s 550 ml vody a bylo zfiltrováno pod vakuem přes membránový filtr NYLON 0,45 µm.

Ředící směs (diluent DIL_0)

50 ml metanolu se smísilo s 50 ml vody (50% MeOH (v/v)).

Roztok flutamidu (~1,4 µg/ml)

Do 100 ml odměrné baňky bylo naváženo asi 1,4 mg standardu flutamidu. Bylo přidáno 25 ml metanolu, roztok byl vložen na 5 min do ultrazvuku, přidala se voda a po temperaci na 20°C (cca 15 min) byl doplněn vodou po značku a důkladně protřepán. 1,0 ml roztoku byl pipetou přenesen do 100ml odměrné baňky, byl přidán diluent a po temperaci na 20°C byl roztok doplněn diluentem DIL_0 po rysku a důkladně protřepán.

4.1.3.2 Chromatografické podmínky

Použité chromatografické podmínky jsou uvedeny v **tabulce 3**.

Tabulka 3 - Optimální chromatografické podmínky

Náplň kolony:	Kinetex C18 100A	Velikost částic [µm]:	2.6
Rozměr kolony [mm]:	50 x 3,0	Průtok [ml/min]	0,9
Teplota kolony (°C)	30	Teplota vzorku [°C]	20
Detekce - UV:	240 nm	Dávkovaný objem [µl]:	20
Délka analýzy	3 min pro roztoky standardu 7 min pro vzorky	Wash solvent (strong wash):	80% MeOH
Typ chromatografu:	UPLC	Purge solvent (weak wash):	20% MeOH
Typ detektoru	UV		
Mobilní fáze (MF):	ACN : Voda (45:55, V/V)		
Diluent	Diluent 1 : MeOH :Voda (25:75, V/V)		

4.1.3.3 Vlastní analýza a závěr

Pro test vhodnosti systému byl připraven roztok standardu flutamidu s experimentální navázkou 14,002 mg, jako diluent byl použit 50 % MeOH. Roztok standardu byl pak nastříknut na kolonu. Pík flutamidu je znázorněn na **chromatogramu 1**. Faktor symetrie vyšel 1,1; počet teoretických pater 6244 (výpočet dle USP) a retenční čas 1,559.

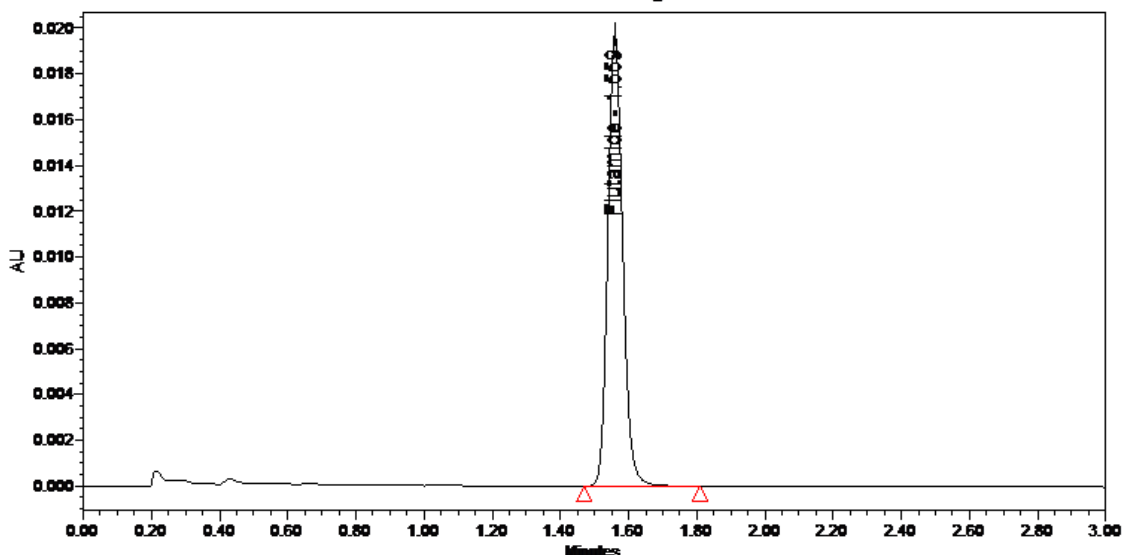
Dílčí závěr 1: Bylo zjištěno, že všechny výsledky vyhovují zadaným limitům parametrů a systém je tedy vhodný pro analýzu.

System Suitability Results

System Information

	Vial	Inj	SampleName	Injection Id	Processing Method	Proc Mtd ID	Instrument Method	Inst Mthd ID
1	2A2	2	Std_c=1.4ug/ml	1062	120323_cal	1068	Flutamide_test_0_9ml	1031

Auto-Scaled Chromatogram



— SampleName Std_c=1.4ug/ml; Result Id 1232; Date Processed 27.3.2012 11:05:12 CEST

System Suitability Separation Results

	Name	Sample Type	Int Type	RT (min)	Area	Result Id	Calib Id	USP Plate Count	EP Plate Count	USP Tailing
1	Flutamide	Standard	BB	1.559	60068	1232	1233	6244	6262	1.1

Column KinetexC18 100A,50 x 3mm,2.6µm

Column Number nový

Serial Number 585569-5

Chromatogram 1 - test vhodnosti systému - pik flutamidu

4.2 Validace analytické metody

Postup, dle kterého byla analýza provedena, je uveden ve validačním protokolu QDP0042864 V 1,0 a v pracovní instrukci PI\PQC\065 V 1,0. Výpočty a grafy pocházejí ze softwaru Empower Pro verze 2 a z programu Microsoft Excel 2007.

4.2.1 Přístrojové vybavení a pomůcky

Viz. 4.1.1, navíc:

- stěrové tyčinky, Texwipe, TX714A
- mikrostříkačka, Hamilton, SYR_043

4.2.2 Vzorky povrchů

- výrobní zařízení
 - leštěná ocel
 - neleštěná ocel
 - tvrdý plast
 - potahovaná litina
 - gumové těsnění
- pracovní prostředí
 - leštěná ocel
 - neleštěná ocel
 - PVC podlaha
 - epoxidová podlaha

4.2.3 Roztoky pro validaci analytické metody

Mobilní fáze pro UPLC (MF) - viz 4.1.3.1 Roztoky pro vývoj metody

Ředící směs 1 (DIL_1)

250 ml metanolu se smísilo se 750 ml vody (25% MeOH (v/v)).

Ředící směs 2 (DIL_2)

500 ml metanolu se smísilo s 500 ml vody. (50% MeOH v/v).

4.2.3.1 Roztoky pro stanovení výtěžnosti z výrobního zařízení

Roztoky standardů S1 a S2 pro výtěžnost z výrobního zařízení (~0,85µg/ml)

Byly připraveny 2 roztoky postupem analogickým k přípravě *Roztoku flutamidu* (viz 4.1.3.1 **Roztoky pro vývoj metody**), ale s navázkou standardu flutamidu asi 8,5 mg. Místo diluentu DIL_0 byl použit diluent DIL_1 (25% MeOH (v/v)).

Zásobní roztoky pro výtěžnost z výrobního zařízení (na hladině 50%, 100%, resp. 150%)

Byly připraveny 3 roztoky postupem obdobným k přípravě *Roztoku flutamidu* (viz **4.1.3.1 Roztoky pro vývoj metody**), ale s navázkou standardu flutamidu asi 4,25 mg pro výtěžnost na hladině 50% nebo asi 8,5 mg pro výtěžnost na hladině 100% nebo asi 12,75 mg pro výtěžnost na hladině 150%. flutamidu. Při přípravě těchto roztoků nebylo provedeno ředění diluentem. Koncentrace flutamidu ve stěru byla ~0,425 µg/ml, ~0,85 µg/ml a ~1,275 µg/ml.

Roztoky vzorku stěru pro výtěžnost z výrobního zařízení

Bylo připraveno 45 těchto roztoků. Do 10 ml odměrné baňky s 5 ml DIL_2 byla vložena stěrová tyčinka. Navlhčenou stěrovou tyčinkou byl setřen daný povrch (na kterém byl nanesen *zásobní roztok* (viz výše)). Tyčinka se vložila zpět do 10 ml odměrné baňky s 5 ml DIL_2 a byly přidány 3 ml vody. Odměrná baňka byla utěsněna parafilmem a vložena na 5 min do ultrazvuku. Poté byla tyčinka opláchnuta vodou, vymačkána o hrdlo baňky a vyňata. Vzorek byl doplněn vodou po rysku a temperován na 20°C (cca 15 min) a doplněn vodou po rysku.

Slepý roztok (blank) pro výtěžnost z výrobního zařízení

Bylo připraveno 15 roztoků postupem analogickým k postupu pro *Roztoky vzorku stěru pro výtěžnost z výrobního zařízení* (viz výše), v tomto případě ale byly k přípravě použity sterilní stěrové tyčinky, kterými se setřel čistý povrch.

Slepý roztok (blank swab)

Tento roztok byl připraven postupem analogickým k postupu pro *Roztoky vzorku stěru pro výtěžnost z výrobního zařízení* (viz výše), v tomto případě ale byla k přípravě použita nová suchá sterilní stěrová tyčinka (kterou se nestíral žádný povrch).

4.2.3.2 Roztoky pro stanovení výtěžnosti z pracovního prostředí

Roztoky standardů S1 a S2 pro výtěžnost z pracovního prostředí (~10µg/ml)

Byly připraveny 2 roztoky postupem analogickým k přípravě *Roztoků standardů S1 a S2 pro výtěžnost z výrobního zařízení* (viz **4.2.3.1**), ale místo 1,0 ml do 100 ml odměrné baňky byly ke zředění diluentem DIL_1 pipetovány 3,0 ml do 25 ml odměrné baňky.

Zásobní roztoky pro výtěžnost z pracovního prostředí s koncentrací flutamidu ve stěru

~5µg/ml, ~10µg/ml a ~15µg/ml

Byly připraveny 3 roztoky postupem obdobným k přípravě *Zásobních roztoků pro výtěžnost z výrobního zařízení* (viz **4.2.3.1**), ale s navázkami asi 5 mg standardu flutamidu pro výtěžnost na hladině 50%, nebo asi 10 mg pro výtěžnost na hladině 100%, nebo asi 15 mg pro výtěžnost na hladině 150% do 10 ml odměrné baňky.

Roztoky vzorku stěru pro výtěžnost z pracovního prostředí

Bylo připraveno 36 roztoků postupem analogickým k přípravě *Roztoků vzorků stěru pro výtěžnost z výrobního zařízení* (viz **4.2.3.1**).

Slepý roztok pro výtěžnost z pracovního prostředí

Bylo připraveno 9 roztoků postupem analogickým k přípravě *Slepého roztoku (blank) pro výtěžnost stěrů z výrobního zařízení* (viz **4.2.3.1**).

Blank swab

Byl připraven postupem analogickým k přípravě *Slepého roztoku (blank swab)* (viz **4.2.3.1**).

4.2.3.3 Roztoky pro stanovení specifity

Roztoky standardů S1 a S2 pro specifitu (0,85 µg/ml)

Byly připraveny stejně jako *Roztoky standardů S1 a S2 pro výtěžnost z výrobního zařízení* (viz **4.2.3.1**).

Roztoky detergentů pro specifitu s koncentrací 0,01 mg/ml

K 1,0 ml detergentu bylo do 100 ml odměrné baňky přidáno cca 75 ml diluentu DIL_1. Odměrná baňka byla na 5 min vložena do ultrazvuku a po temperaci na 20°C doplněna po značku diluentem DIL_1 a důkladně protřepána. 1,0 ml tohoto roztoku byl pipetou přenesen do 100 ml odměrné baňky, přidán diluent DIL_1 po rysku a důkladně protřepán. Z toho roztoku byl 1, 0 ml se pipetován do 10 ml odměrné baňky, přidán diluent DIL_1 po rysku a důkladně protřepán. Bylo připraveno 11 takových roztoků s různými detergenty.

4.2.3.4 Roztoky pro stanovení robustnosti

Roztoky standardů S1 a S2 pro robustnost a pro robustnost stěru (~0,85 µg/ml)

Byly připraveny 2 roztoky postupem analogickým k přípravě *Roztoků standardů S1 a S2 pro výtěžnost z výrobního zařízení* (viz **4.2.3.1**).

Roztoky standardů S pro robustnost - ultrazvuk (~0,85 µg/ml)

Byly připraveny 4 roztoky postupem analogickým k přípravě *Roztoků standardů S1 a S2 pro výtěžnost z výrobního zařízení* (viz **4.2.3.1**), ale dva z nich byly vloženy do ultrazvuku jen na 3 min a zbývající dva na 7 min.

Roztoky standardů S pro robustnost stěru - ultrazvuk 3, 5, 7 min (s koncentrací flutamidu ve stěru ~0,85µg/ml)

Do 100 ml odměrné baňky bylo naváženo asi 8,5 mg standardu flutamidu a přidáno 25 ml metanolu. Odměrná baňka byla na 5 min vložena do ultrazvuku, přidána voda a po temperaci na 20°C (cca 15 min) doplněna vodou po značku a důkladně protřepána.

100 µl tohoto roztoku bylo nanášeno na daný povrch a setřeno. Stěrová tyčinka byla vložena do 10 ml odměrné baňky s 5 ml diluentu DIL_2 a byly přidány 3 ml vody. Odměrná baňka byla pak uzavřena parafilmem a vložena na 3, 5 a 7 min do ultrazvuku. Poté byla opláchnuta vodou, vymačkána o hrdlo baňky a vyjmuta. Vzorek byl doplněn vodou pod rysku, temperován na 20°C (cca 15 min) a doplněn vodou po rysku.

4.2.3.5 Roztoky pro stanovení linearitu a rozsahu

Roztoky standardů S1 a S2 pro linearitu (~0,85 µg/ml)

Byly připraveny 2 roztoky postupem analogickým k přípravě *Roztoků standardů S1 a S2 pro výtěžnost z výrobního zařízení* (viz **4.2.3.1**).

Zásobní roztoky ZR1 a ZR2 pro linearitu (~0,2 µg/ml)

Do 50 ml odměrné baňky bylo naváženo asi 10 mg standardu flutamidu a přidáno 12,5 ml metanolu. Odměrná baňka byla na 5 min vložena do ultrazvuku, přidána voda a po temperaci na 20°C (cca 15 min) doplněna vodou po značku a důkladně protřepána.

4.2.3.6 Roztoky pro stanovení ověření limitu detekce (LOD) a limitu kvantifikace (LOQ)

Roztoky standardů S1 a S2 pro ověření LOD a LOQ (~0,85 µg/ml)

Byly připraveny 2 roztoky postupem analogickým k přípravě *Roztoků standardů S1 a S2 pro výtěžnost z výrobního zařízení* (viz **4.2.3.1**).

Roztoky pro limit kvantifikace - LOQ (~0,03 µg/ml)

Do 100 ml odměrné baňky bylo naváženo asi 7,5 mg standardu flutamidu a přidáno 25 ml metanolu. Odměrná baňka byla na 5 min vložena do ultrazvuku, přidána voda a po temperaci na 20°C (cca 15 min) doplněna vodou po značku a důkladně protřepána. 1,0 ml tohoto roztoku byl pipetován do 100 ml odměrné baňky, přidán diluent DIL_1 a po temperaci na 20°C doplněn diluentem DIL_1 po rysku a důkladně protřepán. 2,0 ml toho roztoku byly pipetovány do 50 ml odměrné baňky, přidán diluent DIL_1 a po temperaci na 20°C doplněn diluentem DIL_1 po rysku a důkladně protřepán. Bylo připraveno 6 takových roztoků.

Roztok pro limit detekce - LOD (~0,009 µg/ml)

Do 10 ml odměrné baňky se 2 ml *Roztoky pro limit kvantifikace - LOQ* (viz výše) byl přidán diluent DIL_1 a po temperaci na 20°C (cca 15 min) doplněn diluentem DIL_1 po rysku a důkladně protřepán.

4.2.3.7 Roztoky pro ověření stability

Roztoky standardů S1 a S2 pro stabilitu standardu - 1, 2, 3, 4 a 7 dní a stabilitu stěru (~0,85µg/ml)

Byly připraveny postupem analogickým k přípravě *Roztoků standardů S1 a S2 pro výtěžnost z výrobního zařízení* (viz **4.2.3.1**).

4.2.3.8 Roztoky pro ověření přesnosti

Roztoky standardů S1 a S2 pro opakovatelnost a mezilehlou přesnost s koncentrací flutamidu (~0,85µg/ml)

Byly připraveny 2 roztoky postupem analogickým k přípravě *Roztoků standardů S1 a S2 pro výtěžnost z výrobního zařízení* (viz **4.2.3.1**).

Roztoky standardů S pro opakovatelnost a mezilehlou přesnost (~0,85µg/ml)

Bylo připraveno 6 roztoků postupem analogickým k přípravě *Roztoků standardů S1 a S2 pro výtěžnost z výrobního zařízení* (viz **4.2.3.1**).

4.2.4 Schéma sekvence dávkování

1. diluent nástřik 1x
2. roztok blanku nástřik 1x
3. roztok standardu S1 nástřik 6x
4. roztok standardu S2 nástřik 2x
5. roztok vzorku 1, nástřik 1x
6. roztok vzorku 2, nástřik 1x
7. roztok standardu S1, nástřik 1x (kontrolní)

Po každých 6 nástřících vzorku se napíchne roztok standardu S1 (1x) pro kontrolu.

Kalibrace je počítána z prvních šesti nápičů standardu S1. Opakovatelnost je počítána ze všech nápičů standardu S1.

4.2.5 Výpočty

Tabulka 4 - Rozmezí hodnot sledovaných parametrů

Relativní směrodatná odchylka (RSD) ploch píků flutamidu pro 6 nápichů standardu S1	≤ 10,0%
RSD ploch píků flutamidu pro všechny nápichy standardu S1	≤ 10,0%
Relativní rozdíl odezvových faktorů (RF) mezi standardy S1 a S2	≤ 15,0%

Výpočet relativní směrodatné odchylky:

$$RSD = \frac{100}{\bar{x}} \times \sum \sqrt{\frac{(x_i - \bar{x})^2}{(n-1)}} \quad [\%] \quad (13)$$

Výpočet relativního rozdílu (Relative Difference) odezvových faktorů (RF) mezi roztoky standardu S1 a S2:

$$\left| 1 - \frac{RF1}{RF2} \right| \times 100 \quad \text{kde } RF = \frac{A}{m} \quad (14)$$

A ... průměrná odezva standardu

m ... navážka příslušného standardu

Výpočet relativní odchylky (Relative Deviance):

$$RD = \frac{A+B}{\frac{A-B}{2}} \times 100 \quad [\%] \quad (15)$$

Výpočet výtěžnosti metodou vnějšího standardu:

$$\text{Výtěžnost} = \frac{A_{vz}}{c_{vložena}} \times \langle RF \rangle \times 100 \quad [\%] \quad \text{kde } RF = \frac{c_{std}}{A_{std}} \quad (16)$$

RF ... průměrný odezvový faktor ze 6 nápichů standardu S1

A_{vz} ... plocha píku vzorku

c_{vložena} ... koncentrace vložena

c_{std} ... průměrná koncentrace ze 6 nápichů standardu S1

A_{std} ... průměrná plocha ze 6 nápichů standardu S1

4.2.6 Stanovení správnosti (výtěžnosti)

Kritérium přijatelnosti bylo stanoveno ve validačním protokolu pro stěr 8,5 µg/ 25 cm² pro čistotu výrobního zařízení (leštěná ocel, neleštěná ocel, gumové těsnění, potahovaná litina, tvrdý plast) a 100 µg/ 25 cm² pro čistotu pracovního prostředí (leštěná ocel, neleštěná ocel, epoxidová podlaha, PVC podlaha). Kritéria přijatelnosti jsou dána maximálním množstvím kontaminantu na povrchu zařízení/prostor (**MAC_{API}** - *maximum allowable carryover*).

Při validaci analytické metody se vycházelo z těchto hodnot.

Kritérium přijatelnosti pro výpočet výtěžnosti:

RSD mezi různými vzorky se stejnou koncentrací ≤ 25%.

Výtěžnost z jednotlivých povrchů ≥ 50%.

4.2.6.1 Stanovení výtěžnosti pro výrobní zařízení

Vlastní analýza

K analýze byly připraveny 2 roztoky standardu S1 a S2 s navážkami 8,604 mg a 8,906 mg. Standard S1 byl nastříknut na kolonu 6x a standard S2 2x.

Dále byly připraveny 3 zásobní roztoky pro výtěžnost stěrů z výrobního zařízení s navážkami 4,258 mg pro výtěžnost na hladině 50%; 8,487 mg pro výtěžnost na hladině 100% a 12,452 mg pro výtěžnost na hladině 150%. Hodnoty koncentrací flutamidu ve stěru jsou uvedeny v **tabulce 5**.

Tabulka 5 - Roztoky pro výtěžnost stěrů z výrobního zařízení - koncentrace flutamidu

Vzorky	Navážka [mg]	Zásobní roztok standardu [µg/ml]	Nanášený objem vzorku na 25 cm ² [µl]	Koncentrace ve stěru [µg/ml]
50%	4,258	42,6	100	0,426
100%	8,487	84,9	100	0,849
150%	12,452	124,5	100	1,245

Provedení stěru

Ze zásobních roztoků bylo odebráno 100 µl pomocí mikrostříkačky a požadovaný objem byl nanášen na plochu o rozměrech 5x5 cm (25 cm²) daného povrchu. Vysušení stěru bylo urychleno pomocí fénu. Vzorek stěru byl připraven postupem popsaným výše (viz **4.2.3.1 Roztoky vzorku stěru pro výtěžnost z výrobního zařízení**). Byl stírán nejprve horizontálním a pak vertikálním pohybem.

Takto byl nanášen každý ze zásobních roztoků (pro výtěžnost na hladině 50%, 100% a 150%) vždy třikrát na každý z 5 povrchů zařízení. Dohromady bylo tedy provedeno 45 stěrů.

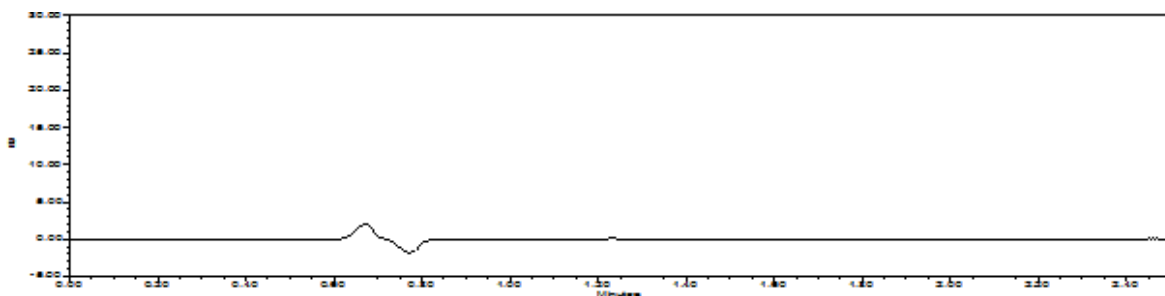
Ke každé hladině výtěžnosti a pro každý povrch byl připraven slepý vzorek (blank), který byl nanášen i stírán stejným způsobem jako zásobní roztoky pro výtěžnost stěrů. Dohromady bylo tedy provedeno 15 stěrů blanku.

Pro odlišení reziduí ze stěrové tyčinky při analýze byl připraven slepý roztok z čisté stěrové tyčinky (blank swab), který se ovšem nenanášel a ani nestíral.

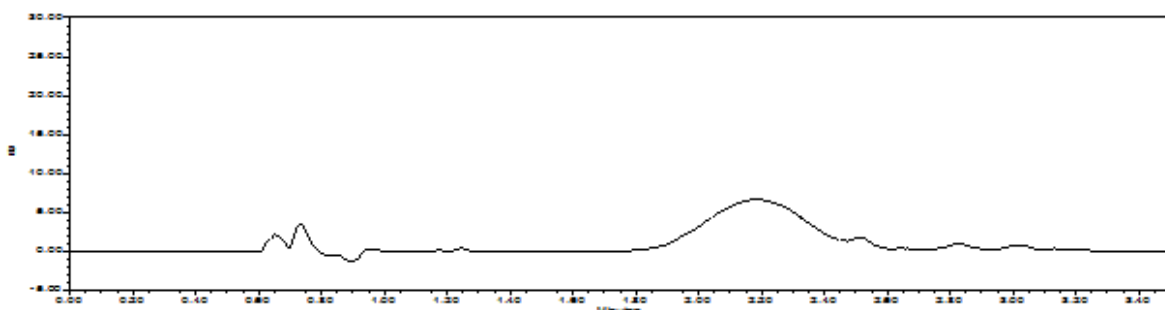
Před každým měřením byla provedena kalibrace přístroje pomocí 6 nápichů roztoku standardu S1 s koncentrací flutamidu ~ 0,85 µg/ml. Opakovatelnost byla počítána ze všech nápichů standardu S1.

Chromatogramy

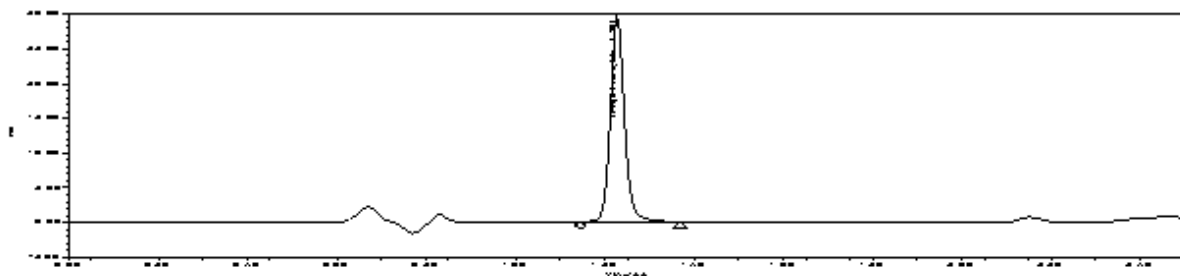
Na **chromatogramech 2 až 5** jsou znázorněné píky diluentu, blanku a flutamidu.



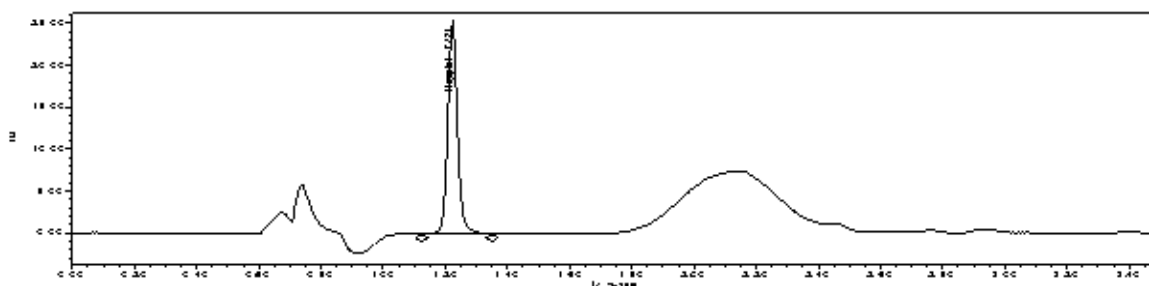
Chromatogram 2 - chromatogram diluentu



Chromatogram 3 - chromatogram slepého vzorku



Chromatogram 4 - chromatogram standardu flutamidu $c = 0,85 \mu\text{g/ml}$



Chromatogram 5 - chromatogram stěru flutamidu pro výrobní zařízení

Výsledky

Výsledky kalibrace, opakovatelnosti a relativního rozdílu mezi RF standardu S1 a S2

Relativní směrodatná odchylka (RSD) ploch píků flutamidu pro 6 nápichů standardu S1 byla 0,2%, RSD ploch píků flutamidu pro všechny nápichy standardu S1 byla 0,18%. Relativní rozdíl odezvoých faktorů (RF) mezi standardy S1 a S2 činil 0,9%.

Výtěžnost vzorku stěru z leštěné oceli na 50%, 100% a 150% hladině pro výrobní zařízení

Tabulka 6 - Výtěžnost - leštěná ocel - výrobní zařízení

Koncentrace roztoku	Číslo vzorku	Koncentrace vložená [μg/ml]	Koncentrace získaná [μg/ml]	Výtěžnost [%]	Faktor výtěžnosti
50%	1	0,4258	0,3302	77,54	0,60
	2	0,4258	0,3037	71,33	
	3	0,4258	0,3234	75,95	
100%	1	0,8487	0,6171	72,71	
	2	0,8487	0,6296	74,18	
	3	0,8487	0,6264	73,81	
150%	1	1,2452	0,7425	59,63	
	2	1,2452	0,8846	71,04	
	3	1,2452	0,9353	75,11	
Průměrná výtěžnost				72,37	
RSD [%]				7,2	
Minimální výtěžnost				59,63	

Výtěžnost vzorku stěru z neleštěné oceli na 50%, 100% a 150% hladině pro výrobní zařízení

Tabulka 7 - Výtěžnost - neleštěná ocel - výrobní zařízení

Koncentrace roztoku	Číslo vzorku	Koncentrace ve stěru [μg/ml]	Skutečná koncentrace [μg/ml]	Výtěžnost [%]	Faktor výtěžnosti
50%	1	0,4258	0,2702	63,45	0,57
	2	0,4258	0,2787	65,46	
	3	0,4258	0,2409	56,57	
100%	1	0,8487	0,5351	63,05	
	2	0,8487	0,5191	61,16	
	3	0,8487	0,5294	62,38	
150%	1	1,2452	0,8195	65,81	
	2	1,2452	0,7345	58,99	
	3	1,2452	0,8394	67,41	
Průměrná výtěžnost				62,70	
RSD [%]				5,5	
Minimální výtěžnost				56,57	

Výtěžnost vzorku stěru z gumového těsnění na 50%, 100% a 150% hladině pro výrobní zařízení

Tabulka 8 - Výtěžnost - gumové těsnění - výrobní zařízení

Koncentrace roztoku	Číslo vzorku	Koncentrace ve stěru [μg/ml]	Skutečná koncentrace [μg/ml]	Výtěžnost [%]	Faktor výtěžnosti
50%	1	0,4258	0,02380	5,59	0,03
	2	0,4258	0,01848	4,34	
	3	0,4258	0,02201	5,17	
100%	1	0,8487	0,05347	6,30	
	2	0,8487	0,02767	3,26	
	3	0,8487	0,51066	60,17	
150%	1	1,2452	0,04308	3,46	
	2	1,2452	0,07147	5,74	
	3	1,2452	0,06575	5,28	
Průměrná výtěžnost				11,03	
RSD [%]				167,3	
Minimální výtěžnost				3,26	

Výtěžnost vzorku stěru z potahované litiny na 50%, 100% a 150% hladině pro výrobní zařízení

Tabulka 9 - Výtěžnost - potahovaná litina - výrobní zařízení

Koncentrace roztoku	Číslo vzorku	Koncentrace ve stěru [µg/ml]	Skutečná koncentrace [µg/ml]	Výtěžnost [%]	Faktor výtěžnosti
50%	1	0,4258	0,2129	50,01	0,50
	2	0,4258	0,2219	52,11	
	3	0,4258	0,2161	50,76	
100%	1	0,8487	0,4292	50,57	
	2	0,8487	0,4525	53,32	
	3	0,8487	0,5096	60,04	
150%	1	1,2452	0,6707	53,86	
	2	1,2452	0,6385	51,28	
	3	1,2452	0,7357	59,08	
Průměrná výtěžnost				53,45	
RSD [%]				6,9	
Minimální výtěžnost				50,01	

Výtěžnost vzorku stěru z tvrdého plastu na 50%, 100% a 150% hladině pro výrobní zařízení

Tabulka 10 - Výtěžnost - tvrdý plast - výrobní zařízení

Koncentrace roztoku	Číslo vzorku	Koncentrace ve stěru [µg/ml]	Skutečná koncentrace [µg/ml]	Výtěžnost [%]	Faktor výtěžnosti
50%	1	0,4258	0,1681	39,47	0,22
	2	0,4258	0,1484	34,84	
	3	0,4258	0,1737	40,80	
100%	1	0,8487	0,1826	21,52	
	2	0,8487	0,1956	23,05	
	3	0,8487	0,2280	26,86	
150%	1	1,2452	0,4617	37,08	
	2	1,2452	0,4275	34,33	
	3	1,2452	0,5387	43,26	
Průměrná výtěžnost				33,47	
RSD [%]				23,5	
Minimální výtěžnost				21,52	

Tabulka 11 - Souhrn výsledků výtěžností jednotlivých povrchů výrobního zařízení

Povrch	Výtěžnost [%]	Faktor výtěžnosti
leštěná ocel	59,63	0,60
neleštěná ocel	56,57	0,57
gumové těsnění	3,26	0,03
potahovaná litina	50,01	0,50
tvrdý plast	21,52	0,22

Dílčí závěr 2:

Výsledky kalibrace, opakovatelnosti a relativního rozdílu mezi RF standardu S1 a S2 odpovídají normě). Výsledky měření výtěžnosti pro výrobní zařízení jsou uvedené v **tabulkách 6 až 10** a shrnuty do **tabulky 11**. Výtěžnost ležela mimo stanovené rozmezí u dvou povrchů, a to u gumového těsnění, kde faktor výtěžnosti byl 0,03 a u tvrdého plastu, kde faktor výtěžnosti byl 0,22 (výtěžnosti jsou menší než 50%). Je to zapříčiněné tím, že tyto materiály mají velmi pórovitou strukturu a nejsou vhodné pro stírání.

4.2.6.2 Stanovení výtěžnosti pro pracovní prostředí

K analýze byly připraveny 2 roztoky standardu S1 a S2 s navážkami 8,657 mg a 8,695 mg. Standard S1 byl nastříknut na kolonu 6x a standard S2 2x.

Dále byly připraveny 3 zásobní roztoky pro výtěžnost stěrů z pracovního prostředí s navážkami 5,304 mg pro výtěžnost na hladině 50%; 10,10 mg pro výtěžnost na hladině 100% a 15,46 mg pro výtěžnost na hladině 150%. Výpočet koncentrace flutamidu ve stěru byl proveden analogicky s výpočtem koncentrace ve stěru pro výrobní zařízení. Koncentrace jsou uvedeny v **tabulce 12**.

Tabulka 12 - Roztoky pro výtěžnost stěrů z pracovního prostředí - koncentrace flutamidu

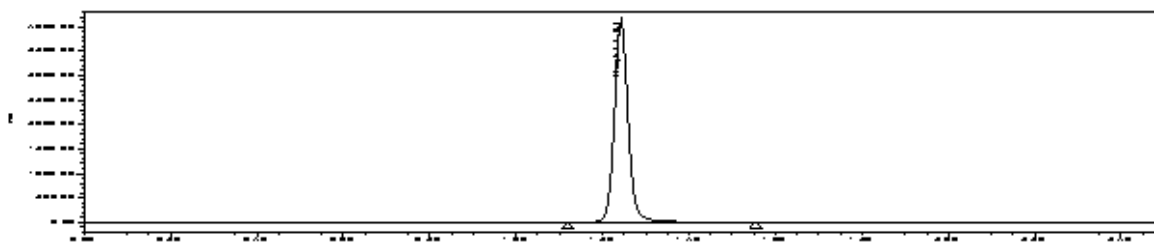
Vzorky	Navážka [mg]	Zásobní roztok standardu [µg/ml]	Nanášený objem vzorku na 25 cm ² [µl]	Koncentrace ve stěru [µg/ml]
50%	5,304	53,04	100	0,53
100%	10,10	101,0	100	1,01
150%	15,46	154,6	100	1,546

Vlastní analýza

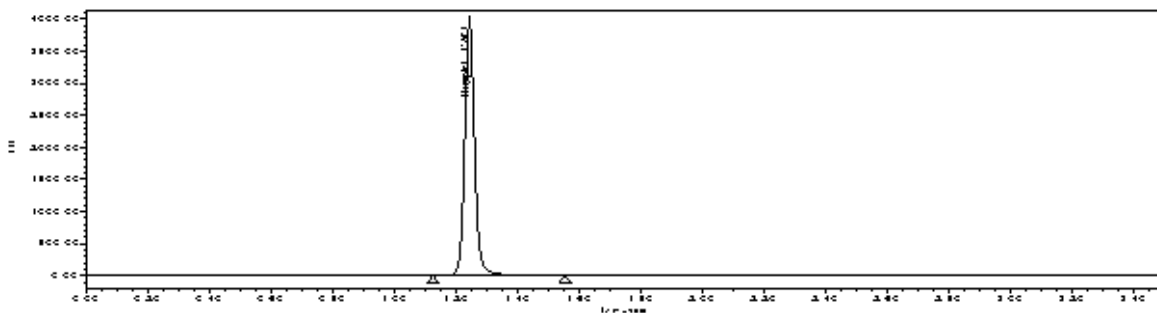
Stěry a příprava roztoků vzorku stěru byly provedeny stejným způsobem jako u stanovení výtěžnosti z výrobního zařízení. Bylo připraveno 36 roztoků vzorku stěru, 4 slepé vzorky a 1 blank swab. Před měřením byla opět provedena kalibrace přístroje pomocí 6 nápichů standardu S1 s koncentrací flutamidu ~0,85 µg/ml.

Chromatogramy

Píky flutamidu jsou znázorněné na **chromatogramech 6 a 7**.



Chromatogram 6 - chromatogram standardu flutamidu c = 10 µg/ml



Chromatogram 7 - chromatogram stěru flutamidu pro pracovní prostředí

Výsledky

Výsledky kalibrace, opakovatelnosti a relativního rozdílu mezi RF standardu S1 a S2

Relativní směrodatná odchylka (RSD) ploch píků flutamidu pro 6 nápičů standardu S1 byla 0,1%, RSD ploch píků flutamidu pro všechny nápičky standardu S1 byla 0,39%. Relativní rozdíl odezvoových faktorů (RF) mezi standardy S1 a S2 činil 0,6%.

Výtěžnost vzorku stěru z leštěné oceli na 50%, 100% a 150% hladině pro pracovní prostředí

Tabulka 13 - Výtěžnost - leštěná ocel - pracovní prostředí

Koncentrace roztoku	Číslo vzorku	Koncentrace ve stěru [μg/ml]	Skutečná koncentrace [μg/ml]	Výtěžnost [%]	Faktor výtěžnosti
50%	1	5,304	4,3509	82,03	0,65
	2	5,304	4,4469	83,84	
	3	5,304	4,3811	82,60	
100%	1	10,10	6,568	65,03	
	2	10,10	7,031	69,61	
	3	10,10	7,005	69,36	
150%	1	15,46	11,869	76,77	
	2	15,46	11,383	73,63	
	3	15,46	11,419	73,86	
Průměrná výtěžnost				75,19	
RSD [%]				8,8	
Minimální výtěžnost				65,03	

Výtěžnost vzorku stěru z neleštěné oceli na 50%, 100% a 150% hladině pro pracovní prostředí

Tabulka 14 - Výtěžnost - neleštěná ocel - pracovní prostředí

Koncentrace roztoku	Číslo vzorku	Koncentrace ve stěru [μg/ml]	Skutečná koncentrace [μg/ml]	Výtěžnost [%]	Faktor výtěžnosti
50%	1	5,304	4,2628	80,37	0,51
	2	5,304	4,2920	80,92	
	3	5,304	4,1435	78,12	
100%	1	10,10	5,4439	35,90	
	2	10,10	5,1288	50,78	
	3	10,10	5,8853	58,27	
150%	1	15,46	12,665	81,92	
	2	15,46	10,499	67,91	
	3	15,46	9,8743	63,87	
Průměrná výtěžnost				68,45	
RSD [%]				18,1	
Minimální výtěžnost				50,78	

Výtěžnost vzorku stěru z epoxidové podlahy na 50%, 100% a 150% hladině pro pracovní prostředí

Tabulka 15 - Výtěžnost - epoxidová podlaha - pracovní prostředí

Koncentrace roztoku	Číslo vzorku	Koncentrace ve stěru [μg/ml]	Skutečná koncentrace [μg/ml]	Výtěžnost [%]	Faktor výtěžnosti
50%	1	5,304	3,8581	72,74	0,63
	2	5,304	3,3521	63,20	
	3	5,304	3,7998	71,64	
100%	1	10,10	6,6620	65,96	
	2	10,10	7,5265	74,52	
	3	10,10	6,8539	67,86	
150%	1	15,46	11,1637	72,21	
	2	15,46	11,9707	77,43	
	3	15,46	11,9042	77,00	
Průměrná výtěžnost				71,40	
RSD [%]				6,8	
Minimální výtěžnost				63,20	

Výtěžnost vzorku stěru z PVC podlahy na 50%, 100% a 150% hladině pro pracovní prostředí

Tabulka 16 - Výtěžnost - PVC podlaha - pracovní prostředí

Koncentrace roztoku	Číslo vzorku	Koncentrace ve stěru [$\mu\text{g/ml}$]	Skutečná koncentrace [$\mu\text{g/ml}$]	Výtěžnost [%]	Faktor výtěžnosti
50%	1	5,304	3,6057	67,98	0,55
	2	5,304	2,9161	54,98	
	3	5,304	3,3813	63,75	
100%	1	10,10	6,2822	62,20	
	2	10,10	6,0570	59,97	
	3	10,10	5,5368	54,82	
150%	1	15,46	9,3595	60,54	
	2	15,46	9,5419	61,72	
	3	15,46	9,4229	60,95	
Průměrná výtěžnost				60,67	
RSD [%]				6,7	
Minimální výtěžnost				64,82	

Tabulka 17 - Výsledky výtěžností a faktory výtěžnosti

Povrch	Výtěžnost [%]	Faktor výtěžnosti
leštěná ocel	65,03	0,65
neleštěná ocel	50,78	0,51
epoxidová podlaha	62,20	0,63
PVC podlaha	54,82	0,55

Dílčí závěr 3:

Výsledky kalibrace, opakovatelnosti a relativního rozdílu mezi RF standardu S1 a S2 odpovídají normě. Výsledky analýzy výtěžnosti z pracovního prostředí jsou uvedeny v **tabulkách 13 až 16** a shrnuty do **tabulky 17**. Všechny výtěžnosti odpovídají požadovaným limitům (tj. $\geq 50\%$).

4.2.7 Stanovení specifiity/selektivity

Kritérium přijatelnosti pro specifitu:

Chromatogram mobilní fáze, diluentu, detergentu výrobního zařízení (Meral Zentra, Meral CIP, Extran AP22, Extran MA02) a detergentu pracovního prostředí (COSA CIP 95, SAVO Prim, Dyclean, Meral Steril, Fixinela, Peresal, Meral steril Mild) a slepé roztoky a povrchy výrobního zařízení (leštěná ocel, neleštěná ocel, potahovaná litina, gumové těsnění a tvrdý plast) a slepé vzorky a povrchy pracovního prostředí (leštěná ocel, neleštěná ocel, epoxidová podlaha, PVC podlaha) neposkytují žádný výraznější pík ($S/N \geq 10$) s retenčním časem podobným retenčnímu času flutamidu.

Vlastní analýza

Byly připraveny dva roztoky standardů S1 a S2 s navážkami 8,596 mg a 8,613 mg a roztoky detergentů pro specifitu s koncentrací 0,01 mg/ml uvedené v **tabulce 18**.

Nově získané výsledky byly srovnány s chromatogramy z minulého měření.

Tabulka 18 - Koncentrace detergentů v roztocích pro zařízení a prostředí (~10 ppm)

	Detergent	Vložený objem [ml/100ml]	Ředění	Koncentrace [mg/ml]	
1	EXTRAN AP 22	1,0	1000	0,01	detergenty výrobního zařízení
2	Meral CIP	1,0	1000	0,01	
3	Meral Zentra	1,0	1000	0,01	
4	Extran MA02	1,0	1000	0,01	
5	Meral Steril MILD	1,0	1000	0,01	detergenty pracovního prostředí
6	SAVO Prim	1,0	1000	0,01	
7	Dyclean	1,0	1000	0,01	
8	PERSTERIL	1,0	1000	0,01	
9	P3COSA CIP 95	1,0	1000	0,01	
10	Fixinela	1,0	1000	0,01	
11	Peresal	1,0	1000	0,01	

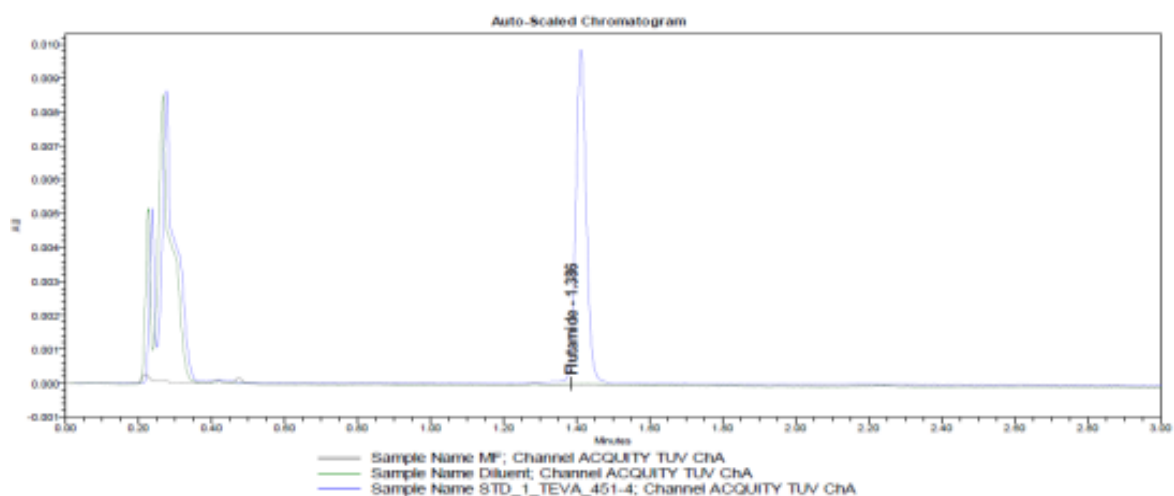
Výsledky

Výsledky kalibrace, opakovatelnosti a relativního rozdílu mezi RF standardu S1 a S2

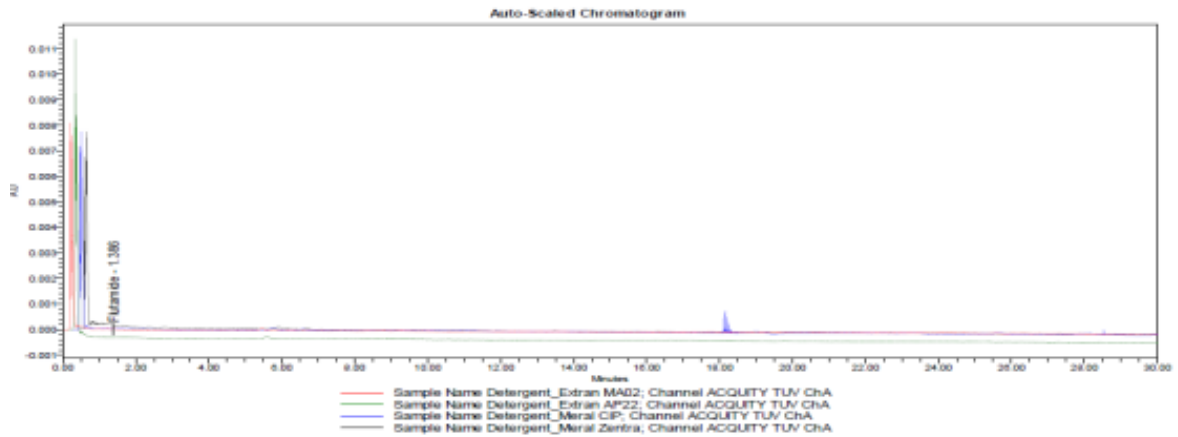
Relativní směrodatná odchylka (RSD) ploch píků flutamidu pro 6 nápiců standardu S1 byla 0,2%, RSD ploch píků flutamidu pro všechny nápichy standardu S1 byla 0,24%. Relativní rozdíl odezvoových faktorů (RF) mezi standardy S1 a S2 činil 0,7%.

Chromatogramy

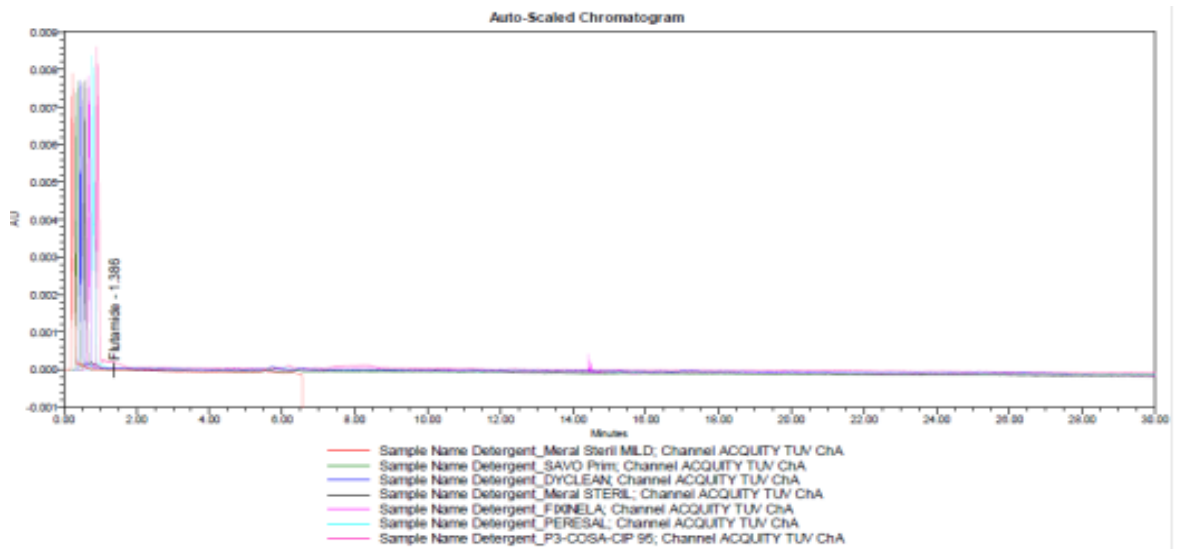
Srovnání chromatogramů flutamidu a doprovodných látek přítomných v analyzovaných roztocích jsou uvedeny v **chromatogramech 8 až 13**.



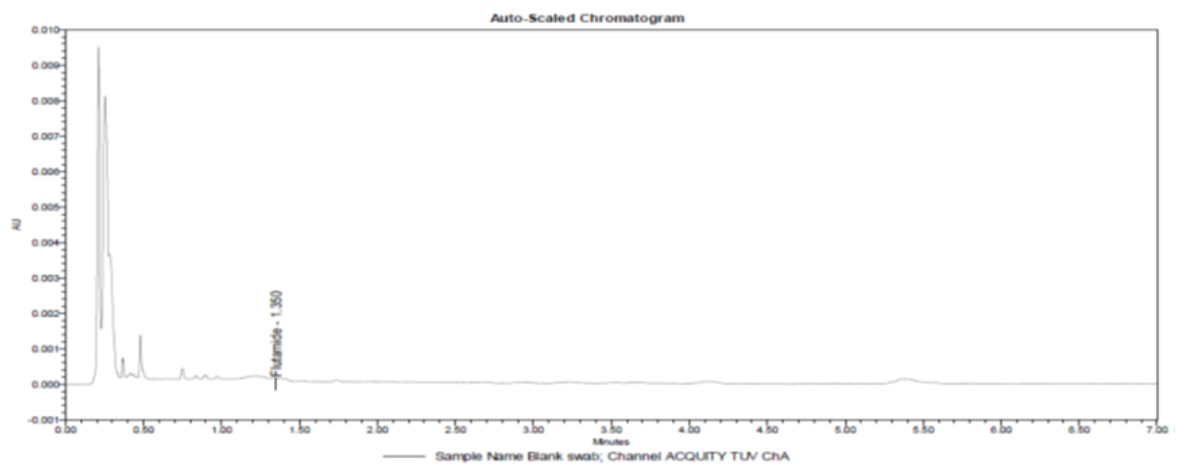
Chromatogram 8 - chromatogram mobilní fáze, diluentu a standardu flutamidu



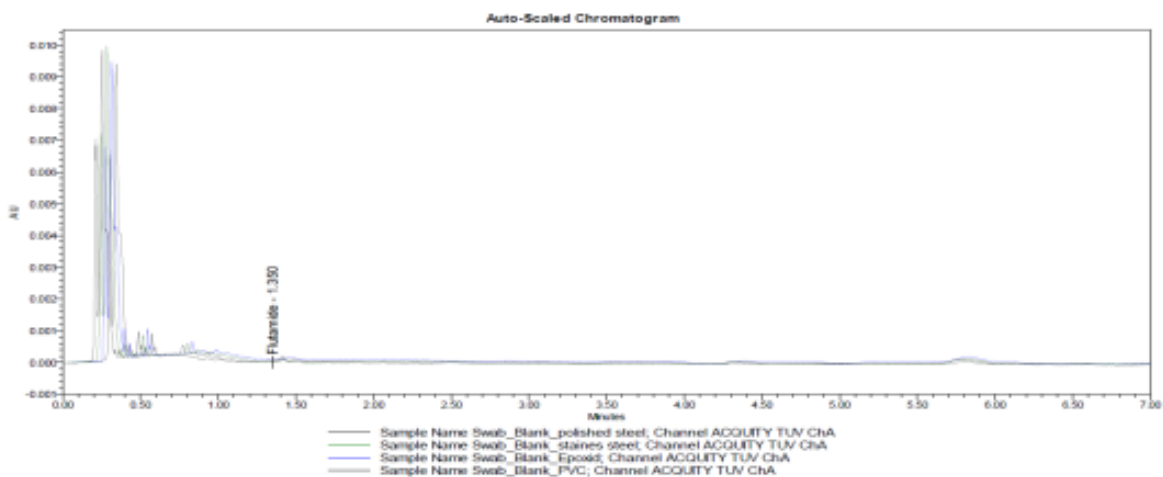
Chromatogram 9 - chromatogram detergentů výrobního zařízení



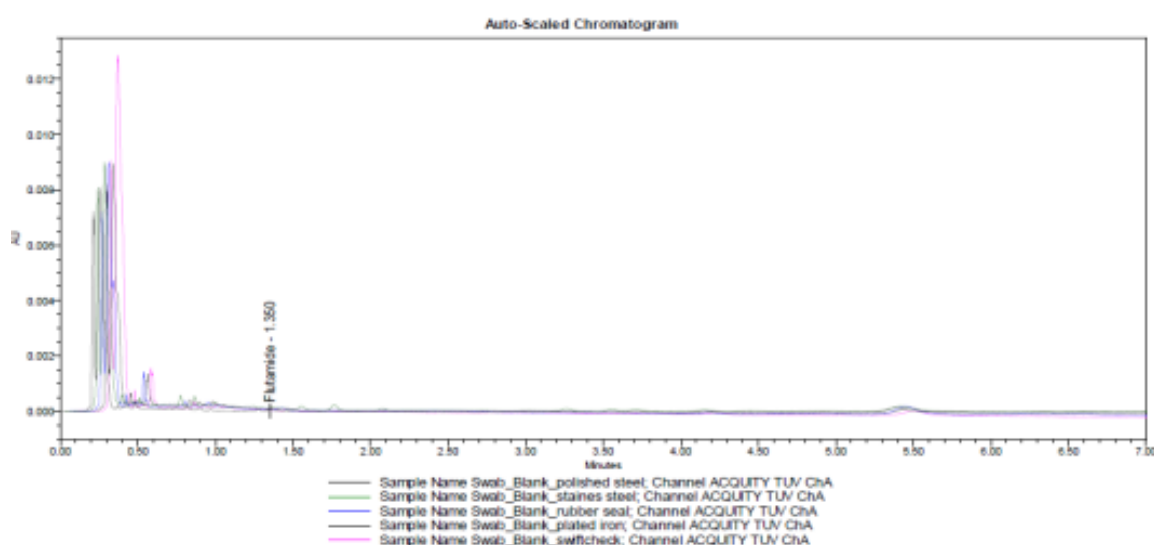
Chromatogram 10 - chromatogram detergentů pracovního prostředí



Chromatogram 11 - chromatogram blank-swab



Chromatogram 12 - chromatogram slepých vzorků z povrchů pracovního prostředí



Chromatogram 13 - chromatogram slepých vzorků z výrobního zařízení

Dílčí závěr 4:

Výsledky kalibrace, opakovatelnosti a relativního rozdílu mezi RF standardu S1 a S2 odpovídají normě. UPLC metoda umožňuje specificky odlišit plochy píků odpovídající flutamidu a doprovodných látek. Nevyskytuje se žádný výraznější pík ($S/N \geq 10$) s retenčním časem podobným flutamidu.

4.2.8 Stanovení robustnosti

Kritérium přijatelnosti pro robustnost:

Relativní směrodatná odchylka mezi 6 nápichy roztoku standardu S1 by neměla být větší než 10,0% a relativní rozdíl mezi odezvyvími faktory roztoku standardu S1 a S2 by neměl být větší než 15,0%. Doba vložení do ultrazvuku by neměla vykazovat výrazný vliv na přípravu standardů a vzorků stěru. Relativní odchylka mezi obsahem flutamidu mezi standardy a vzorky stěru by neměla překročit 15,0%.

4.2.8.1 Změna parametrů analytické metody

Jako kritické parametry analytické metody byly vybrány rychlost průtoku mobilní fáze a vlnová délka UV detektoru.

Změna rychlosti průtoku ± 10 % ml/min (\rightarrow 0,8 ml/min a 1,0 ml/min)

Změna vlnové délky ± 3 nm (\rightarrow 237 nm a 243 nm)

Vlastní analýza

Pro zjištění robustnosti při změně rychlosti průtoku a při změně vlnové délky byly připraveny roztoky standardu S1 a S2 s navážkami 8,633 mg a 8,706 mg. Standard S1 byl nastříknut na kolonu 6x a standard S2 2x. Analýza probíhala při průtoku mobilní fáze 0,8 ml/min a 1,0 ml/min a při vlnových délkách 237 nm a 243 nm.

Měření standardu S1 a S2 při rychlosti průtoku mobilní fáze 0,8 ml/min

Tabulka 19 - 6 nápichů standardu S1 o koncentraci 0,8633 μ g/ml při rychlosti průtoku 0,8 ml/min

Nápich	RT	Plocha	Navážka [mg]	Vypočítaný obsah [mg]	RF
1	1,493	22170	8,633	8,624	2568
2	1,493	22161	8,633	8,620	2567
3	1,493	22137	8,633	8,611	2564
4	1,492	22136	8,633	8,610	2564
5	1,492	22160	8,633	8,620	2567
6	1,491	22182	8,633	8,628	2569
Průměr	1,492	22158			2567
RSD [%]	0,1	0,08			0,1

Tabulka 20 - 2 nápichy standardu S2 o koncentraci 0,8706 µg/ml při rychlosti průtoku 0,8 ml/min

Nápich	RT	Plocha	Navážka [mg]	Vypočítaný obsah [mg]	RF
1	1,491	22534	8,706	8,765	2588
2	1,491	22447	8,706	8,731	2578
Průměr	1,491	22491			2583
RSD [%]	0,0	0,27			0,3

Relativní rozdíl mezi RF roztoku standardu S1a S2 činil 0,6%.

Měření standardu S1 a S2 při rychlosti průtoku mobilní fáze 1,0 ml/min

Tabulka 21 - 6 nápichů standardu S1 o koncentraci 0,8633 µg/ml při rychlosti průtoku 1,0 ml/min

Nápich	RT	Plocha	Navážka [mg]	Vypočítaný obsah [mg]	RF
1	1,190	17839	8,633	8,627	2066
2	1,190	17847	8,633	8,631	2067
3	1,189	17782	8,633	8,599	2060
4	1,189	17802	8,633	8,609	2062
5	1,190	17799	8,633	8,608	2062
6	1,188	17818	8,633	8,617	2064
Průměr	1,189	17814			2064
RSD [%]	0,1	0,14			0,1

Tabulka 22 - 2 nápichy standardu S2 o koncentraci 0,8706 µg/ml při rychlosti průtoku 1,0 ml/min

Nápich	RT	Plocha	Navážka [mg]	Vypočítaný obsah [mg]	RF
1	1,188	18083	8,706	8,745	2077
2	1,187	18141	8,706	8,773	2084
Průměr	1,187	18112			2080
RSD [%]	0,1	0,23			0,2

Relativní rozdíl mezi RF roztoku standardu S1a S2 činil 0,8%.

Měření standardu S1 a S2 při vlnové délce 237 nm

Tabulka 23 - 6 nápichů standardu S1 o koncentraci 0,8633 µg/ml při vlnové délce 237 nm

Nápich	RT	Plocha	Navážka [mg]	Vypočítaný obsah [ml]	RF
1	1,335	22789	8,633	8,628	2640
2	1,335	22756	8,633	8,616	2636
3	1,334	22746	8,633	8,612	2635
4	1,334	22766	8,633	8,619	2637
5	1,334	22762	8,633	8,618	2637
6	1,334	22773	8,633	8,622	2638
Průměr	1,334	22765			2637
RSD [%]	0,0	0,06			0,1

Tabulka 24 - 2 nápichy standardu S2 o koncentraci 0,8706 µg/ml při vlnové délce 237 nm

Nápich	RT	Plocha	Navážka [mg]	Vypočítaný obsah [mg]	RF
1	1,333	23119	8,706	8,753	2656
2	1,333	23091	8,706	8,742	2652
Průměr	1,333	23105			2654
RSD [%]	0,0	0,09			0,1

Relativní rozdíl mezi RF roztoku standardu S1a S2 činil 0,6%.

Měření standardu S1 a S2 při vlnové délce 243 nm

Tabulka 25 - 6 nápichů standardu S1 o koncentraci 0,8633 µg/ml při vlnové délce 243 nm

Nápich	RT	Plocha	Navážka [mg]	Vypočítaný obsah [mg]	RF
1	1,333	18267	8,633	8,622	2116
2	1,333	18227	8,633	8,603	2111
3	1,332	18247	8,633	8,613	2114
4	1,332	18254	8,633	8,616	2114
5	1,333	18240	8,633	8,610	2113
6	1,332	18271	8,633	8,624	2116
Průměr	1,333	18251			2114
RSD [%]	0,0	0,09			0,1

Tabulka 26 - 2 nápichy standardu S2 o koncentraci 0,8706 µg/ml při vlnové délce 243 nm

Nápich	RT	Plocha	Navážka [mg]	Vypočítaný obsah [mg]	RF
1	1,333	18531	8,706	8,747	2129
2	1,332	18586	8,706	8,773	2135
Průměr	1,332	18559			2132
RSD [%]	0,1	0,21			0,2

Relativní rozdíl mezi RF roztoku standardu S1a S2 činil 0,8%.

Výsledky

Výsledky byly srovnány s měřením při standartních podmínkách.

Tabulka 27 - Výsledky změny parametrů metody

Parametr	Hodnota parametru	Retenční čas [~1,3 min]	RSD 6 nápichů roztoku standardu S1 [%]	Relativní rozdíl mezi RF roztoku standardu S1 a S2 [%]
Rychlost průtoku nezměněná	0,9 ml/min	1,331	0,2	0,6
Rychlost průtoku změněná	0,8 ml/min	1,493	0,1	0,6
	1,0 ml/min	1,190	0,1	0,8
Vlnová délka nezměněná	240 nm	1,337	0,2	0,9
Vlnová délka změněná	237 nm	1,335	0,1	0,6
	243 nm	1,333	0,1	0,8

Dílčí závěr 5:

Výsledky analýzy jsou uvedeny v **tabulkách 19 až 26** a shrnuty v **tabulce 27**. RSD 6 nápichů standardu S1 se pohybovala v rozmezí 0,1% až 0,2% a relativní rozdíl mezi RF standardů S1 a S2 v rozmezí 0,6% až 0,9%. Tedy bylo ověřeno, že uvedené změny parametrů metody nemají vliv na stanovení analyzovaných látek. Byl pouze zaznamenán vliv rychlosti průtoku mobilní fáze na hodnotu retenčního času a plochy píku, kdy při vyšší rychlosti došlo ke zkrácení doby analýzy a ke zmenšení plochy píku. U nižší rychlosti průtoku tomu bylo naopak.

4.2.8.2 Změna parametrů přípravy vzorku

Jako změna v přípravě vzorku byla použita odlišná doba sonikace. Místo 5 min při přípravě standardů a vzorků stěru byly vloženy do ultrazvuku na 3 min, resp. na 7 min.

Vlastní analýza

Pro zjištění robustnosti při změně doby vložení do ultrazvuku byly připraveny roztoky standardu S1 a S2 pro 3 a 7 min s navážkami 8,832 mg a 8,676 mg, resp. 8,481 mg a 8,608 mg. Standard S1 byl nastříknut na kolonu 6x a standard S2 2x.

Dále byl připraven roztok standardu S pro robustnost stěru s navážkou 8,487 mg, který byl 4x nanesen na vzorek povrchu leštěná ocel (100 µl). Nanesený roztok standardu byl setřen a byly připraveny 4 roztoky vzorku stěru analogicky s postupem přípravy roztoků vzorku stěru při stanovení výtěžnosti, ale místo 5 min byly 2 roztoky vzorku stěru vloženy do ultrazvuku na 3 min a 2 roztoky vzorku stěru na 7 min.

Měření standardu S1 a S2 při sonikaci 3 min

Tabulka 28 - 6 nápichů standardu S1 o koncentraci 0,8832 µg/ml při sonikaci 3 min

Nápich	RT	Plocha	Navážka [mg]	Vypočítaný obsah [mg]	RF
1	1,348	20206	8,832	8,807	2288
2	1,348	20223	8,832	8,815	2290
3	1,347	20202	8,832	8,806	2287
4	1,347	20213	8,832	8,811	2289
5	1,348	20245	8,832	8,824	2292
6	1,349	20200	8,832	8,805	2287
Průměr	1,348	20215			2289
RSD [%]	0,0	0,08			0,1

Tabulka 29 - 2 nápichy standardu S2 o koncentraci 0,8676 µg/ml při sonikaci 3 min

Nápich	RT	Plocha	Navážka [mg]	Vypočítaný obsah [mg]	RF
1	1,347	20063	8,676	8,745	2312
2	1,347	20037	8,676	8,734	2309
Průměr	1,347	20050			2311
RSD [%]	0,0	0,09			0,1

Relativní rozdíl mezi RF roztoku standardu S1a S2 činil 1,0%.

Měření standardu S1 a S2 při sonikaci 7 min

Tabulka 30 - 6 nápichů standardu S1 o koncentraci 0,8481 µg/ml při sonikaci 7 min

Nápich	RT	Plocha	Navážka [mg]	Vypočítaný obsah [mg]	RF
1	1,347	19581	8,481	8,494	2309
2	1,347	19594	8,481	8,500	2310
3	1,346	19584	8,481	8,496	2309
4	1,346	19622	8,481	8,512	2314
5	1,347	19645	8,481	8,522	2316
6	1,346	19541	8,481	8,477	2304
Průměr	1,347	19594			2310
RSD [%]	0,0	0,18			0,2

Tabulka 31 - 2 nápichy standardu S2 o koncentraci 0,8608 µg/ml při sonikaci 7 min

Nápich	RT	Plocha	Navážka [mg]	Vypočítaný obsah [mg]	RF
1	1,346	19708	8,608	8,550	2290
2	1,346	19712	8,608	8,551	2290
Průměr	1,346	19710			2290
RSD [%]	0,0	0,01			0,0

Relativní rozdíl mezi RF roztoku standardu S1a S2 činil 0,9%.

Měření roztoků vzorku stěru při sonikaci 3 min a 7 min

Tabulka 32 - Výtěžnosti roztoků vzorku stěru při sonikaci 3 min a 7 min

Nápich	Jméno vzorku	Plocha	Navážka [mg]	Výtěžnost [%]	Průměrná výtěžnost [%]
1	Ultrazvuk 3 min - 1	12469	8,487	64,69	68,96
1	Ultrazvuk 3 min - 2	14114	8,487	73,22	
1	Ultrazvuk 7 min - 1	14236	8,487	73,85	70,56
1	Ultrazvuk 7 min - 2	12968	8,487	67,27	

Výsledky

Výsledky byly opět srovnány s analýzou při standartních podmínkách.

Tabulka 33 - Výsledky změny doby vložení do ultrazvuku u přípravy standardu

Doba sonikace standardu	Průměrný RF	Relativní odchylka [%]
5 min (nezměněný)	2291	/
3 min	2289	0,1
7 min	2310	0,8

Tabulka 34 - Výsledky změny doby vložení do ultrazvuku u přípravy roztoků stěru vzorku

Doba sonikace vzorku stěru	Průměrná výtěžnost 2 analýz [%]	Relativní odchylka [%]
5 min (nezměněný)	73,6	/
3 min	69,0	6,5
7 min	70,6	4,2

Dílčí závěr 6:

Výsledky měření jsou uvedeny v **tabulkách 28 až 32**. Výsledky jsou shrnuty v **tabulkách 33 a 34**. Dle výsledků změna doby vložení vzorku do ultrazvuku nemá výrazný vliv na přípravu standardu nebo vzorku stěru. Žádný z výsledků nepřekročil limit (15,0%).

4.2.9 Stanovení linearitu a rozsahu

Studie byla navržena tak, aby pokryla rozsah LOQ do 150 µg/stěr pro limit přijatelnosti pro výrobní zařízení a pracovní prostředí a byla schválena v rozmezí od 0,5 µg/ml do 15 µg/ml flutamidu.

Kritéria přijatelnosti pro linearitu:

Korelační koeficient $R^2 \geq 0,99$

$$\frac{y\text{-intercept}}{\text{plocha píku na 100 \% hladině}} \times 100 \leq 3 \%$$

Vlastní analýza

Byly připraveny roztoky standardu S1 a S2 o koncentraci cca 0,85 µg/ml s navážkami 8,633 mg a 8,706 mg. Standard S1 byl nastříknut na kolonu 6x a standard S2 2x. Dále byly připraveny 2 zásobní roztoky ZR1 a ZR2 pro linearitu s navážkami 10,567 mg a 10,105 mg (koncentrace 0,21134 mg/ml a 0,2021 mg/ml).

Následně byly oba dva zásobní roztoky použity pro přípravu vzorků s různými koncentračními úrovněmi. Všechny roztoky byly ředěny diluentem DIL_2. Příprava jednotlivých roztoků je uvedena v **tabulce 35**. Koncentrace flutamidu v jednotlivých zředěných roztocích jsou uvedeny v **tabulce 36** a v **tabulce 37**.

Tabulka 35 - Příprava roztoků pro různé koncentrační úrovně

Úroveň koncentrace	Koncentrace [~µg/ml]	Přenesený objem [ml]	Odměrná baňka [ml]
L5	15	1,5 ml roztoku flutamidu (ZR)	20
L4	10	1,0 ml roztoku flutamidu (ZR)	20
L3	5	5,0 ml z L4	10
L2	1,0	1,0 ml z L4	10
L1	0,5	1,0 ml z L4	10

Tabulka 36 - Koncentrace flutamidu ve zředěných roztocích připravené ze ZR1

Linearita [%]	Počet nástřiků	Hladina [~µg/ml]	Ředění ZR [x krát]	Vnesená koncentrace [µg/ml]
150	1	15	13,33	15,8509
100	1	10	20	10,567
50	1	5	40	5,2835
10	1	1,0	200	1,0567
5	1	0,5	400	0,52835

Tabulka 37 - Koncentrace flutamidu ve zředěných roztocích připravené ze ZR2

Linearita [%]	Počet nástřiků	Hladina [~µg/ml]	Ředění ZR [x krát]	Vnesená koncentrace [µg/ml]
150	1	15	13,33	15,15788
100	1	10	20	10,105
50	1	5	40	5,0525
10	1	1,0	200	1,0105
5	1	0,5	400	0,50525

Měření zředěných roztoků připravených ze ZR1 a ZR2

Tabulka 38 - Analýza roztoků ZR1 a ZR2 pro stanovení linearity

Nápich	Název vzorku	RT	Area	Výška píku [μV]	S/N	Výtěžnost [%]
1	Linearita ZR1- 5 %, c=0,5 $\mu\text{g/ml}$	1,3	12082	6394	182	99,95
1	Linearita ZR2- 5 %, c=0,5 $\mu\text{g/ml}$	1,3	11246	5960	138	97,29
1	Linearita ZR1- 10 %, c=1 $\mu\text{g/ml}$	1,3	23913	12689	334	98,92
1	Linearita ZR2- 10 %, c=1 $\mu\text{g/ml}$	1,3	22332	11837	285	96,60
1	Linearita ZR1- 50 %, c=5 $\mu\text{g/ml}$	1,3	122762	65003	1409	101,56
1	Linearita ZR2- 50 %, c= 5 $\mu\text{g/ml}$	1,3	112821	59734	1532	97,60
1	Linearita ZR1-100 %, c=10 $\mu\text{g/ml}$	1,3	239257	126547	3227	98,97
1	Linearita ZR2-100 %, c=10 $\mu\text{g/ml}$	1,3	223844	118465	2700	96,83
1	Linearita ZR1-150 %, c=15 $\mu\text{g/ml}$	1,3	352756	186428	4481	97,28
1	Linearita ZR2-150 %, c=15 $\mu\text{g/ml}$	1,3	334379	176719	4188	96,42
Průměr						98,1
RSD [%]						1,7

Výsledky

Výsledky kalibrace, opakovatelnosti a relativního rozdílu mezi RF standardu S1 a S2

Relativní směrodatná odchylka (RSD) ploch píků flutamidu pro 6 nápichů standardu S1 byla 0,1%, RSD ploch píků flutamidu pro všechny nápichy standardu S1 byla 0,14%. Relativní rozdíl odezvoových faktorů (RF) mezi standardy S1 a S2 činil 0,6%.

Výsledky stanovení linearity

Výpočty byly provedeny v programu Microsoft Excel 2007

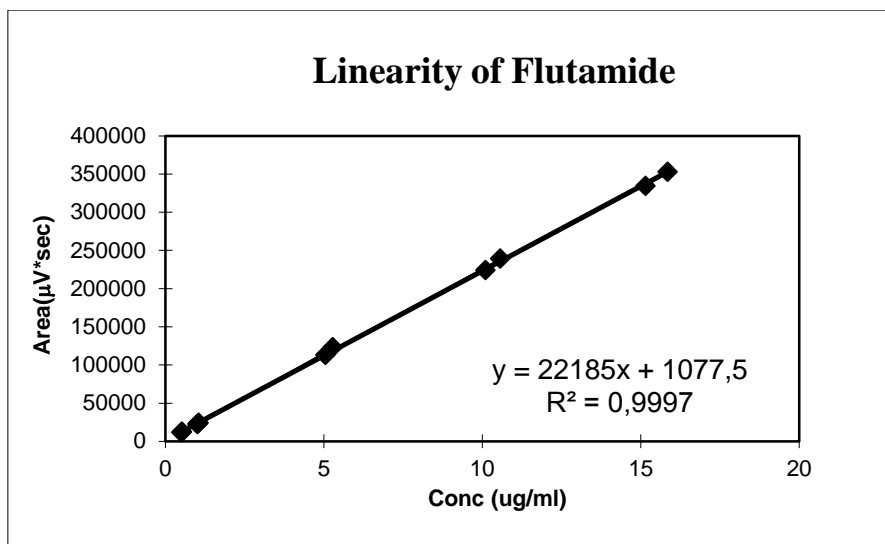
c1= 10,567 mg/50ml

c2= 10,105 mg/50 ml

Tabulka 39 - Výsledky stanovení koncentrace a plochy píku flutamidu

	c/50 ml	Ředění	c [$\mu\text{g/ml}$]	Area
1	10,576	400	0,52835	12082
2	10,105	400	0,50525	11246
3	10,576	200	1,05670	23913
4	10,105	200	1,01050	22332
5	10,576	40	5,28350	122762
6	10,105	40	5,05250	112821
7	10,576	20	10,56700	239257
8	10,105	20	10,10500	223844
9	10,576	13,333	15,85090	352756
10	10,105	13,333	15,15788	334379

Plocha píku každého změřeného roztoku byla vynesena proti její odpovídající koncentraci. Regresní přímka je znázorněna na **obr. 6**. Přímka nesmí vycházet z nuly (koncentrace není nulová).



Obr. 6 - Regresní přímka pro stanovení linearity

$$\frac{y - \text{intercept}}{\text{plocha píku na 100 \% hladině}} \times 100 = 0,5\%$$

Dílčí závěr 7:

Výsledky kalibrace, opakovatelnosti a relativního rozdílu mezi RF standardu S1 a S2 odpovídají normám. Měřeními (tabulka 38), jehož výsledky jsou shrnuty v tabulce 39, bylo dokázáno, že existuje lineární vztah mezi koncentrací flutamidu a plochou jeho píku. Korelační koeficient vyšel $R^2 = 0,9997$, což odpovídá stanovenému rozmezí. Poměr y- interceptu a plochy píku na 100% hladině koncentrace činil 0,5% a je tedy menší než 3,0%. Rozsah byl stanoven od hodnoty LOQ do 15 µg/ml ze stanovení linearity, výtěžnosti a přesnosti.

4.2.10 Stanovení a ověření detekčního limitu

Kritérium přijatelnosti pro LOD:

Poměr $S/N \geq 3$ nebo v 5 ze 6 nástříků je detekován flutamid.

4.2.10.1 Stanovení LOD

Vlastní analýza

Pro stanovení LOD (i LOQ) byl použit zásobní roztok ZR1 ze stanovení linearity. Z toho roztoku bylo naředěno 5 vzorků podle rozpisu uvedeného v tabulce 40. Vnesené koncentrace jsou vypočítané v tabulce 41. Každý vzorek o dané koncentrační hladině byl na kolonu nastříknut 2x.

Tabulka 40 - Příprava roztoků pro různé koncentrační úrovně pro LOD (LOQ)

Úroveň koncentrace	Koncentrace [$\mu\text{g/ml}$]	Přenesený objem [ml]	Odměrná baňka [ml]
Lin-LD-5	0,5	L1/1	-
Lin-LD-4	0,2	10,0 ml z L1	25
Lin-LD-3	0,1	5,0 ml z L1	25
Lin-LD-2	0,05	1,0 ml z L1	10
Lin-LD-1	0,02	1,0 ml z Lin-LD-4	10

Tabulka 41 - Hodnoty vnesené koncentrace v připravených roztocích pro stanovení LOD (LOQ)

Linearita	Počet nástřiků	Hladina [$\mu\text{g/ml}$]	Ředění ZR1 [x krát]	Vnesená koncentrace [$\mu\text{g/ml}$]
5%	1	0,5	400	0,52835
2%	1	0,2	1000	0,21134
1%	1	0,1	2000	0,10567
0,5%	1	0,05	4000	0,052835
0,2%	1	0,02	10000	0,021134

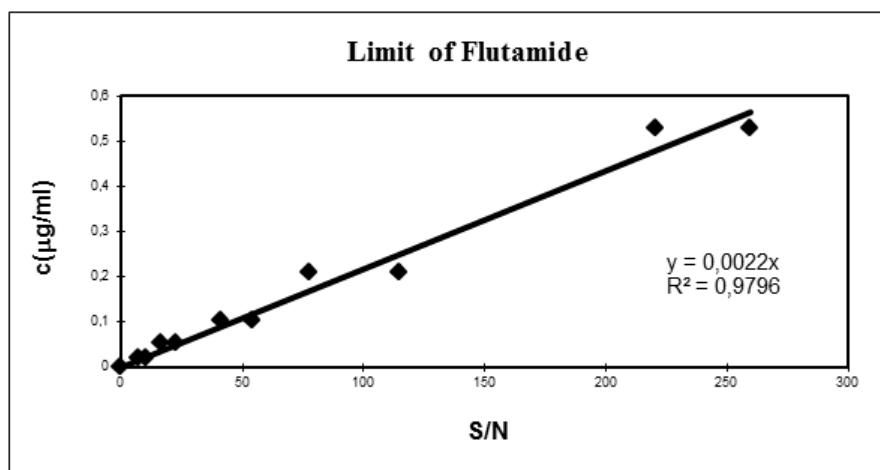
Měření roztoků pro stanovení LOD flutamidu**Tabulka 42** - Výpočet S/N pro LOD dle USP a EP

Nápich	Název vzorku	RT	Area	Výška píku [μV]	S/N (USP)	S/N (EP)
1	Limit 0,2%, c=0,02 $\mu\text{g/ml}$	1,3	574	292	8,3	10,42
2	Limit 0,2%, c=0,02 $\mu\text{g/ml}$	1,3	553	294	6,7	7,76
1	Limit 0,5%, c=0,05 $\mu\text{g/ml}$	1,3	1218	646	13,3	17,09
2	Limit 0,5%, c=0,05 $\mu\text{g/ml}$	1,3	1213	649	15,3	22,84
1	Limit 1%, c=0,1 $\mu\text{g/ml}$	1,3	2446	1290	29,3	41,88
2	Limit 1%, c=0,1 $\mu\text{g/ml}$	1,3	2420	1284	34,7	54,89
1	Limit 2%, c=0,2 $\mu\text{g/ml}$	1,3	4998	2650	65,8	115,28
2	Limit 2%, c=0,2 $\mu\text{g/ml}$	1,3	5032	2662	60,7	78,01
1	Limit 5%, c=0,5 $\mu\text{g/ml}$	1,3	12074	6395	163,1	221,33
2	Limit 5%, c=0,5 $\mu\text{g/ml}$	1,3	12082	6392	185,5	259,82
Průměr		1,3				
RSD [%]		0,1				

Výsledky

Tabulka 43 - Výsledky měření S/N pro LOD

	c/50ml	Ředění	C [µg/ml]	S/N (EP)
1	0	0	0	0
2	10,567	10000	0,021134	10,42
3	10,567	10000	0,021134	7,76
4	10,567	4000	0,052835	17,09
5	10,567	4000	0,052835	22,84
6	10,567	2000	0,10567	41,88
7	10,567	2000	0,10567	54,89
8	10,567	1000	0,21134	115,28
9	10,567	1000	0,21134	78,01
10	10,567	400	0,52835	221,33
11	10,567	400	0,52835	259,82



Obr. 7 - Regresní přímka pro stanovení LOD - závislost koncentrace na S/N

Hodnota šumu, získaná jako směrnice regresní přímky zobrazené na **obr. 7**, činila 0,0022 µg/ml. Limit detekce (LOD), vypočtený jako trojnásobek šumu, činil 0,007 µg/ml a limit kvantifikace (LOQ), vypočtený jako desetinásobek šumu, činil 0,022 µg/ml.

Dílčí závěr 8:

Výsledky měření uvedené v **tabulce 42** jsou dále zpracovány a shrnuty v **tabulce 43**. Graf regresní přímky (**obr. 7**) ukazuje lineární vztah koncentrace k poměru signál/šum a vychází z nuly, protože byla do výpočtů zahrnuta i nulová koncentrace. Limit detekce (LOD) byl stanoven na základě vypočítaného šumu na ~ 0,007 µg/ml a limit kvantifikace (LOQ) na ~ 0,02 µg/ml (dle EP).

4.2.10.2 Ověření LOD

Pro výpočet poměru S/N software Empower používá více metod. Dle firemních nařízení je požadován výpočet podle Evropského lékopisu (EP), ovšem původně se S/N počítal podle Amerického lékopisu (USP). Oba vypočítané poměry signál/šum jsou uvedeny v **tabulce 42**. Ověření LOD (i LOQ) bylo provedeno ještě s původními výsledky (dle USP), kde limit detekce vyšel 0,009 µg/ml a limit kvantifikace 0,03 µg/ml.

Vlastní analýza

Roztok pro ověření limitu detekce (LOD) s koncentrací flutamidu ~ 0,009 µg/ml byl připraven z prvního roztoku LOQ o koncentraci ~ 0,03 µg/ml (viz **tabulka 44**).

Tabulka 44 - Ředění roztoku pro LOD

LOD	Počet nástřiků	Navážka [mg/100 ml]	Ředění [x krát]	c (vnesená) [µg/ml]
1	6	7,391	8333,33	0,008869

Tabulka 45 - Analýza roztoku pro limit LOD o c = ~0,009 µg/ml

Nápich	Název vzorku	RT	Area	Výška píku [µV]	S/N
1	LOD 0,009 µg/ml	1,4	259	121	6,31
2	LOD 0,009 µg/ml	1,4	289	123	6,90
3	LOD 0,009 µg/ml	1,4	393	135	6,53
4	LOD 0,009 µg/ml	1,4	371	137	6,31
5	LOD 0,009 µg/ml	1,4	338	128	6,11
6	LOD 0,009 µg/ml	1,4	272	120	6,56
Průměr		1,4	320,2		6,5
RSD [%]		0,1	17,2		4,2

Výsledky

Výsledky kalibrace, opakovatelnosti a relativního rozdílu mezi RF standardu S1 a S2

Relativní směrodatná odchylka (RSD) ploch píků flutamidu pro 6 nápichů standardu S1 byla 0,2%, RSD ploch píků flutamidu pro všechny nápichy standardu S1 byla 0,99%.

Relativní rozdíl odezvodových faktorů (RF) mezi standardy S1 a S2 činil 0,9%.

Výsledky pro stanovení LOD flutamidu

Tabulka 46 - Výsledky S/N roztoků flutamidu o koncentraci c = 0,008869 µg/ml

Nástřik	S/N	Detekováno [Ano/Ne]
1	6,31	Ano
2	6,90	Ano
3	6,53	Ano
4	6,31	Ano
5	6,11	Ano
6	6,56	Ano
Průměr	6,5	

Dílčí závěr 9:

Výsledky kalibrace, opakovatelnosti a relativního rozdílu mezi RF standardu S1 a S2 jsou společně jak pro stanovení LOD tak pro ověření a odpovídají požadovaným normám. Data z analýzy jsou uvedené v **tabulce 45** a v **tabulce 46**. Obě kritéria pro ověření LOD jsou splněna: všech 6 nástřiků bylo detekováno a všechny hodnoty S/N jsou větší než 3. Průměrná hodnota S/N je 6,5.

4.2.11 Stanovení a ověření kvantifikačního limitu

Kritérium přijatelnosti pro ověření limitů:

RSD 6 nástřiků roztoků pro stanovení LOQ $\leq 20\%$.

Vlastní analýza

Nejprve byly připraveny standardy S1 a S2 o koncentraci $\sim 0,85 \mu\text{g/ml}$, které byly použity ke kalibraci a k výpočtu relativního rozdílu mezi RF roztoku standardu S1a S2 s navážkami 8,759 mg a 8,213 mg. Rovněž byly připraveny roztoky pro limit kvantifikace (LOQ) o koncentraci $\sim 0,03 \mu\text{g/ml}$ (koncentrační úroveň limitu kvantifikace S/N ~ 10) s navážkami 7,391 mg; 7,591 mg; 7,603 mg; 7,253 mg; 7,461 mg a 7,545 mg.

Ředění je zaznamenáno v **tabulce 41**. a výpočet koncentrace (nalezené) v **tabulce 47**.

Tabulka 47 - Ředění roztoků pro LOQ

LOQ	Počet nástřiků	Navážka [mg/100 ml]	Ředění [x krát]	c (vnesená)[$\mu\text{g/ml}$]
1	1	7,391	2500	0,02956
2	1	7,591	2500	0,03036
3	1	7,603	2500	0,03041
4	1	7,253	2500	0,02901
5	1	7,461	2500	0,02984
6	1	7,545	2500	0,03018

Tabulka 48 - Výpočet c (nalezené) roztoků pro LOQ

LOQ	Počet nástřiků	c (vnesená) [$\mu\text{g/ml}$]	c (nalezená) [$\mu\text{g/ml}$]	Výtěžnost [%]
1	1	0,02956	0,03090	104,52
2	1	0,03036	0,03181	104,75
3	1	0,03041	0,03086	101,48
4	1	0,02901	0,03146	108,43
5	1	0,02984	0,03243	108,68
6	1	0,03018	0,03278	108,61

Měření roztoků pro limit kvantifikace

Tabulka 49 - Analýza roztoků pro limit LOQ o $c = \sim 0,03 \mu\text{g/ml}$

Nápich	Název vzorku	RT	Area	Výška píku [μV]	S/N	Výtěžnost [%]
1	LOQ 0,03 $\mu\text{g/ml}$ 1	1,4	691	341	17	104,52
1	LOQ 0,03 $\mu\text{g/ml}$ 2	1,4	711	343	6	104,75
1	LOQ 0,03 $\mu\text{g/ml}$ 3	1,4	690	359	15	101,48
1	LOQ 0,03 $\mu\text{g/ml}$ 4	1,4	703	344	17	108,43
1	LOQ 0,03 $\mu\text{g/ml}$ 5	1,4	725	352	17	108,68
1	LOQ 0,03 $\mu\text{g/ml}$ 6	1,4	733	365	12	108,61
Průměr		1,4				106,1
RSD [%]		0,0				2,8

Výsledky

Výsledky kalibrace, opakovatelnosti a relativního rozdílu mezi RF standardu S1 a S2

Relativní směrodatná odchylka (RSD) ploch píků flutamidu pro 6 nápichů standardu S1 byla 0,2%, RSD ploch píků flutamidu pro všechny nápichy standardu S1 byla 0,99%. Relativní rozdíl odezvoových faktorů (RF) mezi standardy S1 a S2 činil 0,9%.

Výsledky výtěžností roztoků flutamidu pro stanovení LOQ

Tabulka 50 - Výsledky výtěžností roztoků flutamidu o koncentraci $c = \sim 0,03 \mu\text{g/ml}$

Vzorek	c (vnesená) [$\mu\text{g/ml}$]	c (nalezená) [$\mu\text{g/ml}$]	Výtěžnost [%]
1	0,02956	0,03090	104,52
2	0,03036	0,03181	104,75
3	0,03041	0,03086	101,48
4	0,02901	0,03146	108,43
5	0,02984	0,03243	108,68
6	0,03018	0,03278	108,61
Průměr			106,1
RSD [%]			2,8

Dílčí závěr 10:

Výsledky kalibrace, opakovatelnosti a relativního rozdílu mezi RF standardu S1 a S2 odpovídají stanoveným normám. Analýza roztoku pro LOQ je uvedena v **tabulce 49** a výsledky v **tabulce 50**. Výsledky výtěžností jsou v souladu se stanoveným rozmezím. RSD 6 nástřiků je 2,8%.

4.2.12 Stanovení stability standardu a stability stěru

Stabilita roztoku standardu je testována po tři dny v chladničce (2-8°C) a v autosampleru (20°C). Stabilita dokončeného roztoku vzorku stěru je testována rovněž 3 dny v chladničce (2-8°C) a v autosampleru (20°C). Stabilita nedokončeného vzorku stěru je testována po 3 dny v chladničce (2-8°C), po uplynutí této doby je roztok dokončen a analyzován.

Kritérium přijatelnosti pro stabilitu:

Relativní rozdíl $\leq 10\%$ (vypočítaný z RF_s z roztoků stability a RF_n z nově připravených roztoků S1)

RD (pro vzorky) $\leq 25\%$

4.2.12.1 Stanovení stability standardu

Vlastní analýza

Pro stanovení stability roztoku standardu po 1, 2, 3, 4 a 7 dní byly připraveny roztoky S1 a S2 o koncentraci cca 0,85 µg/ml s navážkami 8,596 mg a 8,613 mg. Navážky pro nově připravované roztoky S1 a S2 pro srovnání, pro kalibraci, pro opakovatelnost a pro stanovení relativního rozdílu RF mezi S1 a S2 jsou shrnuty v **tabulce 51** (roztoky s těmito navážkami byly použity při předchozích analýzách).

Tabulka 51 - Navážky pro stanovení kalibrace a relativního rozdílu RF mezi S1 a S2

	1 den (stanovení linearity)	2 dny	3 dny (ověření LOD a LOQ)	4 dny (stanovení výťažnosti pro výrobní zařízení)	7 dní (stanovení stability a robustnosti stěru)
Navážka pro S1	8,633	8,705	8,759	8,604	8,657
Navážka pro S2	8,706	8,894	8,213	8,906	8,695

Měření standardu S1 a S2 při 20 °C v autosampleru - 1. den

Tabulka 52 - 6 nápichů standardu S1 o koncentraci 0,8596 µg/ml při 20°C v autosampleru

- 1 den

Nápich	RT	Plocha	Navážka [mg]	Vypočítaný obsah [mg]	RF
1	1,351	19164	8,596	8,579001	2229
2	1,350	19178	8,596	8,585351	2231
3	1,350	19173	8,596	8,583000	2230
4	1,351	19259	8,596	8,621327	2240
5	1,351	19168	8,596	8,580620	2230
6	1,351	19202	8,596	8,595701	2234
Průměr	1,351	19191			2233
RSD [%]	0,0	0,19			0,2

Tabulka 53 - 2 nápichy standardu S2 o koncentraci 0,8596 µg/ml při 20°C v autosampleru

- 1 den

Nápich	RT	Plocha	Navážka [mg]	Vypočítaný obsah [mg]	RF
1	1,351	19294	8,613	8,637166	2240
2	1,351	19255	8,613	8,619772	2236
Průměr	1,351	19275			2238
RSD [%]	0,0	0,14			0,1

Relativní rozdíl mezi RF roztoku standardu S1a S2 při 20°C činil 0,2%, relativní rozdíl mezi RF roztoku standardu S1 (20°C) a S1 (čerstvě připravený) činil 2,5% a relativní rozdíl mezi RF roztoku standardu S2 (20°C) a S2 (čerstvě připravený) činil 2,8%.

Měření standardu S1 a S2 při 5 °C v chladničce - 1 den**Tabulka 54** - 6 nápichů standardu S1 o koncentraci 0,8596 µg/ml při 5°C v chladničce

- 1 den

Nápich	RT	Plocha	Navážka [mg]	Vypočítaný obsah [mg]	RF
1	1,351	19283	8,596	8,625306	2243
2	1,352	19163	8,596	8,571617	2229
3	1,351	19141	8,596	8,561704	2227
4	1,350	19236	8,596	8,604198	2238
5	1,351	19182	8,596	8,580335	2232
6	1,351	19211	8,596	8,593424	2235
Průměr	1,351	19202			2234
RSD [%]	0,0	0,27			0,3

Tabulka 55 - 2 nápichy standardu S2 o koncentraci 0,8596 µg/ml při 5°C v chladničce

- 1 den

Nápich	RT	Plocha	Navážka [mg]	Vypočítaný obsah [mg]	RF
1	1,351	19330	8,613	8,646568	2244
2	1,350	19268	8,613	8,618771	2237
Průměr	1,350	19299			2241
RSD [%]	0,0	0,23			0,2

Relativní rozdíl mezi RF roztoku standardu S1a S2 při 5°C činil 0,3%, relativní rozdíl mezi RF roztoku standardu S1 (5°C) a S1 (čerstvě připravený) činil 2,5% a relativní rozdíl mezi RF roztoku standardu S2 (5°C) a S2 (čerstvě připravený) činil 2,8%.

Měření standardu S1 a S2 při 20 °C v autosampleru - 2 dny

Tabulka 56 - 6 nápichů standardu S1 o koncentraci 0,8596 µg/ml při 20°C v autosampleru
- 2 dny

Nápich	RT	Plocha	Navážka [mg]	Vypočítaný obsah [mg]	RF
1	1,315	19245	8,596	8,599793	2239
2	1,315	19211	8,596	8,584335	2235
3	1,314	19202	8,596	8,580270	2234
4	1,315	19216	8,596	8,586881	2236
5	1,315	19277	8,596	8,613957	2243
6	1,315	19223	8,596	8,589678	2236
Průměr	1,315	19229			2237
RSD [%]	0,0	0,14			0,1

Tabulka 57 - 2 nápichy standardu S2 o koncentraci 0,8596 µg/ml při 20°C v autosampleru
- 2 dny

Nápich	RT	Plocha	Navážka [mg]	Vypočítaný obsah [mg]	RF
1	1,315	19362	8,613	8,651986	2248
2	1,315	19235	8,613	8,595058	2233
Průměr	1,315	19298			2241
RSD [%]	0,0	0,47			0,5

Relativní rozdíl mezi RF roztoku standardu S1a S2 při 20°C činil 0,2%, relativní rozdíl mezi RF roztoku standardu S1 (20°C) a S1 (čerstvě připravený) činil 1,9% a relativní rozdíl mezi RF roztoku standardu S2 (20°C) a S2 (čerstvě připravený) činil 2,9%.

Měření standardu S1 a S2 při 5 °C v chladničce - 2 dny

Tabulka 58 - 6 nápichů standardu S1 o koncentraci 0,896 µg/ml při 5°C v chladničce - 2 dny

Nápich	RT	Plocha	Navážka [mg]	Vypočítaný obsah [mg]	RF
1	1,315	19287	8,596	8,624586	2244
2	1,316	19186	8,596	8,579664	2232
3	1,316	19220	8,596	8,594654	2236
4	1,315	19198	8,596	8,584638	2233
5	1,315	19208	8,596	8,589334	2235
6	1,315	19181	8,596	8,577180	2231
Průměr	1,315	19213			2235
RSD [%]	0,0	0,20			0,2

Tabulka 59 - 2 nápichy standardu S2 o koncentraci 0,8596 µg/ml při 5°C v chladničce
- 2 dny

Nápich	RT	Plocha	Navážka [mg]	Vypočítaný obsah [mg]	RF
1	1,351	19262	8,613	8,613323	2236
2	1,350	19318	8,613	8,638569	2243
Průměr	1,350	19290			2240
RSD [%]	0,0	0,21			0,2

Relativní rozdíl mezi RF roztoku standardu S1a S2 při 5°C činil 0,2%, relativní rozdíl mezi RF roztoku standardu S1 (5°C) a S1 (čerstvě připravený) činil 2,0% a relativní rozdíl mezi RF roztoku standardu S2 (5°C) a S2 (čerstvě připravený) činil 2,9%.

Měření standardu S1 a S2 při 20 °C v autosampleru - 3 dny

Tabulka 60 - 6 nápichů standardu S1 o koncentraci 0,8596 µg/ml při 20°C v autosampleru
- 3 dny

Nápich	RT	Plocha	Navážka [mg]	Vypočítaný obsah [mg]	RF
1	1,362	19141	8,596	8,567059	2227
2	1,363	19191	8,596	8,589329	2233
3	1,362	19206	8,596	8,595827	2234
4	1,362	19228	8,596	8,606029	2237
5	1,363	19185	8,596	8,586728	2232
6	1,362	19223	8,596	8,603470	2236
Průměr	1,362	19196			2233
RSD [%]	0,0	0,16			0,2

Tabulka 61 - 2 nápichy standardu S2 o koncentraci 0,8596 µg/ml při 20°C v autosampleru
- 3 dny

Nápich	RT	Plocha	Navážka [mg]	Vypočítaný obsah [mg]	RF
1	1,362	19286	8,613	8,631868	2239
2	1,362	19263	8,613	8,621635	2237
Průměr	1,362	19275			2238
RSD [%]	0,0	0,08			0,1

Relativní rozdíl mezi RF roztoku standardu S1a S2 při 20°C činil 0,2%, relativní rozdíl mezi RF roztoku standardu S1 (20°C) a S1 (čerstvě připravený) činil 0,4% a relativní rozdíl mezi RF roztoku standardu S2 (20°C) a S2(čerstvě připravený) činil 0,6%.

Měření standardu S1 a S2 při 5°C v chladničce - 3 dny

Tabulka 62 - 6 nápiců standardu S1 o koncentraci 0,896 µg/ml při 5°C v chladničce - 3 dny

Nápic	RT	Plocha	Navážka [mg]	Vypočítaný obsah [mg]	RF
1	1,362	19229	8,596	8,630529	2237
2	1,361	19237	8,596	8,634381	2238
3	1,362	19087	8,596	8,566794	2220
4	1,363	19011	8,596	8,532907	2212
5	1,361	19198	8,596	8,616599	2233
6	1,361	18972	8,596	8,515325	2207
Průměr	1,362	19122			2225
RSD [%]	0,0	0,60			0,6

Tabulka 63 - 2 nápiců standardu S2 o koncentraci 0,8596 µg/ml při 5°C v chladničce - 3 dny

Nápic	RT	Plocha	Navážka [mg]	Vypočítaný obsah [mg]	RF
1	1,362	19261	8,613	8,644783	2236
2	1,362	19296	8,613	8,660526	2240
Průměr	1,350	19278			2238
RSD [%]	0,0	0,13			0,1

Relativní rozdíl mezi RF roztoku standardu S1a S2 při 5°C činil 0,6%, relativní rozdíl mezi RF roztoku standardu S1 (5°C) a S1(čerstvě připravený) činil 0,0% a relativní rozdíl mezi RF roztoku standardu S2 (5°C) a S2(čerstvě připravený) činil 0,6%.

Měření standardu S1 a S2 při 20°C v autosampleru - 4 dny

Tabulka 64 - 6 nápiců standardu S1 o koncentraci 0,8596 µg/ml při 20°C v autosampleru - 4 dny

Nápic	RT	Plocha	Navážka [mg]	Vypočítaný obsah [mg]	RF
1	1,361	19097	8,596	8,574857	2222
2	1,360	19113	8,596	8,582252	2224
3	1,360	19162	8,596	8,604067	2229
4	1,361	19109	8,596	8,580555	2223
5	1,361	19091	8,596	8,572446	2221
6	1,360	19122	8,596	8,586205	2225
Průměr	1,361	19116			2224
RSD [%]	0,0	0,13			0,1

Tabulka 65 - 2 nápichy standardu S2 o koncentraci 0,8596 µg/ml při 20°C v autosampleru
- 4 dny

Nápich	RT	Plocha	Navážka [mg]	Vypočítaný obsah [mg]	RF
1	1,361	19244	8,613	8,640835	2234
2	1,361	19288	8,613	8,660635	2239
Průměr	1,361	19266			2237
RSD [%]	0,0	0,16			0,2

Relativní rozdíl mezi RF roztoku standardu S1a S2 při 20°C činil 0,6%, relativní rozdíl mezi RF roztoku standardu S1 (5°C) a S1 (čerstvě připravený) činil 1,5% a relativní rozdíl mezi RF roztoku standardu S2 (5°C) a S2 (čerstvě připravený) činil 0,8%.

Měření standardu S1 a S2 při 5°C v chladničce - 4 dny

Tabulka 66 - 6 nápichů standardu S1 o koncentraci 0,896 µg/ml při 5°C v chladničce - 4 dny

Nápich	RT	Plocha	Navážka [mg]	Vypočítaný obsah [mg]	RF
1	1,361	19005	8,596	8,549501	2211
2	1,361	19109	8,596	8,596613	2223
3	1,361	19061	8,596	8,574755	2217
4	1,361	19100	8,596	8,592495	2222
5	1,360	19155	8,596	8,617276	2228
6	1,361	18975	8,596	8,536073	2207
Průměr	1,361	19068			2218
RSD [%]	0,0	0,36			0,4

Tabulka 67 - 2 nápichy standardu S2 o koncentraci 0,8596 µg/ml při 5°C v chladničce
- 4 dny

Nápich	RT	Plocha	Navážka [mg]	Vypočítaný obsah [mg]	RF
1	1,361	19258	8,613	8,663637	2236
2	1,360	19276	8,613	8,671435	2238
Průměr	1,360	19267			2237
RSD [%]	0,0	0,06			0,1

Relativní rozdíl mezi RF roztoku standardu S1a S2 při 5°C činil 0,8%, relativní rozdíl mezi RF roztoku standardu S1 (5°C) a S1 (čerstvě připravený) činil 2,5% a relativní rozdíl mezi RF roztoku standardu S2 (5°C) a S2 (čerstvě připravený) činil 0,8%.

Měření standardu S1 a S2 při 20°C v autosampleru - 7 dní

Tabulka 68 - 6 nápichů standardu S1 o koncentraci 0,8596 µg/ml při 20°C v autosampleru - 7 dní

Nápich	RT	Plocha	Navážka [mg]	Vypočítaný obsah [mg]	RF
1	1,360	19179	8,596	8,600571	2231
2	1,360	19116	8,596	8,572054	2224
3	1,361	19133	8,596	8,579917	2226
4	1,361	19149	8,596	8,589915	2228
5	1,361	19150	8,596	8,587524	2228
6	1,361	19168	8,596	8,595810	2230
Průměr	1,360	19149			2228
RSD [%]	0,0	0,12			0,1

Tabulka 69 - 2 nápichy standardu S2 o koncentraci 0,8596 µg/ml při 20°C v autosampleru - 7 dní

Nápich	RT	Plocha	Navážka [mg]	Vypočítaný obsah [mg]	RF
1	1,361	19247	8,613	8,630916	2235
2	1,361	19285	8,613	8,648188	2239
Průměr	1,361	19266			2237
RSD [%]	0,0	0,14			0,1

Relativní rozdíl mezi RF roztoku standardu S1a S2 při 20°C činil 0,4%, relativní rozdíl mezi RF roztoku standardu S1 (20°C) a S1 (čerstvě připravený) činil 1,5% a relativní rozdíl mezi RF roztoku standardu S2 (20°C) a S2 (čerstvě připravený) činil 0,8%.

Měření standardu S1 a S2 při 5°C v chladničce - 7 dní

Tabulka 70 - 6 nápichů standardu S1 o koncentraci 0,896 µg/ml při 5°C v chladničce - 7 dní

Nápich	RT	Plocha	Navážka [mg]	Vypočítaný obsah [mg]	RF
1	1,362	19179	8,596	8,593669	2231
2	1,362	19131	8,596	8,572516	2226
3	1,361	19202	8,596	8,604310	2234
4	1,361	19176	8,596	8,592590	2231
5	1,361	19137	8,596	8,575216	2226
6	1,361	19209	8,596	8,607434	2235
Průměr	1,361	19173			2230
RSD [%]	0,0	0,17			0,2

Tabulka 71 - 2 nápichy standardu S2 o koncentraci 0,8596 µg/ml při 5°C v chladničce
- 7 dní

Nápich	RT	Plocha	Navážka [mg]	Vypočítaný obsah [mg]	RF
1	1,361	19255	8,613	8,628090	2236
2	1,361	19255	8,613	8,628114	2236
Průměr	1,361	19255			2236
RSD [%]	0,0	0,00			0,0

Relativní rozdíl mezi RF roztoku standardu S1 a S2 při 5°C činil 0,3%, relativní rozdíl mezi RF roztoku standardu S1 (5°C) a S1 (čerstvě připravený) činil 1,4% a relativní rozdíl mezi RF roztoku standardu S2 (5°C) a S2(čerstvě připravený) činil 0,8%.

Výsledky

Výsledky kalibrace, opakovatelnosti a relativního rozdílu mezi RF standardu S1 a S2 - 1 - 7 den

Relativní směrodatné odchylky (RSD) ploch píků flutamidu pro 6 nápichů standardu S1 byly 1., 2., 3., 4. a 7. den 0,4%; 0,2%; 0,5%; 1,2%, resp. 0,1%, RSD ploch píků flutamidu pro všechny nápichy standardu S1 byla 0,34%; 0,16%; 0,45%; 1,22%, resp. 0,12 %, relativní rozdíly odezvoových faktorů (RF) mezi standardy S1 a S2 činil 0,5%; 1,2%; 1,2%; 1,8%, resp. 0,4 %.

Výsledky stability roztoků standardu flutamidu

Tabulka 72 - Výsledky stability roztoků standardu flutamidu S1 a S2

	RF nově připraveného standardu S1	RF roztoku pro stabilitu S1		Relativní rozdíl S1 [%] T ₁ /T ₂	RF nově připraveného standardu S2	RF roztoku pro stabilitu S2		Relativní rozdíl S2 [%] T ₁ /T ₂
		T ₁ [-20°C]	T ₁ [2-8°C]			T ₁ [-20°C]	T ₂ [2-8°C]	
1 den	2291	2233	2234	2,5/2,5	2302	2238	2241	2,8/2,6
2 dny	2280	2237	2235	1,9/2,0	2307	2241	2240	2,9/2,9
3 dny	2225	2233	2225	0,4/0	2252	2238	2238	0,6/0,6
4 dny	2259	2224	2218	1,5/1,8	2219	2237	2237	0,8/0,8
7 dní	2262	2228	2230	1,5/1,4	2254	2237	2236	0,8/0,8

Dílčí závěr 11:

Výsledky opakovatelnosti, kalibrace a relativního rozdílu mezi standardy S1 a S2 odpovídají daným normám. Hodnoty měření jednotlivých nástřiků jsou uvedeny v **tabulkách 52 až 71**. Kritérium pro stabilitu požaduje, aby relativní rozdíl nepřekročil 10%. Z výsledků uvedených v **tabulce 72** vyplývá, že toto kritérium bylo splněno. Roztok standardu je tedy stabilní po celých 7 dní v autosampleru ve 20°C a v chladničce ve 2-8°C.

4.2.12.2 Stanovení stability stěru

Vlastní analýza

Pro kalibraci přístroje, stanovení opakovatelnosti analýzy a vypočítání relativního rozdílu byly připraveny roztoky standardu S1 a S2 s navážkami 8,657 mg a 8,695 mg. Pro stanovení stability stěru byl použit roztok vzorku stěru získaný z povrchu leštěná ocel (byl nanášen zásobní roztok pro výtěžnost stěru na 100% hladině s navážkou 8,487 mg).

Tabulka 73 - Stanovení stability dokončeného roztoku vzorku stěru po 3 dnech při 20°C v autosampleru

Nápich	Název vzorku	Navážka [mg]	RT	Area	Výtěžnost [%]
1	Stabilita stěru 1- 20 °C	8,487	1,4	13782	71,49
1	Stabilita stěru 2- 20 °C	8,487	1,4	14010	72,68
1	Stabilita stěru 3- 20 °C	8,487	1,4	13948	72,36
Průměr					72,18
RSD [%]					0,8
Minimum					71,49

Tabulka 74 - Stanovení stability dokončeného roztoku vzorku stěru po 3 dnech při 5°C v chladničce

Nápich	Název vzorku	Navážka [mg]	RT	Area	Výtěžnost [%]
1	Stabilita stěru 1- 5°C	8,487	1,4	11342	58,84
1	Stabilita stěru 2- 5°C	8,487	1,4	13560	70,34
1	Stabilita stěru 3-5°C	8,487	1,4	10183	52,82
Průměr					60,67
RSD [%]					14,7
Minimum					52,82

Tabulka 75 - Stanovení stability nedokončeného roztoku vzorku stěru po 3 dnech při 5°C v chladničce

Nápich	Název vzorku	Navážka [mg]	RT	Area	Výtěžnost [%]
1	Stabilita stěru nedokončený 1- 5°C	8,487	1,4	16440	85,29
1	Stabilita stěru nedokončený 2- 5°C	8,487	1,4	-	-
1	Stabilita stěru nedokončený 3-5°C	8,487	1,4	14865	77,11
Průměr					81,20
RSD [%]					7,1
Minimum					77,11

Výsledky

Výsledky kalibrace, opakovatelnosti a relativního rozdílu mezi RF standardu S1 a S2

Relativní směrodatná odchylka (RSD) ploch píků flutamidu pro 6 nádechů standardu S1 byla 0,2%, RSD ploch píků flutamidu pro všechny nádechy standardu S1 byla 0,15%, relativní rozdíl odezvoových faktorů (RF) mezi standardy S1 a S2 činil 0,6%.

Výsledky měření stability stěru flutamidu

Tabulka 76 - Výsledky analýzy stability vzorku stěru flutamidu

Název vzorku	Průměrná výtěžnost [%]	Relativní odchylka [%]
Čerstvý vzorek stěru	73,6	/
Vzorek stěru po třech dnech v autosampleru	72,2	1,9
Vzorek stěru po třech dnech v chladničce	60,7	19,2
Nedokončený vzorek stěru po třech dnech v chladničce	81,2	9,8

Dílčí závěr 12:

Výsledky kalibrace, opakovatelnosti a relativního rozdílu mezi RF standardu S1 a S2 opět odpovídají normám. Analýza stability roztoku vzorku stěru je uvedena v **tabulkách 73 až 75**. Výtěžnost vychází nad požadovaným limitem (50%). Relativní odchylka roztoku vzorku stěru v chladničce je 19,2; což je vysoká hodnota, ale stále ještě spadá do požadovaného limitu ($\leq 25\%$). Při přípravě nedokončeného roztoku vzorku stěru byl pravděpodobně 2. vzorek nesprávně setřen, proto výsledek výtěžnosti 2. vzorku (v **tabulce 75**) nebyl započítán do průměrné výtěžnosti uvedené v **tabulce 76**.

4.2.13 Stanovení přesnosti

Kritéria přijatelnosti pro stanovení přesnosti:

Pro opakovatelnost a mezilehlou přesnost je kritérium založené na koncentraci (**tabulka 77**).

Tabulka 77 - Stanovení RSD na základě koncentrace

Koncentrační hladina [%]	RSD [%]
$\leq 0,05$	≤ 15

Rozdíl mezi průměrnými výsledky analýzy opakovatelnosti a mezilehlé přesnosti je rovněž založen na koncentraci (**tabulka 78**).

Tabulka 78 - Stanovení relativní odchylky na základě koncentrace

Koncentrační hladina [%]	Relativní rozdíl [%]
$\leq 0,05$	≤ 20

4.2.13.1 Stanovení opakovatelnosti

Vlastní analýza

Jako roztoky standardu S1 a S2 byly použity už připravené roztoky S1 a S2 z analýzy stability standardu s navážkami 8,596 mg a 8,613 mg. Dále byly připraveny roztoky standardu S pro stanovení opakovatelnosti s navážkami 8,557 mg, 8,644 mg, 8,847 mg, 8,476 mg.

Jako dva zbývající roztoky standardu S pro opakovatelnost byly rovněž použity již připravené roztoky standardu S1 a S2 s navážkami 8,596 mg a 8,613 mg. Analýza proběhla na přístroji UPLC LC - P45 s kolonou č. 571.

Výsledky

Výsledky kalibrace, opakovatelnosti a relativního rozdílu mezi RF standardu S1 a S2

Relativní směrodatná odchylka (RSD) ploch píků flutamidu pro 6 nápiců standardu S1 byla 0,7%, RSD ploch píků flutamidu pro všechny nápichy standardu S1 byla 0,70%, relativní rozdíl odezvodových faktorů (RF) mezi standardy S1 a S2 činil 0,3%.

Výsledky stanovení opakovatelnosti

Tabulka 79 - Analýza stanovení opakovatelnosti roztoků standardů S o koncentraci

~0,85 µg/ml

Vzorek	Navážka [mg/100ml]	Ředění	c (vložená) [µg/ml]	Area [µV x sec]	c (získaná) [µg/ml]	Výtěžnost [%]
1	8,596	100	0,8596	19208	0,8550	99,47
2	8,613	100	0,8613	19516	0,8687	100,86
3	8,557	100	0,8557	19379	0,8627	100,82
4	8,644	100	0,8644	19244	0,8566	99,10
5	8,847	100	0,8847	19636	0,8741	98,80
6	8,476	100	0,8476	19006	0,8461	99,82
Průměr						99,8
RSD [%]						0,9

Dílčí závěr 13:

Výsledky stanovení kalibrace, opakovatelnosti a relativního rozdílu mezi S1 a S2 odpovídají normám. Relativní směrodatná odchylka u stanovení opakovatelnosti vyšla 0,9%, což odpovídá stanovenému kritériu ($\leq 5,0\%$) - **tabulka 79**.

4.2.13.2 Stanovení mezilehlé přesnosti

Vlastní analýza

Pro přípravu roztoků standardů S1 a S2 byla použita navážka 8,159 mg a 8,313 mg. Pro přípravu roztoků standardů pro stanovení mezilehlé přesnosti byly použity navážky 8,250 mg; 8,032 mg; 8,702 mg; 8,566 mg. Jako zbývající roztoky S byly použity roztoky S1 a S2. Měření probíhalo na přístroji UPLC LC - P44 s kolonou č. 570 jiný den jiným pracovníkem.

Výsledky

Výsledky kalibrace, opakovatelnosti a relativního rozdílu mezi RF standardu S1 a S2

Relativní směrodatná odchylka (RSD) ploch píků flutamidu pro 6 nápiců standardu S1 byla 0,2%; RSD ploch píků flutamidu pro všechny nápicové standardy S1 byla 0,19%; relativní rozdíl odezvočných faktorů (RF) mezi standardy S1 a S2 činil 0,05%.

Výsledky stanovení mezilehlé přesnosti

Tabulka 80 - Výsledky výtěžností roztoků standardů S o koncentraci ~ 0,85 µg/ml pro stanovení mezilehlé přesnosti

Vzorek	Navážka [mg/100ml]	Ředění	c (vložená) [µg/ml]	Area [µV x sec]	c (získaná) [µg/ml]	Výtěžnost [%]
1	8,159	100	0,8159	32408	0,8152	99,92
2	8,313	100	0,8313	33121	0,8332	100,23
3	8,250	100	0,8250	33078	0,8321	100,86
4	8,032	100	0,8032	32038	0,8059	100,34
5	8,702	100	0,8702	34613	0,8707	100,06
6	8,566	100	0,8566	34148	0,8590	100,28
Průměr						100,3
RSD [%]						0,3

Stanovení relativní odchylky mezi výsledky opakovatelnosti a výsledky mezilehlé přesnosti

Tabulka 81 - Stanovení relativní odchylky mezi výsledky opakovatelnosti a mezilehlé přesnosti

	Výtěžnost [%]	RSD [%]	Relativní odchylka [%]
Opakovatelnost	99,8	0,9	-
Mezilehlá přesnost	100,3	0,3	0,5

Dílčí závěr 14:

Stanovení mezilehlé přesnosti je zahrnuto do této práce i přesto, že měření bylo provedeno jiným pracovníkem. Důvodem je fakt, že metoda vyžaduje, aby analýzu provedl někdo jiný a zároveň je stanovení mezilehlé přesnosti důležitým rysem validace analytické metody. Výsledky výtěžností a výpočtu relativní odchylky pro stanovení mezilehlé přesnosti jsou uvedeny v **tabulkách 80 a 81**. Výsledky kalibrace, opakovatelnosti a relativního rozdílu mezi standardy S1 a S2 odpovídají normám. Relativní směrodatná odchylka vyšla 0,3%; což odpovídá stanovenému kritériu ($\leq 5,0\%$). Výsledek relativního rozdílu mezi hodnotami opakovatelnosti a mezilehlé přesnosti rovněž odpovídá zadanému kritériu ($\leq 10\%$). Ostatní výsledky také odpovídají normám.

5 Komentář k výsledkům

V experimentální části jsem se podílela na vývoji a validaci UPLC metody pro stanovení účinné látky flutamid, která je součástí přípravku Flutamid 250 mg tablety, ve výrobním zařízení a v pracovním prostředí.

Nejprve bylo nutné metodu *vyvinout*, což zahrnovalo prokázání *vhodnosti* chromatografického systému. Nejprve jsem se zabývala výběrem vhodné chromatografické kolony, jíž se stala kolona Kinetex C18 100 A. Dále jsem zmenšila průtokovou rychlost mobilní fáze z důvodu probíhající analýzy za vyšších tlaků. Jako rozpouštědlo jsem vybrala metanol v poměru k vodné složce 25 : 75. Rovněž jsem ověřila účinnost UV detektoru, kde flutamid vykazoval maximum při 240 nm. Vhodnost systému jsem prokázala vyhovujícími hodnotami chromatografických parametrů: faktor symetrie píku byl stanoven na 1,1; počet teoretických pater vyšel 6244 (výpočetem podle USP) a retenční čas byl stanoven na 1,559.

Dalším krokem byla *validace* nově vyvinuté metody, která zahrnovala ověření validačních parametrů (správnosti, specifity, robustnosti, linearity a rozsahu, stanovení a ověření LOD a LOQ, stability a přesnosti) dle vnitřních předpisů firmy.

Před každým měřením bylo nutné provést *kalibraci* přístroje, stanovit *opakovatelnost* ze všech nápichů standardu S1 a stanovit relativní rozdíl mezi 6 nápichy standardu S1 a 2 nápichy standardu S2.

Jako první byla stanovena *správnost* (resp. výtěžnost) metody pro *povrchy*, které jsou součástí *výrobních zařízení* (leštěná ocel, neleštěná ocel, potahovaná litina, tvrdý plast a gumové těsnění) a pro *povrchy*, které jsou součástí *pracovního prostředí* (leštěná ocel, neleštěná ocel, epoxidová podlaha, PVC podlaha). Kritérium přijatelnosti pro obsah flutamidu ve stěru bylo stanoveno ve validačním protokolu QDP0042864 V 1,0 na 8,5 µg/25 cm² pro stěr z výrobního zařízení a 100 µg/25 cm² pro stěr z pracovního prostředí. Na vybrané vzorky povrchů jsem nanášela připravené zásobní roztoky flutamidu, následně stírala a analyzovala výtěžnost. Jediné výsledky, které nevyhovovaly požadovaným kritériím, byly výtěžnosti z tvrdého plastu a z gumového těsnění. Důvodem byla vysoká pórovitost povrchu.

Dále jsem stanovovala *specifitu* metody s detergenty výrobních zařízení (Meral Zentra, Meral CIP, Extran AP22, Extran MA02), s detergenty pracovního prostředí (COSA CIP 95, SAVO Prim, Dyclean, Meral Steril, Fixinela, Peresal, Meral steril Mild) a s ostatními doprovodnými látkami, které se mohou vyskytnout v roztoku vzorku flutamidu. Potvrdila jsem, že UPLC metoda umožňuje odlišit plochy píku flutamidu a doprovodných látek.

Následně jsem stanovovala *robustnost* metody při změně parametrů analytické metody (rychlosti průtoku mobilní fáze a změny vlnové délky UV detektoru) a při změně parametrů přípravy vzorku, kde jsem měnila dobu vložení vzorku do ultrazvuku.

Z výsledku jsem usoudila, že jak změna parametrů UPLC metody, tak změna délky doby vložení vzorku do ultrazvuku, nemá podstatný vliv na analýzu.

Při určování *linearity* jsem dokázala, že existuje lineární vztah mezi koncentrací flutamidu a plochou jeho píku. *Rozsah* jsem stanovila od hodnoty LOQ do 15 µg/ml. Výsledky stanovení a ověření detekčního a kvantifikačního limitu jsou rovněž v souladu s požadovanými hodnotami.

Rovněž jsem stanovovala *stabilitu standardu* a *stabilitu stěru*. Pro stabilitu standardu jsem připravila roztoky, které byly ponechány v autosampleru při 20°C a v chladničce při 5°C po dobu 7 dní. Analýzu jsem prováděla po 1, 2, 3, 4 a 7 dnech. Roztok pro stabilitu stěru jsem analyzovala po třech dnech v chladničce při 5°C. Také jsem analyzovala nedokončený roztok stěru, který byl ponechán po tři dny v chladničce a pak byl dokončen. Bohužel byl při druhém stěru vzorku špatně setřen povrch, a tím pádem nebyl výsledek dále započítáván. Dokázala jsem, že roztoky standardu jsou stabilní po celých 7 dní a roztok stěru je stabilní 3 dny.

Jako poslední validační parametr analytické metody jsem stanovovala *přesnost*, resp. její dílčí části - opakovatelnost a mezilehlou přesnost. RSD opakovatelnosti vyšla v požadovaných hodnotách. Metoda stanovení mezilehlé přesnosti vyžadovala, aby byla provedena jiným pracovníkem a na jiném přístroji.

6 Závěry

Všechny dílčí závěry validace analytické metody jsou shrnuty v **tabulce 82**.

Tabulka 82 - Výsledky validace analytické metody pro stanovení flutamidu

Validační charakteristika	Kritérium	Výsledek			Vyhovuje/ Nevyhovuje
		Výrobní zařízení	Faktor výtěžnosti	RSD [%]	
Správnost	RSD mezi různými vzorky se stejnou koncentrací je $\leq 25\%$. Výtěžnost z jednotlivých povrchů je $\geq 50\%$.	Leštěná ocel	0,60	7,2	V
		Neleštěná ocel	0,57	5,5	V
		Gumové těsnění	0,22	-	N
		Tvrký plast	0,03	-	N
		Potahovaná litina	0,50	6,9	V
		Pracovní prostředí	Faktor výtěžnosti	RSD [%]	
		Leštěná ocel	0,65	8,8	V
		Neleštěná ocel	0,51	18,1	V
		Epoxidová podlaha	0,63	6,8	V
		PVC podlaha	0,55	6,7	V
Specifita	Nevyskytuje se žádný výraznější pik ($S/N \geq 10$) s retenčním časem podobným píku flutamidu	Nevyskytuje se žádná interference s píkem flutamidu			V
Robustnost	Změna chromatografických parametrů - vhodnost systému i přes tyto změny	Změna parametrů metody: Rychlost průtoku: 0,8 - 1,0 ml/min Vlnová délka UV: 237 - 243 nm Změny neměly vliv na analýzu			V
	Změna přípravy standardu a vzorku - vhodnost systému i přes tyto změny	Změna doby sonikace - 3 min a 7 min, relativní odchylka pro standard (3 min) je 0,1 %, pro standard (7 min) je 0,8 %, pro vzorek (3 min) je 6,5 %, pro vzorek (7 min) je 4,2 %			V
Linearita a rozsah	Korelační koeficient $R^2 \geq 0,99$ (y-intercept/plocha píku na 100 % hladině koncentrace) $\times 100 \leq 3\%$	Korelační koeficient $R^2 = 0,9997$ (y-intercept/plocha píku na 100 % hladině koncentrace) $\times 100 \leq 0,5\%$ Rozsah: od LOQ do 15 $\mu\text{g/ml}$			V
LOD	Poměr $S/N \geq 3$ nebo v 5 ze 6 nástřiků je detekován flutamid	0,007 $\mu\text{g/ml}$ $S/N = 6,5$			V
LOQ	RSD 6 nástřiků roztoků pro stanovení $LOQ \leq 20\%$	0,02 $\mu\text{g/ml}$ RSD = 2,8 %			V
Stabilita	Relativní rozdíl (vypočítaný z RFs z roztoků stability a RFn z nově připravených roztoků S1) je $\leq 10\%$. RD (pro vzorky) je $\leq 25\%$	Roztoky standardu jsou stabilní 7 dní v autosampleru (20 °C) a 7 dní v chladničce (5 °C) Roztoky sčeru (dokončený a nedokončený) jsou stabilní 3 dny v chladničce (5 °C)			V
Přesnost - opakovatelnost	$c \leq 0,05 \rightarrow \leq 15\%$	Výtěžnost = 99,8 % RSD = 0,9 %			V
Přesnost - mezilehlá přesnost	$c \leq 0,05 \rightarrow \leq 15\%$	RD = 0,5 %			V

7 Seznam zkratek

AM	analytická metoda
API	účinná farmaceutická látka (Active Pharmaceutical Ingredient)
BS	velikost šarže (Batch Size)
CA	čisticí prostředek (Cleaning Agent)
CFU	jednotky tvořící kolonii (Colony Forming Units)
CV	validace čištění (Cleaning Validation)
DIL_1	diluent 1
DIL_2	diluent 2
EP	Evropský lékopis (European Pharmacopoeia)
FDA	Úřad pro kontrolu potravin a léčiv (Food and Drug Administration)
GC	plynová chromatografie
GMP	správná výrobní praxe (Good Manufacturing Practice)
HPLC	vysoce účinná kapalinová chromatografie
IMS	iontová mobilní spektroskopie
LOD	limit detekce (Limit of Detection)
LOQ	limit kvantifikace (Limit of Quantification)
MAC	maximální množství kontaminantu na povrchu zařízení (Maximal Allowable Carryover)
MeOH	metanol
MF	mobilní fáze
MO	mikroorganismy
MS	hmotnostní spektrometrie
PDA	Parental Drug Association
PIC/S	Pharmaceuticals Inspection Co-operation Scheme
QA	oddělení jištění jakosti (Quality Assurance)
QC	oddělení kontroly kvality (Quality Control)
RD	relativní odchylka (Relative Deviation)
RF	odezvoový faktor (Response Factor)
RSD	relativní směrodatná odchylka
SOP	standardní operační postup
SÚKL	Státní ústav pro kontrolu léčiv
TCI	Teva Czech Industries, s.r.o.
TSA	oddělení Technical and Scientific Affairs
UPLC	extrémně účinná kapalinová chromatografie
USP	U. S. Pharmacopoeia

8 Literatura

- 1 Milníky v historii prání. *Žena X* [online]. 2010 [cit. 2013-03-05]. Dostupné z: http://www.zenax.cz/milniky_v_historii_prani_9118.htm
- 2 CHALABALA, Milan et al. *TECHNOLOGIE LÉKŮ: Druhé, přepracované a doplněné vydání*. 2. vydání. Praha: Galén, 2001. ISBN 8072621289.
- 3 O společnosti. *TEVA* [online]. 2007 [cit. 2013-03-02]. Dostupné z: <http://www.teva.cz/teva-se-predstavuje/o-spolecnosti.htm>
- 4 Profil firmy. *IVAX* [online]. 2013 [cit. 2013-03-02]. Dostupné z: <http://www.ivax.cz/web/structure/9.html>
- 5 TEVA CZECH INDUSTRIES S.R.O. *Validace čištění: Školící materiál*. Opava, 2012, 47 s. TCI083-TCI-A-KO15.
- 6 TEVA CZECH INDUSTRIES S.R.O. *Validace - TCI Pharma: SOP*. Opava, 2011, 35 s. SOP\PQA\008.
- 7 Validation. In: *Wikipedia: the free encyclopedia* [online]. San Francisco (CA): Wikimedia Foundation, 2001- [cit. 2013-05-02]. Dostupné z: [http://en.wikipedia.org/wiki/Validation_\(drug_manufacture\)](http://en.wikipedia.org/wiki/Validation_(drug_manufacture))
- 8 SÚKL. VYR-32: *POKYNY PRO SPRÁVNOU VÝROBNÍ PRAXI - DOPLNĚK 15. KVALIFIKACE A VALIDACE*. 2003. Dostupné z: http://www.sukl.cz/file/65202_1_1/
- 9 VYR-32 verze 3: *VOD K POKYNUŮM PRO SPRÁVNOU VÝROBNÍ PRAXI*. In: SÚKL [online]. 2013 [cit. 2013-05-06]. Dostupné z: <http://www.sukl.cz/leciva/vyr-32-verze-3>
- 10 TEVA CZECH INDUSTRIES S.R.O. *Validace čištění: SOP*. Opava, 2012, 26 s. SOP\PQA\031.
- 11 TEVA CZECH INDUSTRIES S.R.O. *Validace analytických metod: SOP*. Opava, 2012, 29 s. SOP\PQA\025.
- 12 KLIMEŠ, Jiří. *Kontrola léčiv II*. 1. vyd. Praha: Karolinum, 2004, 94 s. Učební texty (Univerzita Karlova). ISBN 80-246-0818-9.
- 13 HPLC - Vysokoúčinná kapalinová chromatografie. VYŠŠÍ ODBORNÁ ŠKOLA ZDRAVOTNICKÁ A STŘEDNÍ ZDRAVOTNICKÁ ŠKOLA. *Laboratorní metody* [online]. 2013 [cit. 2013-07-24]. Dostupné z: <http://labmet.zshk.cz/vyuka/hplc.aspx>
- 14 Chromatografie. In: *Wikipedia: the free encyclopedia* [online]. San Francisco (CA): Wikimedia Foundation, 2013 [cit. 2013-07-20]. Dostupné z: <http://cs.wikipedia.org/wiki/Chromatografie>
- 15 UPLC teorie. *HPLC* [online]. 2009 [cit. 2013-04-23]. Dostupné z: <http://www.hplc.cz/UPLC/>
- 16 Iontová mobilní spektrometrie. In: *Wikipedia: the free encyclopedia* [online]. San Francisco (CA): Wikimedia Foundation, 2013 [cit. 2013-05-05]. Dostupné z: http://cs.wikipedia.org/wiki/Iontov%C3%A1_mobiln%C3%AD_spektrometrie

- 17 HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETRIE: PŘEHLED ZAJÍMAVÝCH OBLASTÍ AKTUÁLNÍHO VÝVOJE. *Chemické listy* [online]. 2011, č. 105 [cit. 2013-05-05]. Dostupné z: http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2011_04_230-236.pdf
- 18 Český lékopis 2009 (ČL 2009). 1. vydání. Praha: GRADA Publishing, a.s 2009, 3968 s. ISBN 978-80-247-2994-7.
- 19 TEVA CZECH INDUSTRIES S.R.O. *Tvorba a provádění HPLC metod: SOP*. Opava, 2013, 35 s. SOP\PQC\062.
- 20 Number of Theoretical Plates. In: *PHARMAINFO* [online]. 2013 [cit. 2013-07-21]. Dostupné z: <http://www.pharmainfo.net/reviews/introduction-analytical-method-development-pharmaceutical-formulations>)
- 21 Separace na chromatografické koloně. *HPLC* [online]. 2009 [cit. 2013-07-12]. Dostupné z: <http://www.hplc.cz/Teorie/resolution.html>
- 22 Flutamid. Velký lékařský slovník [online]. 2008 [cit. 2013-03-02]. Dostupné z: <http://lekarske.slovniky.cz/lexikon-pojem/flutamid-2>

9 Seznam tabulek

- Tabulka 1** - Limity parametrů způsobilosti systému (str. 20)
- Tabulka 2** - Povolené úpravy chromatografických podmínek (str. 20)
- Tabulka 3** - Optimální chromatografické podmínky (str. 28)
- Tabulka 4** - Rozmezí hodnot sledovaných parametrů (str. 35)
- Tabulka 5** - Roztoky pro výtěžnost stěrů z výrobního zařízení - koncentrace flutamidu (str. 36)
- Tabulka 6** - Výtěžnost - leštěná ocel - výrobní zařízení (str. 38)
- Tabulka 7** - Výtěžnost - neleštěná ocel - výrobní zařízení (str. 39)
- Tabulka 8** - Výtěžnost - gumové těsnění - výrobní zařízení (str. 39)
- Tabulka 9** - Výtěžnost - potahovaná litina - výrobní zařízení (str. 40)
- Tabulka 10** - Výtěžnost - tvrdý plast - výrobní zařízení (str. 40)
- Tabulka 11** - Souhrn výsledků výtěžností jednotlivých povrchů výrobního zařízení (str. 40)
- Tabulka 12** - Roztoky pro výtěžnost stěrů z pracovního prostředí - koncentrace flutamidu (str. 41)
- Tabulka 13** - Výtěžnost - leštěná ocel - pracovní prostředí (str. 42)
- Tabulka 14** - Výtěžnost - neleštěná ocel - pracovní prostředí (str. 43)
- Tabulka 15** - Výtěžnost - epoxidová podlaha - pracovní prostředí (str. 43)
- Tabulka 16** - Výtěžnost - PVC podlaha - pracovní prostředí (str. 44)
- Tabulka 17** - Výsledky výtěžností a faktory výtěžnosti (str. 44)
- Tabulka 18** - Koncentrace detergentů v roztocích pro zařízení a prostředí ~10 ppm (str. 45)
- Tabulka 19** - 6 nápichů standardu S1 o koncentraci 0,8633 µg/ml při rychlosti průtoku 0,8 ml/min (str. 48)
- Tabulka 20** - 2 nápichy standardu S2 o koncentraci 0,8706 µg/ml při rychlosti průtoku 0,8 ml/min (str. 49)
- Tabulka 21** - 6 nápichů standardu S1 o koncentraci 0,8633 µg/ml při rychlosti průtoku 1,0 ml/min (str. 49)
- Tabulka 22** - 2 nápichy standardu S2 o koncentraci 0,8706 µg/ml při rychlosti průtoku 1,0 ml/min (str. 49)
- Tabulka 23** - 6 nápichů standardu S1 o koncentraci 0,8633 µg/ml při vlnové délce 237 nm (str. 50)
- Tabulka 24** - 2 nápichy standardu S2 o koncentraci 0,8706 µg/ml při vlnové délce 237 nm (str. 50)
- Tabulka 25** - 6 nápichů standardu S1 o koncentraci 0,8633 µg/ml při vlnové délce 243 nm (str. 50)
- Tabulka 26** - 2 nápichy standardu S2 o koncentraci 0,8706 µg/ml při vlnové délce 243 nm (str. 50)
- Tabulka 27** - Výsledky změny parametrů metody (str. 51)

- Tabulka 28** - 6 nápichů standardu S1 o koncentraci 0,8832 µg/ml při sonikaci 3 min (str. 52)
- Tabulka 29** - 2 nápichy standardu S2 o koncentraci 0,8676 µg/ml při sonikaci 3 min (str. 52)
- Tabulka 30** - 6 nápichů standardu S1 o koncentraci 0,8481 µg/ml při sonikaci 7 min (str. 52)
- Tabulka 31** - 2 nápichy standardu S2 o koncentraci 0,8608 µg/ml při sonikaci 7 min (str. 52)
- Tabulka 32** - Výtěžnosti roztoků vzorku stěru při sonikaci 3 min a 7 min (str. 53)
- Tabulka 33** - Výsledky změny doby vložení do ultrazvuku u přípravy standardu (str. 53)
- Tabulka 34** - Výsledky změny doby vložení do ultrazvuku u přípravy roztoků stěru vzorku (str. 53)
- Tabulka 35** - Příprava roztoků pro různé koncentrační úrovně (str. 54)
- Tabulka 36** - Koncentrace flutamidu ve zředěných roztocích připravené ze ZR1 (str. 54)
- Tabulka 37** - Koncentrace flutamidu ve zředěných roztocích připravené ze ZR2 (str. 54)
- Tabulka 38** - Analýza roztoků ZR1 a ZR2 pro stanovení linearitu (str. 55)
- Tabulka 39** - Výsledky stanovení koncentrace a plochy píku flutamidu (str. 55)
- Tabulka 40** - Příprava roztoků pro různé koncentrační úrovně pro LOD (LOQ) (str. 57)
- Tabulka 41** - Hodnoty vnesené koncentrace v připravených roztocích pro stanovení LOD (LOQ) (str. 57)
- Tabulka 42** - Výpočet S/N pro LOD dle USP a EP (str. 57)
- Tabulka 43** - Výsledky měření S/N pro LOD (str. 58)
- Tabulka 44** - Ředění roztoku pro LOD (str. 59)
- Tabulka 45** - Analýza roztoku pro limit LOD o $c = \sim 0,009$ µg/ml (str. 59)
- Tabulka 46** - Výsledky S/N roztoků flutamidu o koncentraci $c = 0,008869$ µg/ml (str. 59)
- Tabulka 47** - Ředění roztoků pro LOQ (str. 60)
- Tabulka 48** - Výpočet c (nalezené) roztoků pro LOQ (str. 60)
- Tabulka 49** - Analýza roztoků pro limit LOQ o $c = \sim 0,03$ µg/ml (str. 61)
- Tabulka 50** - Výsledky výtěžností roztoků flutamidu o koncentraci $c = \sim 0,03$ µg/ml (str. 61)
- Tabulka 51** - Navážky pro stanovení kalibrace a relativního rozdílu RF mezi S1 a S2 (str. 62)
- Tabulka 52** - 6 nápichů standardu S1 o koncentraci 0,8596 µg/ml při 20 °C v autosampleru - 1 den (str. 62)
- Tabulka 53** - 2 nápichy standardu S2 o koncentraci 0,8596 µg/ml při 20 °C v autosampleru - 1 den (str. 63)
- Tabulka 54** - 6 nápichů standardu S1 o koncentraci 0,8596 µg/ml při 5 °C v chladničce - 1 den (str. 63)
- Tabulka 55** - 2 nápichy standardu S2 o koncentraci 0,8596 µg/ml při 5 °C v chladničce - 1 den (str. 63)
- Tabulka 56** - 6 nápichů standardu S1 o koncentraci 0,8596 µg/ml při 20 °C v autosampleru - 2 dny (str. 64)

- Tabulka 57** - 2 nápichy standardu S2 o koncentraci 0,8596 µg/ml při 20 °C v autosampleru
- 2 dny (str. 63)
- Tabulka 58** - 6 nápichů standardu S1 o koncentraci 0,896 µg/ml při 5 °C v chladničce - 2 dny
(str. 64)
- Tabulka 59** - 2 nápichy standardu S2 o koncentraci 0,8596 µg/ml při 5 °C v chladničce - 2 dny
(str. 65)
- Tabulka 60** - 6 nápichů standardu S1 o koncentraci 0,8596 µg/ml při 20 °C v autosampleru
- 3 dny (str. 65)
- Tabulka 61** - 2 nápichy standardu S2 o koncentraci 0,8596 µg/ml při 20 °C v autosampleru
- 3 dny (str. 65)
- Tabulka 62** - 6 nápichů standardu S1 o koncentraci 0,896 µg/ml při 5 °C v chladničce - 3 dny
(str. 66)
- Tabulka 63** - 2 nápichy standardu S2 o koncentraci 0,8596 µg/ml při 5 °C v chladničce - 3 dny
(str. 66)
- Tabulka 64** - 6 nápichů standardu S1 o koncentraci 0,8596 µg/ml při 20 °C v autosampleru
- 4 dny (str. 66)
- Tabulka 65** - 2 nápichy standardu S2 o koncentraci 0,8596 µg/ml při 20 °C v autosampleru
- 4 dny (str. 67)
- Tabulka 66** - 6 nápichů standardu S1 o koncentraci 0,896 µg/ml při 5 °C v chladničce - 4 dny
(str. 67)
- Tabulka 67** - 2 nápichy standardu S2 o koncentraci 0,8596 µg/ml při 5 °C v chladničce - 4 dny
(str. 67)
- Tabulka 68** - 6 nápichů standardu S1 o koncentraci 0,8596 µg/ml při 20 °C v autosampleru
- 7 dní (str. 68)
- Tabulka 69** - 2 nápichy standardu S2 o koncentraci 0,8596 µg/ml při 20 °C v autosampleru
- 7 dní (str. 68)
- Tabulka 70** - 6 nápichů standardu S1 o koncentraci 0,896 µg/ml při 5 °C v chladničce - 7 dní
(str. 68)
- Tabulka 71** - 2 nápichy standardu S2 o koncentraci 0,8596 µg/ml při 5 °C v chladničce - 7 dní
(str. 69)
- Tabulka 72** - Výsledky stability roztoků standardu flutamidu S1 a S2 (str. 69)
- Tabulka 73** - Stanovení stability dokončeného roztoku vzorku stěru po 3 dnech při 20 °C
v autosampleru (str. 70)
- Tabulka 74** - Stanovení stability dokončeného roztoku vzorku stěru po 3 dnech při 5 °C
v chladničce (str. 70)
- Tabulka 75** - Stanovení stability nedokončeného roztoku vzorku stěru po 3 dnech při 5 °C
v chladničce (str. 70)
- Tabulka 76** - Výsledky analýzy stability vzorku stěru flutamidu (str. 71)
- Tabulka 77** - Stanovení RSD na základě koncentrace (str. 71)

Tabulka 78 - Stanovení relativní odchylky na základě koncentrace (str. 71)

Tabulka 79 - Analýza stanovení opakovatelnosti roztoků standardů S o koncentraci $\sim 0,85 \mu\text{g/ml}$ (str. 72)

Tabulka 80 - Výsledky výtěžností roztoků standardů S o koncentraci $\sim 0,85 \mu\text{g/ml}$ pro stanovení mezilehlé přesnosti (str. 73)

Tabulka 81 - Stanovení relativní odchylky mezi výsledky opakovatelnosti a mezilehlé přesnosti (str. 73)

Tabulka 82 - Výsledky validace analytické metody pro stanovení flutamidu (str. 76)

10 Seznam obrázků

Obr. 1 - Faktor symetrie (str. 18)

Obr. 2 - Počet teoretických pater a výpočty dle USP a EP (str. 19)

Obr. 3 - Grafické vyjádření rozlišení dvou píků (str. 19)

Obr. 4 - Strukturní vzorec flutamidu (str. 24)

Obr. 5 - Test UV detektoru (str. 27)

Obr. 6 - Regresní přímka pro stanovení linearitu (str. 56)

Obr. 7 - Regresní přímka pro stanovení LOD - závislost koncentrace na S/N (str. 58)

11 Seznam chromatogramů

Chromatogram 1 - test vhodnosti systému - pík flutamidu (str. 29)

Chromatogram 2 - chromatogram diluentu (str. 37)

Chromatogram 3 - chromatogram slepého vzorku (str. 37)

Chromatogram 4 - chromatogram standardu flutamidu $c = 0,85 \mu\text{g/ml}$ (str. 37)

Chromatogram 5 - chromatogram stěru flutamidu pro výrobní zařízení (str. 38)

Chromatogram 6 - chromatogram standardu flutamidu $c = 10 \mu\text{g/ml}$ (str. 41)

Chromatogram 7 - chromatogram stěru flutamidu pro pracovní prostředí (str. 42)

Chromatogram 8 - chromatogram mobilní fáze, diluentu a standardu flutamidu (str. 45)

Chromatogram 9 - chromatogram detergentů výrobního zařízení (str. 46)

Chromatogram 10 - chromatogram detergentů pracovního prostředí (str. 46)

Chromatogram 11 - chromatogram blank-swab (str. 46)

Chromatogram 12 - chromatogram slepých vzorků z povrchů pracovního prostředí (str. 47)

Chromatogram 13 - chromatogram slepých vzorků z výrobního zařízení (str. 47)