

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ



**Využití HPLC v analýze farmaceuticky
významných látek**

Rigorózní práce

Hradec Králové 2006

Mgr. Ludvík Ráb

Děkuji Doc. Petru Solichovi a PharmDr. Ludmile Matysové za jejich odborné vedení, cenné rady a pomoc při vypracování této rigorózní práce.

Také chci poděkovat pracovníkům na Katedře analytické chemie za ochotu, odbornou pomoc a trpělivost.

Obsah

Obsah	3
1 Úvod a cíl práce	6
1.1 Úvod a cíl práce	7
2 Teoretická část	8
2.1 Diklofenak sodný (Diclofenacum natricum)	9
2.1.1 Farmakologická charakteristika	9
2.1.2 Fyzikálně-chemická charakteristika	11
2.2 Čípky (Suppositoria)	12
2.3 Chromatografické metody	13
2.3.1 Obecné principy chromatografie	13
2.3.2 Teorie chromatografického procesu	Chyba! Záložka není definována.
2.3.3 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC)	14
2.3.3.1 Kapalinový chromatograf	16
2.3.4 Ultra performance liquid chromatography (UPLC)	21
2.4 Validace analytických metod	22
2.4.1 Přesnost (Precision)	23
2.4.2 Správnost (Accuracy)	24
2.4.3 Limit detekce (LOD)	25
2.4.4 Limit kvantifikace (LOQ)	25
2.4.5 Selektivita/Specifita	25
2.4.6 Linearita a rozsah	26
2.4.7 Odolnost	26
2.4.8 Robustnost	26
2.4.9 Testování způsobilosti systému (System suitability tests – SST)	27
2.4.9.1 Dělicí účinnost systému (počet teoretických pater)	27
2.4.9.2 Asymetrie chromatografického píku (chvostování píku = tailing)	28
2.4.9.3 Rozlišení chromatografických píků	28
2.4.9.4 Opakovatelnost analýzy (Instrument precision)	28
2.4.9.5 Stabilita standardů a vzorků	29
2.5 Analytické hodnocení diklofenaku	29
2.5.1 HPLC hodnocení diklofenaku	29
2.5.1.1 Lékopisné HPLC hodnocení diklofenaku	29
2.5.1.2 HPLC hodnocení v léčivých přípravcích	31
2.5.1.3 HPLC hodnocení diklofenaku v biologických materiálech	31
2.5.1.4 HPLC hodnocení diklofenaku v ostatních materiálech	31
2.5.2 Ostatní analytické metody	37
2.5.2.1 Využití při analýze diklofenaku v léčivých přípravcích	37
2.5.2.2 Využití při analýze diklofenaku v biologických materiálech	37
2.5.2.3 Využití při analýze diklofenaku v ostatních maeriálech	37
3 Experimentální část	40
3.1 Přístrojové vybavení	41
3.2 Chemikálie	41
3.2.1 Příprava zásobních a pracovních roztoků	41
3.3 Vývoj metody – optimalizace chromatografických podmínek	42
3.4 Příprava vzorku	42
4 Výsledky a diskuse	43
4.1 Vývoj metody – optimalizace chromatografických podmínek	44
4.1.1 Vlnová délka detektoru.....	44

4.1.2	Optimální chromatografické podmínky - souhrn	45
4.2	Příprava vzorku	45
4.3	Validace metody	51
4.3.1	Testování způsobilosti chromatografického systému	51
4.3.1.1	Účinnost kolony	51
4.3.1.2	Asymetrie chromatografických píků	51
4.3.1.3	Rozlišení chromatografických píků	52
4.3.1.4	Opakovatelnost analýzy	52
4.3.2	Přesnost	53
4.3.3	Správnost	54
4.3.4	Selektivita	55
5	Závěr	57
6	Seznam zkratk	59
7	Literatura	61

1 Úvod a cíl práce

1.1 Úvod a cíl práce

K dosažení základních cílů farmacie, tj. zajištění kvality, účinnosti a bezpečnosti léčiva nebo léčivého přípravku, nám slouží mnoho analytických metod, které se liší svým principem, náročností provedení, citlivostí a selektivitou.

Většina léčivých přípravků je složena z mnoha různých chemických substancí, a proto jsou výhodné zejména ty metody, které umožňují separaci jednotlivých složek léčivého přípravku a jejich následnou identifikaci a kvantifikaci. Takovou metodou je právě vysokoúčinná kapalinová chromatografie (High Performance Liquid Chromatography – HPLC), která je díky svojí vysoké variabilitě, selektivitě a citlivosti velmi často využívanou analytickou metodou pro analýzu chemických individuí.

Cílem této práce bylo vyvinout izolační postup diklofenaku z přípravku VERAL[®] čípky firmy Herbacos Bofarma a následně provést i validaci této metody.

2 Teoretická část

2.1 Diklofenak sodný (*Diclofenacum natrium*)

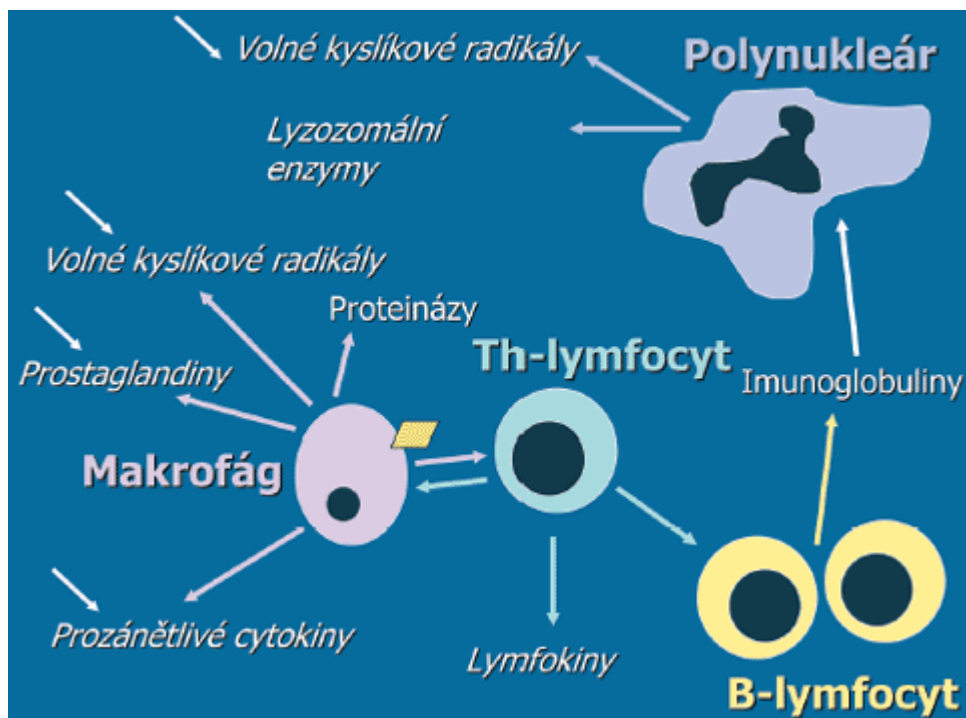
2.1.1 Farmakologická charakteristika

Diklofenak je nesteroidní antirevmatikum (NSAID) [1]. Nesteroidní antirevmatika jsou skupina látek, které mají antiflogistický, analgetický, antipyretický a některé i antiagregační působení. Na rozdíl od analgetik opiátového typu nejsou nesteroidní antirevmatika (NSAID) návyková. Diklofenak byl zaveden do praxe v sedmdesátých letech [2].

Diklofenak je nejužívanější látkou této skupiny se středně silným protizánětlivým, dobrým analgetickým a mírným antipyretickým účinkem [3].

Diklofenak a ostatní NSAID inhibují cyklooxygenázu, enzym zodpovědný za syntézu prostaglandinů, jež jsou vytvářeny v ohnisku zánětu a jsou zdrojem lokálních projevů zánětu jako je hyperémie, otok, zvýšená teplota, bolestivost apod. Mimo to však plní prostaglandiny celou řadu fyziologických funkcí (např. ochrana žaludeční sliznice, regulace mikrocirkulace v ledvinách, regulace funkce destiček atd.). Deplece těchto tzv. konstitučních prostaglandinů pak vede k nežádoucím projevům léčby NSAID [2].

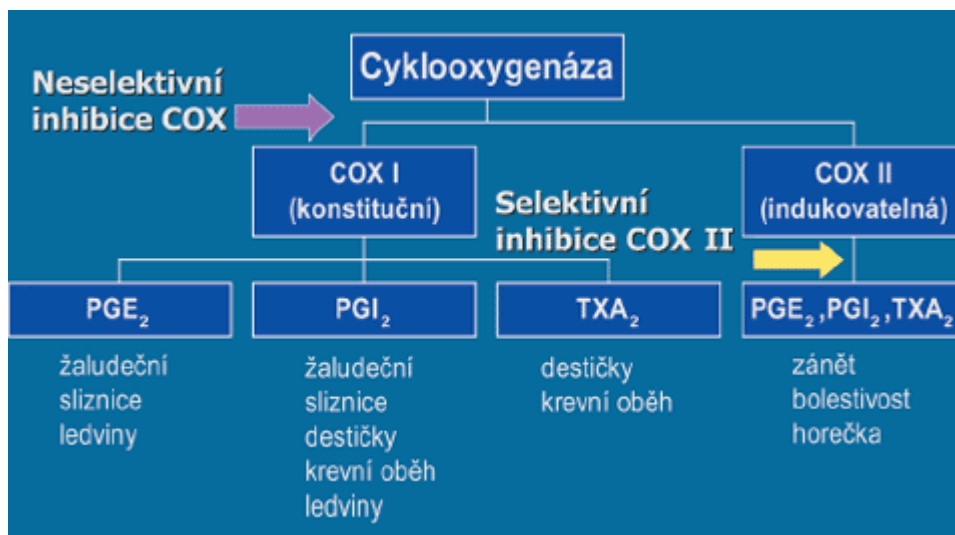
Obr. 1: Mechanismus vzniku zánětu



Enzym cyklooxygenáza má dvě izoformy: tzv. konstituční cyklooxygenázu I (COX I – vyskytuje se v těle fyziologicky) a indukovatelnou cyklooxygenázu II (COX

II – je exprimována zejména za některých patologických stavů, např. v místě zánětu). Podle afinity k cyklooxygenázám dělíme NSAID do tří skupin na neselektivní, preferenční a selektivní inhibitory COX II. Do skupiny neselektivních NSAID se v současné době řadí všechna tradiční NSAID, tedy i [2] diklofenak.

Obr. 2: Mechanismus účinku NSAID



Diklofenak se hromadí v synoviální tekutině.[3] Diklofenak se používá u akutních i chronických zánětlivých nebo degenerativních onemocnění kloubů a páteře (např. u revmatoidní artritidy nebo osteoartrózy). Zmírňuje projevy mimokloubního revmatismu, pooperačních a poúrazových zánětů [1]. Terapeuticky je vhodný i při akutních svalových bolestech a lze jej použít rovněž jako běžné analgetikum [3].

Je kontraindikován při přecitlivělosti na diklofenak či jiné protizánětlivé léky. Dále pak při žaludečních vředech nebo při zánětlivých onemocněních tlustého střeva. Podání dětem mladším 1 roku, v poslední třetině těhotenství a v období kojení je také kontraindikováno.[1]

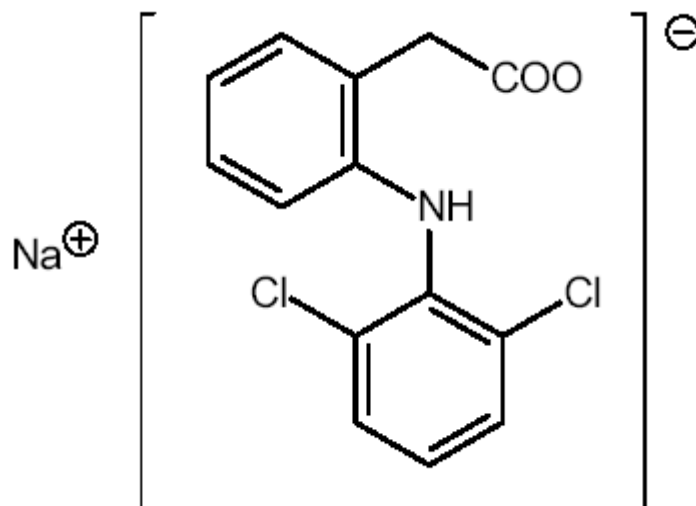
Vyrábí se jak v retardovaných formách, tak v lékových formách s rychlým nástupem účinku.[3] Obvyklá perorální dávka pro dospělé je 25-50 mg 1-3 krát denně. Obvyklá dávka pro děti ve věku 1-6 let je 0,5-3 mg/kg/den podaná ve 2-3 dílčích dávkách. Obvyklá dávka pro děti starší 6 let je 2 mg/kg/den podaná ve 2 dílčích dávkách. Čípky se podávají dospělým i mladistvým starším 15 let v dávce 50 mg jedenkrát denně. Ve formě čípků má rychlejší nástup účinku [1]. Diklofenak lze podávat i pomocí topických léčivých přípravků (masti, gely), kde se využívá jeho analgetického a antiflogistického účinku [4][5].

2.1.2 Fyzikálně-chemická charakteristika

Diklofenak patří mezi deriváty kyseliny octové [3].

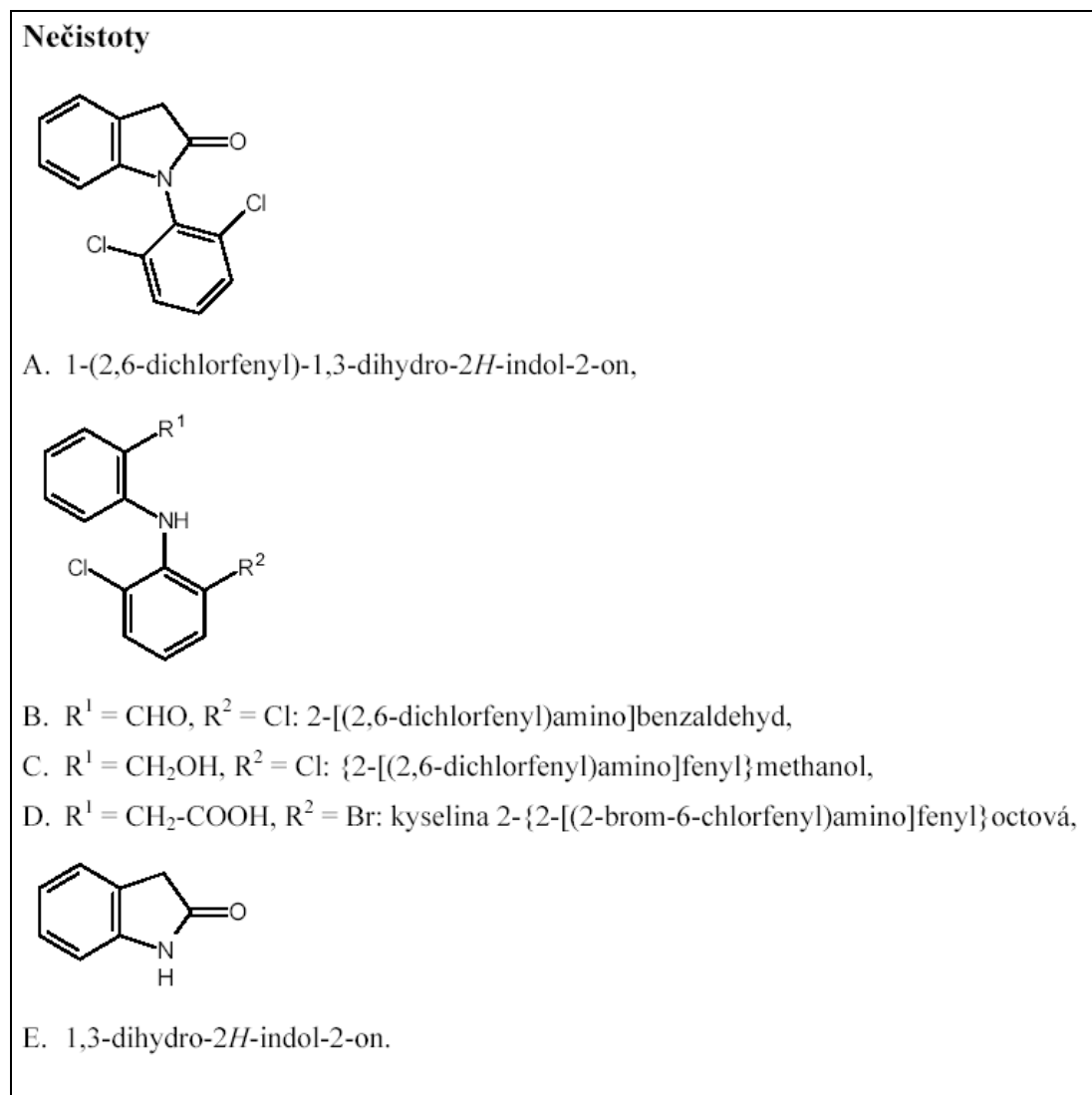
Je to natrium-{2-[(2,6-dichlorfenyl)amino]fenyl}acetát. Počítáno na vysušenou látku, obsahuje 99,0 % až 101,0 % sloučeniny $C_{14}H_{10}Cl_2NNaO_2$ (viz Obr.3).

Obr. 3: Vzorec diklofenaku sodného



Je to bílý nebo slabě nažloutlý krystalický slabě hygroskopický prášek. Je mírně rozpustný ve vodě, snadno rozpustný v methanolu, dobře rozpustný v lihu 96% a těžce rozpustný v acetonu [6].

Obr. 4: Lékopisné nečistoty diklofenaku sodného



2.2 Čípky (*Suppositoria*)

Čípky jsou tuhé, tvarově specifické jednodávkové léky, které jsou tvarem (válcovitý, torpédovitý), hmotností (1-3g) a konzistencí přizpůsobivé rektálnímu podání. Obsahují jedno nebo více léčiv, které jsou v čípkovém základu dispergované. Čípkový základ taje při tělesné teplotě nebo je rozpustný.

Jako čípkové základy se používají lipofilní i hydrofilní léky v průmyslové výrobě hlavně triglyceridy.

Dále se v čípcích můžeme setkat s látkami zvyšujícími teplotu tání, zvyšujícími viskozitu, tenzidy, barvivy, konzervačními a stabilizačními látkami.

V hromadné výrobě se čípky formují odléváním do forem nebo odléváním do tvarované fólie, která slouží současně jako vnitřní obal [7].

2.3 Chromatografické metody

2.3.1 Obecné principy chromatografie

Chromatografické metody jsou vysoce účinné separační metody, sloužící k oddělení analyzovaných složek ze směsi a zároveň jejich kvalitativní i kvantitativní analýze. Jejich přednosti vyniknou především při analýzách směsí látek, kdy ostatní analytické metody, jako např. spektrofotometrické, nelze principiálně použít. Jelikož veškeré technické produkty a velká většina přírodních látek jsou složité směsi, mají chromatografické metody analýzy prvořadý význam [8].

Chromatografie je separační proces, při němž se využívá mnohokrát opakované ustanovení rovnováhy mezi dvěma nemísitelnými fázemi, jednou pohyblivou (tzv. mobilní fází; plyn nebo kapalina) a druhou nepohyblivou (tzv. stacionární fází; tuhá látka nebo kapalina) [9][10]. Při styku stacionární a mobilní fáze s dělenými látkami dochází k vzájemným interakcím, které jsou základním předpokladem pro jejich úspěšnou separaci. Interakce dělených látek se stacionární a mobilní fází má rozdílnou kvantitu, tj. velikost vzájemně působících sil, i kvalitu, tj. povahu interakcí [11]. Látky, které interagují silněji se stacionární fází se pohybují pomaleji než ty, které interagují slaběji [9].

Chromatografické metody můžeme dělit:

1. Dle povahy separačního děje
 - adsorpční
 - rozdělovací
 - iontovýměnná
 - na molekulových sítích
2. Dle použité techniky
 - sloupcová
 - papírová
 - na tenké vrstvě
3. Dle skupenství mobilní fáze
 - kapalinová
 - plynová
4. Dle způsobu vyvíjení
 - eluční

- vytěšňovací
- frontální [8][9][10][11]

V dnešní době je nejdůležitější separační a analytickou metodou vysokoúčinná kapalinová chromatografie (High Performance Liquid Chromatography – HPLC). V analýze těkavých látek má velký význam plynová chromatografie (Gas Chromatography – GC). V toxikologickém screeningu a při stanovení nečistot má velkou roli kapalinová chromatografie na tenké vrstvě (Thin Layer Chromatography – TLC) [12][13].

2.3.2 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC)

Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (High performance liquid chromatography – HPLC) je v současné době jedna z nejprogresivnějších analytických metodik, která nachází stále větší uplatnění ve všech oblastech analýzy léčiv.[14] Díky své univerzálnosti a široké možnosti aplikace, je HPLC nejvíce užívanou separační metodou [15].

Hlavní přednosti HPLC

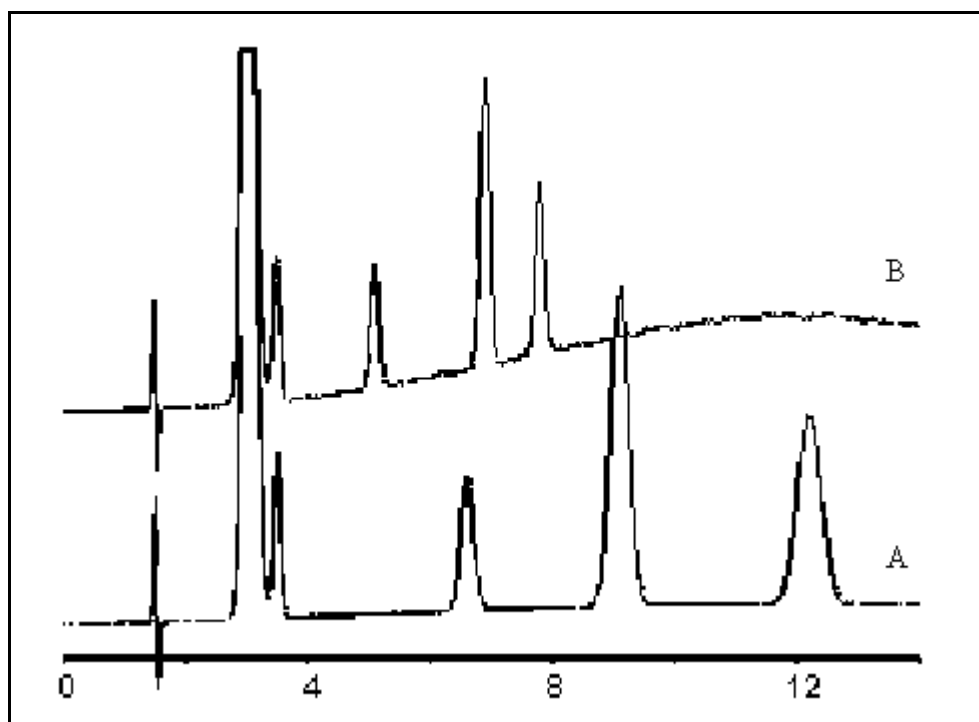
Svou podstatou se jedná o separační metodu, která umožňuje kvalitativní i kvantitativní hodnocení separovaných složek směsi. Přednostmi HPLC jsou rychlost analýzy, citlivost stanovení, to že pro analýzu postačuje minimální množství vzorku a také možnost automatizace (po vhodném nastavení parametrů lze provádět desítky analýz bez obsluhy) [14].

Dle relativní polaritativy stacionární a mobilní fáze jsou rozlišovány dva typy provádění HPLC a to chromatografie na normálních fázích a na reverzních fázích.

1. *chromatografie na normálních fázích* – stacionární fáze je silně polární (např. silikagel) a mobilní fáze je nepolární (n-hexan, tetrahydrofuran).
2. *chromatografie na reverzních fázích* – stacionární fáze je nepolární (hydrofobní), kdežto mobilní fáze je polární kapalina, jako např. směs vody, methanolu nebo acetonitrilu.

Polarita mobilní fáze má významnou úlohu v HPLC. Jsou dva typy eluce – izokratická a gradientová. V prvním případě je složení mobilní fáze konstantní a je užíváno v průběhu celé analýzy. Ve druhém případě se složení mobilní fáze mění plynule nebo skokem v průběhu analýzy (viz Obr.5) [17].

Obr. 5: Chromatogramy z analýzy čtyř sloučenin: (A) je isokratická eluce, (B) je gradientová eluce [17]



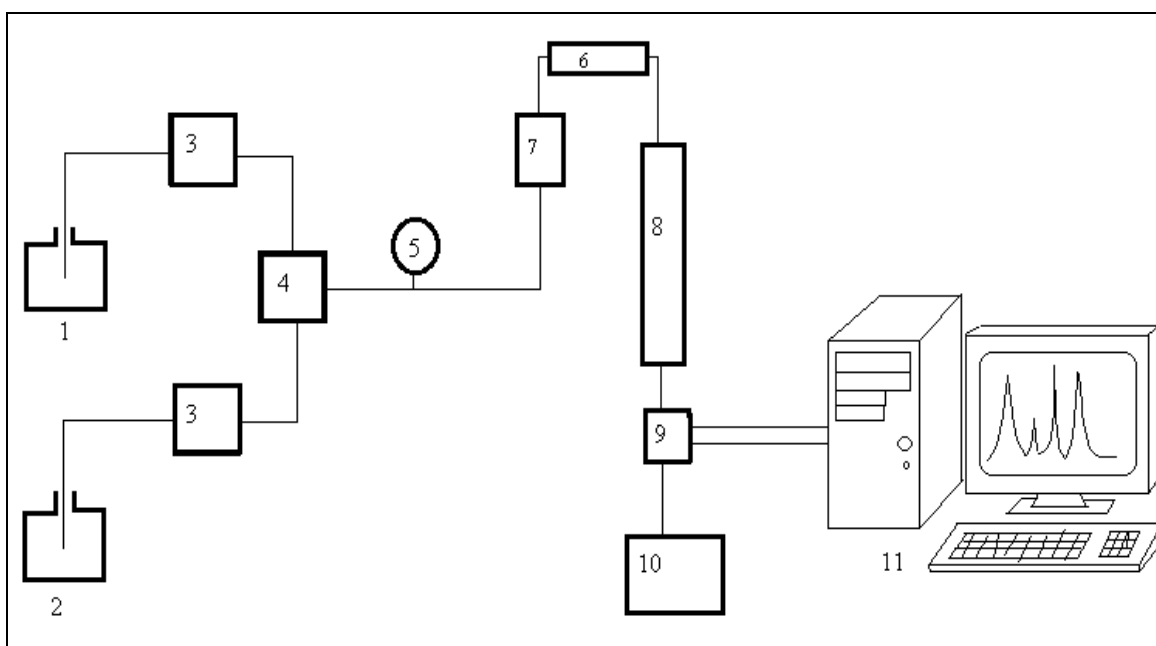
Předpokladem úspěšné HPLC analýzy je optimalizace chromatografických podmínek tak, aby jednotlivé separované složky směsi poskytovaly ostré a symetrické chromatografické píky, rozdělené pokud možno až na základní linii.

Základní kvalitativní charakteristikou v HPLC je retenční (eluční) čas t_R , což je čas od nástřiku vzorku na kolonu k maximu chromatografického píku. Nejčastějším důkazem totožnosti je shoda retenčních časů chromatografického píku léčiva v analyzovaném vzorku s retenčním časem píku standardu. Kvantitativní charakteristikou v HPLC je plocha (event. výška) chromatografického píku [14].

2.3.2.1 Kapalinový chromatograf

Sestava kapalinového chromatografu je buď stavebnicového typu (jednotlivé součásti jsou odděleny, dají se přestavovat, případně spojovat s přídatnými zařízeními) nebo kompaktní konstrukce (uspořádání jednotlivých komponent je fixní). Kapalinový chromatograf se skládá z částí, které zabezpečují průchod mobilní fáze, dávkování vzorku, separaci látek, jejich detekci a vyhodnocení výsledků analýzy [12]. Základní součásti sestavy jsou znázorněny na schématu (viz Obr.6).

Obr. 6: Schéma kapalinového chromatografu



Jsou to: zásobníky mobilní fáze (1,2), vysokotlaké čerpadlo (3), směšovač (4), manometr (5), předkolona (6), dávkovací zařízení (7), kolona (8), detektor (9), sběrač frakcí (10), počítač (11). Přítomen může být ještě odplyňovač mobilní fáze (degasser), případně více za sebou spojených detektorů [8].

Kolony

HPLC kolony můžeme rozdělit na analytické, preparativní a mikrokolony.[16] HPLC chromatografické kolony pro analytické účely jsou nejčastěji dlouhé 10 – 25 cm o vnitřním průměru 3 – 5 mm, jsou zpravidla zhotoveny z nerezové oceli nebo skla. Kolony jsou naplněny vhodnými sorbenty. V HPLC se nejčastěji používají tzv. chemicky vázané stacionární fáze. Na hydroxylové skupiny na povrchu silikagelových zrněk jsou vhodnou chemickou reakcí navázány různé radikály. Nejčastěji se jedná

o uhlovodíkové řetězce obsahující zpravidla 18 (případně 8) uhlíkových atomů. Jde o nepolární chemicky vázané fáze (tzv. reverzní fáze). Radikál obsahuje tříuhlíkatý řetězec zakončený skupinami $-NH_2$, $-CN$ aj. Jde o středně polární fáze.

Jako HPLC sorbenty se rovněž používají silikagel a oxid hlinitý (polární sorbenty), i když daleko méně než chemicky vázané stacionární fáze. Pro potřeby iontově výměnné chromatografie se jako sorbenty používají vhodné ionexy. V současné době jsou již běžně dostupné různé typy chirálních stacionárních fází [14].

Detektory

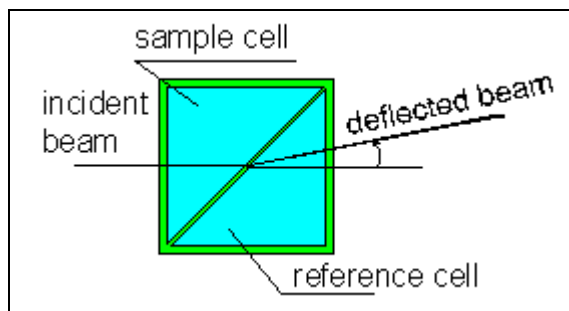
Funkcí HPLC detektoru je monitorování mobilní fáze vycházející z kolony. Výstup detektoru je signál, který je úměrný koncentraci látky přítomné v eluátu. K detekci separovaných látek se zpravidla využívá jejich obecných nebo specifických vlastností, jimiž se tyto látky liší od mobilní fáze. Citlivost detektoru je limitací citlivosti analytické metody.

Požadavky na používané detektory jsou:

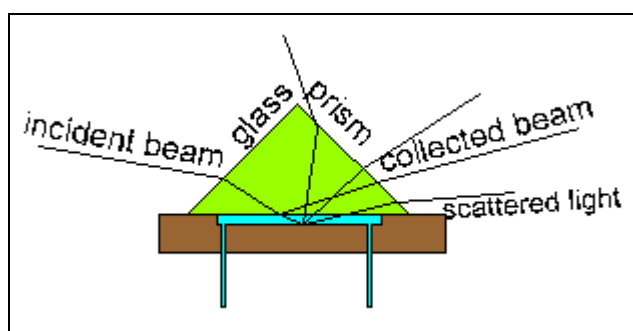
- univerzální nebo selektivní odpověď
- citlivost
- linearita (odpověď detektoru je přímo úměrná koncentraci látky)
- co nejmenší ovlivnění detektoru vnějšími podmínkami (teplota, složení mobilní fáze)
- nedestruktivnost
- spolehlivost, jednoduchost manipulace, přiměřená cena
- minimální mrtvý objem

1. *refraktometrický detektor* (viz Obr.7 – 8)– měří rozdílný index lomu mezi čistou mobilní fází a eluátem vytékajícím z kolony, obsahujícím analyzovanou látku [14]. Čím větší rozdíl indexu lomu mezi vzorkem a čistou mobilní fází, tím větší odezva. Jakákoli změna složení mobilní fáze vyžaduje znovu nastavení detektoru [18]. Jsou to univerzální detektory s citlivostí 10^{-6} g/ml. Nedají se použít při gradientové eluci [14][18].

Obr. 7: Výhylkový detektor[17]



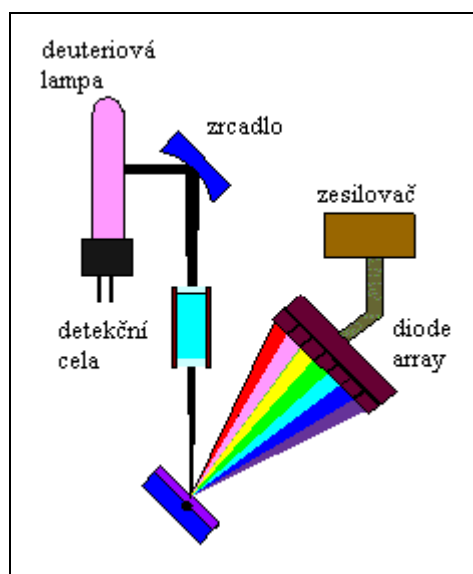
Obr. 8: Odrazový detektor



2. *spektrofotometrické detektory* – proměřují absorbované elektromagnetické záření určité vlnové délky složkami eluátu protékajícím celou detektorem [14]. Nejvíce užívané jsou detektory pracující v rozmezí 200 – 600 nm (UV-VIS).
- detektor s fixní vlnovou délkou – měří při jedné vlnové délce. Obvykle 254 nm.
 - Detektor s proměnnou vlnovou délkou – je možné nastavit vlnovou délku dle potřeby [18].
 - Scanning UV detektor – snímající během několika sekund absorpční spektrum v maximu píku hodnoceného léčiva [14].
 - Diode-array detektor (DAD) (viz Obr.9) – měří celé spektrum vlnových délek[18], trojrozměrná projekce [17][14][17].

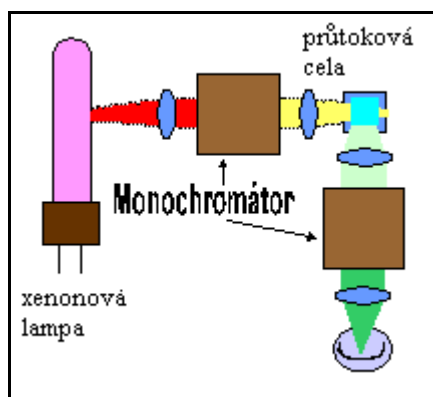
Citlivost $10^{-9} - 10^{-10}$ g/ml.

Obr. 9: Diode-array detektor [17]



3. *fluorimetrický detektor* (viz Obr.10) – jsou to jedny z nejcitlivějších detektorů ve spektru současných HPLC detektorů [17]. Jsou vhodné v případech, kdy analyzované léčivo (rozkladný produkt nebo metabolit) vykazuje fluorescenci [14]. Jsou schopné detekovat i jen jedinou molekulu v průtokové cele [17], citlivost mají $10^{-9} - 10^{-12}$ g/ml.[14] Jsou to selektivní detektory [17].

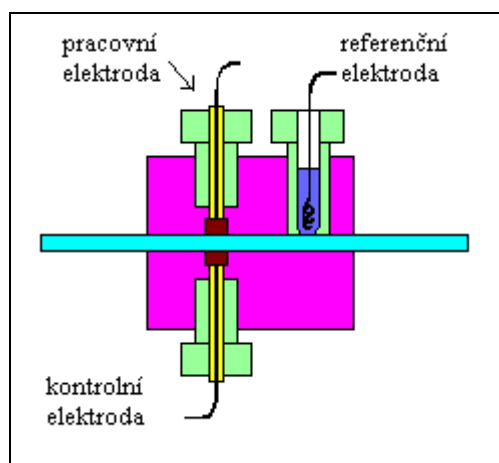
Obr. 10: Fluorimetrický detektor



4. *radiochemický detektor* – vyžaduje užívání radiochemicky značeného materiálu, především tritiem (^3H) nebo uhlíkem ^{14}C . Nejvíce se užívá v metabolickém výzkumu. Detekční limit je $10^{-9} - 10^{-10}$ g/ml [18].
5. *elektrochemické detektory* (viz Obr.11) – proměřují elektrochemickou veličinu, jejíž hodnota je závislá na koncentraci analyzovaného léčiva [14]. Stanovují se jimi sloučeniny podléhající oxidaci nebo redukci. Velice důležitá

je čistota mobilní fáze, protože přítomnost kyslíku či kontaminace kovy způsobují výrazné šумы při detekci. Jedná se o selektivní detektor, detekční limit je $10^{-12} - 10^{-13}$ g/ml [17][18]. Řadí se sem voltametrický, amperometrický a polarografický detektor.

Obr. 11: Elektrochemický detektor



6. *hmotnostně spektrometrický (MS)* – molekula vzorku je ionizována [18]. Nabité částice jsou v magnetickém poli separovány podle hmotnosti a náboje a zaznamenává se hmotnostní spektrum [14].

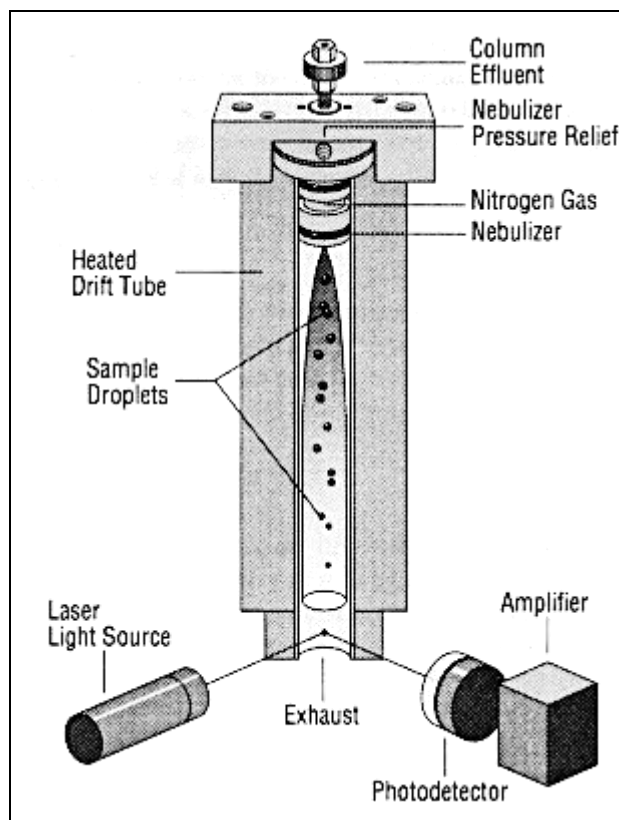
Je několik možností ionizace:

- a) nárazy elektronů – elektron nebo proud elektronů utvořený pod vysokým napětím se využívá k ionizaci vzorku vystupujícího z kolony
- b) chemická ionizace – méně agresivní metoda užívající ionizovaný plyn.
- c) ostřelování rychlými atomy – využívají se atomy xenonu hnané vysokou rychlostí

Detekční limit je $10^{-8} - 10^{-10}$ g/ml [18].

7. *NMR (nukleární magnetická rezonance)* – využívá principu působení magnetického pole na jádra atomů. Především se jedná o jádra atomů vodíku ^1H a jádra atomů uhlíku ^{13}C [18].
8. *light scattering detektor (viz Obr.12)* – pracuje na principu nefelometrie anebo turbidimetrie. Měří se záření rozptýlené částicemi vzorku. Je nutná nebulizace eluátu z kolony do aerosolu, následované odpařením rozpouštědla k vytvoření malých částíček zkoumané látky. Tyto jsou detekovány v cele detektoru [17][18].

Obr. 12: Light-scattering detektor



9. *infračervený detektor* - zaznamenává se transmitance a detekční limit je 10^{-6} g/ml [14].

Nejpoužívanější detektory pracují na principu fotometrickém v ultrafialové (a viditelné) oblasti. Následují detektory fluorimetrické, elektrometrické a refraktometrické. Velkého významu v současnosti nabývají detektory hmotnostně spektrometrické.

2.3.3 *Ultra performance liquid chromatography (UPLC)*

UPLC je relativně nová technika dávající nové možnosti v kapalinové chromatografii především s ohledem na zkrácení doby analýzy a snížení spotřeby rozpouštědel. UPLC chromatografický systém je vyvinut speciálně, aby odolával vysokým zpětným tlakům v systému. Ve spojení s tímto systémem se užívají speciální analytické kolony UPLC Acquity UPLC BEH C18 plněné částicemi o průměru $1,7\mu\text{m}$ [19].

Pro využití těchto sub-2 mikronových částic je využíván tlak až 100,0 MPa. Klasická HPLC technologie nedokáže plně využít výhod těchto sub-2 mikronových částic.

Nově vyvinutý systém ACQUITY UPLC poskytuje významně vyšší rozlišení, přičemž jsou redukovány retenční časy a zlepšuje se citlivost pro analýzu mnoha látek **Chyba! Nenalezen zdroj odkazů..**

UPLC je velmi vhodnou alternativou HPLC, zejména ve vysoce produktivních analytických laboratořích, jako jsou např. farmaceutické laboratoře.

Přenos metod mezi HPLC a UPLC je velmi jednoduchý, protože v UPLC jsou zachovány stejné mechanismy separace a chromatografické principy jako v HPLC, přičemž dojde ke zlepšení citlivosti i rozlišení a také k urychlení analýzy [21].

2.4 Validace analytických metod

Validace analytických metod je definována jako proces určení způsobilosti dané metody poskytovat použitelná analytická data. Validace se primárně zabývá identifikací zdrojů potenciálních chyb a jejich kvantifikací [22].

Metodikou validací se zabývají tři významné autority: ICH (International Conference of Harmonisation) [22][23][24][25][26][27][28], USP (United States Pharmacopoeia) [29] a Státní ústav pro kontrolu léčiv (SÚKL) [30], které se snaží sjednotit terminologii a metodiku validací. SÚKL se při validaci HPLC řídí metodikou ICH [30]. Metodikou validací se také zabývá Český lékopis 2002 [6].

V tabulce *Tab.1.* jsou uvedeny validační charakteristiky tak, jak jsou užívány v jednotlivých konvencích dle ICH, USP a SÚKL.

Tab. 1: Validační parametry - porovnání [23][30]

<i>SÚKL</i>	<i>USP XXIII</i>	<i>ICH</i>	<i>Parametry</i>
+	+	+	Přesnost (Precision)
+	+	+	Správnost (Accuracy)
+	+	+	Limit detekce
+	+	+	Limit kvantifikace
+	+	+	Selektivita/Specifika
+	+	+	Linearita a rozsah
-	+	-	Odolnost (Ruggedness)
+	+	+	Robustnost
-	-	+	Způsobilost systému (System suitability tests)

ICH řadí testování způsobilosti systému (System suitability tests) přímo do metodiky validace, kdežto USP a SÚKL má tuto problematiku vyčleněnu mimo metodiku validace, ale i přesto je její nedílnou součástí.

2.4.1 Přesnost (*Precision*)

Přesnost analytické metody představuje těsnost souhlasu (stupeň rozptylu) v sérii měření získaných z několika měření stejného homogenního vzorku za předepsaných podmínek [26]. Přesnost dle ICH a SÚKL zahrnuje tři součásti: opakovatelnost (repeatability), intermediární přesnost (intermediate precision) a reprodukovatelnost (reproducibility). Odolnost, jak je definována v USP XXIII, slučuje pojmy popsané pod termíny střední přesnost, reprodukovatelnost a robustnost [27].

1. opakovatelnost – vyjadřuje přesnost změřenou za stejných podmínek (jeden analytik, jeden přístroj [28]) v krátkém časovém intervalu. Bývá také nazývána intralaboratorní (intra-assay) přesnost (různí analytici a přístroje) [26].

2. střední přesnost – je definována ICH a SÚKL jako dlouhodobá variabilita v měření a je vymezena srovnáním výsledků z průběhu metody v jedné laboratoři během několika týdnů [28].

3. reprodukovatelnost – vyjadřuje přesnost mezi laboratořemi [26]. Cílem je ověřit, že metoda bude dávat stejné výsledky v různých laboratořích [28].

Připraví se šest roztoků analyzované látky a nastříkne se do chromatografu. Změří se odpovídající plochy píků (A_i) pro hlavní látku i pro přítomné vedlejší látky a získané hodnoty se použijí pro výpočet průměrné hodnoty (A_p) a směrodatné odchylky (s) podle vzorce:

$$A_p = \frac{(\sum A_i)}{n} \quad s = \sqrt{\left\{ \frac{\sum (A_i - A_p)^2}{(n-1)} \right\}} \quad s_R = \frac{100 \cdot s}{A_p}$$

Požadavek je $s_R < 1\%$ pro hlavní látku a $s_R < 5\%$ pro vedlejší látky (ty jsou ve vzorku v 0,1 – 1,0%-ním množství) [24][25][29][31].

2.4.2 Správnost (Accuracy)

Správnost analytické metody je těsnost souhlasu mezi naměřenou hodnotou a hodnotou uznanou jako smluvní pravdivou hodnotu nebo jako referenční hodnotu [22].

Vymezení správnosti obvykle vyžaduje právě referenční hodnotu, což je známý obsah látky nebo obsah zjištěný uznanou metodou jejíž správnost je zaručena.

Správnost metody se testuje pomocí standardního přídatku účinné látky, pokud látka interferuje s maticí; její známá koncentrace je C_0 , koncentrace stanovená u modelového vzorku je C_i . Statisticky se správnost testuje pomocí výtěžnosti R .

$$R_i(\%) = \frac{100 \cdot c_i}{c_0} \quad R_p = \frac{(\sum R_i)}{n} \quad s = \sqrt{\left\{ \frac{\sum (R_i - R_p)^2}{(n-1)} \right\}}$$

$$s_T = \sqrt{\left\{ \frac{\sum (R_i - 100)^2}{n} \right\}}$$

$$\text{Interval spolehlivosti (95\%)} \Rightarrow c_i = \frac{t \cdot s}{\sqrt{n}}$$

t ...kvantil Studentova rozdělení pro hladinu významnosti 0,95 a (n-1) stupňů volnosti

Požadavek je, aby číslo 100 bylo v intervalu $R_p \pm c_I$ a $s_T < 5\%$ pro stanovenou hlavní látku ve farmaceutickém přípravku [24][25][29][31].

2.4.3 Limit detekce (LOD)

Je to koncentrace analytu, která vyvolá vzrůst signálu, jenž je významně odlišný od negativní kontroly nebo slepého vzorku. LOD je nejnižší koncentrace analytu, která je odlišitelná od pozadí [22]. V chromatografii je to pík s výškou alespoň 2 – 3 krát větší než je šum základní linie [28](trojnásobek směrodatné odchylky slepého pokusu - šum) [29].

2.4.4 Limit kvantifikace (LOQ)

Limit kvantifikace jednotlivé analytické metody je nejmenší množství analytu ve vzorku, které může být kvantitativně určeno s vhodnou přesností a správností. Limit kvantifikace je parametrem kvantitativních zkoušek pro malá množství látek v matrici vzorku a užívá se zejména pro analýzu nečistot a degradačních produktů [26].

Definuje se jako desetinásobek směrodatné odchylky šumu.

Směrodatnou odchylku šumu lze odhadnout při měření placebo ze záznamu šumu v okolí retenčního času stanovované látky. Středem šumu se narýsuje nulová linie a od ní se změří největší kladná (r^+) a záporná (r^-) amplituda šumu.

$$s_n = \frac{(r^+ - r^-)}{5}$$

V okolí retenčního času analyzované látky se odečte amplituda 100 bodů a označí se jako y . Jako x se označí řada čísel od 1 do 100 a pomocí lineární regrese se vypočítají parametry b_0 a b_1 . Z hodnot y a reprodukovaných hodnot Y se vypočítají reziduály ε

$$s_n = 0,1 \cdot \sqrt{\sum \varepsilon^2} \quad [24][25][29][31]$$

2.4.5 Selektivita/Specifita

Termíny selektivita a specifita jsou často užívány střídavě [26].

Specifita metody definuje způsobilost metody měřit analyt s vyloučením vlivu ostatních důležitých komponent.

Selektivita popisuje způsobilost analytické metody odlišit různé látky ve vzorku [28].

Testuje se tak, že se připraví jeden roztok standardu analyzované látky s přídatkem asi 5% látek vedlejších. Třikrát se nastříkne, vypočítá se průměrná hodnota plochy A_I a selektivita S_L se vypočte:

$$S_L(\%) = \frac{100 \cdot (A_0 - A_I)}{A_0}$$

A_0 ...plocha vypočítaná pro odpovídající koncentraci hlavní látky či z parametrů regresní funkce z testu linearit

Požadavek je, aby selektivita byla $S_L > 99\%$.

V HPLC se selektivita zjišťuje porovnáním chromatogramů roztoku standardů a placebo. Zjišťuje se, zda se na záznamu placebo nevyskytují interferující píky v retenčních časech stanovovaných látek [24][25][29][31].

2.4.6 Linearita a rozsah

Linearita analytické metody je její způsobilost zjišťovat výsledky, které jsou přesné nebo ve smyslu dobře definované matematické transformace úměrné koncentraci analytu ve vzorku v daném rozmezí. Linearita je vymezena sérií 3 – 6 nástřiků pěti nebo více standardů, jejichž koncentrace je v rozmezí 80 – 120% očekávané koncentrace [28] nebo 50 – 150%. Výsledky se zpracovávají standardním postupem pro lineární regresi [24][25][29][31].

Rozsah metody je oblast mezi nejnižší a nejvyšší hodnotou kvantifikace. V rozsahu metody jsou výsledky správné, přesné a lineární [22].

2.4.7 Odolnost

Odolnost je reprodukovatelnost výsledků identického vzorku za normálních (ale proměnlivých) testovacích podmínek [22].

2.4.8 Robustnost

Robustnost procedury je měření její kapacity zůstat nedotčená malými záměrnými změnami parametrů metody a poskytuje údaj o spolehlivosti

při normálním použití [22] nebo-li metoda je robustní, jestliže přesnost stanovení není ovlivněna malými změnami pracovních podmínek [29].

Pro vymezení robustnosti chromatografické metody se mění určité parametry: průtok, teplota kolony, nastříkovaný objem, vlnová délka detekce nebo složení mobilní fáze, a to v reálném rozmezí a vymezení se kvantitativní vliv změn.

Připraví se jeden vzorek standardu analyzované látky, osmkrát se nastříkne a změří se odpovídající plochy píku A_i . Před každým nástřikem se změní pracovní podmínky podle parciálního faktorového experimentu.

Vyhodnocení efektu jednotlivých proměnných se provede tak, že se sečtou plochy $P1 - P8$ se znaménky v příslušném řádku a výsledek se vydělí 8. Podstatou hodnocení je vícenásobná regrese [24][25][29][31].

2.4.9 Testování způsobilosti systému (*System suitability tests – SST*)

SST je nedílnou součástí mnoha analytických postupů [32]. SST jsou založeny na konceptu, že přístroje, elektronika, analytické operace a vzorky k analýze představují jeden celek a mají tak být i hodnoceny.

Je to číselné prokázání toho, že navržený analytický postup byl zvolen správně [22].

2.4.9.1 Dělicí účinnost systému (počet teoretických pater)

V inflexních bodech chromatografického píku se vedou tečny až protnou základní linii; tím na ní vznikne úsečka w . Z vrcholu píku se spustí kolmice na základní linii; průsečík označuje retenční čas t_R . Počet pater N :

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

w_h ...šířka píku v polovině výšky

Požadavek na 10-cm kolonu je $N > 1\,500$ [24][25][29][31].

2.4.9.2 Asymetrie chromatografického píku (chvostování píku = tailing)

Tato veličina vyjadřuje symetričnost chromatografického píku.

Ve vzdálenosti 5% výšky píku se vede rovnoběžka se základní linií. Úsečka $w_{0,05}$, která vznikne protnutím ramen píku je rozdělena kolmicí spuštěnou z vrcholu na dvě části: menší část se označí f a asymetrie (T) se vypočte:

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

Pro symetrický pík je $T=1$ a tato hodnota se zvětšuje s rostoucí asymetrií. Požadavek je $T < 2,0$ pro HPLC [24][25][29][31].

2.4.9.3 Rozlišení chromatografických píků

Rozlišení je funkcí účinnosti kolony N a zajišťuje, že látky eluující se blízko sebe jsou od sebe odděleny.

U píku hlavní látky a píku nejbližše eluované nečistoty se odměří úseky na základní linii (w_i resp. w_j) a retenční časy (t_{Ri} resp. t_{Rj}). Rozlišení se vypočítá:

$$R_{ij} = \frac{2 \cdot (t_{Ri} - t_{Rj})}{w_i + w_j}$$

Požadavek je $R_{ij} > 1,5$ [24][25][29][31].

2.4.9.4 Opakovatelnost analýzy (Instrument precision)

Z jednoho roztoku standardu analyzované látky se 6 – 10 krát nastříkne do chromatografu a změří se odpovídající plochy píku (A_i) a retenční časy (t_{Ri}). Získané hodnoty se testují Dean – Dixonovým testem na odlehlost.

Pro výpočet odpovídajících průměrných hodnot (x_p) a směrodatných odchylek se použijí vzorce:

$$x_p = \frac{\sum x_i}{n} \quad s = \sqrt{\left\{ \frac{\sum (x_i - x_p)^2}{(n-1)} \right\}}$$

Relativní směrodatná odchylka: $s_R = \frac{100 \cdot s}{x_p}$

Požadavek je, aby jak pro A tak i pro t_R byla $s_R < 1\%$ [24][25][29][31].

2.4.9.5 Stabilita standardů a vzorků

Tímto testem se zkouší, zda je analyzovaný vzorek dostatečně stabilní a zda je jeho teplotní stabilita srovnatelná se standardem.

Připraví se roztoky standardu a vzorku a rozdělí se na dvě části, které se uchovávají po 4 dny při teplotě 2 – 8 °C a při teplotě místnosti. Plochy píků takto skladovaných roztoků se srovnávají každý den s plochami píků získaných od čerstvě připravených roztoků. Stabilita S_T (%) se vypočte:

$$S_T(\%) = \frac{100 \cdot (A - A_T)}{A}$$

A_T ...průměr dvou měření ploch píku u roztoku skladovaného

A ...průměr dvou měření ploch píku u roztoku čerstvě připraveného

Požadavek je $S_T(\%) < 1\%$ [24][25][29][31].

2.5 Analytické hodnocení diklofenaku

Byla provedena rešerše na analytické hodnocení diklofenaku jak v léčivých přípravcích a biologických materiálech tak v ostatních materiálech, a to pomocí různých analytických metod.

2.5.1 HPLC hodnocení diklofenaku

2.5.1.1 Lékopisné HPLC hodnocení diklofenaku

Český lékopis 2002 vyžaduje HPLC hodnocení pro stanovení příbuzných látek diklofenaku. Stejně tak se HPLC hodnocení využívá i v ostatních lékopisech, tj. americkém lékopise USP 28, Britském lékopise 2004 (British Pharmacopoeia 2004), Evropském lékopise 4.vydání (European Pharmacopoeia 4th edition) či Japonském lékopise (Japan Pharmacopoeia 14th edition). Všechny tyto lékopisy využívají HPLC hodnocení diklofenaku ke stanovení a kvantifikaci příbuzných látek diklofenaku. Výsledky rešerše jsou uvedeny v tabulce *Tab.2*.

Tab. 2: Lékopisné HPLC hodnocení diklofenaku

Chromatografické podmínky	Kolona a stacionární fáze	Průtok mobilní fáze	Složení mobilní fáze	Detekce	Zdroj
ČL 2002	Nerezová ocelová kolona délky 0,25m a vnitřním průměru 4,6mm; oktadecylsilanizovaný silikagel s odstíněnými koncovými skupinami o průměru částic 5µm	1 ml/min	Fosforečnanový pufr pH 2,5 (kyselina fosforečná 0,5g/l a dihydrogenfosforečnan sodný 0,8g/l upravené na pH 2,5 kyselinou fosforečnou) a methanol v poměru 34:66	UV, λ = 254nm	[6]
EP 4th edition	Kolona délky 0,25m a vnitřním průměru 4,6mm; oktadecylsilanizovaný silikagel s odstíněnými koncovými skupinami o průměru částic 5µm	1 ml/min	Fosforečnanový pufr pH 2,5 (kyselina fosforečná 0,5g/l a dihydrogenfosforečnan sodný 0,8g/l upravené na pH 2,5 kyselinou fosforečnou) a methanol v poměru 34:66	UV, λ = 254nm	[33]
BP 2004	Kolona délky 25cm a průměru 4,6mm; oktadecylsilanizovaný silikagel s odstíněnými koncovými skupinami o průměru částic 5µm	1 ml/min	Fosforečnanový pufr pH 2,5 (kyselina fosforečná 0,5g/l a dihydrogenfosforečnan sodný 0,8g/l upravené na pH 2,5 kyselinou fosforečnou) a methanol v poměru 34:66	UV, λ = 254nm	[34]
USP 28	Kolona délky 25cm a průměru 4,6mm; stacionární fáze L7 s odstíněnými koncovými skupinami	1 ml/min	Fosforečnanový pufr pH 2,5 (0,01M kyselina fosforečná a 0,01M dihydrogenfosforečnan sodný v poměru 1:1) a methanol v poměru 30:70	UV, λ = 254nm	[35]
JP 14th edition	Nerezová ocelová kolona délky 0,25m a vnitřním průměru 4,6mm; oktadecylsilanizovaný silikagel s odstíněnými koncovými skupinami o průměru částic 7 µm	-	Methanol a zředěná kyselina octová v poměru 4:3	UV, λ = 240nm	[36]

2.5.1.2 HPLC hodnocení v léčivých přípravcích

Pro hodnocení diklofenaku v léčivých přípravcích je užíváno mnoho metod. HPLC metoda je užívána velice často. Užívá se nejen ke stanovení obsahu diklofenaku v léčivých přípravcích, ale také ke studiu kinetiky uvolňování tohoto léčiva z léčivých přípravků různých forem apod. Výsledky rešerše jsou uvedeny v tabulce *Tab.3 – Tab.4*.

2.5.1.3 HPLC hodnocení diklofenaku v biologických materiálech

Stanovení diklofenaku v biologických materiálech má velký význam pro sledování farmakokinetiky diklofenaku, jeho distribuci v organismu a pro stanovení terapeutických hladin. Jako biologický materiál je nejčastěji používána plazma či moč. Výsledky rešerše jsou uvedeny v tabulce *Tab.5 – Tab.6*.

2.5.1.4 HPLC hodnocení diklofenaku v ostatních materiálech

Těmito materiály jsou většinou odpadní a povrchové vody, v nichž se stanovuje obsah diklofenaku společně s jinými biologicky aktivními molekulami. Výsledky rešerše jsou uvedeny v tabulce *Tab.7*.

Tab. 3: HPLC stanovení diklofenaku v léčivých přípravcích

Kolona a stacionární fáze	Průtok mobilní fáze	Složení mobilní fáze	Teplota	Detekce	Analyzované látky	Zdroj
LUNA CN C-18 5µm, 150x4,6mm; Hzipersil BDS C-18 5µm, 150x4,6mm s předkolonou plněnou Hzipersil C-18	0,8 ml/min	Acetonitril a 50mM fosforečnanový pufr pH 3,0 v poměru 60:40	laboratorní	UV, 266nm	Diklofenak, sůl diklofenaku s kyselinou askorbovou	[37]
LABCROM (150x4,6mm); 5µm částice Rainin silicaz poly(methyloktadecylsiloxanu)	1,0 ml/min	Methanol a voda v poměru 70:30	20°C	UV, 275nm	Diklofenak a vitamin B	[38]
ODS C-18 Hzipersil, 250x4,6mm; 5µm	2,0 ml/min	Voda, methanol a kyselina octová ledová v poměru 69:28:3	-	UV, 275nm	Diklofenak sodný	[39]
Superspher RP (125x3,0mm; 5µm)	-	Acetonitril a 20mM kyselina mravenčí v poměru 53:47	40 °C	MS	Diklofenak	[40]
Waters Nova-Pack C 18 (3,9x300mm)	-	Acetonitril a voda v poměru 65:35 upravené na pH 5,0 10% kyselinou octovou	-	UV, 280nm	Diklofenak	[41]
Skleněná kolona Seladon SGX C-18 (150x3,3mm; 7µm)	0,5 ml/min	Methanol a fosforečnanový pufr pH 6,5 v poměru 110:100 s přísadkou tetrabutylamonium jodidu (5mM:1)	37°C	UV, 284nm	Diklofenak	[42]
SGE ODS (délka 250mm, částice 5µm)	1,5 ml/min	Acetonitril a voda v poměru 60:40; před přidáním vody přidáno 10ml kyseliny octové a 10ml octanu sodného; pH 4,8	-	UV, 280nm	diklofenak sodný, diklofenak, diethylamin diklofenak	[43]

Tab. 4: Dokončení tabulky - LP

Kolona a stacionární fáze	Průtok mobilní fáze	Složení mobilní fáze	Teplota	Detekce	Analyzované látky	Zdroj
LiChroCART (250x4mm) plněná LiChrospher 100 RP-18, 5µm	-	5mM fosforečnanový pufr pH 7,2 a methanol v různých poměrech	laboratorní	UV, 254nm; DAD	diklofenak, paracetamol, kofein, indometacin, kodein, fenobarbital, propylfenazon	[44]
SUPELCO Discovery C 18	0,7 ml/min	Methanol a fosforečnanový pufr pH 2,5 v poměru 65:35	laboratorní	UV, 254nm	diklofenak, methylparaben, propylparaben a flurbiprofen (IS)	[45]
Luna C8(2) (100x2,0mm; 3µm)	0,300 l/min	gradient mobilní fáze A a B acetonitril – voda – kys. octová – triethylamin A: 200:791.18:8.17:0.65 B: 600:391.18:8.17:0.65	30°C	UV, 280nm	diklofenak	[40]
RP18 125x4mm, částice 5µm	0,8 – 1,9 ml/min	Acetonitril a voda v poměru 40:60, pH 3,45 upravené kyselinou octovou; průtokový gradient	34°C	UV, 240nm	cyanokobalamin, betamethason, diklofenak sodný	[46]

Tab. 5: Stanovení diklofenaku v biologických materiálech

Kolona a stacionární fáze	Průtok mobilní fáze	Složení mobilní fáze	Teplota	Detekce	Analyzovaný materiál	Zdroj
Kromasil C (150x4,6mm; 5µm) v inline spojení s filtrem	1,0 ml/min	0,05M KH ₂ PO ₄ (pH7,0) a methanol a acetonitril v poměru 58:21:21	35°C	UV, 205nm	synoviální tekutina	[47]
Dvě sériově spojené Kromasil C8KR100 (150x4,6mm; 5µm)	1,0 ml/min	Methanol a fosforečnanový pufr pH2,5 v poměru 58:42	30,8°C	UV, 236, 254, 275, 282nm	metabolity diklofenaku z jater	[48]
Kromasil C18 (250x4,6mm; 5µm)	1,0 ml/min	0,02M fosforečnanový pufr pH 7,4 a acetonitril v poměru 75:25; přídavek triethanolaminu 0,02% 25mM	30,8°C	UV, 254, 282nm	metabolity diklofenaku z jater	[48]
Merk C18 (250x4,6mm; 5µm)	1,0 ml/min	dihydrogenfosforečnan draselný pH 3,5 a acetonitril v poměru 30:70	-	UV, 28nm	lidská plazma	[49]
Waters Spherisorb S5 ODS1 (125x4,6mm), předkolona Waters Spherisorb S5 ODS1 (10x4,6mm)	1,0 ml/min	methanol a voda v poměru 63:37 s pH upraveným kyselinou fosforečnou na hodnotu 3,3	30°C	UV, 280nm	plazma a roztoky	[50]
Kromasil OSD II (C18) (15x0,4cm) a předkolona (1x0,4cm)	1,0 ml/min	20mM fosforečnanový pufr pH 7,4 a acetonitril v poměru 74:26	-	DAD, 250-350nm	hepatocyty a moč	[51]
1. Capcell Pak MF Ph-1 (20x4mm) 2. Capcell Pak C18 UG 120 (35x2mm) 3. Luna 2 Phenyl-hexyl (100x2mm; 3µm)	1. 0,5 ml/min 2. + 3. 0,2 ml/min	1. acetonitril a 0,1M fosforečnan draselný pH 7,0 v poměru 14:86 2. + 3. acetonitril a 0,02M fosforečnan draselný pH 7,0 v poměru 33:67	30°C	UV, 278nm	lidská plazma	[52]

Tab. 6: Dokončení tabulky – biologické materiály

Kolona a stacionární fáze	Průtok mobilní fáze	Složení mobilní fáze	Teplota	Detekce	Analyzované látky	Zdroj
C-18 Spherisorb (250x4,6mm; 5µm)	1,0 ml/min	acetonitril a 0,1M octan sodný v poměru 35:65; pH upraveno ledovou kys. octovou na hodnotu 6,3	Laboratorní	UV, 278nm	plazma	[53]
LiChroCART 125-4 (125x4mm) plhěný částicemi LiChrospher 100 RP-18 (5µm)	-	Methanol – acetonitril – 0,02M hydroxid sodný – 0,033M kyselina octová v poměru 25:23:40:12 (pH 6,3)	-	UV, 280nm	potkaní játra	[54]
Regis SPS 100 RP-8 (150x4,6mm; 5µm)	-	-	-	elektrochemická	lidské tekutiny	[55]
Spherisorb ODS (125x4,6mm)	-	Methanol a voda v poměru 65:35 a 63:37; pH upraveno na hodnotu 3,3	-	-	plazma a synoviální tekutina	[56]
Spherisorb S5 ODS (250mm)	-	Methanol a 0,05M fosforečnanový pufr o pH 6,2 v poměru 43:57	-	fluorimetrický (excitace – 282nm, emise – 365nm)	sérum	[57]

Tab. 7: Stanovení diklofenaku v ostatních materiálech

Kolona a stacionární fáze	Průtok mobilní fáze	Složení mobilní fáze	Teplota	Detekce	Analyzovaný materiál	Zdroj
LiChrospher 100 RP-18 (125x4mm; 5µm) a předkolona (4x4mm; 5µm)	1,0 ml/min	Methanol a acetonitril a 50mM dihydrogenfosforečnan draselný (gradient)	-	fluorescenční, DAD	odpadní vody	[58]
Luna C 18 (250x2mm; 5µm)	0,2 ml/min	Voda a methanol a 40mM octan amonný pH 5,5 (upraveno kys. mravenčí)	-	MS	povrchové vody	[59]
Nova-Pak C-18 (150x3,9mm; 4µm)	1,0 ml/min	A: Methanol a voda v poměru 70:30 B: acetonitril a voda v poměru 70:30 nebo 50:50 obě okyseleny 0,2% kys. mravenčí	-	UV=254nm Fluorimetri cký (excitace při 230nm)	odpadní vody	[60]
Chromopak C-18	1,0 ml/min	kys. trifluoroctová a acetonitril	-	UV, DAD	mineralizace koncentrovaných roztoků diklofenaku	[61]

2.5.2 Ostatní analytické metody

Kromě HPLC stanovení diklofenaku jsou při jeho analýze užívány i jiné analytické metody. Jedná se o metody chromatografické, elektromigrační, spektrofotometrické a další.

2.5.2.1 Využití při analýze diklofenaku v léčivých přípravcích

Pro stanovení diklofenaku v tomto případě se využívá mnoho různých metod. Jedná se např. o plynovou chromatografii, spektrofotometrii (jak v UV tak VIS oblasti spektra), dále potenciometrická, polarografická či titrační stanovení. Výjimkou nejsou ani elektromigrační metody jako je např. kapilární zónová elektroforéza.

Nejčastěji využívány jsou spektrofotometrické metody následované plynovou chromatografií, fluorimetrickým či potenciometrickým stanovením (viz *Tab.8*).

2.5.2.2 Využití při analýze diklofenaku v biologických materiálech

V této oblasti analýzy diklofenaku je nejvíce užívána plynová chromatografie. Je zde opět zastoupeno stanovení spektrofotometrické, potenciometrické, polarografické, kapilární zónová elektroforéza a také HPTLC (vysokoučinná tenkovrstvá kapalinová chromatografie) (viz *Tab.9*).

2.5.2.3 Využití při analýze diklofenaku v ostatních materiálech

Největší zastoupení při těchto analýzách má opět plynová chromatografie. Dalšími analytickými metodami využívanými v této oblasti jsou kapilární elektroforéza, spektrofotometrie a NMR ^1H a ^{13}C (viz *Tab.10*).

Tab. 8: Analytické metody užívané v analýze diklofenaku v léčivých přípravcích

Stanovované látky	Analytická metoda	Detekce	Zdroj
21 fenolických a kyselých látek (nonylfenol, bisfenol A, triclosan, 17- β -estradiol, estron, ibuprofen, naproxen, diklofenak, ...)	GC	MS	[62]
diklofenak sodný, aminofylin	FT – Ramanova spektrometrie		[63]
diklofenak sodný	spektrofotometrie	$\lambda = 380$ nm	[64]
aceklofenak, diklofenak	spektrofotometrie	$\lambda = 242$ nm, 245 nm, 273 nm	[65]
benzylalkohol, diklofenak sodný	spektrofotometrie	-	[66]
diklofenak sodný	spektrofotometrie	$\lambda = 281$ a 400 nm	[67]
diklofenak sodný	spektrofotometrie	$\lambda = 520$ a 640 nm	[68]
diklofenak sodný, enfenamová kyselina, mefenamová kys.	spektrofotometrie	$\lambda = 670$ nm (DS), 720 nm (EK), 740 nm (MK)	[69]
diklofenak, warfarin	potenciometrie	-	[70]
diklofenak	potenciometrie	Pt/Hg/Hg ₂ (DCF) ₂ /grafitová elektroda	[71]
benzaldehyd, diklofenak sodný	polarografie	Ag/AgCl referenční elektroda	[72]
diklofenak sodný v přítomnosti kyslíku	polarografie	-	[73]
methylparaben, propylparaben, diklofenak sodný, butylparaben	SIA	UV detekce	[74]
diklofenak	SIA	potenciometricky (iontově selektivní elektroda – cyklohextrin); fluorimetricky	[75]
diklofenak	TLC	densitometricky ($\lambda = 248$ nm)	[76]
diklofenak, cyklohextrin	fluorimetrie	-	[77]
diklofenak sodný v přítomnosti Eu ³⁺	fluorimetrie	$\lambda = 616$ nm	[78]
mefenamová kys., ibuprofen, diklofenak sodný	bezvodá titrace (přímá, nepřímá)	potenciometricky	[79]
diklofenak sodný, famotidin,	FIA	spektrofotometrická ($\lambda = 451$ nm)	[80]
ibuprofen, indomethacin, ketoprofen, piroxikam, diklofenak	CZE (kapilární zónová elektroforéza)	-	[81]
ibuprofen, indomethacin, ketoprofen, piroxikam, diklofenak	micelární elektrokinetická kapilární chromatografie	-	[81]

Tab. 9: Analytické metody užívané v analýze diklofenaku v biologických materiálech

Použitý materiál (analyzované látky)	Analytická metoda	Detekce	Zdroj
moč (ciprofloxacin, ofloxacin, diklofenak, mefenamová kys.)	spektrometrie, fluorimetrie	-	[82]
krevní sérum, moč (diklofenak)	potenciometrie	diklofenak iontově-selektivní elektroda	[83]
plazma (diklofenak, aceklofenak)	CZE	-	[84]
moč (diklofenak)	CZE	elektrochemická (amperometricky)	[85]
různé biologické materiály (diklofenak)	polarografie	-	[86]
krevní sérum (diklofenak sodný)	HPTLC	densitometricky ($\lambda = 280 \text{ nm}$)	[87]
plazma (diklofenak)	kapilární GC	MS	[88]
plazma, moč (diklofenak značený deuteriem)	kapilární GC	MS	[89]
koňská moč (ibuprofen, ketoprofen, naproxen, diklofenak, ...)	GC	MS	[90]
plazma (diklofenak a metabolity)	kapilární GC	detektor elektronového záchytu	[91]
lidská plazma (diklofenak)	GC	MS	[92]

Tab. 10: Analytické metody užívané v analýze diklofenaku v ostatních materiálech

Použitý materiál (analyzované látky)	Analytická metoda	Detekce	Zdroj
odpadní vody, říční voda	GC	Ms	[93]
povrchové říční vody (kofein, ibuprofen, diklofenak)	GC	MS	[94]
odpadní vody Řecka	GC	MS	[95]
odpadní vody (ibuprofen, naproxen, ketoprofen, tolfenamová kys., diklofenak)	GC	MS	[96]
pitná voda (fibráty, diklofenak, ibuprofen, ...)	GC	-	[97]
povrchové a odpadní vody (ibuprofen, diklofenak, ketoprofen, fibráty)	GC	MS	[98]
diklofenak (komplexy s organotinem)	^{119}Sn Mössbauerova spektrometrie; ^1H a ^{13}C NMR	-	[99]
říční voda (paracetamol, diklofenak, penicilin v, fibráty, ...)	HPLC, kapilární elektroforéza	MS	[100]

3 Experimentální část

3.1 Přístrojové vybavení

Kapalinový chromatograf:	SHIMADZU LC-2010C Shimadzu Corporation, Kyoto, Japonsko
Vyhodnocení:	chromatografická stanice Shimadzu CLASS-VP, verze 6.12 SP4
Laboratorní pH metr:	pH212 Microprocessor pH Meter, Hannah instruments, Rumunsko
UV spektrofotometr:	Hewlett Packard 8453, USA
Ultrazvuková lázeň:	Bandelin Sonorex Digitec, typ DT 52, Bandelin electronic, SRN
Centrifuga:	EBA 21, Hettich Zentrifugen
Analytické váhy:	Sartorius 2004 MP, SRN
Vodní lázeň:	Memmert typ WB 10, Memmert GmbH Co., SRN

3.2 Chemikálie

Diclofenacum natricum (VV 230/05), š. 04-S-0081 PP, Herbacos Bofarma Pardubice

Flurbiprofen 97% p.a., Sigma Aldrich GmbH, SRN

Witepsol W25 (VV 231/05), š. 506490, Herbacos Bofarma Pardubice

Kyselina fosforečná 85% p.a., Merck, SRN

Methanol R CHROMASOLV for HPLC, Sigma Aldrich GmbH, SRN

Ultračistá voda, čištěná systémem Milli-Q (Millipore, Bedford, MA, USA)

3.2.1 Příprava zásobních a pracovních roztoků

Zásobní roztoky

- *Roztok kyseliny fosforečné o pH 2,5* byl připraven přidáním 0,50 ml kyseliny fosforečné do 250 ml ultračisté vody a následným upravením pH kyselinou fosforečnou na požadovanou hodnotu pH 2,5 za stálého míchání na magnetické míchače.

- **Zásobní roztok vnitřního standardu** o koncentraci 100 mg/100 ml byl připraven rozpuštěním 95,20 mg flurbiprofenu v methanolu a následným doplněním methanolem do 100,00 ml.

Pracovní roztoky

- **Pracovní roztok pro opakovatelnost** o koncentraci 250 mg/100 ml diklofenaku a 5 mg/100 ml vnitřního standardu flurbiprofenu byl připraven navážením 499,81 mg, přidáním 10,00 ml zásobního roztoku vnitřního standardu flurbiprofenu a následným doplněním methanolem do 200,00 ml.
- **Pracovní roztok vnitřního standardu** o koncentraci 5 mg/100 ml flurbiprofenu byl připraven z 5,00 ml zásobního roztoku vnitřního standardu a následným zředěním methanolem na 100,00 ml.

3.3 Vývoj metody – optimalizace chromatografických podmínek

Jako metoda pro stanovení diklofenaku v přípravku VERAL čípky byla používána metoda vyvinutá na Katedře analytické chemie pro stanovování diklofenaku a jeho nečistoty 1-(2,6-dichlorfenyl)-1,3-dihydro-2*H*-indol-2-onu (dále „nečistota A“) v různých léčivých přípravcích.

3.4 Příprava vzorku

Pro izolaci diklofenaku z čípků musela být vyvinuta nová izolační technika, jejímž základem byl postup užívaný pro extrakci podobných látek z léčivých přípravků v akreditované laboratoři na Katedře analytické chemie. Tento postup sestává z navážení daného množství léčivého přípravku, jeho následném roztavení na vodní lázni teploty 40°C, přidání 20,00 ml roztoku vnitřního standardu, umístěním do ultrazvukové lázně na 10 minut a centrifugaci 15 minut při 6000 otáčkách za minutu.

Tento postup byl následně modifikován.

4 Výsledky a diskuse

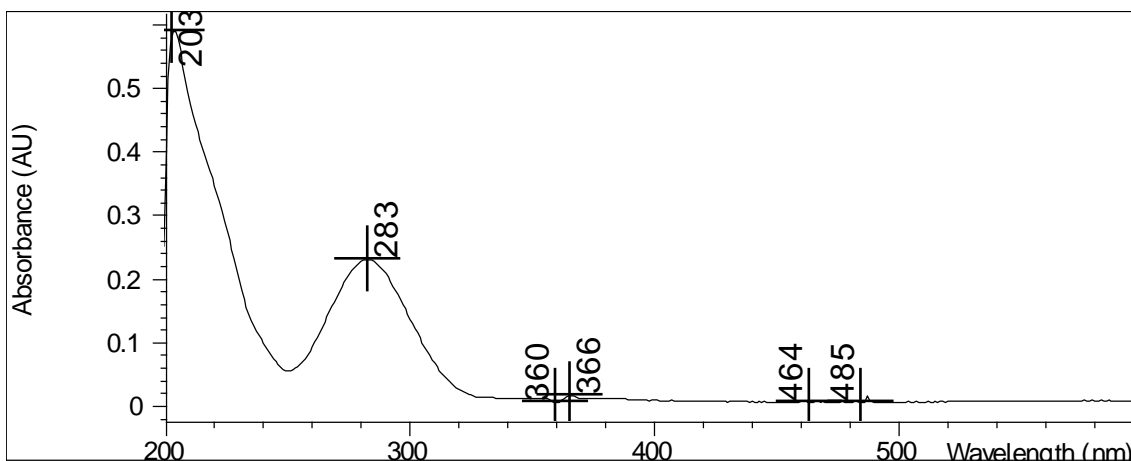
4.1 Vývoj metody – optimalizace chromatografických podmínek

Jelikož byla používána již vyvinutá metoda pro stanovení diklofenaku a jeho nečistoty A, uvádím základní data, která vedla k vývoji této metody.

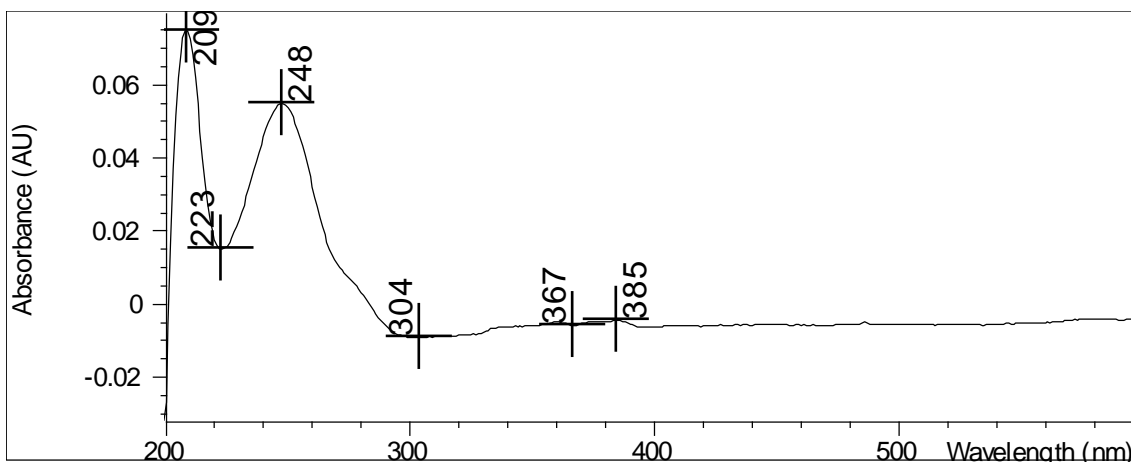
4.1.1 Vlnová délka detektoru

Optimální vlnová délka pro stanovení diklofenaku, jeho nečistoty A a flurbiprofenu (vnitřní standard) byla stanovena na $\lambda = 254$ nm. Pro dokumentaci uvádím UV spektra všech tří látek (viz *Obr.13 – Obr.15*).

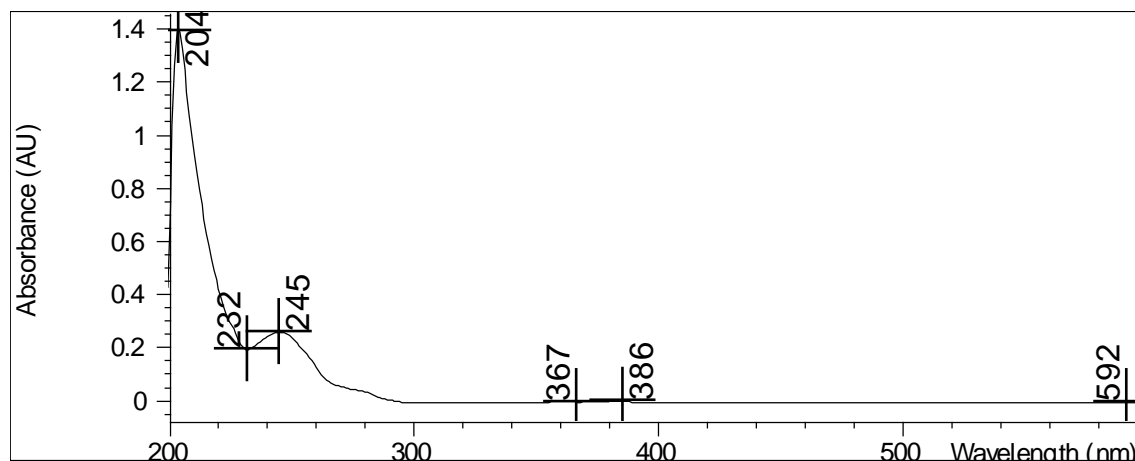
Obr. 13: UV spektrum diklofenaku



Obr. 14: UV spektrum flurbiprofenu



Obr. 15: UV spektrum nečistoty A



Při této vlnové délce ($\lambda = 254 \text{ nm}$) je dosaženo dobré citlivosti jak u diklofenaku tak u jeho nečistoty A.

4.1.2 Optimální chromatografické podmínky - souhrn

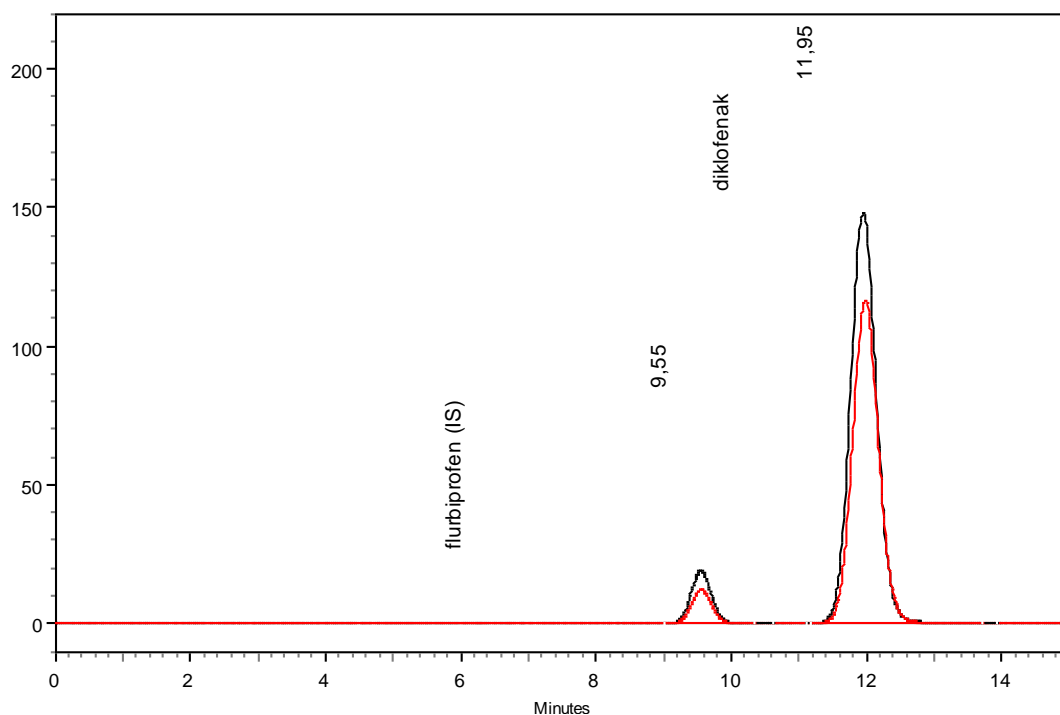
Mobilní fáze:	methanol : vodný roztok kys. fosforečné o pH 2,5 (65 : 35)
Analytická kolona:	LiChroCART Purospher RP-18e (Merck); 125x4 mm, 5 μm
Předkolona:	LiChroCART Purospher RP-18e (Merck); 4x4 mm, 5 μm
Průtok F_m (ml/min):	0,8
Vlnová délka λ (nm):	254
Vnitřní standard:	flurbiprofen
Dávkovaný objem:	1 μl
Teplota:	laboratorní
Režim:	isokratický

4.2 Příprava vzorku

Jako první byl testován tento izolační postup: čípky Veral byly rozmělněny nožem a bylo odváženo do centrifugační zkumavky asi 2,1400 g čípkoviny přesně. (Hmotnost jednoho čípku je totiž 2,14 g). Poté byla centrifugační zkumavka umístěna na vodní lázeň o teplotě 40°C a na ní ponechána 20 minut. Došlo k roztavení čípkoviny. Následně bylo přidáno 40,00 ml roztoku vnitřního standardu a tato směs byla umístěna na 10 minut do ultrazvukové lázně. Následovala 15 minut trvající

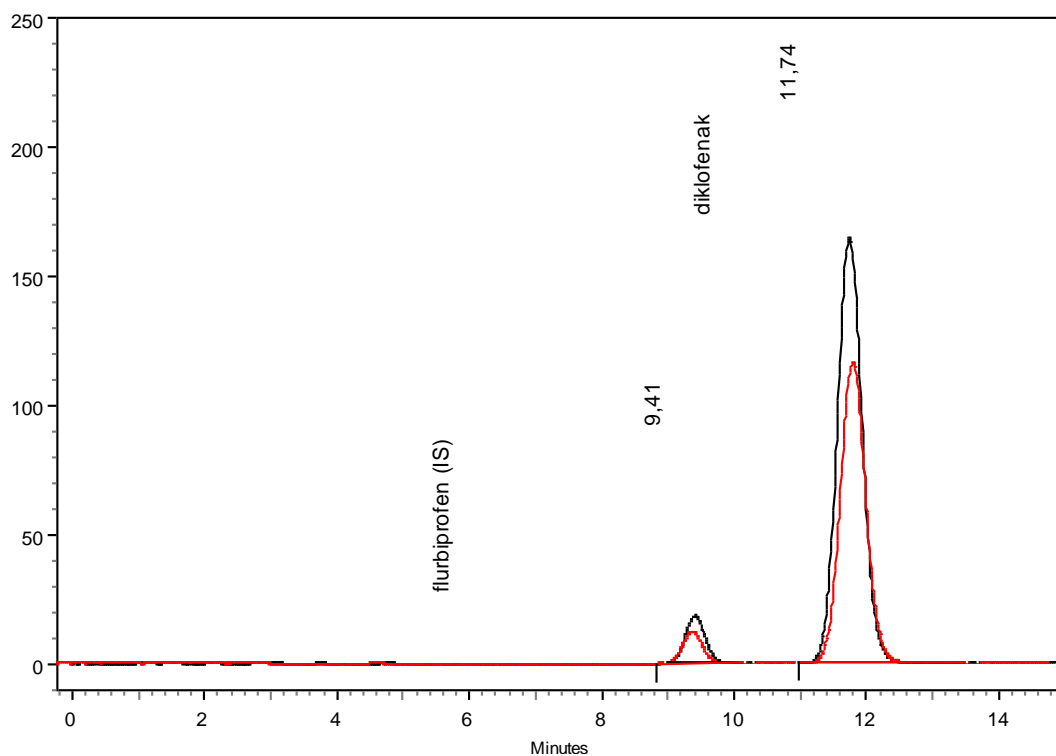
centrifugace při 6000 otáčkách za minutu. Centrifugovaný vzorek se přefiltroval přes teflonovou membránu o velikosti pórů 0,45 μm a čirý supernatant byl nastříkována na kolonu. Výtěžnost tohoto izolačního postupu byla cca 80% obsahu účinné látky (viz *Obr.16*), proto jej nebylo možné použít.

Obr.16: Porovnání chromatogramu vzorku (černá barva) s chromatogramem standardu (červená barva), výtěžnost cca 80% ($A_0/A_{IS0} = 13,01$; poměr $A_i/A_{IS} = 10,01$)



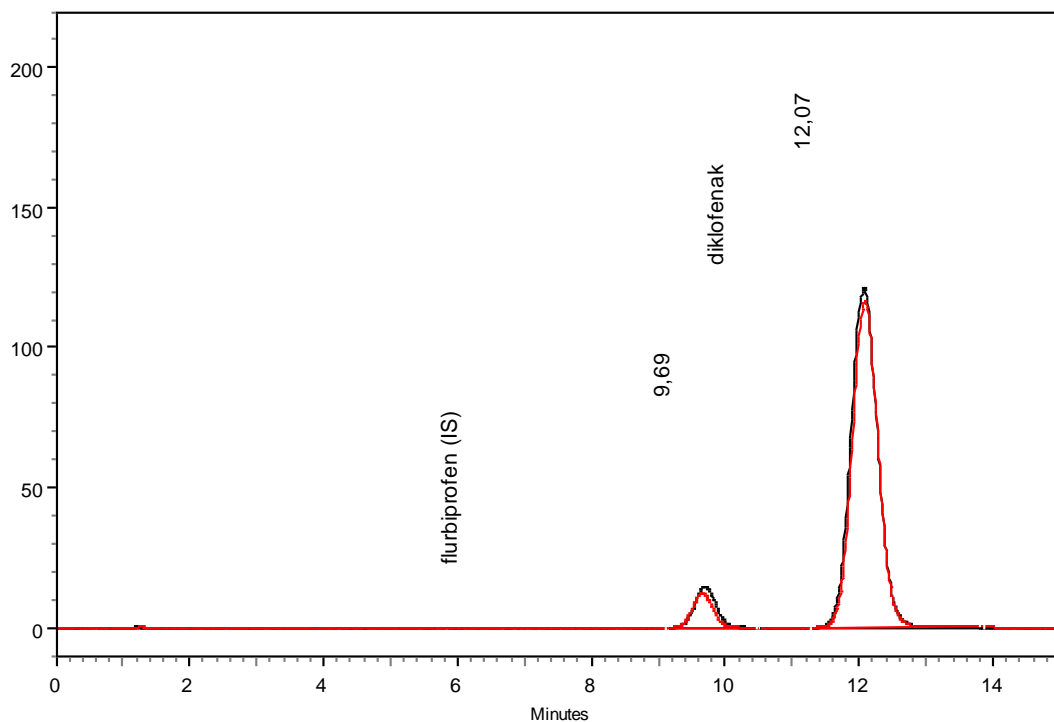
Podmínky izolace musely tedy být upraveny. Byl zachován postup uvedený výše a v něm se změnila doba ponechání vzorku v ultrazvukové lázni a to z 10 na 15 minut. Touto změnou došlo ke zvýšení výtěžnosti na cca 87% (viz *Obr.17*)

Obr.17: Porovnání chromatogramu vzorku (černá barva) s chromatogramem standardu (červená barva), výtěžnost cca 87% ($A_0/A_{IS0} = 13,01$; poměr $A_i/A_{IS} = 11,20$)



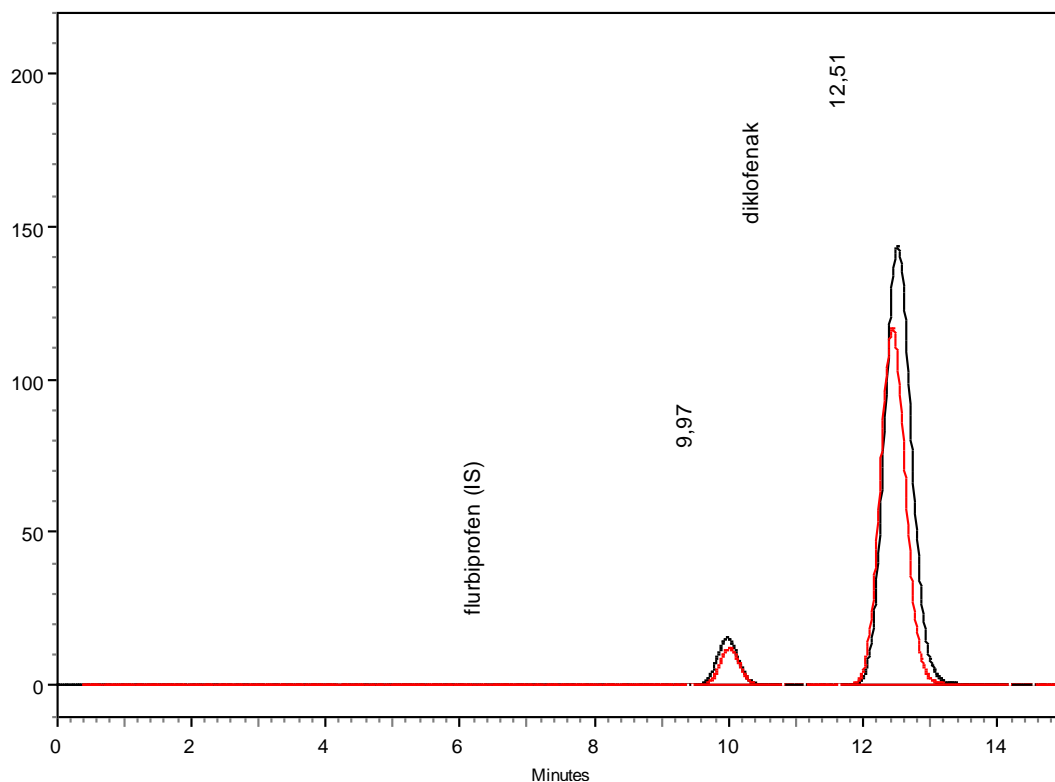
Následně byl zkoušen tento postup: bylo odváženo asi 2,1400 g čípkoviny přesně do centrifugační zkumavky. Ta byla umístěna na vodní lázeň o teplotě 50°C na dobu 10 minut. Došlo k roztavení čípkoviny a bylo k ní přidáno 40,00 ml roztoku vnitřního standardu. Tato směs byla ponechána na vodní lázni dalších 10 minut, poté byla umístěna na 15 minut do ultrazvukové lázně a následně centrifugována 15 minut při 6000 otáčkách. Výtěžnost tohoto izolačního postupu byla cca 85% (viz *Obr.18*)

Obr.18: Porovnání chromatogramu vzorku (černá barva) s chromatogramem standardu (červená barva), výtěžnost cca 85% ($A_0/A_{IS0} = 13,01$; poměr $A_i/A_{IS} = 10,58$)



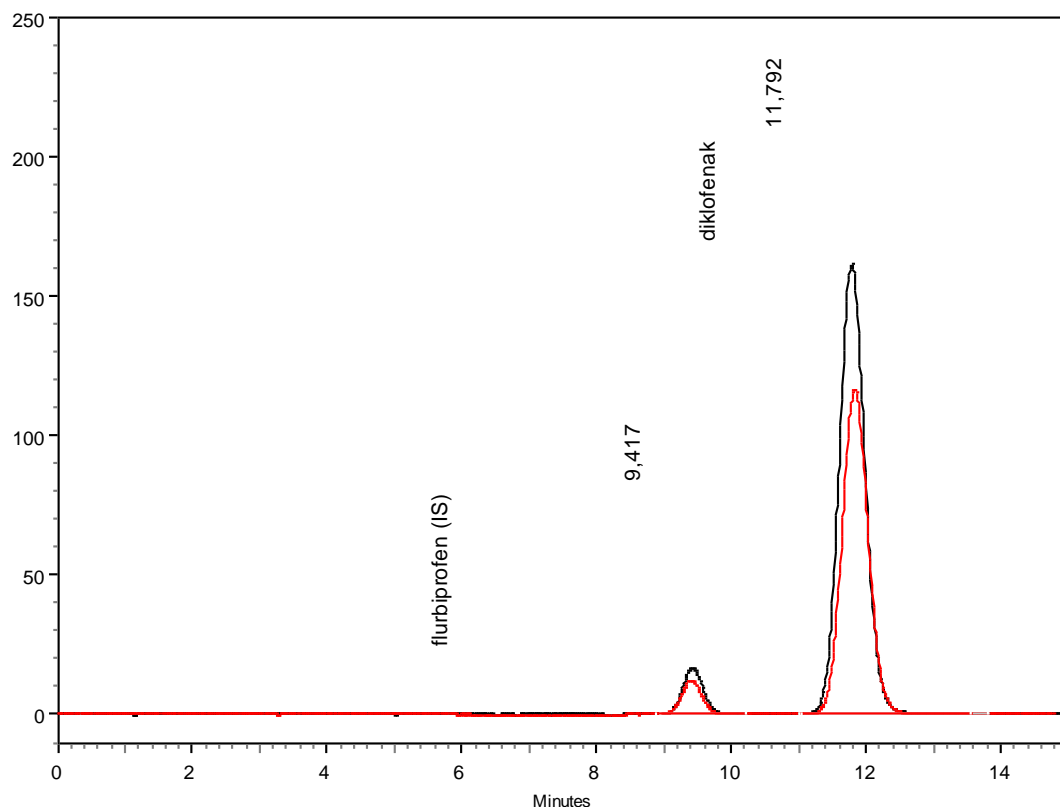
Následně byl zkoušen nový izolační postup. Byla zachována navážka vzorku do centrifugační zkumavky, ale byla zvýšena teplota vodní lázně a to na 60°C. Délka rozpouštění čípkoviny byla zachována, ale byla prodloužena doba ponechání směsi roztavené čípkoviny a roztoku vnitřního standardu na vodní lázni a to na 15 minut. Výtěžnost tohoto postupu byla cca 94% (viz *Obr.19*).

Obr.19: Porovnání chromatogramu vzorku (černá barva) s chromatogramem standardu (červená barva), výtěžnost cca 94% ($A_0/A_{IS0} = 13,01$; poměr $A_i/A_{IS} = 12,41$)



Jako další možnost byl zkoušen tento izolační postup: bylo naváženo asi 1,0700g čípkoviny přesně do centrifugační zkumavky a ta byla umístěna na vodní lázeň o teplotě 70°C. Na ní byl vzorek ponechán 5 minut, aby došlo k roztavení čípkoviny. K roztavené čípkovině bylo přidáno 20,00 ml roztoku vnitřního standardu a vzniklá směs byla ponechána na 70°C teplé vodní lázni po dobu 15 minut. Na centrifugační zkumavky byly volně položeny skleněné zátky, pro lepší akumulaci tepla. Následovalo umístění vzorků do ultrazvukové lázně na 15 minut a poté centrifugace 15 minut při 6000 otáčkách za minutu. Stejně jako u předchozích postupů byl roztok filtrován přes teflonovou membránu velikosti pórů 0,45 μm a čirý supernatant se nastříkoval na kolonu. Výtěžnost tohoto postupu byla cca 98% (viz *Obr.20*) a proto byl tento postup dále používán pro validaci.

Obr.20: Porovnání chromatogramu vzorku (černá barva) s chromatogramem standardu (červená barva), výtěžnost cca 98% ($A_0/A_{IS0} = 13,01$; poměr $A_i/A_{IS} = 12,75$)



4.3 Validace metody

Jelikož nebyla vyvíjena nová separační metodika, byly testovány pouze ty parametry, které byly ovlivněny použitím jiné lékové formy léčivého přípravku. Testovala se tedy Způsobilost chromatografického systému, Přesnost, Správnost a Selektivita.

4.3.1 Testování způsobilosti chromatografického systému

4.3.1.1 Účinnost kolony

Účinnost kolony byla testována pomocí pracovního roztoku pro opakovatelnost. Pro výpočet byly brány údaje získané jako průměr ze šesti měření. Účinnost kolony N byla vypočítána chromatografickou stanicí Shimadzu CLASS-VP verze 6.12 SP4 podle vzorce uvedeného v Kap.2.4.9.1.

Výsledky jsou uvedeny v *Tab.11*.

Tab. 11: Účinnost kolony

název látky	retenční čas (t_R)	teoretická patra (N)
flurbiprofen (IS)	9,64	4455
diklofenak	12,09	4298

Účinnost kolony byla vyjádřena jako počet teoretických pater N. U diklofenaku to bylo 4298 teoretických pater a u flurbiprofenu 4455 teoretických pater. Požadavek je $N > 1500$.

4.3.1.2 Asymetrie chromatografických píků

Asymetrie chromatografických píků T byla vypočítána podle vzorce v Kap.2.4.9.2 a to odečtením příslušných parametrů z chromatogramů získaných nástřikem pracovního roztoku pro opakovatelnost. Výsledky uvedené v tabulce *Tab.12* jsou průměrem ze šesti hodnot.

Tab. 12: Asymetrie chromatografických píků

název látky	$w_{0,05}$ (min)	f (min)	asymetrie píků (T)
flurbiprofen (IS)	0,721	0,341	1,06
diklofenak	0,921	0,435	1,06

Asymetrie píků byla u obou hodnocených látek $T = 1,06$ a nebyla tedy negativně ovlivněna věrohodnost integrace.

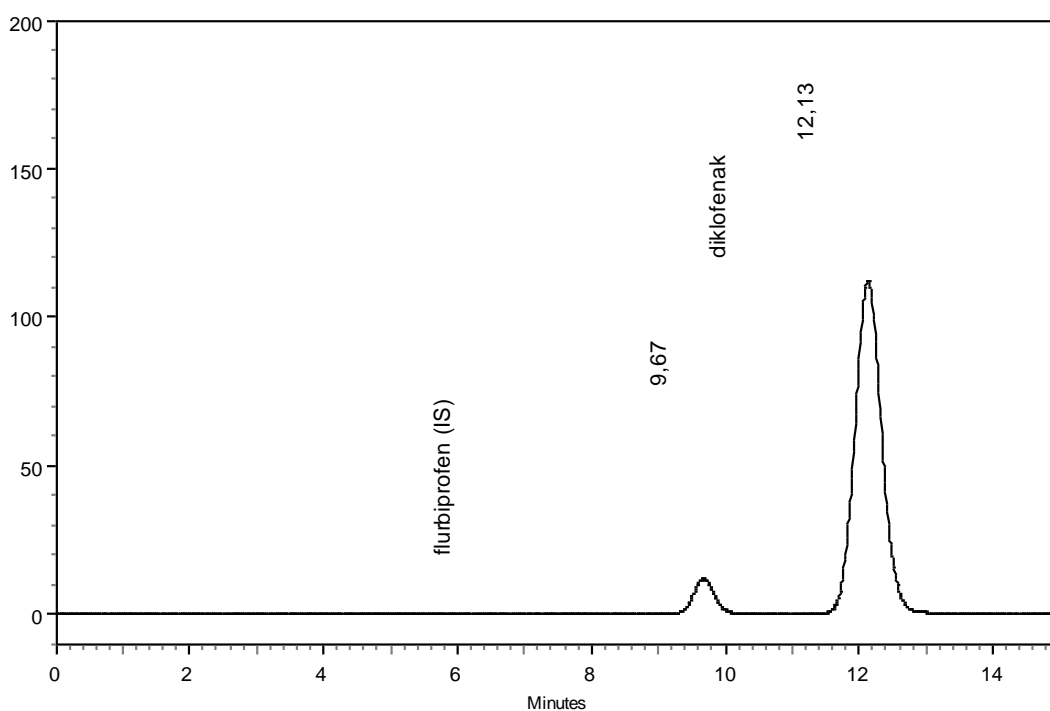
4.3.1.3 Rozlišení chromatografických píků

Testování rozlišení chromatografických píků bylo provedeno nástřikem pracovního roztoku pro opakovatelnost. Výsledek je průměrnou hodnotou ze šesti měření. Rozlišení bylo vypočítáno chromatografickou stanicí Shimadzu CLASS-VP verze 6.12 SP4 podle vzorce v Kap.2.4.9.3. Výsledky jsou uvedeny v tabulce *Tab.13*.

Tab. 13: Rozlišení píků

název látky	rozlišení píků (R_{ij})
flurbiprofen (IS) - diklofenak	3,74

Obr. 21: Ukázka chromatogramu dokumentující rozlišení



4.3.1.4 Opakovatelnost analýzy

Na analytickou kolonu byl šestkrát nastříknut pracovní roztok pro opakovatelnost. Výpočet směrodatné odchylky pro retenční časy a plochy píků byly vypočítány pomocí programu Microsoft EXCEL 2003.

Výsledky jsou uvedeny v *Tab.14 – Tab.15*.

Tab. 14: Flurbiprofen (IS) – opakovatelnost

Vzorek	Retenční čas (min)	Plocha
1	9,74	250 798
2	9,69	250 686
3	9,65	249 857
4	9,62	251 213
5	9,58	251 595
6	9,55	252 659
průměr	9,64	251 135
	9,64	251 135
s	0,07	864,94
s_R (%)	0,68	0,34

Tab. 15: Diklofenak – opakovatelnost

Vzorek	Retenční čas (min)	Plocha
1	12,24	3 250 150
2	12,18	3 250 207
3	12,12	3 241 737
4	12,06	3 255 141
5	12,01	3 263 552
6	11,97	3 280 953
průměr	12,09	3 256 957
	12,09	3 256 957
s	0,09	12557,51
s_R (%)	0,78	0,39

Při testování opakovatelnosti analýzy se směrodatná odchylka s_R ploch píků i retenčních časů pohybovala pod požadovaným limitem $s_R = 1\%$.

4.3.2 Přesnost

Byly analyzovány roztoky vzorku VERAL čípky šarže 2010905, které byly paralelně připraveny postupem z Kap.4.2.

Naměřené plochy píků byly pro každý vzorek zprůměrovány a přepočteny na navážku vzorku 1,07 g čípkoviny.

Výsledky jsou uvedeny v tabulce *Tab.16* a jsou průměrem ze tří měření. Výpočet relativní směrodatné odchytky byl proveden pomocí programu Microsoft EXCEL 2003.

Tab. 16: Přesnost

Vzorek	Plocha píku vzorku	Plocha píku přepočtená na navážku 1,07g
1	4 393 058	4 389 448
2	4 373 712	4 359 899
3	4 327 434	4 262 858
4	4 344 297	4 323 689
5	4 305 608	4 297 776
6	4 383 855	4 349 748
	průměr	4 330 570
		4 330 570
	s	41637,95
	s_R (%)	0,96

Relativní směrodatná odchytka s_R byla 0,96. Požadavek je, aby relativní směrodatná odchytky pro přesnost byla $s_R < 5\%$.

4.3.3 Správnost

Byl analyzován roztok standardů, kde byly z koncentrací diklofenaku ($c_0 = 249,905$ mg/100ml) a vnitřního standardu flurbiprofenu ($c_0 = 4,76$ mg/100ml) získány plochy A_0 .

Poté bylo analyzováno šest vzorků obsahujících placebo (Witepsol W25), diklofenak a vnitřní standard flurbiprofen. Tyto vzorky byly paralelně připraveny postupem uvedeným v Kap.4.2. Místo 20,00 ml roztoku vnitřního standardu bylo k navážce placebo přidáno 20,00 ml roztoku standardů (koncentrace látek ve směsi je c_i). Výsledky jsou uvedeny v tabulce *Tab.17*.

Tab. 17: Správnost – diklofenak

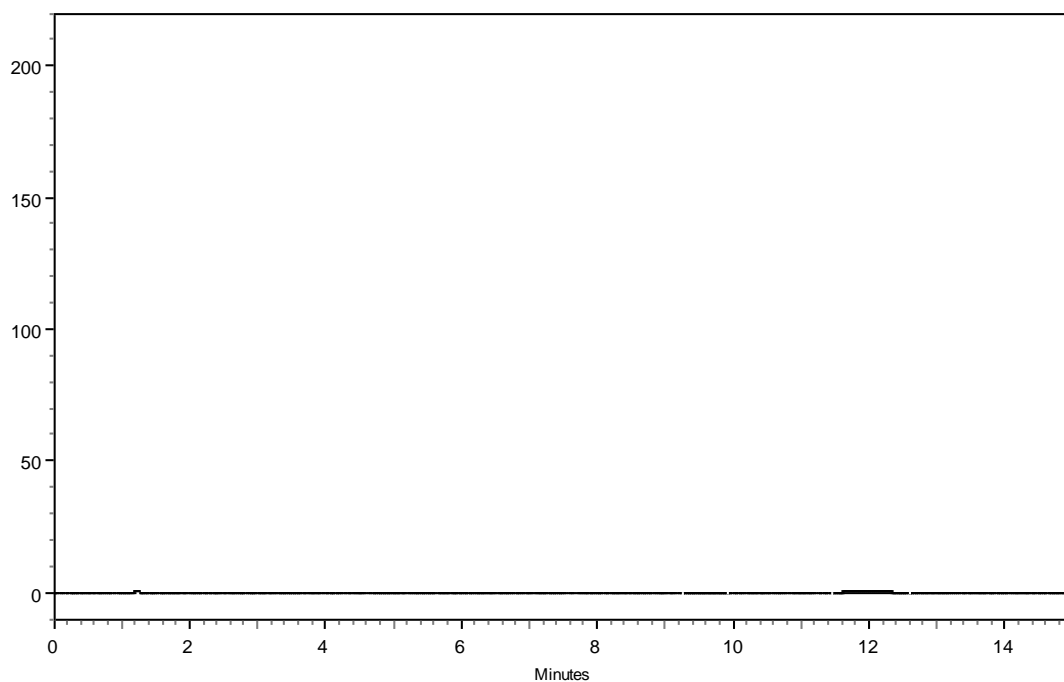
Vzorek	c_0 (mg/100ml)	A_i/A_{IS}	c_i (mg/100ml)	R_i (%)
1	249,905 mg/100ml odpovídá ploše $A_0/A_{IS0} = 13,010$	12,947	248,695	99,52
2		12,964	249,021	99,65
3		12,935	248,464	99,42
4		12,926	248,291	99,35
5		12,951	248,772	99,55
6		12,895	247,696	99,12
			průměr	99,44
				99,42
			s	0,17
			s_R (%)	0,17

Relativní směrodatná odchylka správnosti výsledků je $s_R = 0,17\%$ a to odpovídá požadavku na s_R (%) < 5%. Zjištěná koncentrace diklofenaku je 99,42% koncentrace c_0 , což odpovídá požadavku že $R_i = 100 \pm 5\%$.

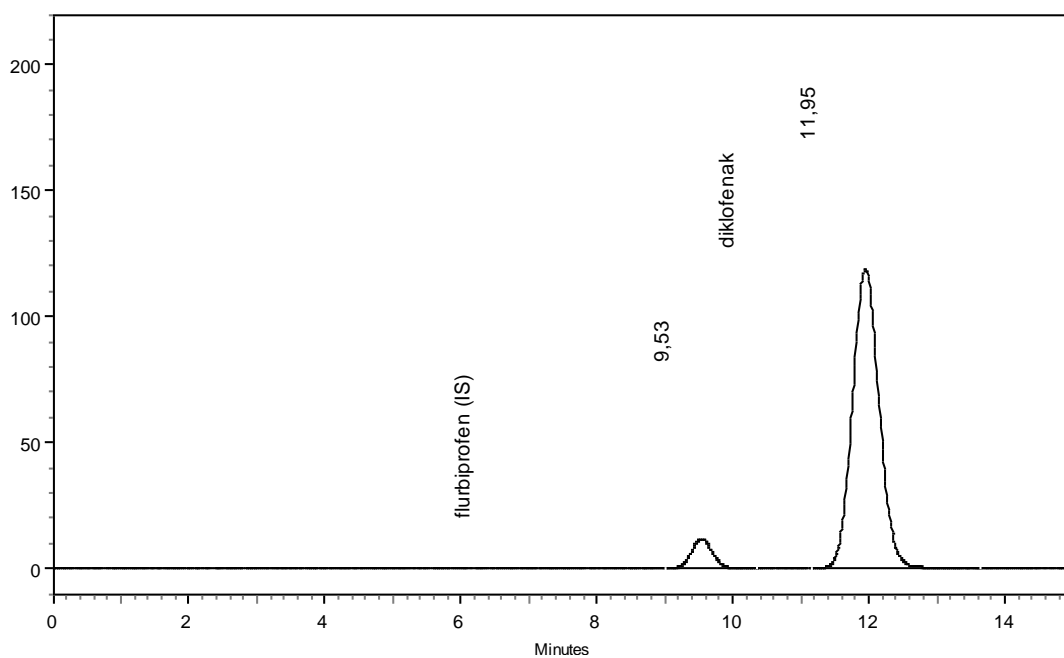
4.3.4 Selektivita

Selektivita se zjišťuje porovnáním chromatogramu placeba připraveného postupem z Kap.4.2 a chromatogramem standardů. (viz Obr.22 – Obr.23)

Obr. 22 : Chromatogram placebo



Obr. 23 : Chromatogram standardů



Porovnáním obou chromatogramů bylo zjištěno, že na chromatogramu placebo není žádný pík, který by měl podobný retenční čas jako jsou píky standardů na druhém chromatogramu. To znamená, že žádný pík z placebo neinterferuje s píky stanovované látky a s píkem vnitřního standardu a tedy že metoda je selektivní.

5 Závěr

- Byla zpracována rešerše na HPLC hodnocení diklofenaku. Byla zpracována i rešerše na jiné analytické metody hodnocení diklofenaku.
- Byl vyvinut izolační postup pro extrakci diklofenaku z léčivého přípravku VERAL čípky.
- Při testování způsobilosti chromatografického systému byla zjištěna tato data:
 - Účinnost kolony vyjádřená počtem teoretických pater byla $N > 4298$.
 - Asymetrie píků byla $A = 1,06$.
 - Rozlišení chromatografických píků bylo $R_{ij} = 3,74$.
 - Opakovatelnost vyjádřená jako směrodatná odchylka byla jak pro diklofenak tak pro flurbiprofen (vnitřní standard) $s_R < 1,0 \%$.
- Přesnost vyjádřená jako směrodatná odchylka byla $s_R = 0,96 \%$. Požadavek je, aby $s_R < 5 \%$.
- Správnost vyjádřená jako směrodatná odchylka byla $s_R = 0,17\%$. Požadavek je, aby $s_R < 5 \%$.
- Metoda je selektivní.

6 Seznam zkratek

HPLC	High performance liquid chromatography (vysokoúčinná kapalinová chromatografie)
NSAID	nesteroidní antiflogistika
COX I	cyklooxygenáza typ I
COX II	cyklooxygenáza typ II
GC	Gas chromatography (plynová chromatografie)
TLC	Thin-layer chromatography (tenkovrstvá chromatografie)
UV	ultrafialové spektrum světelného záření
VIS	viditelné spektrum světelného záření
DAD	diode-array detektor
MS	hmotnostní spektrometrie
NMR	nukleární magnetická rezonance
UPLC	Ultra performance liquid chromatography
ICH	International Conference of Harmonisation
USP	United States Pharmacopoeia (Americký lékopis)
SÚKL	Státní ústav pro kontrolu léčiv
LOD	limit of detection (limit detekce)
LOQ	limit of quantification (limit kvantifikace)
SST	System suitability testing (testování způsobilosti systému)
ČL 2002	Český lékopis 2002
EP	European Pharmacopoeia
BP	British Pharmacopoeia
JP	Japanese Pharmacopoeia
IS	Internal standard (vnitřní standard)

7 *Literatura*

- [1] <http://www.samoleceni.cz> (stránky navštíveny dne 16.11.2005)
- [2] <http://www.pace.cz/source.php?id=8&page=1> (stránky navštíveny dne 16.11.2005)
- [3] Lincová D., Farghali H. et al.: Základní a aplikovaná farmakologie, Galén a Nakladatelství Karolinum, Praha 2002
- [4] Pharmindex Kompendium 2001, MediMedia Information, Praha 2001
- [5] Pharmindex Brevíř 2002/2, MediMedia Information, Praha 2002
- [6] Český lékopis 2002, Grada Publishing a.s., Praha 2002
- [7] Chalabala M. et al.: Technologie léků, Galén, Praha 2001, 308 – 313
- [8] Karlíček R. et al.: Analytická chemie pro farmaceuty, Karolinum, Praha 1998, 267 – 279
- [9] Pacáková V., Štulík K.: High Performance Liquid Chromatography, Státní pedagogické nakladatelství, Praha 1990
- [10] <http://www.kralupy.cz/dg/www2/stranky/chemie/chromatografie.htm> (stránky navštíveny dne 16.11.2005)
- [11] Holzbecher Z., Churáček J. a kol.: Analytická chemie, SNTL – Nakladatelství technické literatury, Praha 1987, 413 – 480
- [12] Meyer V. R.: Practical High Performance Liquid Chromatography, John Willy&Sons, 1994
- [13] Klíma et al.: Pokroky ve farmacii 7, Praha, Avicenum 1990
- [14] Klimeš J. a kol.: Kontrola léčiv I., Karolinum, Praha 2002, 29-33
- [15] Skoog D.A., West D.M., Holler F.J.: Fundamentals of analytical chemistry, Sannders college publishing, U.S.A. 1997, 660-723
- [16] http://faf.vfu.cz/fytochem/hplc_gc.pdf (stránky navštíveny dne 16.11.2005)
- [17] http://hplc.chem.shu.edu/NEW/HPLC_Book/ (stránky navštíveny dne 16.11.2005)
- [18] <http://kerouac.pharm.uky.edu/aery/hplc/detectors.html> (stránky navštíveny dne 16.11.2005)
- [19] Nováková L., Matysová L., Solich P.: Talanta68, 2006, 908 -918
- [20] <http://www.lcgcmac.com/lcgc/data/articlestandard/lcgc/242005/164646/article.pdf> (stránky navštíveny dne 16.11.2005)
- [21] Nováková L.: Disertační práce, FaF UK Hradec Králové 2005

- [22] <http://www.fda.gov/cber/summaries/120600bio10.ppt>
(Stránky navštíveny dne 29.4.2004)
- [23] <http://www.sigmaaldrich.com/img/assets/13660/031.pdf>
(Stránky navštíveny dne 29.4.2004)
- [24] Guideline ICH: Note for guidance on validation of analytical procedures: Methodology (CPMP/ICH/281/95)
- [25] Guideline ICH: Note for guidance on validation of analytical procedures: Definitions and terminology (CPMP/ICH/281/95)
- [26] <http://www.fda.gov/cder/guidance/ichq2a.pdf>
(Stránky navštíveny dne 29.4.2004)
- [27] http://www.labcompliance.com/methods/meth_val.htm
(Stránky navštíveny dne 29.4.2004)
- [28] <http://www.fda.gov/cder/guidance/cmc3.pdf>
(Stránky navštíveny dne 29.4.2004)
- [29] American Pharmacopoeial Convention, Inc.: United States Pharmacopoeia 26, Rockville 2003
- [30] <http://www.sukl.cz> – miluse.pseudlova@sukl.cz
(Stránky navštíveny dne 14.3.2005)
- [31] Holík M.: Validace analytických metod: Postup při práci a příprava protokolu se zaměřením na HPLC a TLC (příručka), Přírodovědecká fakulta Masarykovy univerzity, Brno 1995
- [32] <http://www.emea.eu.int/pdfs/human/ich/028195en.pdf>
(Stránky navštíveny dne 29.4.2004)
- [33] European Pharmacopoeia 4th edition, European Directorate for the Quality of Medicines, Štrasburk 2001
- [34] British Pharmacopoeia 2004, British Pharmacopoeia Commission Office, London 2004
- [35] American Pharmacopoeial Convention, Inc.: United States Pharmacopoeia 28, Rockville 2004
- [36] Japanese Pharmacopoeia 14th edition (English version), The Society of Japanese Pharmacopoeia, Tokyo 2001
- [37] A. Dalpia et al.: International Journal of Pharmaceutics, **291**, 2005, 171 – 181
- [38] M. M. Sena et al.: J. Pharm. Biomed. Anal., **36**, 2004 , 743 – 749

- [39] M. Saravanan et al.: International Journal of Pharmaceutics, **283**, 2004, 71 – 82
- [40] B. X. Mayer et al.: J. Pharm. Biomed. Anal., **33**, 2003, 745 – 754
- [41] S. R. Schaffazick et al.: European Journal of Pharamceutics and Biopharmaceutics, **56**, 2003, 501 – 505
- [42] J. Klimeš et al.: International Journal of Pharmaceutics, **217**, 2001, 153 – 160
- [43] N. H. Gabboun et al.: International Journal of Pharmaceutics, **212**, 2001, 73 – 80
- [44] B. Dimitrova et al.: J. Pharm. Biomed. Anal., **23**, 2000, 955 – 964
- [45] R. Hájková et al.: Analytica Chimica Acta, **467**, 2002, 91 – 96
- [46] L. Gonzalez et al.: J. Pharm. Biomed. Anal., **20**, 1999, 487 – 492
- [47] R. Rocker, V. Kmetec: J. Chromatogr. B, **788**, 2003, 57 – 64
- [48] M. C. Gaudiano et al.: J. Pharm Biomed. Anal., **32**, 2003, 151 – 158
- [49] C. Arcelloni et al.: J. Chromatogr. B, **763**, 2001, 195 – 200
- [50] J. S. Millership et al.: J. Pharm. Biomed. Anal., **25**, 2001, 871 – 879
- [51] X. Ponsoda et al.: Journal of Hematology, **34**, 2001, 19 – 25
- [52] H. S. Lee et al.: J. Pharm. Biomed. Anal., **23**, 2000, 775 – 781
- [53] G. Giagoudakis, S. L. Markantonis: J. Pharm. Biomed. Anal., **17**, 1998, 897 – 901
- [54] G. González – Martin et al.: Biomed. & Pharmacother., **51**, 1997, 170 – 175
- [55] O. Kuhlmann et al.: J. Pharm. Biomed. Anal., **17**, 1998, 1351 – 1356
- [56] I. S. Blagbrough et al.: Journal of Chromatography:Biomedical applications, **578**, 1992, 251 – 257
- [57] J. Moncrief: Journal of Chromatography: Biomedical Applications, **577**, 1992, 185 - 189
- [58] J. L. Santos et al.: Analytica Chimica Acta, **550**, 2005, 116 – 122
- [59] M. J. Hilton, K. V. Thomas: J. Chromatogr. A, **1015**, 2003, 129 – 141
- [60] C. González – Barreiro et al.: J. Chromatogr. A, **993**, 2003, 29 – 37
- [61] M. Ravina et al.: Water Research, **36**, 2002, 3553 – 3560
- [62] Hing-Biu Lee et al.: J. Chromatogr. A, **1094**, 2005, 122 – 129

- [63] Sylwester Mazurek, Roman Szostak: *J. Pharm. Biomed. Anal* , článek v tisku, 2005 (staženo z <http://www.sciencedirect.com>) (stránky navštíveny dne 16.11.2005)
- [64] A. A. Marin et al.: *Il Farmaco*, **60**, 2005, 855 – 858
- [65] N. Y. Hasan et al.: *Il Farmaco*, **58**, 2003, 91 – 99
- [66] Y. C. de Micalizzi et al.: *Talanta*, **47**, 1998, 525 – 530
- [67] M. L. Fernandez de Cordova et al.: *Analytica Chimica Acta*, **369**, 1998, 263 – 268
- [68] Y. K. Agrawal, K Shivramchandra: *J. Pharm. Biomed. Anal*, **9**, 1991, 97 – 100
- [69] C. S. Sastry et al.: *Microchemical Journal*, **39**, 1989, 277 – 282
- [70] Saad S. M. Hassan et al.: *J. Pharm. Biomed. Anal*, **39**, 2005, 315 – 321
- [71] A. O. Santini et al.: *Talanta*, článek v tisku, 2005 (staženo z <http://www.sciencedirect.com>) (stránky navštíveny dne 16.11.2005)
- [72] Amir G. Kazemifard et al.: *J. Pharm. Biomed. Anal*, **30**, 2002, 257 – 262
- [73] Maotian Xu et al.: *Analytical biochemistry*, **329**, 2004, 21 – 27
- [74] D. Šatinský et al.: *Analytica Chimica Acta*, **499**, 2003, 205 – 214
- [75] A.M. Pimenta et al.: *Analytica Chimica Acta*, **470**, 2002, 185 – 194
- [76] Jan Krzek: *J. Pharm. Biomed. Anal*, **28**, 2002, 227 – 243
- [77] Juan A. Arancibia et al.: *Talanta*, **52**, 2000, 261 – 263
- [78] L. A. Carreira et al.: *J. Pharm. Biomed. Anal*, **13**, 1995, 1331 – 1337
- [79] Orhan Caklerer, et al.: *J. Pharm. Biomed. Anal*, **20**, 1999, 19 – 26
- [80] B. V. Kamath et al.: *J. Pharm. Biomed. Anal*, **12**, 1994, 343 – 346
- [81] M. G. Donato et al.: *J. Pharm. Biomed. Anal*, **12**, 1994, 21 – 26
- [82] A.Espinosa-Mansilla et al.: *Analytical Biochemistry*, článek v tisku, 2005 (staženo z www.sciencedirect.com) (stránky navštíveny dne 16.11.2005)
- [83] Mojtaba Shamsipur et al.: *J. Pharm. Biomed. Anal*, **37**, 2005, 943 – 947
- [84] Angelo Zinellu et al.: *European Journal of Pharmaceutical Science*, **24**, 2005, 375 – 380
- [85] Wenrui Jin, Jie Zhang: *J. Chromatogr.*, **868**, 2000, 101 – 107
- [86] Maotian Xu et al.: *Analytical Biochemistry*, **329**, 2004, 21 – 27
- [87] L. G. Lala et al.: *J. Pharm. Biomed. Anal*, **29**, 2002, 539 – 544

- [88] Michael R. Borenstein et al.: J. Chromatogr. B: Biomedical Sciences and Applications, **685**, 1996, 59 – 66
- [89] A. Sioufi et al.: J. Chromatogr.: Biomedical Applications, **571**, 1991, 87 – 100
- [90] E. G. de Jong et al.: J. Pharm. Biomed. Anal, **7**, 1989, 1617 – 1622
- [91] W. Schneider, P. H. Degen : J. Chromatogr. B: Biomedical Sciences and Applications, **383**, 1986, 412 – 418
- [92] B. Kadowaki et al.: J. Chromatogr.: Biomedical Bpplications, **308**, 1984, 329 – 333
- [93] Wan-Ching Line t al.: J. Chromatogr. A, **1065**, 2005, 279 – 285
- [94] Stefan Weigel et al.: J. Chromatogr. A, **1023**, 2004, 183 – 195
- [95] V. Koutsouba et al.: Chemosphere, **51**, 2003, 69 – 75
- [96] I. Rodriguez et al.: J. Chromatogr. A, **985**, 2003, 265 – 274
- [97] Ulrich Jux et al.: International Journal of Hygiene and Environmental Health, **205**, 2002, 393 – 398
- [98] Sjef Öllers et al.: J. Chromatogr. A, **911**, 2001, 225 – 234
- [99] Nikolaos Kourkoumelis et al.: Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy, **60**, 2004, 2253 – 2259
- [100] Werner Ahrer et al.: J. Chromatogr. A, **910**, 2001, 69 – 78