

Studium disoluce u finálního farmaceutického přípravku

Bc. Markéta Vilášková

Diplomová práce
2013



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně

Fakulta technologická

Ústav analýzy a chemie potravin

akademický rok: 2012/2013

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Markéta Vilášková**
Osobní číslo: **T11727**
Studijní program: **N2901 Chemie a technologie potravin**
Studijní obor: **Technologie, hygiena a ekonomika výroby potravin**
Forma studia: **kombinovaná**

Téma práce: **Studium disoluce u finálního farmaceutického přípravku.**

Zásady pro vypracování:

I. Teoretická část

1. Charakteristika farmaceutického přípravku Novo – passit.
2. Proces disoluce.
3. Stanovení aktivních složek HPLC a spektrofotometricky.
4. Validace metody stanovení aktivní látky v přípravku Novo – passit.

II. Praktická část

1. Validací proces v systému cGMP.
2. Provedení validace zaregistrované analytické metody.
3. Vývoj metody s UV/VIS detekcí.

Rozsah diplomové práce:

Rozsah příloh:

Forma zpracování diplomové práce: **tištěná**

Seznam odborné literatury:

1. Český lékopis 2009. 1. vyd. Praha: Grada Publishing, 2009
2. KLOUDA, Pavel. Moderní analytické metody. 2., upr. a dopl. vyd. Ostrava: Pavel Klouda, 2003
3. HELEN FARMER-KNOWLESOVÁ. Léčivé rostliny od A do Z. první vydání. Praha: Metafora spol. s r.o., 2011
4. DRESSMAN, J a Johannes KRAEMER. Pharmaceutical dissolution testing. Boca Raton: Taylor, 2005
5. Léčivé rostliny. Překlad Jana Jindrová. Praha: Ottovo nakladatelství, 2010, Ottův průvodce přírodou.
6. Interní dokumenty Teva Czech Industries: PI/PQC/065/V2; PI/PQC/069/V1; NO/PQC/093; SOP/PQA/025/V6; SOP/PQA/026/V5; SOP/PQA/056; SOP/PQA/058/V3; SOP/PQA/070/V3; SOP/PQC/062/V8; SOP/PQC/064/V2; SOP/PQC/093
7. www.ich.org

Vedoucí diplomové práce:

Mgr. Lukáš Dvořák

Teva Czech Industries s.r.o.

Datum zadání diplomové práce:

11. února 2013

Termín odevzdání diplomové práce:

17. května 2013

Ve Zlíně dne 11. února 2013


doc. Ing. Roman Čermák, Ph.D.
děkan




doc. Ing. Miroslav Fišera, CSc.
ředitel ústavu

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že

- beru na vědomí, že odevzdáním diplomové práce souhlasím se zveřejněním své práce podle zákona č. 111/1998 Sb. o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších právních předpisů, bez ohledu na výsledek obhajoby ¹⁾;
- beru na vědomí, že diplomová práce bude uložena v elektronické podobě v univerzitním informačním systému dostupná k nahlédnutí, že jeden výtisk diplomové práce bude uložen na příslušném ústavu Fakulty technologické UTB ve Zlíně a jeden výtisk bude uložen u vedoucího práce;
- byla jsem seznámena s tím, že na moji diplomovou práci se plně vztahuje zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, zejm. § 35 odst. 3 ²⁾;
- beru na vědomí, že podle § 60 ³⁾ odst. 1 autorského zákona má UTB ve Zlíně právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla v rozsahu § 12 odst. 4 autorského zákona;
- beru na vědomí, že podle § 60 ³⁾ odst. 2 a 3 mohu užít své dílo – diplomovou práci nebo poskytnout licenci k jejímu využití jen s předchozím písemným souhlasem Univerzity Tomáše Bati ve Zlíně, která je oprávněna v takovém případě ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které byly Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně na vytvoření díla vynaloženy (až do jejich skutečné výše);
- beru na vědomí, že pokud bylo k vypracování diplomové práce využito softwaru poskytnutého Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně nebo jinými subjekty pouze ke studijním a výzkumným účelům (tedy pouze k nekomerčnímu využití), nelze výsledky diplomové práce využít ke komerčním účelům;
- beru na vědomí, že pokud je výstupem diplomové práce jakýkoliv softwarový produkt, považují se za součást práce rovněž i zdrojové kódy, popř. soubory, ze kterých se projekt skládá. Neodevzdání této součásti může být důvodem k neobhájení práce.

Ve Zlíně 10. 5. 2013

.....

¹⁾ zákon č. 111/1998 Sb. o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších právních předpisů, § 47 Zveřejňování závěrečných prací:

(1) Vysoká škola nevýdělečně zveřejňuje disertační, diplomové, bakalářské a rigorózní práce, u kterých proběhla obhajoba, včetně posudků oponentů a výsledku obhajoby prostřednictvím databáze kvalifikačních prací, kterou spravuje. Způsob zveřejnění stanoví vnitřní předpis vysoké školy.

(2) Disertační, diplomové, bakalářské a rigorózní práce odevzdané uchazečem k obhajobě musí být též nejméně pět pracovních dnů před konáním obhajoby zveřejněny k nahlížení veřejnosti v místě určeném vnitřním předpisem vysoké školy nebo není-li tak určeno, v místě pracoviště vysoké školy, kde se má konat obhajoba práce. Každý si může ze zveřejněné práce pořizovat na své náklady výpisy, opisy nebo rozmnoženiny.

(3) Platí, že odevzdáním práce autor souhlasí se zveřejněním své práce podle tohoto zákona, bez ohledu na výsledek obhajoby.

²⁾ zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, § 35 odst. 3:

(3) Do práva autorského také nezasahuje škola nebo školské či vzdělávací zařízení, užije-li nikoli za účelem přímého nebo nepřímého hospodářského nebo obchodního prospěchu k výuce nebo k vlastní potřebě dílo vytvořené žákem nebo studentem ke splnění školních nebo studijních povinností vyplývajících z jeho právního vztahu ke škole nebo školskému či vzdělávacímu zařízení (školní dílo).

³⁾ zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, § 60 Školní dílo:

(1) Škola nebo školské či vzdělávací zařízení mají za obvyklých podmínek právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla (§ 35 odst. 3). Odpírá-li autor takového díla udělit svolení bez vážného důvodu, mohou se tyto osoby domáhat nahrazení chybějícího projevu jeho vůle u soudu. Ustanovení § 35 odst. 3 zůstává nedotčeno.

(2) Není-li sjednáno jinak, může autor školního díla své dílo užít či poskytnout jinému licenci, není-li to v rozporu s oprávněnými zájmy školy nebo školského či vzdělávacího zařízení.

(3) Škola nebo školské či vzdělávací zařízení jsou oprávněny požadovat, aby jim autor školního díla z výdělku jím dosaženého v souvislosti s užitím díla či poskytnutím licence podle odstavce 2 přiměřeně přispěl na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložily, a to podle okolností až do jejich skutečné výše; přitom se přihlédne k výši výdělku dosaženého školou nebo školským či vzdělávacím zařízením z užití školního díla podle odstavce 1.

ABSTRAKT

Diplomová práce je zaměřena na problematiku disolučních testů, které zaujímají významnou úlohu při studiích léčivých přípravků ve farmaceutickém průmyslu. Disoluce neboli testy rozpustnosti umožňují stanovení množství uvolněné léčivé látky z pevné lékové formy v předepsané kapalině a v předepsaném časovém úseku. Diplomová práce popisuje uvolňování účinné látky z lékové formy do organismu u přípravku Novo-Passit tablety. Disoluční studie probíhala dle pravidel popsaných v evropském lékopisu (EP). Disoluční testy byly provedeny na disolučním přístroji SOTAX AT 7 Smart a na disolučním robotu SOTAX AT 70 Smart. Validace současně zaregistrované metody proběhla podle ICH (International Conference on Harmonisation) protokolu Q2(R1), který u disolucí požaduje ověření linearity, přesnosti, správnosti, robustnosti a specifity. V souladu s českou legislativou (Zákon 378/2007 Sb. o léčivech a o změnách některých souvisejících zákonů) a ICH Q8(R2) (Pharmaceutical Development) byl proveden převod detekce stanovení obsahu účinné látky s cílem usnadnit nebo zjednodušit analýzu a zkrátit její čas. Byly navrženy dva nové typy detekce – UV/VIS (Ultraviolet/Visible) a UHPLC (Ultra-High Performance Liquid Chromatography). Zatímco UV/VIS metoda v důsledku neselektivity nevyhověla požadavkům pro využití ve farmaceutické praxi, převodem na UHPLC metodu byla při změně přípravy roztoků (sjednocení přípravy roztoků vzorku a standardu), kolony (Acquity UPLC BEH C18, 1.7 μ m, 50 x 2.1 mm) a podmínek chromatografického měření (průtok – 0,4 ml, objem vzorku - 1 μ l) výrazně zkrácená doba analýzy z původních 15-ti minut na 2 minuty.

Klíčová slova: Novo-Passit tablety, disoluce, validace, spektrofotometrie, chromatografie.

ABSTRACT

The thesis is focused on the issue of dissolution tests, which play an important role in the study of medicinal products in the pharmaceutical industry. Dissolution test allows determination of the released active ingredient from solid dosage forms in the prescribed fluid and in a prescribed time period. The thesis describes the drug release from the dosage form of the Novo-Passit tablets into the body. The dissolution study was carried out according to the rules described in the European Pharmacopoeia (EP). Dissolution tests were performed on the dissolution device SOTAX AT 7 Smart and dissolution robot SOTAX AT 70 Smart. Validation of current method was held by ICH Q2 Protocol (R1), which requires verification of linearity, precision, accuracy, robustness and specificity. In accordance with Czech legislation (Act 378/2007 Coll. Pharmaceuticals (International Conference on Harmonisation) and on Amendments to Some Related Acts) and ICH Q8 (R2) (Pharmaceutical Development) was performed transfer of detection assay of the active substance in order to facilitate and simplify the analysis and shorten its time. There were designed two new types of detection – UV/VIS (ultraviolet/visible) and UHPLC (Ultra-High Performance Liquid Chromatography). While UV/VIS method failed to comply with the requirements for use in pharmaceutical practice, a new UHPLC method significantly shortened time of the analysis (from 15 minutes to 2 minutes) and simplified standard and sample preparation under following conditions: column (Acquity UPLC BEH C18, 1.7 micron, 50 x 2.1 mm) and chromatographic measurement conditions (flow rate - 0.4 mL sample volume - 1 mL).

Keywords: Novo-Passit tablets, dissolution studies, validation, spectrophotometry, chromatography.

Tímto bych chtěla poděkovat doc. Ing. Miroslavu Fišerovi CSc., Mgr. Lukáši Dvořákovi, Ing. Petru Lepařovi a Ing. Lukáši Müllerovi za odborné vedení, poskytnutí cenných připomínek a rad, trvalý zájem a podporu při vypracování diplomové práce.

Prohlašuji, že odevzdaná verze diplomové práce a verze elektronická nahraná do IS/STAG jsou totožné.

Prohlašuji, že jsem na diplomové práci pracovala samostatně a použitou literaturu jsem citovala. V případě publikace výsledků, je-li to uvedeno na základě licenční smlouvy, budu uvedena jako spoluautorka.

Ve Zlíně, 10. 5. 2013

.....

Podpis studenta

OBSAH

ÚVOD	13
I TEORETICKÁ ČÁST	15
1 NOVO-PASSIT TABLETY	16
1.1 BYLINNÉ SLOŽENÍ NOVO-PASSIT TABLET	16
1.1.1 Třezalka tečkovaná.....	16
1.1.2 Mučenka pletní.....	17
1.1.3 Kozlík lékařský	17
1.1.4 Meduňka lékařská	18
1.1.5 Chmel otáčivý	18
1.1.6 Hloh obecný	18
1.1.7 Bez černý.....	19
1.2 CHEMICKÉ SLOŽENÍ PŘÍPRAVKU NOVO-PASSIT TABLETY.....	19
1.2.1 Guaifenesin.....	19
1.3 VÝROBA NOVO-PASSIT EXTRACT DRY	21
1.4 VÝROBA TABLET NOVO-PASSIT	22
2 DISOLUCE	23
2.1 TYPY DISOLUČNÍCH METOD	24
2.1.1 Pádelková metoda	25
2.2 KOŠÍČKOVÁ METODA	27
2.3 METODA S PRŮTOKOVOU CELOU	29
2.4 MODERNÍ DISOLUČNÍ TECHNIKY	29
2.4.1 Disoluční automat	31
2.5 DŮLEŽITÉ PARAMETRY DISOLUČNÍCH TESTŮ	31
2.5.1 Otáčky míchadla.....	31
2.5.2 Disoluční médium	32
2.5.2.1 Objem disolučního média	32
2.5.2.2 Teplota disolučního média a odplynění disolučního média.....	32
2.5.3 Čas analýzy.....	33
2.6 KONTROLA DISOLUČNÍCH PŘÍSTROJŮ.....	33
3 MOLEKULOVÁ ABSORPČNÍ SPEKTROFOTOMETRIE V UV/VIS OBLASTI	35
3.1 ABSORPČNÍ SPEKTRUM	35
3.2 LAMBERT-BEERŮV ZÁKON	36
3.3 INSTRUMENTACE	37
3.3.1 Zdroje záření	38
3.3.2 Detektory	38
3.4 ZÁKLADNÍ USPOŘÁDÁNÍ PRO UV/VIS SPEKTROFOTOMETRII	39
4 KAPALINOVÁ CHROMATOGRRAFIE	41

4.1	VYSOKOÚČINNÁ KAPALINOVÁ CHROMATOGRAFIE	42
4.1.1	Základní části HPLC chromatografu.....	42
4.1.1.1	Vysokotlaká pumpa	44
4.1.1.2	Zařízení pro gradientovou eluci	44
4.1.1.3	Dávkování	44
4.1.1.4	Kolona.....	45
4.1.1.5	Detektor	45
4.1.2	Chromatogram.....	45
4.1.3	Praktická aplikace kapalinové chromatografie.....	46
5	VALIDACE.....	47
5.1	VALIDACE ANALYTICKÝCH METOD.....	47
5.2	TYPY ANALYTICKÝCH METOD	49
5.3	VALIDAČNÍ CHARAKTERISTIKY ANALYTICKÝCH METOD	49
5.3.1	Specificita.....	50
5.3.1.1	Testy totožnosti.....	50
5.3.1.2	Testy stanovení obsahu a nečistot.....	50
5.3.2	Správnost.....	50
5.3.2.1	Stanovení obsahu v léčivé látce	50
5.3.2.2	Stanovení obsahu v léčivém přípravku	51
5.3.2.3	Kvantitativní stanovení nečistot.....	51
5.3.2.4	Prokázání správnosti analytické metody.....	51
5.3.3	Přesnost	51
5.3.4	Linearita	52
5.3.5	Rozsah	52
5.3.6	Detekční limit.....	52
5.3.7	Kvantifikační limit	53
5.3.8	Robustnost.....	53
5.4	ŘÍZENÍ VALIDACÍ.....	53
5.4.1	Validační protokol.....	54
5.4.2	Validační zpráva.....	54
II	PRAKTICKÁ ČÁST	55
6	CÍL DIPLOMOVÉ PRÁCE	56
7	VALIDACE ANALYTICKÉ METODY U PŘÍPRAVKU NOVO-PASSIT TABLETY	57
7.1	VYTVOŘENÍ VALIDAČNÍHO PROTOKOLU	57
7.1.1	Materiál a přístroje	57
7.1.1.1	Vzorek Novo-Passit tablety	57
7.1.1.2	Seznam chemikálií a roztoků.....	58
7.1.1.3	Zařízení	58
7.1.2	Příprava vzorků, standardů a placebo disoluční technikou	58
7.1.2.1	Příprava vzorku.....	58
7.1.2.2	Příprava standardu	59
7.1.2.3	Příprava placebo.....	59
7.1.2.4	Příprava mobilní fáze.....	59
7.1.2.5	Chromatografické podmínky	59

7.1.3	Validace jednotlivých charakteristik	60
7.1.3.1	Specificita	60
7.1.3.2	Robustnost	60
7.1.3.3	Správnost	62
7.1.3.4	Linearita	63
7.1.3.5	Rozsah	63
7.1.3.6	Přesnost	63
7.2	LABORATORNÍ PROVEDENÍ VALIDACE ANALYTICKÉ METODY	65
7.3	VALIDAČNÍ ZPRÁVA	66
7.3.1	Specificita	68
7.3.2	Robustnost	71
7.3.2.1	Stabilita vzorku a standardu	71
7.3.2.2	Disoluční parametry	74
7.3.2.3	HPLC parametry	76
7.3.2.4	Filtrační studie	76
7.3.3	Správnost	77
7.3.4	Linearita	77
7.3.5	Rozsah	78
7.3.6	Přesnost	78
7.3.6.1	Opakovatelnost	78
7.3.6.2	Systémová přesnost	79
7.3.6.3	Intermediální přesnost	80
7.3.6.4	Srovnání automatické a manuální disoluce	81
8	VÝVOJ NOVÉ METODY NA STANOVENÍ OBSAHU GUAIFENESINU	82
8.1	STANOVENÍ GUAIFENESINU SPEKTROFOTOMETRICKY	82
8.1.1	Materiál a přístroje	82
8.1.1.1	Vzorek Novo-Passit tablety	82
8.1.1.2	Seznam chemikálií	82
8.1.1.3	Pomůcky a přístroje	83
8.1.1.4	Příprava vzorku, placebo a standardu pro UV/VIS měření	83
8.1.1.5	Spektrofotometrické měření	84
8.1.1.6	Výsledky a diskuze	85
8.2	PŘEVEDENÍ METODY STANOVENÍ GUAIFENESINU Z HPLC NA UHPLC	90
8.2.1	Příprava roztoků standardu a vzorku	90
8.2.2	Identifikace neznámého píku	91
8.2.3	Vývoj nové UHPLC metody	95
8.2.3.1	Chemikálie a činidla	95
8.2.3.2	Zařízení	95
8.2.3.3	Příprava mobilní fáze a disolučního média	95
8.2.3.4	Příprava roztoků vzorku a standardu	95
8.2.4	Chromatografické podmínky	96
8.3	VALIDACE UHPLC METODY PRO PŘÍPRAVEK NOVO-PASSIT TABLETY	97
8.3.1	Validační protokol UHPLC metody	97
8.3.1.1	Materiál a přístroje	97
8.3.1.2	Seznam chemikálií a roztoků	98
8.3.1.3	Zařízení	98

8.3.1.4	Příprava disolučního média	98
8.3.1.5	Příprava mobilní fáze.....	98
8.3.1.6	Příprava roztoků vzorku a standardu	98
8.3.2	Chromatografické podmínky.....	99
8.3.3	Validace jednotlivých charakteristik	100
8.3.3.1	Specificita	100
8.3.3.2	Robustnost	100
8.3.3.3	Správnost	102
8.3.3.4	Linearita	103
8.3.3.5	Rozsah.....	103
8.3.3.6	Přesnost.....	103
ZÁVĚR	106
SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	108
SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK	113
SEZNAM OBRÁZKŮ	114
SEZNAM TABULEK	116
SEZNAM PŘÍLOH	118

ÚVOD

Disoluční studie patří mezi nezbytné testy používané ve farmaceutickém průmyslu. Prvotní uplatnění disolucí bylo při stanovení množství a rozsahu uvolňování API (Active Pharmaceutical Ingredients) z pevných lékových forem (tablety, měkké želatinové tobolky, kapsle). V dnešní době nachází disoluce uplatnění nejen v oblasti výzkumu a vývoje (R&D – Research and Development) nových generických přípravků a jejich bioekvivalenčních studiích, ale také při kontrole kvality (QC – Quality Control) již registrovaných přípravků.

Jednoduše lze disoluce popsat jako prostředek, který může poskytnout cenné informace o biologické dostupnosti léčivého přípravku. Disoluční testování sleduje především rychlost, s jakou se API dostane z lékové formy do kapaliny, která představuje určitou část gastrointestinálního traktu, kde se má tableta rozpustit a API se má vstřebat do lidského těla. Obsah účinné látky ve vzorcích odebraných během disoluce se stanoví spektrofotometricky nebo pomocí kapalinové chromatografie.

Cílem validace analytické metody je zajistit, že zvolená analytická metoda je vhodná pro zamýšlený účel použití. Validace představuje ověření validačních charakteristik podle zásad GMP (Good Manufacturing Practice). Validací se běžně využívá nejen v oblasti kontroly kvality, ale také při registraci léku a jeho následném uvedení na trh. Každá metoda sloužící pro účely propouštění finálního farmaceutického přípravku na trh musí být validována. Stejná zásada platí i v případě, kdy nahrazujeme dle principu „Quality by Design“ neefektivní nebo již zaregistrovanou metodu metodou modernější. V těchto případech je nutné kromě validace, poskytnout i srovnání mezi oběma metodami.

Diplomová práce je zaměřena na validaci současně zaregistrované disoluční analytické metody u přípravku Novo-Passit tablety. Tato metoda nebyla doposud validována. Z důvodu studijního programu byl zvolen přípravek, který vyniká bylinným složením. V dnešní době se člověk nachází na počátku trendu, který má svůj původ zakořeněný hluboko v minulosti, kdy jediným farmaceutickým gigantem byla příroda sama. Na základě této skutečnosti byl vyvinut i přípravek Novo-Passit (perorální roztok a tablety), který obsahuje extrakt ze sedmi bylin. Obsah účinné látky guaifenesinu v přípravku Novo-Passit tablety se stanovuje pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie.

Dalšími cíly diplomové práce je vyvinout metodu pro stanovení obsahu guaifenesinu spektrofotometricky, nebo převést metodu z HPLC techniky (High Performance Liquid Chromatography) na UHPLC techniku, což by významně rozšířilo možnosti testování přípravku.

Diplomová práce byla vytvořena výhradně ve společnosti Teva Czech Industries s.r.o v prostorách laboratoří kontroly kvality QC Pharma. Analytická (validační i vývojová) práce proběhla plně v souladu s předpisy korporace Teva a GMP. Veškerá primární data jsou uložena a závěry diplomové práce formovány do následujících dokumentů společnosti Teva Czech Industries s.r.o.:

QDP0050029 – Novo-Passit 200 mg tablety: Validací protokol disoluční metody.

QDP0055972 – Novo-Passit 200 mg: Validací zpráva disoluční metody.

QDP0057894 – Novo-Passit 200 mg: Vývoj disoluční metody UV/VIS technikou.

QDP0057892 – Novo-Passit 200 mg tablety: Vývoj disoluční metody UHPLC technikou.

QDP0056753 – Novo-Passit 200 mg tablety: Validací protokol UHPLC metody.

I. TEORETICKÁ ČÁST

1 NOVO-PASSIT TABLETY

Zvýšená podrážděnost, náladovost, únava, nedostatečná schopnost koncentrace, bolesti hlavy a svalů, poruchy spánku nebo pocity malátnosti představují příznaky, které se řadí pod lékařský pojem „neurastenie“. Někdy však postačí prostředky souhrnně označovány jako fytotherapeutika (léčiva, jejichž účinnou látkou jsou rostlinné drogy) a anxiolytika, mezi které řadíme guaifenesin, jednu z API u přípravku Novo-Passit tablety [1].

Novo-Passit je léčivý přípravek, který je vyráběn v podobě perorálního roztoku a tablet (Obr. 1). Nejvýznamnější API je guaifenesin, jenž odstraňuje strach a psychické napětí a uvolňuje kosterní svalstvo. Novo-Passit obsahuje dále směs extraktů ze sedmi léčivých bylin – meduňka, mučenka, kozlík, třezalka, bez, hloh a chmel. Tento lék je určen nejen pro dospělé lidi, ale je vhodný také pro děti od dvanácti let.



a)



b)

Obr. 1 Novo-Passit (a – tablety, b – kapky) [1]

1.1 Bylinné složení Novo-Passit tablet

1.1.1 Třezalka tečkovaná (*Hypericum perforatum*)

Třezalka tečkovaná je považována za velmi významnou léčivou bylinu, která má velmi silný pozitivní účinek na náš organismus. Její léčivá působení jsou známá již po mnoho generací, především v lidovém léčitelství. I když je proslulá jako účinná zbraň proti stresu, nespavosti, úzkosti a depresím, tak i nadále bývá často předmětem různých výzkumů, protože účinky obsahovaných látek a jejich kombinací v této rostlině nejsou ještě plně odhaleny [2].

Třezalku je možné užívat po mnoho měsíců, jelikož není návyková. Její léčivou látkou je pigment hypericin, který je nejčastěji považován za aktivní složku byliny. Mimoto však

třezalka obsahuje i velké množství organických látek (flavanoly, flavonony, karoteny, fytoosteroly) v různé koncentraci. Je tedy možné, že antidepresivní účinek má některá jiná složka [2]. Některé látky, které třezalka obsahuje, mohou působit na lidské tělo močopudně, takže je možné třezalku využít i při čištění těla a při zánětlivých onemocněních ledvin. Celkově podporuje činnost žaludku, žlučníku a jater. Je možné ji použít i jako přírodní antibiotikum v boji proti původcům chřipky [3].

1.1.2 Mučenka pletní (*Passiflora inkarnata*)

Mučenka je rostlina původem z Jižní Ameriky a jižních oblastí Severní Ameriky. Nadzemní část rostliny obsahuje významné množství harmalových alkaloidů, které mají poměrně silné sedativní účinky. Její výhodou je, že není návyková, takže ji lze používat po delší dobu. Nedoporučuje se však pacientům, kteří mají nemocná játra, a malým dětem. Mimoto obsahuje také flavonoidy (především glykosylflavony), glykoproteiny, v nepatrném množství kyanogenní glykosid gyncardin a stopy éterických olejů [4].

Mučenka je blahodárnou rostlinou pro všechny, kteří mají problémy s nespavostí, trpí pocity psychického napětí a úzkosti. Působí též jako kardiosedativum. Jelikož uklidňuje i hladké svalstvo v trávicí soustavě, doporučuje se také k uklidnění trávení. Vzhledem k psychickým nárokům, které hektická doba klade na každého člověka, cení se především její schopnosti utlumit pocity úzkosti a psychického napětí. Rovněž zlepšuje a prohlubuje spánek, navrácí duševní rovnováhu a pohodu [4].

1.1.3 Kozlík lékařský (*Valeriana officinalis*)

Kozlík lékařský patří mezi jedny z nejpobulárnějších rostlin, které často nacházejí své využití při nervových chorobách, např. úzkosti a nespavosti. Kozlík je výjimečný především díky obsahu valepotriátů a terpenických látek, jež mají sedativní účinky. Studie prokázaly, že i samotná vůně kozlíku lékařského má uklidňující a relaxační účinky. Jeho pozitivní efekt se využívá při neurózách a nervovém vyčerpání. Na rozdíl od jiných látek se sedativním účinkem není návykový a nezůstává po něm pocit omámenosti. Kozlík lékařský by neměli brát lidé s jaterními obtížemi a není doporučován ani těhotným ženám, jelikož by mohl mít negativní vliv na vývoj dětského mozku [3].

1.1.4 Meduňka lékařská (*Melissa officinalis*)

Meduňka lékařská je ceněnou rostlinou především pro uklidňující účinky. Obsahuje hlavně silice (citral, citronelal, geraniol, linalol), třísloviny, kyselinu hydroxytriterpenovou, flavonoidy a minerální látky [4].

Meduňka posilňuje nervovou soustavu a působí sedativně a spazmolyticky. Mimoto se uplatňuje při srdečních onemocněních, migrénách, nespavosti a nervovém vypětí. Kromě toho působí taktéž proti nadýmání, takže se využívá při funkčních onemocnění střev – uvolňuje plyny ve střevech, zastavuje zvracení, stimuluje trávení a vylučování žlučové šťávy, podporuje chuť k jídlu [4].

1.1.5 Chmel otáčivý (*Humulus lupulus*)

Chmel jakožto léčivá rostlina je známá již od středověku. Kromě využití v pivovarnictví a gastronomii se chmel cení také pro obsah pryskyřice s hořčinami. Hořčiny a silice povzbuzují chuť k jídlu a mohou působit mírně diureticky. Uklidňují nepříjemné stavy při nervové podrážděnosti a vyvolávají spánek, takže působí jako sedativum [5]. Sedativní účinky jsou zesíleny, když se chmel otáčivý použije v kombinaci s kozlíkem lékařským.

1.1.6 Hloh obecný (*Crataegus laevigata*)

Hloh je považován za „srdeční bylinu“. Květy a čerstvé nebo usušené plody jsou srdečním sedativem, roztahují cévy a snižují krevní tlak. Listy, bobule a květy jsou zase srdečním tonikem, které funguje synergisticky a normalizuje činnost srdce. Květy ve formě čaje jsou výborné na krevní oběh a na srdce. Hloh se může uplatňovat jako lék proti křečím, popřípadě má taktéž sedativní účinky [3].

Obsahuje flavonoidy, které mají silný antioxidační účinek a dále taniny, esenciální oleje, barviva, vitamíny, kyseliny a deriváty purinu. Má uklidňující účinek u lidí trpících nespavostí a pomáhá při celkovém vyčerpání, především u starších lidí. Pro většinu dospělých je při krátkodobém užívání bezpečný, může však reagovat s látkami na předpis a tehdy by jeho užívání mělo být konzultováno s lékařem [3].

1.1.7 Bez černý (*Sambucus nigra*)

Bez černý je listnatý keř, který své využití nachází nejen ve farmaceutickém průmyslu, ale také v léčitelství a potravinářství. Léčivé jsou pouze rostliny s fialovými a černými bobulemi. Všechny zelené části černého bezu jsou jedovaté, protože obsahují glykosid, jehož rozkladem vzniká kyanid. V kůře jsou toxické krystaly oxalátu vápenatého [3].

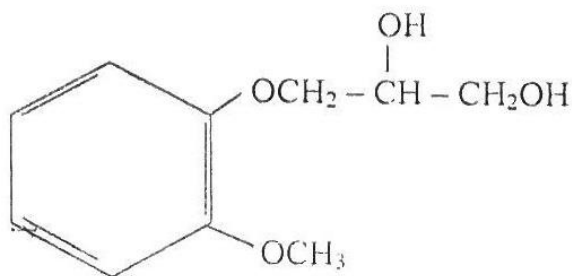
Bez černý obsahuje především glykosidy, třísloviny, vitamíny, slizovité látky, éterické oleje a organické kyseliny. Své využití nachází nejen při boji proti chřipce, ale též při pročištění krve, usnadnění vykašlávání a zastavení krvácení. Mimoto má také analgetický účinek, takže se uplatňuje při neuralgii a migréně. Bez černý má uklidňující efekt na nervový systém bez pocitů spavosti a snížení pozornosti. Extrakt z listů v kombinaci s třezalkou tečkovanou a mydlicí lékařskou oslabuje chřipkové a oparové viry [3].

1.2 Chemické složení přípravku Novo-Passit tablety

1.2.1 Guaifenesin

Guaifenesin je bezpečná a nenávyková látka. Je vhodný na lehčí formy neurastenických obtíží, jako je úzkost, strach, smutek, neklid, podrážděnost, lehčí formy nespavosti, nesoustředěnost, bolest hlavy spojená s neurotickým napětím, ale i na problémy spojené s premenstruačním syndromem.

Guaifenesin [3-(2-Methoxyphenoxy)-1,2-propandiol] (Obr. 2) je bílý krystalický prášek [6]. Látka guaifenesin původně pochází z Amerického kontinentu. Již v 16. století byl využíván v boji proti syfilis, v dnešní době je guaifenesin obsažen v lécích, které se používají při onemocnění respiračních cest. Mimo jiné patří do skupiny centrálních myorelaxancií, kdy snižuje psychické a emoční napětí s pocitem úzkosti, má mírně sedativní účinky, snižuje svalový tonus a působí expektoračně.

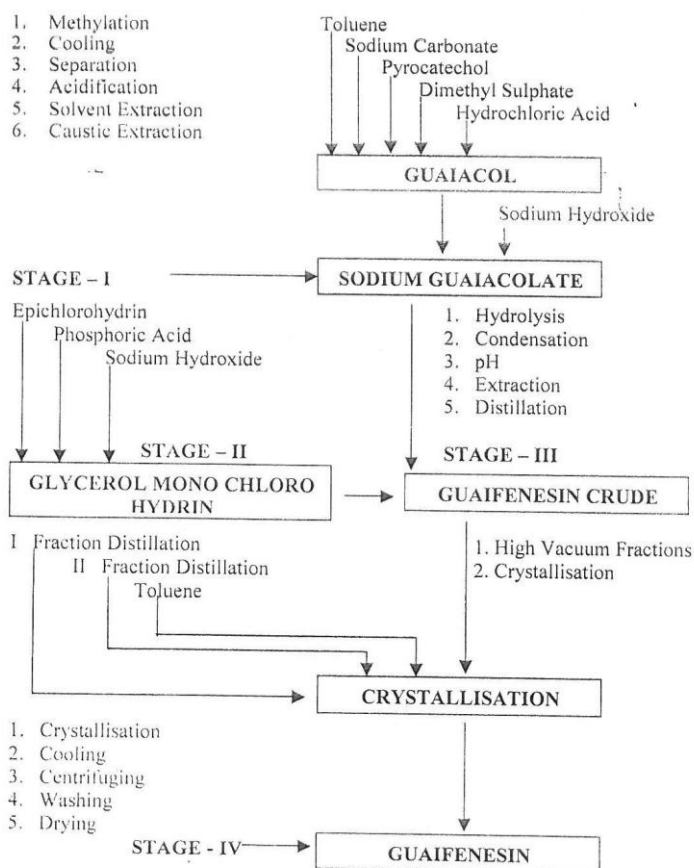


Obr. 2 Molekulární struktura guaifenesinu (Příloha PI)

Guaifenesin patří mezi látky dráždivé. Jestliže přijde do kontaktu s očima a pokožkou, může vyvolat alergickou reakci na prach. V případě vdechnutí může podráždit sliznici a vyvolat nevolnost. Proto je nutné při práci s guaifenesinem používat ochranné pomůcky, jako jsou rukavice, ochranné brýle a ochrannou masku proti prachu. (Příloha PI)

Výroba guaifenesinu (Obr. 3) je rozdělena do několika etap. V první fázi reaguje pyrokatechol s dimethyl sulfátem v toluenu a vznikne guajakol, který s hydroxidem sodným reaguje za vzniku soli guajakolátu sodného. V další fázi reaguje epichlorhydrin s vodou v prostředí kyseliny fosforečné a vznikne glycerol monochlorohydrin. Produkty první a druhé fáze spolu reagují při 100°C a dávají vzniknout surovému guaifenesinu, který se dále čistí, promývá a destiluje se ve vakuu, čímž vzniká technický guaifenesin. V posledním kroku dochází ke krystalizaci technického guaifenesinu v toluenu a vzniká forma guaifenesinu, jenž se využívá ve farmaceutickém průmyslu (Příloha PI).

Ve společnosti Teva Czech Industries s.r.o. se jako API používá nejen k výrobě přípravku Novo-Passit, ale figuruje také jako aktivní ingredience společně s butamirát citrátem i v přípravku Stoptussin.

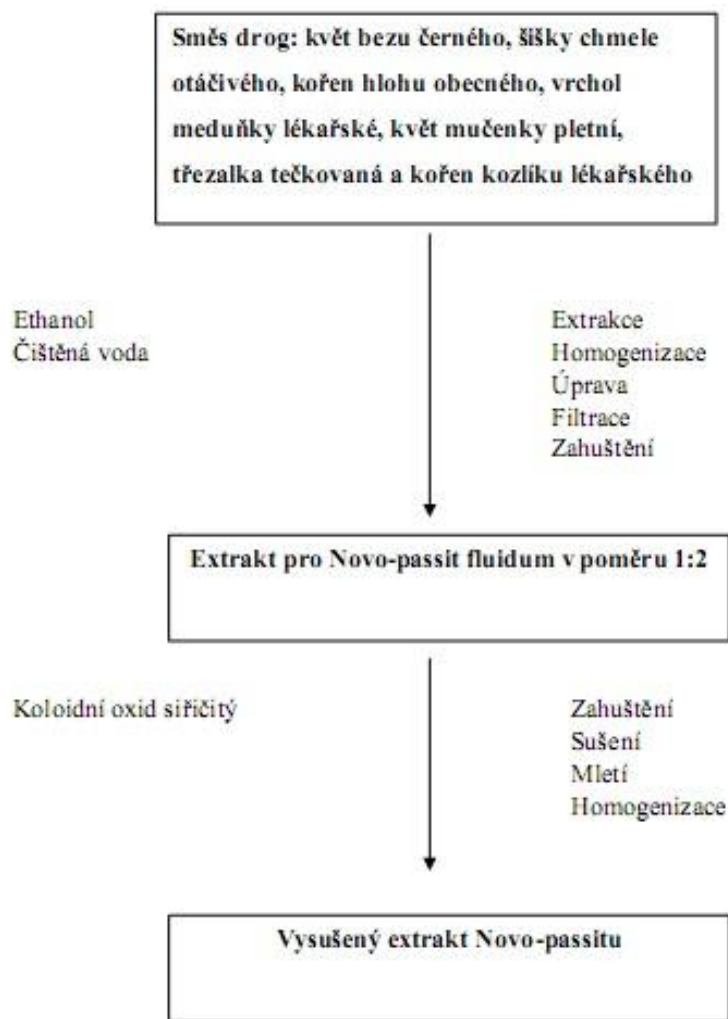


Obr. 3 Výroba guaifenesinu (Příloha PI)

1.3 Výroba Novo-Passit Extract Dry

Výroba Novo-Passit Extract Dry probíhá extrakcí jednotlivých bylin v ethanolu. Extrahuje se květ bezu černého, šišky chmele otáčivého, kořen hlohu obecného, vrchol meduňky lékařské, květ mučenky pletní a třezalky tečkované a kořen kozlíku lékařského. Primární extrakty jsou homogenizovány a upraveny tak, aby dosahovaly požadovaných parametrů, a následně jsou filtrovány. Tekutý extrakt je poté zahuštěn v daném poměru, aby se získal přechodný extrakt Novo-Passit Fluidum. Po ukončení homogenizace je konečný suchý extrakt analyzován a připraven pro farmaceutické zpracování podle registrační specifikace produktu.

Plán výroby je zobrazen na Obr. 4.



Obr. 4 Schéma výroby Novo-Passit Extract Dry

1.4 Výroba tablet Novo-Passit

Tablety se vyrábí z tabletoviny, která představuje meziprodukt pro výrobu tablet. Tabletovina přípravku Novo-Passit vzniká smícháním Novo-Passit Extract Dry, guaifenesinu a placeba (Silicon dioxide, Microcrystalline Cellulose, Glyceryl Tribehenate, Magnesium Stearate, Lactose Monohydrate – Fast Flo, Opadry AMB 80W311115) a pomocných látek (plniva, pojiva, zvlhčovadla) smícháním granulátu s extragranulárními pomocnými látkami v předepsaném poměru (Příloha PII).

Mimo přípravy tabletoviny je základní operací při výrobě tablet lisování, které se uskutečňuje v tabletovacích lisech. Tabletovací lis se skládá z matrice, horního a spodního razidla. K lisování tablety dochází v prostoru vymezeném maticí a razidly [7].

2 DISOLUCE

Disoluční (rozpouštěcí) studie patří mezi základní testy používané ve farmacii při vyhodnocování uvolňování aktivních látek z pevných a polotuhých lékových forem [8]. Základním principem disoluce je uvolňování léčivé látky z lékové formy v předepsané kapalině (disoluční médium) a v předepsaném čase [9]. Disoluční médium (pufr; 0,1 M HCl) simuluje prostředí v žaludku a ve střevech, kde dochází k absorpci léčiv. Hodnoty pufrů nejsou zvoleny náhodně, ale přesně podle pH jednotlivých částí trávicího traktu, kde se tablety rozpouští. pH žaludeční sliznice má hodnotu 1 – 2. Proto se k simulaci rozpouštění tablet v žaludku používá nejčastěji kyselina chlorovodíková v různé koncentraci (0,1 M HCl; 0,01 M HCl nebo 0,06 M HCl). Mohou se použít také pufrы, které mají hodnotu pH = 1,2. V tenkém střevě převažuje alkalické prostředí s pH > 7, takže se používají především fosforečnanové pufrы s hodnotou pH okolo 7,4. V tlustém střevě je vstřebávání léků méně významné, uplatní se u retardovaných lékových forem s pomalým uvolňováním aktivní látky. Hodnota pH v tlustém střevě se pohybuje v rozmezí od lehce kyselého až po zásaditou, takže pufrы mohou mít hodnotu od pH = 6 do pH = 8 (acetátový, fosforečnanový pufr) [9, 10, 11].

Velmi často může docházet k záměně pojmu disoluce s rozpadem. Rozpad představuje schopnost pevné lékové formy rozpadnout se na částice, zatímco disolucí je chápáno uvolnění molekul (iontů) z krystalické vazby a jejich difúze do rozpouštědla, popřípadě trávicích šťáv [12].

Aby disoluční zkouška proběhla správně, je nutno brát v potaz také to, že každý lék musí během disoluční zkoušky splnit dané limity. Obecně se léky ze skupiny tuhých perorálních lékových forem rozdělují na lékové formy bez úpravy uvolňování léčiva a léky s modifikovaným uvolňováním léčiva. Lékové formy první skupiny musí splnit pouze podmínku, že uvolní minimální předepsané množství léčiva v požadovaném časovém intervalu [13]. Zde řadíme i Novo-Passit tablety. U lékových forem s modifikovaným uvolňováním se prodloužené uvolňování a prodloužený účinek léčiva vyjadřuje zabezpečení terapeutické hladiny léčivé látky v krevní plazmě po požadovaný časový interval. Delší působení léčivé látky v biofázi je umožněno specifickými farmaceutickými pomocnými látkami, speciálními technologickými postupy nebo jejich kombinací. Zpožděného uvolňování se využívá u léčiv, kdy se má látka vstřebávat až ve střevním traktu nebo v jeho určitém místě (např. kolon) [14]. Množství aktivní látky je nutné

stanovit kvantifikační metodou. Mezi kvantifikační techniky patří spektrofometrie a chromatografie. Tyto metody budou popsány v dalších kapitolách.

Disoluce nachází uplatnění nejen jako nástroj ve vývoji léků, ale spadá také do kontroly výrobního procesu. Disoluční testování se běžně používá v řízení jakosti a v oblasti výzkumu a vývoje. Pro účely QC se disoluce využívá pro deklaraci shody mezi jednotlivými komerčními šaržemi a pro detekci výrobních odchylek. V oblasti výzkumu a vývoje se disoluční testování zaměřuje na poskytnutí některých odhadů uvolňování léčiv ve vztahu k *in vivo* testování. Jestliže splňuje všechny parametry, následuje po *in vivo* testování registrace přípravku a následná rutinní testování, která se ověřují u každé šarže [8, 12]. Součástí jakékoliv registrace generického přípravku je státní autoritě předkládána disoluční studie srovnávající disoluční profily mezi generikem a originálním farmaceutickým přípravkem v dané zemi již registrovaném. V České republice uděluje registraci na základě paragrafu 25, zákona č. 378/2007 Sb. Státní útvar pro kontrolu léčiv (SÚKL, <http://www.sukl.cz/>).

Analytická metoda popisující disoluční zkoušku daného léčivého přípravku musí obsahovat následující podmínky provedení:

- 1) typ přístroje, který má být použit
- 2) složení, objem a teplota disoluční kapaliny
- 3) rychlost otáčení, případně průtoková rychlost disoluční kapaliny
- 4) čas, způsob a množství odebraného roztoku ke stanovení obsahu účinné látky, případně podmínky pro automatické vyhodnocování
- 5) metoda stanovení obsahu účinné látky (UV/VIS nebo kapalinová chromatografie – viz kapitola 3 a 4)
- 6) způsob vyhodnocení
- 7) limity pro hodnocení disoluce přípravku v předepsaném čase

2.1 Typy disolučních metod

Disoluční test je možné provést několika způsoby. Správná volba metody souvisí s vlastnostmi lékové formy. Pro disoluce pevných lékových forem se používají tři lékopisné metody, nebo metody z nich vycházející [12]:

- ✓ pádelková metoda
- ✓ košíčková metoda
- ✓ metoda s průtokovou celou

Pro účely diplomové práce byla použita pádelková metoda.

2.1.1 Pádelková metoda

Zařízení (Obr. 5) se skládá z nádoby (sklo nebo jiný inertní materiál) s víkem. V nádobě, která je naplněna čištěnou vodou, je částečně ponořeno sedm skleněných nádob s kulatým dnem. Nádoby mají objem jeden litr a jejich rozměry jsou: výška 160 mm až 210 mm a vnitřní průměr je 98 mm až 160 mm [12]. Pro správnou práci disolučního zařízení je nutné, aby každá nádoba byla ve svislé poloze. K měření svislé polohy se používá digitální měřidlo, kdy svislost nádoby se stanovuje na dvou místech svírajících úhel 90°. Limit pro svislost musí být $\leq 0,1^\circ$. Měření horizontální polohy lázně se provádí pomocí speciálního měřidla a měřidlo je umístěno vždy mezi dvěma nádobami (1 – 3, 1 – 2 a 6 – 7). Maximální povolená odchylka je $0,5^\circ$ [15]. V horní části nádoby je obruba, aby víko dokonale přiléhalo na nádobu a nedocházelo tak k odpařování disolučního média. Mimo jiné jsou nádoby ohřívány čištěnou vodou na předepsanou teplotu ($37 \pm 0,5^\circ\text{C}$). Disoluční médium v nádobách simuluje šťávy gastrointestinálního traktu, a proto jsou tyto nádoby nazývány žaludky. Dalšími důležitými součástmi přístroje je motor, hnací hřídele a lopatková míchadla. Je nutné, aby se disoluční médium udržovalo ve stálém, plynulém chodu, pro jehož zajištění nesmí žádná část zařízení ani prostředí, ve kterém je přístroj umístěn, přispívat ke zdatnému pohybu, třesení nebo vibracím [16, 17].

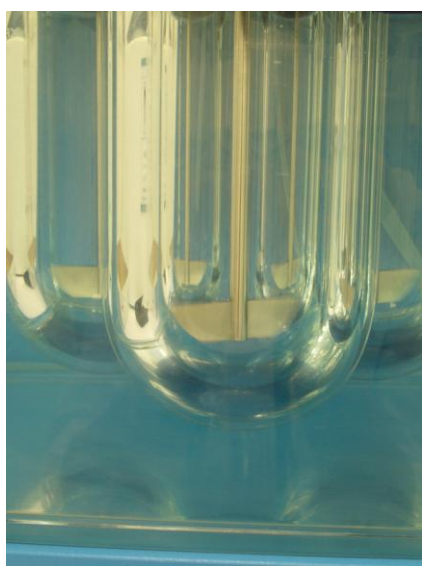
Míchací jednotku představuje pádlo, jež tvoří hnací hřídel s lopatkovým míchadlem. Rozměry každého pádla musí odpovídat rozměrům uvedeným v lékopise. Rozměry pádla zobrazuje Obr. 6. Je velmi důležité, aby hřídel byla vystředěna a její rotace byla plynulá a bez zdatného chvění, které by mohlo ovlivnit nejen průběh analýzy, ale i celkové výsledky. Jako kontrola slouží vhodné měřidlo, které zaznamenává vychýlení hřídele. Je respektováno zrychlení $\leq 1,0$ mm [12]. Lopatkové míchadlo je vyrobené z kovu nebo vhodného inertního neohebného materiálu a může být pevně spojeno s hřídelí nebo se jednoduše na hřídel našroubuje. Hlavní náplní lopatkového míchadla je regulace rychlosti otáček. Každá analytická metoda zkoušeného přípravku přesně udává, jaké otáčky

a teplota mají být během analýzy nastavené. Vodní lázeň reguluje teplotu a pomocí lopatkových míchadel je zajištěno proudění disoluční kapaliny. Tím je dosaženo homogenního prostředí žaludku [16, 17].

Tablety se spouštějí do disolučního média pomocí horních otvorů ve víku. Dopadnou na dno nádoby a po určité době se rozpouští. Po uplynutí definované doby dojde k odebrání vzorku pomocí kanyl do stříkaček a vzorky jsou následně dle analytické metody zpracovávány. Pokud tableta plave na hladině a je třeba ji potopit, může se využít drobného spirálovitě zatočeného drátku, který se nazývá sinker [12].

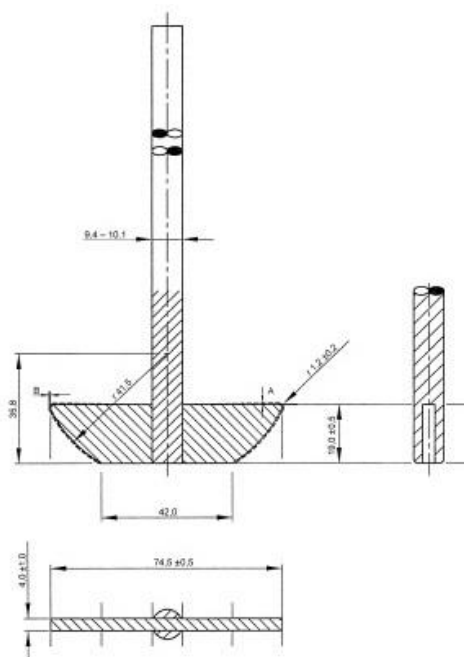


a)



b)

Obr. 5 SOTAX AT 7 Smart – pádelková metoda (a – celkový pohled, b – detailní pohled)



Obr. 6 Rozměry pádla disoluční jednotky [12]

2.2 Košíčková metoda

Přístroj pro košíčkovou metodu (Obr. 7) pracuje na stejném principu a zařízení vypadá téměř identicky jako zařízení u pádelkové metody. Lopatková míchadla jsou však nahrazena košíčky. Zařízení taktéž obsahuje hnací hřídel, která může být napevno spojena s válcovitým košíčkem, popřípadě se košíček může lehce našroubovat na hnací hřídel. Košíček je složen ze dvou částí. Na hnací hřídel se připevňuje nebo je připevněná horní příruba, ke které se pomocí tří pružných per připevňuje tubus košíčku, jež je tvořen sítkou válcovitého tvaru zasazenou nahoře i dole do úzkých kovových prstenců. Upevnění tubusu košíčku musí být velmi pevné, aby nedošlo k jeho vychýlení od středové osy nádoby během analýzy, popřípadě jeho spadnutí na dno nádoby. Ke kontrole košíčků slouží vhodné měřidlo, které zaznamenává vychýlení koše. Přijatelné hodnoty musí být $\leq 1,0$ mm. Hřídel a válcovitý košíček jsou vyrobené z nerez oceli nebo jiného inertního kovu. Rozměry košíčků musí odpovídat rozměrům uvedeným v lékopise. Rozměry košíčků zobrazuje Obr. 8. Princip provedení analýzy s košíčkovou metodou je velmi podobný metodě pádelkové. Nejprve se musí nastavit parametry dané metodou – teplota, otáčky a čas analýzy. Poté se vloží do košíčku tablety a košíčky se upevní na pružná péra. Během analýzy se tablety

rozpouštějí v disolučním médiu a po uplynutí doby jsou vzorky odebrány pomocí kanyl do stříkaček a následně dle metody vyhodnoceny [12, 16].

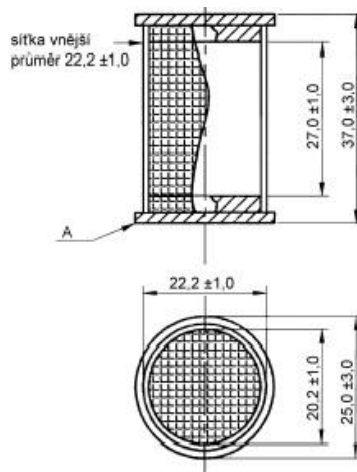


a)



b)

Obr. 7 SOTAX AT 7 Smart – košíčková metoda (a – celkový pohled, b – detailní pohled)



Obr. 8 Rozměry košíčku disoluční jednotky [12]

2.3 Metoda s průtokovou celou

Přístroj s průtokovou celou obsahuje zásobní nádobu na disoluční médium, pumpu na disoluční médium, průtokové cely a vodní lázeň, která udržuje teplotu disolučního média během analýzy. Průtoková pumpa slouží k vytlačení disolučního média přes průtokovou celu. Průtoková cela je vyrobena z průhledného, inertního materiálu. V horní části je průtoková cela spojena s filtračním systémem, který zabraňuje úniku nerozpuštěných částic z horní části cely. Dolní kuželovitá část cely je naplněna malými skleněnými kuličkami o průměru asi 1 mm a ve špičce kužele je umístěna jedna větší kulička o průměru asi 5 mm, aby se zabránilo vniknutí tekutiny do cely. Cela je vložena do vodní lázně a teplota se udržuje v limitu $37 \pm 0,5^\circ\text{C}$ [12].

Cela je upevněna v přístroji pomocí upínacího mechanismu a dvou O – kroužků. Je důležité, aby pumpa nebyla umístěna výše než zásobní nádoby s disolučním médiem. Pumpa je oddělena od disoluční jednotky, aby se předešlo nechtěným vibracím [12].

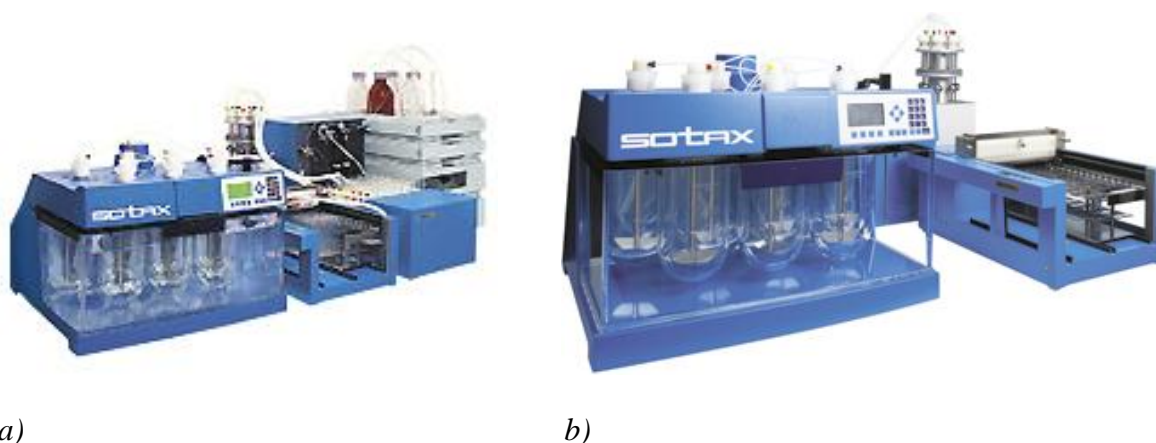
2.4 Moderní disoluční techniky

Rozvoj vědeckých poznatků a převedení vědy do praxe vede k tomu, že se disoluční techniky modernizují. Disoluce se stává jednou z nejčastěji automatizovaných technik v moderních farmaceutických laboratořích. Jelikož disoluční metody jsou časově náročné a jsou závislé také na lidském faktoru, je nutné provoz disolučních strojů neustále zdokonalovat a automatizovat, a tím eliminovat lidský faktor.

Farmaceutické společnosti přicházejí na trh s novými registrovanými farmaceutickými přípravky, u nichž se zavazují ke kontrole kvality každé komerční šarže. Obecným cílem společností je dosáhnout maximální efektivity za současného snižování nákladů. I z tohoto důvodu jsou k dostání modernější disoluční stroje, které mají práci ještě více urychlit, zjednodušit a zlevnit. Tyto stroje pracují samostatně, takže také lidská práce a především lidská chyba jsou zde zredukovány na minimum.

V dnešní době je velice populární propojení s HPLC jednotkou, takže jsou vzorky ihned analyzovány pomocí metody s chromatografickou detekcí. Druhou možností ON-LINE systémů je propojení disoluční jednotky se spektrofotometrem, který ihned vyhodnotí obsah účinné látky v lékové formě na základě Lambert-Beerova zákona. U farmaceutických přípravků s prodlouženou dobou uvolňování aktivní látky se velmi často využívá propojení disoluční jednotky s kolektorem (OFF-LINE), přes který se vzorek odebere do zkumavky nebo vialky a je připraven k dalším analýzám. Přístroje s možností ON-LINE a OFF-LINE analýzy zobrazuje Obr. 9.

Mezi nejznámější společnosti, které se zabývají produkcí disolučních zařízení, patří především značky Hanson (<http://www.hansonresearch.com>), Agilent (<http://www.chem.agilent.com/en-US/products-services/Instruments-systems/Dissolution/Pages/default.aspx>), Erweka (<http://www.erweka.com/en>) a Sotax (<http://www.sotax.com/>). Společnost Teva Czech Industries s.r.o. pro své účely používá výhradně disoluční stroje značky Sotax (SOTAX AT 7 Smart).



Obr. 9 SOTAX AT 7 Smart (a - ON-LINE, b - OFF-LINE) [18]

2.4.1 Disoluční automat

Plně automatizovaný přístroj (Obr. 10) umožňuje úsporný provoz při sériovém testování přípravků a díky extrémně krátkým intervalům mezi jednotlivými analýzami patří disoluční roboty mezi nejatraktivnější přístroje, které se ve farmacii v dnešní době nacházejí. Lidská práce je zde minimální, přístroj sám zajišťuje přechod mezi jednotlivými analýzami a očistu zařízení. V porovnání s klasickými metodami je robot rychlejší a efektivnější. Jeho velkou předností jsou minimální nároky na obsluhu [18].

Teva Czech Industries s.r.o. vlastní disoluční automat značky Sotax (SOTAX AT 70 Smart).



Obr. 10 SOTAX AT 70 Smart

2.5 Důležité parametry disolučních testů

2.5.1 Otáčky míchadla

Rychlost otáčení pádel nebo košíčků má významný vliv na průběh analýzy a ovlivňuje především rozpadavost lékové formy. Měly by se proto volit tak, aby se léková forma dobře rozpadala, a zároveň byly respektovány požadavky dané lékopisem. Nejčastěji se farmaceutické přípravky analyzují při rychlosti 50, 75, 100, 120 a 150 RPM (Rotation per Minute). Ověření nastavení obvodové rychlosti se provádí na jedné hřídeli pomocí otáčkoměru. Hřídel by měla hladce rotovat a neměla by se vychylovat ze své dráhy. Limit přijatelnosti je ± 2 otáčky za minutu. Tabulka 1 ukazuje, jaké jsou povolené rozdíly otáček u běžně užívaných hodnot rychlostí [12, 19].

Tabulka 1 Povolené rozdíly u otáček [12]

Obvodová rychlost (RPM)	Limit
50	±2
75	±3
100	±4
125	±4,8
150	±6

2.5.2 Disoluční médium

Pro správné provedení disoluce je nezbytný nejen správný výběr přístroje, ale také ideální disoluční médium. Disoluční kapalina má napodobovat pH šťáv gastrointestinálního traktu [11].

Nejčastěji používaná disoluční média zobrazuje Tabulka 2.

Tabulka 2 Nejčastěji používaná disoluční média [12]

pH	Disoluční médium
pH 1,0	HCl
pH 1,2	NaCl, HCl
pH 1,5	NaCl, HCl
pH 4,5	Tlumivý roztok fosforečnanový nebo acetátový
pH 5,5 a 5,8	Tlumivý roztok fosforečnanový nebo acetátový
pH 6,8	Tlumivý roztok fosforečnanový
pH 7,2 a 7,5	Tlumivý roztok fosforečnanový

2.5.2.1 Objem disolučního média

Co se objemu disolučního média týče, nejčastěji bývá v nádobě 500 ml, 900 ml nebo 1000 ml disolučního média [12].

2.5.2.2 Teplota disolučního média a odplynění disolučního média

Médium se připraví odměřením jednotlivých komponent do vhodné nádoby. Obsah se musí důkladně promíchat pomocí magnetického míchadla, popřípadě je možné při obtížném rozpouštění médium zahřát na teplotu 40°C. Pro přípravu média je velmi důležité, aby byla

čištěná voda odplyněná. Odplynění se provádí zahříváním čištěné vody na teplotu 41 °C a poté se provede vakuová filtrace přes filtr (0,45 μm). Takto odplyněná čištěná voda se míchá. Zařízení, jež pracuje na tomto principu, se nazývá MPS zařízení. MPS médium nejen odplyní, ale předejde také čištěnou vodu na požadovanou teplotu 37±0,5 °C. Další možností získání odplyněného média je probublávání čištěné vody héliem, které odstraní všechny přebytečné plyny. Odplyněné a promíchané médium se dále dávkuje pomocí odměrného válce do disolučních nádob. V případě, že se dávkuje pouze odplyněná čištěná voda, lze použít přímo MPS zařízení, u kterého lze nastavit dávkovaný objem [19, 20].

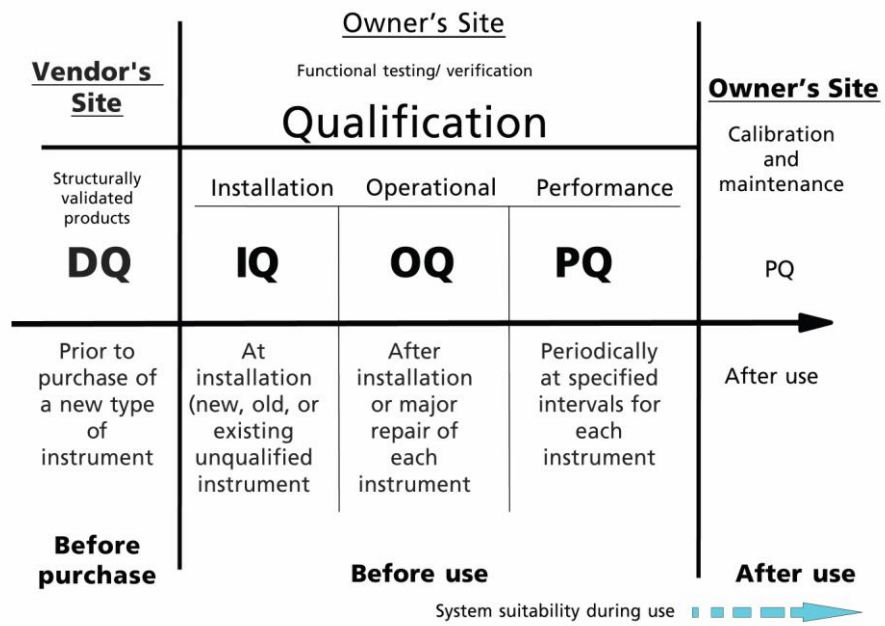
2.5.3 Čas analýzy

Čas analýzy lékové formy vychází z analytické metody, kde je časový průběh přesně definován. Nejčastěji bývá 30, 45 nebo 60 minut. Vzorky se mohou odebírat ve stanoveném čase v toleranci ± 2%. V případě, že se provádí disoluční profil, je odběr vzorku prováděn v několika časových rozmezích (např. 5, 10, 15, 20, 30, 45 a 60 minut) [12].

2.6 Kontrola disolučních přístrojů

Každé zařízení, které je při kontrole farmaceutického přípravku používáno, je nutné neustále kontrolovat, kalibrovat a kvalifikovat. Kalibrace laboratorních přístrojů a zařízení patří mezi kritické činnosti, jelikož na správném provedení kalibrace závisí správnost vyhodnocení analytických dat výsledků. Kalibraci mohou provádět proškolení pracovníci nebo externí firma. Přístroj musí být kalibrován v celém rozsahu, který je používán při provádění analýz [19].

Kvalifikací AIQ (Analytical Instrument Qualification) se rozumí komplexní prověření přístroje nebo zařízení. Schéma AIQ zobrazuje Obr. 11 [19, 21].



Obr. 11 Schéma AIQ [21]

3 MOLEKULOVÁ ABSORPČNÍ SPEKTROFOTOMETRIE V UV/VIS OBLASTI

Spektrofotometrie patří k nejvyužívanějším instrumentálním metodám v analytické praxi. Jedná se o optickou metodu, která je založena na sledování absorpce elektromagnetického záření z oblasti UV (190 - 400 nm) a VIS (400 - 800 nm) molekulami analytu v roztocích nebo v pevných látkách [22]. Látky, jež absorbují záření s vlnovou délkou menší než 380 nm, se projevují jako bezbarvé, zatímco látky, které absorbují z bílého slunečního záření vlnové délky v rozsahu 380 nm až 780 nm se projevují jako barevné. UV/VIS spektrometrie se nejčastěji používá na studium barevných sloučenin nebo sloučenin obsahující chromofor [23]. Chromofory jsou charakteristická funkční seskupení zodpovědná za barevnost sloučeniny – často se jedná o konjugovaný systém násobných vazeb (např. azobarviva) [22].

3.1 Absorpční spektrum

Principem spektrofotometrie je interakce mezi elektrony umístěnými ve vazebných, případně nevazebných orbitalech molekuly s fotony UV/VIS záření. Molekuly jsou schopny pohlcovat elektromagnetické záření pouze určitých vlnových délek. Je to dáno tím, že mohou existovat v určitých kvantových stavech, které se liší obsahem energie.

V případě, že má molekula přejít ze stavu s nižší energií do stavu s energií vyšší, musí absorbovat záření o frekvenci ν , která právě odpovídá rozdílu energií mezi energetickými hladinami E_2 a E_1 obou kvantových stavů podle Planckova vztahu:

$$\Delta E = E_2 - E_1 = h \cdot \nu \quad (1)$$

kde E_2 a E_1 jsou energie atomu ve vyšším a nižším energetickém stavu, h je Planckova konstanta ($6,626 \cdot 10^{-34}$ J·s) a ν je frekvence [Hz] vyzářeného nebo absorbovaného záření. Záření je dále možno charakterizovat pomocí vlnové délky λ [nm] nebo vlnočtu $\tilde{\nu}$ [1 m^{-1}]:

$$\nu = c / \lambda = c \cdot \tilde{\nu} \quad (2)$$

kde c je rychlost záření [$\text{m} \cdot \text{s}^{-1}$] [24].

Absorbuje se vždy ta část elektromagnetického záření, která svou energií odpovídá přechodu elektronu ze základní hladiny na excitovanou hladinu. Proto molekulová

absorpční spektra v ultrafialové a viditelné oblasti jsou svou podstatou elektronová spektra [22].

3.2 Lambert-Beerův zákon

Metoda absorpční spektrofotometrie zjišťuje, pro které vlnové délky a do jaké míry vzorek pohlcuje (absorbuje) ultrafialové nebo viditelné záření. Lambert-Beerův zákon je základem pro kvantitativní analýzu, která je založena na měření absorpce záření. Platnost zákona je omezena jen pro zředěné roztoky [18]. Pokud na vzorek dopadá monochromatické záření, poklesne v důsledku absorpce původní zářivý tok dopadajícího paprsku I_0 na nižší hodnotu I [25].

$$\tau = \frac{I_1}{I_0} \quad (3)$$

Poměr obou zářivých toků I_1/I_0 (jsou-li zanedbány ztráty vzniklé rozptylem a odrazem na stěnách kyvety) se nazývá propustnost (transmitance) τ . Propustnost nezávisí na velikosti dopadajícího zářivého toku. Dekadický logaritmus převrácené hodnoty propustnosti se nazývá absorbance A [25]:

$$A = -\log \tau \quad (4)$$

Závislost propustnosti nebo absorbance na vlnové délce záření představuje absorpční spektrum vzorku.

Absorbance roztoku absorbující látky je přímo úměrná její molární koncentraci c a tloušťce proměřované vrstvy roztoku l . Tato závislost je označována jako Lambert-Beerův zákon a je možno ji zapsat ve tvaru [25]:

$$A_\lambda = \alpha_\lambda l c \quad (5)$$

kde α_λ se nazývá absorpční koeficient. Jestliže se hmotnostní koncentrace vyjádří v jednotkách g.l^{-1} a tloušťka vrstvy v cm , je rozměr absorpčního koeficientu $\text{l.g}^{-1}.\text{cm}^{-1}$. Je-li koncentrace vyjádřena v jednotkách mol.l^{-1} , získá se hodnota molárního absorpčního koeficientu ϵ_λ (jednotky $\text{l.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$). Absorpční koeficient je veličina charakteristická pro danou látku v daném prostředí a podobně jako absorbance závisí na vlnové délce, při které jsou prováděna měření [25].

Není-li uvedeno jinak, měří se ve farmacii absorbance při předepsané vlnové délce v 1 cm vrstvě při $20 \pm 1^\circ\text{C}$ a měření se provádí proti použitému rozpouštědлу nebo směsi rozpouštědel [12].

Platnost Lambert-Beerova zákona je možné využít v omezeném rozsahu. Je platný, pokud se splní tyto podmínky:

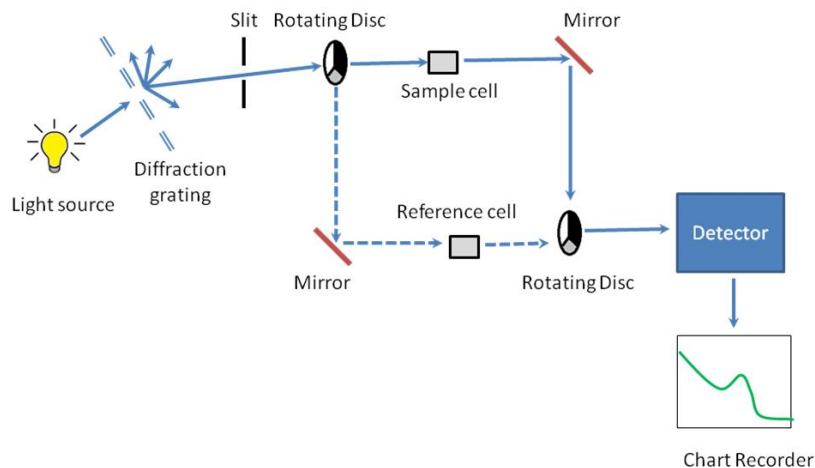
- záření musí být monochromatické
- roztoky musejí být velmi zředěné ($c < 10^{-2} \text{ mol.l}^{-1}$)
- absorbující prostředí nesmí podléhat žádným změnám
- pro kvantitativní analýzu je nutné vybrat takovou vlnovou délku, při níž stanovovaná látka silně absorbuje, případné interferující látky mají absorpci minimální [26].

3.3 Instrumentace

Přístroje, které se používají k měření intenzity záření v ultrafialové nebo viditelné oblasti spektra, se nazývají fotometry nebo spektrofotometry. Fotometry jsou jednodušší a používají k vymezení úzkého pásma vlnových délek filtry. Spektrofotometry používají mřížkový monochromátor, který dovoluje kontinuálně měnit vlnovou délku měření v širokém intervalu [22]. Všechny fotometry a spektrofotometry sestávají ze tří základních částí (Obr. 12):

- a) zdroj zářivé energie
- b) filtr nebo mřížka pro izolaci úzkého pásma zářivé energie (monochromátor)
- c) detektor měřícího zářivou energii propuštěnou vzorkem.

Mezi monochromátor a detektor se vkládá kyveta s roztokem měřeného vzorku [22].



Obr. 12 Instrumentace spektrofotometru [26]

3.3.1 Zdroje záření

V UV oblasti se používala deuteriová výbojka, vysokotlaká výbojka naplněná inertním plynem (xenon, argon), popřípadě bylo možné také využít velmi intenzivní rtuťové výbojky. VIS oblast pokrývala wolframová žárovka nebo halogenové vlákno. V dnešní době jsou však velmi žádané zdroje záření především lasery, které produkují vysoce monochromatické a koherentní (stejná fáze vln) záření, jež má vysokou intenzitu [27].

Světelný tok dále prochází monochromátorem (lámavé hranoly nebo mřížka v kombinaci se štěrbinami a odrazovými zrcadly). Nakláněním mřížky je možné plynule regulovat vlnovou délku. Rozsah vlnových délek, které z monochromátoru vycházejí, určuje štěrba. Dalším prvkem soustavy, do kterého míří monochromatické světlo, je kyveta. Nejčastěji používané kyvety jsou hranaté (konstantní vzdálenost a tloušťka dvou planoparalelních stěn). Kyveta propouští světlo požadované vlnové délky a vyrábí se z křemenného skla. Nejčastěji se používají kyvety s optickou dráhou 1 cm, výjimkou ale nejsou ani kyvety s optickou dráhou 0,5 cm a 1mm [27, 28].

3.3.2 Detektory

V UV/VIS spektrofotometrii se používají detektory v podobě fotonásobičů, polovodičových fotoelektronových článků, diodových polí a detektorů CCD [23].

Fotonásobiče jsou běžně používané detektory v ultrafialové a viditelné spektrometrii. Jsou uspořádány tak, že elektrony dopadnou po ozáření fotokatody na první zesilovací elektrodu

(dynodu), kde je počet fotoelektronů násoben sekundární emisí. Takových dynod je ve fotonásobiči 10 i více a výsledný efekt zesílení může být i několik milionů [23].

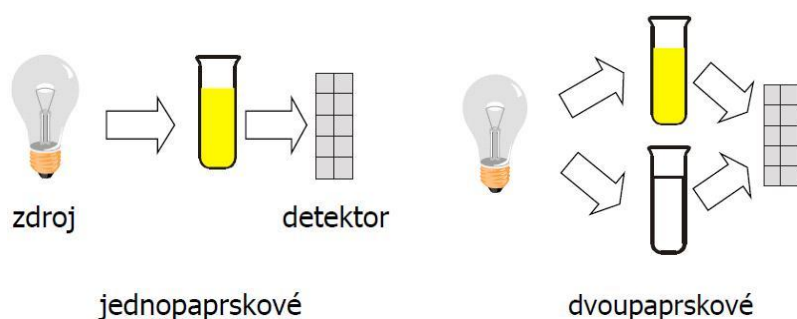
Lineární diodové pole je multikanálový detektor, kdy jeho elementy měří najednou paprsek rozložený disperzním prvkem. Tento detektor se využívá pro záznam absorpčních spekter vzorků, které rychle procházejí průtočnou kyvetou (HPLC) [23].

3.4 Základní uspořádání pro UV/VIS spektrofotometrii

Základní uspořádání přístrojových prvků může být dvojí: jednopaprskové a dvoupaprskové. U jednopaprskových přístrojů (Obr. 13) prochází světlo ze zdroje kondenzorovým systémem na vstupní šěrbinu monochromátoru, projde kyvetou a detekuje se např. fotonkou. Jednopaprskový systém má větší optickou propustnost a tím nižší šum signálu a lepší meze detekce. Jeho nevýhodou je však nižší stabilita systému a nelze eliminovat kolísání intenzity zdroje záření [23].

U dvoupaprskového přístroje (Obr. 13) dopadá paprsek z monochromátoru na rotující sektorové zrcadlo, které je nastavené tak, že buď odráží paprsek na referenční vzorek, nebo nebrání paprsku, a ten dopadá rovnou na kyvetu s měřeným vzorkem. Dvoupaprskové systémy mají vyšší stabilitu, ale dochází k větší ztrátě záření. Navíc se dvoupaprskové přístroje liší od předchozích tím, že oba vzorky, srovnávací i měřený, jsou proměřovány buď současně (u přístrojů „dvoupaprskových v prostoru“) nebo skoro současně (u přístrojů „dvoupaprskových v čase“) [23].

Pro potřeby diplomové práce byl použit spektrofotometr značky Varian (Varian Cary 100) a je zobrazen na Obr. 14.



a)

b)

Obr. 13 Spektrofotometr - a) jednopaprskový, b) dvoupaprskové [28]



Obr. 14 Varian Cary 100 [29]

4 KAPALINOVÁ CHROMATOGRRAFIE

Chromatografie je separační metoda, která slouží k oddělení a analýze směsí látek. Základním principem chromatografie je rozdělování složek směsi mezi mobilní a stacionární fázi. Význam slova „separační“ (metoda) v uvedené definici znamená, že chromatografické metody umožňují vzájemnou separaci látek obsažených ve zkoumané směsi. Chromatografické analýzy se zpravidla používají pro složité směsi látek, které mají navzájem dosti podobné chemické a fyzikální vlastnosti a které by se jinými metodami kvalitativně a kvantitativně analyzovaly jen velmi obtížně, pokud by to vůbec bylo možné [30].

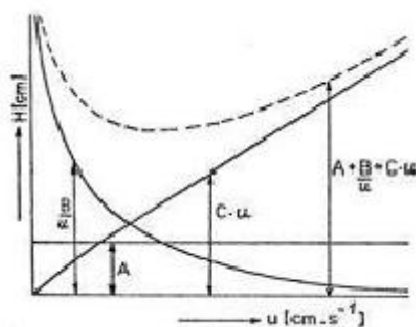
Hlavním principem chromatografie je vnášení vzorku mezi dvě nemísitelné fáze – nepohyblivá stacionární fáze a pohyblivá mobilní fáze [22]. Mobilní fází je u kapalinové chromatografie kapalina. Stacionární fází je látka zakotvená na povrchu nosiče nebo pevný adsorbent. Principem kapalinové chromatografie je tedy interakce analyzovaného vzorku se sorbentem kolony a protékající mobilní fází. Následkem fyzikálně chemických vlastností sorbentu a mobilní fáze dojde k rozdělení analyzovaného vzorku na koloně do různých zón [30]. Při průchodu kolonou přejde každá molekula vzorku mnohokrát z proudu mobilní fáze na povrch sorbentu a zpět. Pohybem mobilní fáze je vzorek touto soustavou unášen. Složky vzorku mohou být stacionární fází zachycovány, a proto se při pohybu zdržují. Více se zdrží složky, které jsou stacionární fází poutány silněji. Tím se postupně složky od sebe oddělí [22].

Souvislost mezi difúzními vlivy a lineární rychlostí mobilní fáze odvodil van Deemter. Van Deemterova rovnice popisuje závislost výšky ekvivalentní teoretického patru na rychlosti průtoku mobilní fáze a zahrnuje vliv zmíněných parametrů, kde u je průměrná rychlost toku mobilní fáze, A , B a C jsou faktory způsobující rozšiřování píků [31]:

$$H = A + B/u + C * u \quad (6)$$

kde A je faktor vlivu turbulentní difúze, B představuje faktor vlivu molekulární difúze, C je faktor vlivu odporu vůči převodu hmoty, u je střední lineární rychlost toku mobilní fáze.

Grafické zobrazení Van Deemterovy rovnice představuje Obr. 15.



Obr. 15 Van Deemterova rovnice graficky [31]

4.1 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie

Označení HPLC je zkratka, která je odvozená od názvu „High Performance Liquid Chromatography“ [20]. V dnešní době se stále stávají populárními také UHPLC a IC (Ion Chromatography) techniky. Celý proces probíhá za velmi vysokých tlaků (až 400 MPa), oproti klasické HPLC metodě UHPLC přináší řadu výhod, jako kratší doba analýzy, snížení nákladů, zvýšení separační účinnosti, snížení meze detekce, zvýšení citlivosti a získání více kvalitativních informací [32].

Klasická kapalinová chromatografie se používá k separaci jednoduchých směsí, zatímco pro separaci komplikovaných směsí látek je tato metoda prakticky nepoužitelná. K těmto účelům slouží vysokoúčinná kapalinová chromatografie [33]. Touto metodou lze analyzovat ionty, látky polární i nepolární, málo těkavé, tepelně nestabilní i vysokomolekulární [34].

4.1.1 Základní části HPLC chromatografu

Přístroj, na kterém se provádí kapalinová chromatografie, se nazývá kapalinový chromatograf. K účinné separaci je nutné použít dostatečně malých zrníček sorbentu, která kladou prostupující kapalině značný odpor. Z toho důvodu je nutné pracovat při vysokém tlaku [22]. Metoda HPLC existuje jako tzv. „normální“ (stacionární fáze je polárnější než mobilní fáze) a „reversní“ (stacionární fáze méně polární než fáze mobilní).

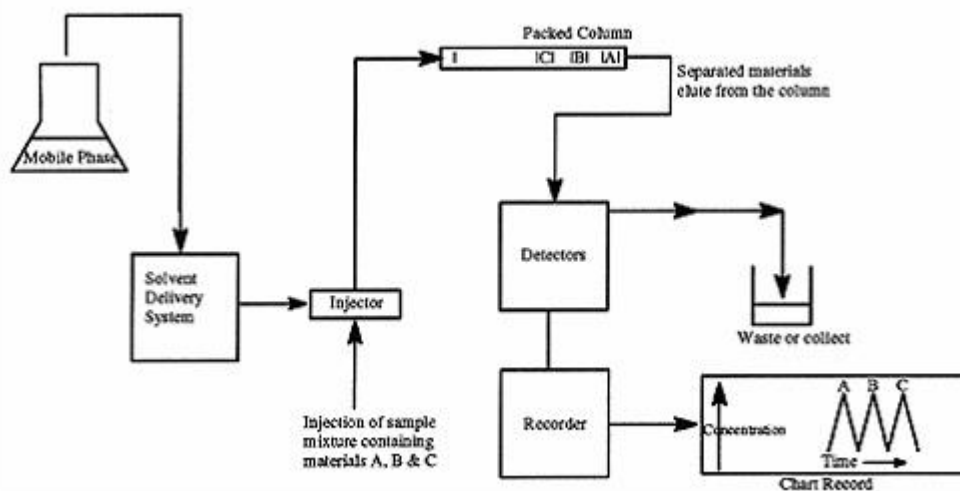
Aparatura HPLC (Obr. 16) je složena z vysokotlakých čerpadel, které zabezpečují transport mobilní fáze kolonou, dávkovače vzorků, chromatografické kolony, v níž se složky vzorku separují. Dále je nezbytnou součástí HPLC stroje detektor, který poskytuje elektrický signál při průchodu separovaných látek jako odezvu úměrnou změně sledované vlastnosti eluátu,

vytékajícího z kolony. Pro záznam a ukládání signálu detektoru je přístroj doplněn o zařízení, které vyhodnocuje výsledný chromatogram [22].

Nejčastější technikou, která se využívá u HPLC, je eluční technika. Při ní se na kolonu zavádí vzorek do kontinuálně protékajícího proudu mobilní fáze, přičemž dojde k rozdělení látek. Složky ze vzorku jsou z kolony eluovány v pořadí sorpce na stacionární fázi a mezi sebou jsou rozděleny mobilní fází [22].

Vymývání látek je možné realizovat v několika variantách, které se od sebe liší závislostí tzv. eluční síly mobilní fáze na čase. Jestliže se složením mobilní fáze během celé doby analýzy nemění, jedná se o eluci izokratickou. Pokud se složení mobilní fáze mění s časem, tak se jedná o gradientovou eluci [35].

K diplomové práci byly použity HPLC přístroje značky Agilent - Agilent 1100 series, Agilent series 1200 a Waters - Waters Acquity UPLC (Obr. 17). Nastavení sample setu, instrumentálních metod, vyhodnocení SST (System Suitability Test) a všech chromatogramů probíhalo za pomoci softwaru Empower Pro, version 2 (Waters Corporation Milford, USA).



Obr. 16 Schéma kapalinového chromatografu [31]



a)



b)

Obr. 17 Kapalinový chromatograf (a – Agilent [36], b – Waters [37])

4.1.1.1 Vysokotlaká pumpa

V dnešní době jsou nejpoužívanějšími čerpadla s malým objemem mobilní fáze, kde se mobilní fáze střídavě nasává přes systém zpětných ventilů ze zásobníku do malé pístní komory o objemu 10 - 400 μl a poté je vytlačována na chromatografickou komoru. Tento malý vnitřní objem umožňuje rychlou výměnu mobilní fáze [35].

4.1.1.2 Zařízení pro gradientovou eluci

Gradientová eluce je nejpoužívanější a neúčinnější technikou změny selektivity na analytické koloně. U gradientové eluce je důležitá mobilní fáze, jejíž složení se mění s časem, takže v průběhu separace dochází ke zvyšování eluční síly. Časová změna koncentrace v průběhu separace se nazývá profil gradientu [38]. Hlavní výhodou gradientové eluce je kratší doba analýzy a vyšší citlivost detekce pro později vymývající se látky [39].

4.1.1.3 Dávkování

Vzorek je dávkován do proudu mobilní fáze pomocí dávkovací smyčky nebo pomocí automatického dávkovače, který představuje optimální zajištění konstantní aplikace vzorku na analytickou kolonu [30].

4.1.1.4 Kolona

Zpravidla se jedná o nerezovou trubici o vnitřním průměru okolo 4 mm a délce typicky 5 – 25 cm, která je naplněna stacionární fází. Náplně kolony mohou být buď sorbenty nepolymerizovanými (SiO_2 , Al_2O_3) nebo sorbenty polarizovanými (syntetizovány na principu prostorové sítě složené ze styren-divinyl-benzenu). Nejpoužívanější náplní je reverzní fáze a kolony jsou tvořeny gelem SiO_2 o velikosti 5 – 10 μm , na němž je chemicky navázán C_8 nebo C_{18} alifatický uhlíkový řetězec. Normální fáze je složena ze silikagelu a umožňuje mechanismem interakce „aktivních“ silikátových skupin s analyzovaným vzorkem rozdělení jednotlivých komponent směsi [30].

4.1.1.5 Detektor

V metodě HPLC je dostupná opět řada různých detektorů, které se liší principem funkce, konstrukcí, selektivitou, citlivostí, mezí detekce a lineárním dynamickým rozsahem. Detekovatelnost představuje minimální množství látky, jež je možné detekovat a odlišit u ní odezvu detektoru od šumu. Metoda HPLC využívá tyto typy detektorů: spektrofotometrický detektor (UV/VIS), fluorescenční, hmotnostní, vodivostní a refraktometrický. Nejpoužívanějším detektorem je detektor spektrofotometrický (UV/VIS detekce s fixní vlnovou délkou 214 nm, 254 nm nebo 280 nm nebo spektrofotometrický detektor s proměnlivou vlnovou délkou) a fluorescenční (sloučeniny vykazující přirozenou fluorescenci). Podmínkou použití těchto detektorů je, aby daný analyt absorboval záření určité vlnové délky (UV/VIS), popřípadě aby emitoval fluorescenční záření (fluorescenční detekce). Pokud analyt sám o sobě neabsorbuje záření v oblasti UV/VIS nebo neemituje fluorescenční záření, je použití těchto detektorů podmíněno derivatizací vzorku (vzorek je chemickou reakcí převeden na sloučeniny, které mají potřebné vlastnosti - absorpce UV/VIS, fluorescence) [30].

4.1.2 Chromatogram

Výsledkem HPLC analýzy je chromatografický záznam, který se odborně nazývá chromatogram. Během chromatografické analýzy dochází k rozdělení všech složek vzorku a je možné je zaregistrovat v podobě homogenních píků. Chromatogram zkoušené látky se vyznačuje určitými retenčními charakteristikami:

- šířka píků na nulové linii nebo v polovině jeho výšky

- velikost plochy píku
- stupňovité rozdělení nebo stupňovité překrytí
- tvar píku

Tyto retenční charakteristiky je možné využít k chromatografické identifikaci [40].

4.1.3 Praktická aplikace kapalinové chromatografie

Využití kapalinové chromatografie v praxi je rozsáhlé. Velkou výhodou vysokoúčinné kapalinové chromatografie je především rychlost analýzy a možnost automatického vyhodnocení chromatogramů, využívá se tedy k řešení nejen analytických problémů, ale také je spojena s čištěním a preparací složek ve směsi.

Hlavní oblasti, kde se využívá kapalinová chromatografie:

- dělení a identifikace látek ve směsi
- kontrola čistoty preparátů
- čištění a mikropreparace látek
- kvantitativní analýza látek ve směsi
- kontrola výroby (kontrola surovin, meziproductů i finálních výrobků)
- kontrola životního prostředí
- klinická praxe – analýza komponent v tělních tekutinách (moč, krev) [41]

5 VALIDACE

Obecná firemní politika, záměry a přístup k validaci, včetně validace výrobních postupů, čištění, analytických metod, postupů průběžných výrobních kontrol, systémů řízených počítačem a osob odpovědných za návrh, revizi, schvalování a dokumentaci jednotlivých validačních fází, mají být v systému GMP zdokumentovány. Kritické parametry (vlastnosti) by měly být běžně stanoveny ve vývojové fázi nebo na základě historických údajů a měla by být stanovena rozmezí nutná pro reprodukovatelný provoz. Toto má zahrnovat následující:

- ✓ definování léčivé látky ve smyslu jejích kritických znaků produktu
- ✓ identifikace parametrů procesu, jež by mohly ovlivnit kritické jakostní znaky léčivé látky
- ✓ stanovení rozmezí jednotlivých kritických parametrů procesu, u nichž se předpokládá, že budou použity v průběhu rutinních výrobních a procesních kontrol

Validace by se měla vztahovat i na operace, které byly určeny jako kritické pro jakost a čistotu léčivé látky, např. validace mycího procesu ve výrobě, validace výrobního procesu, validace softwaru [42].

5.1 Validace analytických metod

Analytická metoda pojednává o způsobu provedení analýzy. Předmětem analýzy je analyt, kterým může být prvek, funkční skupina, ion nebo jejich kombinace ve vzorku. Přítomnost a množství analytu je určováno analytickými zkouškami. Analytická metoda (AM – Analytical Method) by měla detailně obsahovat všechny kroky nezbytné k provedení jednotlivých kroků analytické zkoušky [43, 44].

Validace je dokumentované ověření, že daný postup (proces), který se provozuje v rámci stanovených parametrů je účinný, spolehlivý a reprodukovatelný. Validace může být také považována za ověření, že podle zásad GMP daný postup, proces, zařízení, či materiál, činnost nebo systém splňuje očekávané výsledky. Cílem validace je prokázat, že daný proces nebo postup je vhodný pro zamýšlený účel [43, 45]. Validace metody obvykle velmi úzce souvisí s vývojem metody, často není možné určit hranici, kde končí vývoj metody

a začíná validace metody. Mnoho parametrů, které se stanovují u validace metod, je vyhodnocováno také u vývoje metody. Hlavní rozdíl však spočívá v tom, že validací se ověřují již vyvinuté analytické metody [44].

Analytické metody musí být validovány, pokud není používaná metoda obsažena v příslušném lékopise či jiném uznávaném standardním zdroji. Vhodnost všech používaných zkušebních metod by měla být ověřena v rámci skutečných podmínek použití a vše musí být zdokumentováno. Stupeň prováděné analytické validace by měl odrážet účel analýzy a fázi výrobního procesu. O každém kroku validace se musí vést záznamy, jakákoliv modifikace při validaci musí být zdokumentována. Tyto záznamy musí obsahovat důvod modifikace a příslušné údaje sloužící k ověření toho, že tato modifikace má stejně přesné a spolehlivé výsledky jako původně zasláné nebo vyvinuté parametry [42].

Oblast validací analytických metod definuje mimojiné mezinárodní společnost ICH v pokynu ICH Q2(R1) a podle typů a charakteru dělí rozsah validace mezi základní validační charakteristiky [46]:

- ✓ správnost (Accuracy)
- ✓ přesnost (Precision)
 - intermediální přesnost (Intermediate Precision)
 - opakovatelnost (Repeatability)
- ✓ specifická (Specificity)
- ✓ detekční limit (Detection Limit)
- ✓ kvantifikační limit (Quantitation Limit)
- ✓ linearita (Linearity)
- ✓ rozsah (Range)
- ✓ robustnost (Robustness)

5.2 Typy analytických metod

Pro účely provádění validací se analytické metody rozdělují do skupin [47]:

- 1) skupina – metody kvantitativního stanovení (aktivní komponenty v léčivé látce, aktivní komponenty v léčivém přípravku, vybrané komponenty v léčivém přípravku s obsahem nad 10 % ve vztahu k API)
- 2) skupina – metody pro stanovení nečistot v léčivé látce nebo přípravku (kvantitativní testy pro stanovení nečistot, limitní testy pro kontrolu nečistot)
- 3) skupina – procesní charakteristiky přípravku (disoluce)
- 4) skupina – identifikační testy

5.3 Validační charakteristiky analytických metod

Validace analytické metody je prováděna proto, aby se prokázala její vhodnost pro daný účel. Je nutné, aby se prokázaly všechny validační charakteristiky v závislosti na kategorii analytické metody [43, 47], což zobrazuje Tabulka 3.

Tabulka 3 Validační charakteristiky v závislosti na kategorii analytické metody [44]

Validační charakteristika	1. kategorie	2. kategorie		3. kategorie	4. kategorie
	(Stanovení obsahu)	Kvantitativní stanovení	Limitní test	(Disoluce)	(Totožnost)
<i>Specifická</i>	+	+	+	*	+
<i>Správnost</i>	+	+	*	*	-
<i>Přesnost</i>	+	+	-	+	-
<i>Linearita</i>	+	+	-	*	-
<i>Rozsah</i>	+	+	*	*	-
<i>Detekční limit</i>	-	-	+	*	-
<i>Kvantifikační limit</i>	-	+	-	*	-
<i>Robustnost</i>	+	+	+	+	+

* charakteristika může být požadována (uvádí validační protokol)

- daná charakteristika je požadována

+ daná charakteristika není požadována

5.3.1 Specificita (Specificity)

Specificita je schopnost identifikovat analyt v přítomnosti očekávaných komponent zkušební vzorku (například placebo, doprovodné látky, rozkladné produkty) [43, 47].

5.3.1.1 Testy totožnosti

Prokázání testů totožnosti představuje pozitivní výsledek ve vzorcích, které obsahují analyt (srovnání se známým referenčním materiálem) nebo negativní výsledek pro vzorky, které tuto látku neobsahují [47].

5.3.1.2 Testy stanovení obsahu a nečistot

Při stanovení analytu se musí brát v potaz, že analyt nesmí být rušen ostatními komponenty zkoušeného vzorku, ať už jsou to doprovodné látky, rozkladné produkty, pomocné látky, zbytková rozpouštědla, či rezidua katalyzátorů. Jako důkaz specificity separačních metod se používají reprezentativní záznamy (chromatogramy), kde musí být identifikovány jednotlivé složky a také se přezkoumává separace jednotlivých komponent. Pokud je stanovení nejednoznačné, pak se využívá dalších podpůrných metod pro daný analyt (titrace v kombinaci s chromatografickým stanovením obsahu nečistot) [47].

V případě stanovení nečistot nesmí být analýza analytu rušena ostatními složkami zkušební vzorku (placebo, rozkladné produkty, doprovodné látky, pomocné látky) [47].

5.3.2 Správnost (Accuracy)

Správnost analytické metody představuje míru shody skutečné hodnoty analytu s hodnotou nalezenou. Správnost má být potvrzena ve specifickém rozsahu a může být odvozena spolu s přesností, linearitou a rozsahem. Způsob, jakým se vyhodnocuje, je závislý na kategorii analytické metody [43].

5.3.2.1 Stanovení obsahu v léčivé látce

Analytická metoda se aplikuje na analyt o známé čistotě (referenční materiál), popřípadě je možné porovnání výsledků analytické metody s výsledky jiné validované metody [47].

5.3.2.2 Stanovení obsahu v léčivém přípravku

Analytická metoda se aplikuje na umělé směsi analytu a placebo (pokud není k dispozici placebo, pak se může přidat známé množství analytu do léčivého přípravku nebo se porovnávají výsledky získané jinou validovanou metodou) [47].

5.3.2.3 Kvantitativní stanovení nečistot

Správnost se posuzuje na vzorcích léčivé látky, popřípadě přípravku, do kterého se přidává známé množství nečistot [47].

5.3.2.4 Prokázání správnosti analytické metody

Provedou se 3 přípravy roztoku standardu s množstvím placebo odpovídajícím jedné jednotce (minimálně 3 navážky) na 3 koncentračních úrovních cca 50%, 100% a 120% koncentrace stanovované látky ve vzorku [44, 48]. Provede se požadovaná analýza a stanoví se výtěžek (recovery) [47].

$$\text{Recovery} = \frac{1}{n} * \sum \text{Recovery}_i = \frac{1}{n} * \sum \frac{100 * \text{namerena_hodnota}_i}{\text{realna_hodnota}_i} \quad (7)$$

5.3.3 Přesnost (Precision)

Přesnost analytické metody představuje míru shody mezi sérií výsledků získaných mnohonásobnou analýzou homogenního vzorku za předepsaných podmínek. Pro odhad přesnosti se využívá homogenní vzorek nebo uměle připravený vzorek či roztok vzorku. Vyjadřuje se obvykle buď jako směrodatná odchylka (RD – Relative Difference) nebo relativní směrodatná odchylka (RSD – Relative Standard Difference) a konfidenční interval. Přesnost je možné vyhodnocovat na třech úrovních [43, 47]:

- ✓ opakovatelnost – vyjádření variability výsledků analýz provedených za stejných podmínek (stejná laboratoř, stejný analytik, stejný den, stejný přístroj, stejný analyt, stejná chemikálie) v krátkém časovém intervalu
- ✓ intermediální přesnost – vyjádření variability výsledků v rámci laboratoře (různé dny, různí analytici, různé přístroje, chemikálie)

- ✓ reprodukovatelnost – vyjádření variability výsledků mezi laboratořemi, pokud se provádí reprodukovatelnost, není nutná intermediální přesnost

Je vyžadováno provést šest stanovení analytu, nejčastěji na 100% koncentrační úrovni analytu [43, 47].

5.3.4 Linearita (Linearity)

Linearita analytické metody představuje její schopnost prokázat lineární vztah mezi nalezenými výsledky a koncentrací analytu ve vzorku. Lineární vztah se má hodnotit v definovaném rozsahu. Může být dokázán přímo na léčivé látce nebo přípravou umělých vzorků směsi komponent léčivého přípravku. Pro stanovení linearity se doporučuje provedení dvou analýz laboratorních vzorků na minimálně pěti koncentračních úrovních. Linearita má být hodnocena vizuální inspekcí vztahu odezvy jako funkce koncentrace nebo obsahu analyzované látky. Pokud se jedná o lineární vztah, mají být výsledky vyhodnoceny vhodnými statistickými metodami (regresní metodou nebo metodou nejmenších čtverců) [43, 47].

5.3.5 Rozsah

Rozsah analytické metody představuje interval mezi nejvyšší a nejnižší koncentrací analytu ve vzorku, pro které bylo demonstrováno, že analytická procedura má odpovídající přesnost, správnost a linearitu. Požadovaný rozsah závisí na předpokládané aplikaci analytické metody a je uveden vždy společně s linearitou [44, 47].

5.3.6 Detekční limit

Detekční limit analytické metody představuje nejnižší množství (koncentraci) analytu ve vzorku, které může být detekováno, ale není stanoveno kvantitativně. Pro určení detekčního limitu se použijí tyto metody [47]:

- ✓ vizuální hodnocení se používá především pro neinstrumentální metody, detekční limit se určí hodnocením vzorků o známých koncentracích analytu a stanovením minimální detekovatelné hladiny
- ✓ poměr signálu k šumu základní linie, kde platí vzorec: $S/N \sim 3$

5.3.7 Kvantifikační limit

Kvantifikační limit analytické procedury představuje nejnižší množství (koncentraci) analytu ve vzorku, kterou lze stanovit s přijatelnou přesností a správností. Pro určení kvantifikačního limitu se používají tyto metody [47]:

- ✓ vizuální hodnocení se používá především pro neinstrumentální metody, kvantifikační limit se získá hodnocením vzorků o známých koncentracích analytu a stanovením minimální hladiny, kterou lze kvantifikovat s přijatelnou správností a přesností
- ✓ poměr signálu šumu k základní linii se používá pouze u analytických metod, které vykazují šum základní linie; provádí se porovnání naměřených signálů vzorků s nízkými koncentracemi analytu a signálů slepých vzorků ($S/N \sim 10$)

5.3.8 Robustnost

Robustnost analytické metody je míra schopnosti metody poskytnout spolehlivé výsledky i při provedení malých, úmyslných změn parametrů metody. Poskytuje informaci o vhodnosti metody pro použití při běžných podmínkách. Cílem robustnosti je nalezení intervalu spolehlivosti pro daný parametr, ve kterém je analytická metoda validní. V rámci robustnosti analytické metody se ověřují [44, 47]:

- ✓ test způsobilosti systému (SST)
- ✓ stabilita roztoků standardů a vzorků
- ✓ změna parametrů přípravy zkušebních vzorků (změna ve složení mobilní fáze)
- ✓ změna parametrů analytické metody (změna teploty kolony, změna průtoku, změna nastavení teploty a otáček u disolučního testování)

5.4 Řízení validací

Před vlastním provedení validace je potřeba vytvořit validační protokol. Po schválení validačního protokolu nastupuje vlastní průběh validace. Během validace jsou ověřeny parametry, které jsou dané jednotlivými charakteristikami. Výsledky analýz jsou následně shrnuty ve validační zprávě, jejíž součástí je nejen prezentace výsledků, ale také závěrečné shrnutí, zdali všechny parametry vyhovují a metoda byla úspěšně validována.

5.4.1 Validační protokol

Validační protokol je důležitý dokument v systému GMP, který musí být vypracován a schválen dříve než začne praktická část validace. Název validačního protokolu má obsahovat „název substance (přípravku) – prováděná analýza“. Tento název by měl být identický pro analytickou metodu, validační protokol a validační zprávu. Validační protokol by měl obsahovat předmět a cíl, popis metody, stručný popis a odkaz na vydaný dokument analytické metody. Stručný popis by měl obsahovat jaké vzorky, standardy a chemikálie budou použity, přístroje a pomůcky, postup přípravy vzorků a standardů, způsob stanovení analýzy, způsob vyhodnocení výsledků [47]. Mezi základní body validačního protokolu patří postup provedení validace, který musí obsahovat seznam validovaných položek (hlavní látka, doprovodné látky, rozkladné produkty), seznam validačních charakteristik pro každou položku, způsob ověření každé validační charakteristiky (požadovaný rozsah, standardy a původní vzorky, způsob přípravy laboratorních a zkušebních vzorků, způsob provedení analýz, způsob zpracování primárních dat, způsob statistického vyhodnocení, kritéria přijatelnosti). Ve validačním protokolu by měly být taktéž popsány speciální požadavky, které by měly být v průběhu validace ověřeny (optimalizace přípravy vzorků, důkaz kvantitativního uvolnění analytu z matrice, doplňkové testy specificity – analýza při nižší vlnové délce). Validační protokol by měl také obsahovat související dokumenty (např. dokumenty původní validace) [47, 48].

5.4.2 Validační zpráva

Validační zpráva je připravena pověřeným specialistou. Název validační zprávy musí být identický s názvem validačního protokolu a validační zpráva by měla obsahovat odkaz na validační protokol (přesný popis metody), specifikaci a složení výrobku, popis ověření každé validační charakteristiky – jak způsob provedení, tak také vyhodnocení získaných dat. Souhrn validační zprávy musí obsahovat tabulky shrnující kritéria a dosažené výsledky pro všechny ověřené validační charakteristiky a musí zde být jednoznačný závěr o celkovém výsledku validace. Přílohy validační zprávy obsahují tabulky, obrázky a odkazy na primární data [47, 48].

II. PRAKTICKÁ ČÁST

6 CÍL DIPLOMOVÉ PRÁCE

Cílem diplomové práce je provést validaci analytické metody přípravku Novo-Passit tablety a dle principu „Quality by Design“ vytvořit efektivnější způsob detekce a kvantifikace účinné látky guaifenesinu v přípravku Novo-Passit tablety.

1. Validace současné zaregistrované metody.

2. Podle trendu „Quality by Design“ najít efektivnější (rychlejší) způsob detekce a kvantifikace. Byly navrženy tyto typy:
 - ✓ spektrofotometrická detekce v oblasti UV/VIS
 - ✓ UHPLC metoda

7 VALIDACE ANALYTICKÉ METODY U PŘÍPRAVKU NOVO-PASSIT TABLETY

Pokud se provádí v systému GMP změna, nebo je zaváděn nový pracovní postup, je nutno před zahájením takové práce popsat a schválit projekt formou změnového řízení. V našem případě došlo nejprve ke schválení změnového řízení ZŘ165782, na základě kterého byla validace formálně rozčleněna na tři fáze:

- ✓ validační protokol
- ✓ samostatné provedení validace
- ✓ validační zpráva

7.1 Vytvoření validačního protokolu

Prvním krokem validace analytické metody přípravku Novo-Passit tablety bylo vytvoření validačního protokolu, který obsahuje provedení a rozsah validace [49]. Součástí validačního protokolu jsou také matematické vztahy, pomocí nichž se vypočítají hodnoty stanovení obsahu a statistické modely zpracování dat. Protokol rovněž definuje limity a kritéria přijatelnosti, na základě kterých je validace považována za úspěšně provedenou; AM je tedy vhodná k zamyšlenému způsobu použití.

7.1.1 Materiál a přístroje

7.1.1.1 Vzorek Novo-Passit tablety

K analýze bude použita jedna šarže přípravku Novo-Passit tablety, placebo a standard guaifenesin:

tablety Novo-Passit 200 mg, šarže: 6A0390410V, expirace: 4/2013

placebo (Silicon dioxide expirace: 11/2012 , Microcrystalline Cellulose expirace: 2/2015, Glyceryl Tribhenate expirace: 9/2015 , Magnesium Stearate expirace: 5/2014, Lactose Monohydrate – Fast Flo expirace 9/2013, Opadry AMB 80W311115 expirace: 10/2013)

standard guaifenesin (číslo standardu: 033-7, šarže: 11GF02113, expirace: 3/2013)

Novo-Passit Extractum Dry, expirace: 3/2013

7.1.1.2 Seznam chemikálií a roztoků

- čištěná voda
- kyselina chlorovodíková
- kyselina fosforečná
- ethanol
- acetonitril

7.1.1.3 Zařízení

- disoluční zařízení (SOTAX AT70 Smart, SOTAX AT7 Smart nebo ekvivalentní)
- HPLC systém
- zařízení pro odplynění média
- standardní laboratorní vybavení

7.1.2 Příprava vzorků, standardů a placebo disoluční technikou

Vzorky budou připraveny pomocí disolučního přístroje SOTAX AT 7 Smart a automatu SOTAX AT 70 Smart. Příprava vzorku se řídí podle interního dokumentu Teva Czech Industries s.r.o. NO/PCQ/093/V6 – Disoluční zařízení SOTAX AT 7 (Smart).

7.1.2.1 Příprava vzorku

Do každého disoluční nádoby se odměří 900 ml disolučního média (0,1 M HCl). Poté se naváží šest tablet a po jedné se umístí do šesti disolučních nádob a spustí se měření.

Po 45 minutách:

- ✓ Odebere se 10 ml vzorku do stříkačky a vzorek se filtruje přes 0,45 µm nylonový filtr. Poté se pipetuje 2,0 ml filtrovaného roztoku vzorku do 10 ml odměrné baňky a baňka se doplní 60% ethanolem po rysku (AT 7 Smart).
- ✓ 15 ml roztoku vzorku se pumpuje přes 0,45 µm nylonový filtr do kolektoru. Pipetuje se 2,0 ml filtrovaného roztoku vzorku do 10 ml odměrné baňky a baňka se doplní 60% ethanolem po rysku (AT 70 Smart).

7.1.2.2 Příprava standardu

Do 100 ml odměrné baňky se naváží přesně asi 40,00 mg standardu guaifenesin a standard se rozpustí v 60% ethanolu. Zásobní roztok se temperuje 20 minut ve vodní lázni (20 °C) a poté se doplní 60% ethanolu po rysku. Vždy budou připraveny dvě navážky.

Pracovní roztok standardu

Pipetuje se 5,0 ml ze zásobního roztoku do 50 ml odměrné baňky, přidá se 60% ethanol a pracovní roztok se temperuje po dobu 15 minut ve vodní lázni (20 °C) a poté se doplní 60% ethanolu po rysku.

7.1.2.3 Příprava placebo

Pro provedení některých parametrů validace (specifická, správnost, linearita a rozsah) bude nutné připravit placebo. Jednotlivé komponenty se naváží, rozpustí se v disolučním médiu a připraví se k analýze.

7.1.2.4 Příprava mobilní fáze

Mobilní fáze se připraví smícháním acetonitrilu pro HPLC a čištěné vody v přesném poměru (1:4) a hodnota se poté upraví pomocí kyseliny na hodnotu pH = 2.

7.1.2.5 Chromatografické podmínky

Kolona: Hypersil ODS, 5 µm, 250 x 4,6 mm

Teplota kolony: 25 °C

Dávkovaný objem: 20 µl

Průtok: 1,0 ml/min.

Detekce (UV): 225 nm

Délka analýzy (min): 15

Oplach injektoru: 50% acetonitril

Teplota vzorku: 20 °C

Poznámka: Po analýze je doporučeno kolonu promývat po dobu 20 minut 50% acetonitrem.

7.1.3 Validace jednotlivých charakteristik

Validace analytické metody proběhne podle interního dokumentu Teva Czech Industries s.r.o. SOP\PQA\025 verze 5.00 – Validace analytických metod.

7.1.3.1 *Specificita*

Bude analyzováno placebo, disoluční médium mobilní fáze a standard.

Kritéria přijatelnosti:

Pro HPLC detekci v chromatogramu nesmí být přítomny žádné píky interferující s píkem analytu, případně odezva interferujícího píku $\leq 0,5 \%$.

7.1.3.2 *Robustnost*

Provede se disoluční test dvou navážených tablet s pozměněnými podmínkami při přípravě vzorku, standardu anebo detekce analytu. Pracuje se vždy se dvěma předem naváženými tabletami.

7.1.3.2.1 Stabilita vzorku a standardu

Provede se disoluční test, vzorky budou poté analyzovány a následně uschovány v lednici, autosampleru a při laboratorní teplotě. Další dny se bude vzorek vždy analyzovat a porovnávat s nově připravenými vzorky. Stejně se bude postupovat také se standardem.

Kritéria přijatelnosti:

Pro roztoky standardu: Vyhodnotí se opakovatelnost. Pro stabilitní a nové standardy se vypočítá relativní rozdíl (RF). Pro vyhodnocení roztoků standardů jsou použity průměrné hodnoty relativního rozdílu 1. naváženého standardu. Hodnota se vypočítá dle vzorce:

$$RF = \left| 1 - \frac{RF_N}{RF_S} \right| \cdot 100 \text{ [%]} \quad (8)$$

RF_N je hodnota relativního rozdílu nově připraveného roztoku

RF_S je hodnota relativního rozdílu stabilitně sledovaného standardního roztoku

RF $\leq 3 \%$

Pro roztoky vzorku: Obsah se vyhodnocuje pro každou navážku a každý čas analýzy zvlášť. Srovnává se obsah nové analýzy k obsahu původní analýzy roztoku vzorku. Hodnota relativního rozdílu se vypočítá dle vzorce:

$$RD = \frac{|\text{Průměr}_A - \text{Průměr}_B|}{\text{Průměr}_{AB}} \cdot 100 [\%] \quad (9)$$

Průměr_A je průměrná hodnota původní analýzy připraveného roztoku vzorku

Průměr_B je průměrná hodnota stabilitní analýzy připraveného roztoku vzorku

Průměr_{AB} je průměrná hodnota vypočítaná z obou hodnot (původně připravený vzorek, stabilitní vzorek)

RD ≤ 3 %

7.1.3.2.2 Disoluční parametry

Provede se disoluce dvou navážených tablet s pozměněnými podmínkami:

- ✓ Otáčky pádel ± 5 % (114 RPM, 126 RPM)
- ✓ Teplota ±2°C (35°C, 39°C)
- ✓ odplyněno/neodplyněno – odplyněné disoluční médium

Kritéria přijatelnosti:

Relativní rozdíl mezi průměrnými hodnotami dvou výsledků se spočítá podle vzorce:

$$\text{Průměr}_{A,B,AB} = \bar{x} = \frac{1}{n} \cdot \sum x_i \quad RD = \frac{|\text{Průměr}_A - \text{Průměr}_B|}{\text{Průměr}_{AB}} \cdot 100 [\%] \quad (10)$$

Průměr_A je průměrná hodnota vypočítaná z % rozpuštěné látky z prvního setu (normální podmínky).

Průměr_B je průměrná hodnota vypočítaná z % rozpuštěné látky v druhém setu.

Průměr_{AB} je průměrná hodnota z obou výsledných setů.

Rozdíl mezi soubory je vyhovující, pokud je **RD ≤ 3 %**.

7.1.3.2.3 HPLC parametry

Provede se detekce šarže za pozměněných podmínek:

- ✓ vlnová délka ± 3 nm
- ✓ Složení mobilní fáze ± 10 % organického složení
- ✓ teplota kolony $\pm 5^\circ\text{C}$
- ✓ průtok $\pm 10\%$

Kritéria přijatelnosti:

Test způsobilosti systému **musí vyhovovat požadavkům metody.**

7.1.3.2.4 Filtrační studie

U dvou navážených tablet se provede disoluční test. Nejprve budou odebrány vzorky, které se centrifugují a poté budou odebrány vzorky, jež se filtrují v daném rozmezí (alespoň ve třech frakcích).

Kritéria přijatelnosti:

Hodnota, která je získána z centrifugovaného vzorku, je považována za referenci. Obsah ve filtrovaném vzorku se vyjadřuje jako procento z obsahu nalezeného v centrifugovaných frakcích.

$$\text{Průměr}_{A,B,AB} = \bar{x} = \frac{1}{n} \cdot \sum x_i \quad RD = \frac{|\text{Průměr}_A - \text{Průměr}_B|}{\text{Průměr}_{AB}} \cdot 100 [\%] \quad (11)$$

Průměr_A je průměrná hodnota vypočítaná z centrifugovaného roztoku vzorku

Průměr_B je průměrná hodnota vypočítaná z filtrovaného roztoku vzorku

Průměr_{AB} je průměrná hodnota z obou roztoků vzorku

Rozdíl mezi soubory je vyhovující, pokud je **RD $\leq 3,0$ %**.

7.1.3.3 Správnost

Připraví se tři roztoky standardu s množstvím placeba, které bude odpovídat dané jednotce. Standardy se připraví na třech koncentračních úrovních (50%, 100% a 120%) a jsou připraveny vždy 3 navážky.

Kritéria přijatelnosti:

Průměrná hodnota výtěžnosti se musí pohybovat v rozmezí **95 – 105 %**.

7.1.3.4 Linearita

Provedou se dvě přípravy roztoku standardu s přidavkem placebo odpovídajícím jedné jednotce. Standardy se připraví na pěti koncentračních úrovních od 50 % do 120 %. Připraví se vždy 2 navážky.

Kritéria přijatelnosti:

Kritérium přijatelnosti u linearity je $R^2 \geq 0,99$.

Analýzou dat (ANOVA), popřípadě výpočtem uvedeným níže zjišťujeme, zda regresní přímka prochází počátkem. Pokud kritéria přijatelnosti nejsou splněna, je možné použít k analýze vhodnou kalibrační křivku.

$$\frac{\text{úsek na ose y}}{\text{odezva 100 \% koncentrace látky}} \cdot 100 \leq 5,0\% \quad (12)$$

7.1.3.5 Rozsah

Rozsah se prokazuje v rozmezí 50 – 120% (z linearity, správnosti a přesnosti).

7.1.3.6 Přesnost**7.1.3.6.1 Opakovatelnost**

Provede se disoluce běžné šarže přípravku v šesti disolučních nádobách. Tablety se před začátkem analýzy zváží.

Kritéria přijatelnosti:

RSD \leq 8,0 %.

7.1.3.6.2 Systémová přesnost

Provede se šest analýz vzorku v jedné disoluční nádobě. Tablety se před začátkem analýzy zváží.

Kritéria přijatelnosti:

RSD ≤ 8,0 %.

7.1.3.6.3 Intermediální přesnost

Provede se disoluce šesti tablet jedné šarže, avšak jiným laborantem, v jiný den a na jiném přístroji. Tablety se před začátkem analýzy zváží.

Kritéria přijatelnosti:

$$RD = \frac{|\text{Průměr}_A - \text{Průměr}_B|}{\text{Průměr}_{AB}} \cdot 100 \text{ [%]} \quad (13)$$

Průměr_A je průměrná hodnota vypočítaná z původních výsledků.

Průměr_B je průměrná hodnota vypočítaná z nových výsledků (jiný laborant, den, přístroj).

Průměr_{AB} je průměrná hodnota z obou analýz.

Jestliže **RD ≤ 8,0 % z 12 – ti výsledků** (2 disoluce), pak lze považovat rozdíl mezi soubory za vyhovující.

7.1.3.6.4 Srovnání manuální a automatické disoluce

Srovnají se výsledné hodnoty šesti vzorků z manuální a automatické disoluční jednotky.

Kritéria přijatelnosti:

$$RD = \frac{|\text{Průměr}_A - \text{Průměr}_B|}{\text{Průměr}_{AB}} \cdot 100 \text{ [%]} \quad (14)$$

Průměr_A je průměrná hodnota vypočítaná z výsledků manuální disoluční jednotky.

Průměr_B je průměrná hodnota vypočítaná z automatické disoluční jednotky.

Průměr_{AB} je průměrná hodnota z obou disolučních jednotek.

Jestliže $RD \leq 8,0 \%$ z 12 – ti výsledků (2 disoluce), pak lze považovat rozdíl mezi soubory za vyhovující.

Jednotlivá akceptační kritéria validační zprávy jsou shrnuta v Tabulce 4.

Tabulka 4 Kritéria přijatelnosti u jednotlivých charakteristik

Parametr	Akceptační kritérium
Specificita	$E_{\text{fekt}} \leq 0,5 \%$
Robustnost	
Stabilita roztoku standardu (Laboratoř, lednice, autosampler)	$RF \leq 3,0 \%$
Stabilita zásobního roztoku standardu (Lednice, laboratoř)	$RF \leq 3,0 \%$
Disoluční parametry (otáčky pádel, teplota, odplynění)	$RD \leq 3,0 \%$
Stabilita roztoku vzorku (Lednice, laboratoř, autosampler)	$RD \leq 3,0 \%$
HPLC parametry	Test vhodnosti musí odpovídat požadavkům metody.
Filtrační studie	$RD \leq 3,0 \%$
Správnost	Průměrná hodnota výtěžnosti se musí pohybovat v rozmezí 95 – 105 %.
Linearita	$R^2 \geq 0,99$.
Přesnost	
Opakovatelnost	$RSD \leq 8,0 \%$
Systémová přesnost	$RSD \leq 8,0 \%$
Intermediální přesnost	$RD \leq 8,0 \%$, $RSD \leq 8,0 \%$
Srovnání automatické a manuální disoluce	$RD \leq 8,0 \%$, $RSD \leq 8,0 \%$

7.2 Laboratorní provedení validace analytické metody

Samostatné provedení testů k jednotlivým validačním charakteristikám probíhá podle schváleného validačního protokolu. Reálné vzorky šarží a placebo obsažené v analytu v předem definované koncentraci se převedou do disolučního zařízení, kde dojde k uvolnění analytu do disolučního média. Po disolučním procesu se dle pokynů validačního protokolu k provádění jednotlivých validačních charakteristik a dle metody připraví reprezentativní roztoky pro vyhodnocení obsahu uvolněné účinné látky HPLC analýzou.

7.3 Validační zpráva

Po ukončení validace se připraví validační zpráva, která musí obsahovat odkaz na validační protokol. Validační zpráva obsahuje popis ověření každé validační charakteristiky (způsob provedení, vyhodnocení získaných dat, vyhodnocení odchylek), souhrn (tabulky shrnující kritéria a dosažené výsledky pro všechny ověřované validační charakteristiky, jednoznačný závěr o celkovém výsledku validace) a přílohy (tabulky, obrázky, odkazy na primární data) [47, 50] (Tabulka 5).

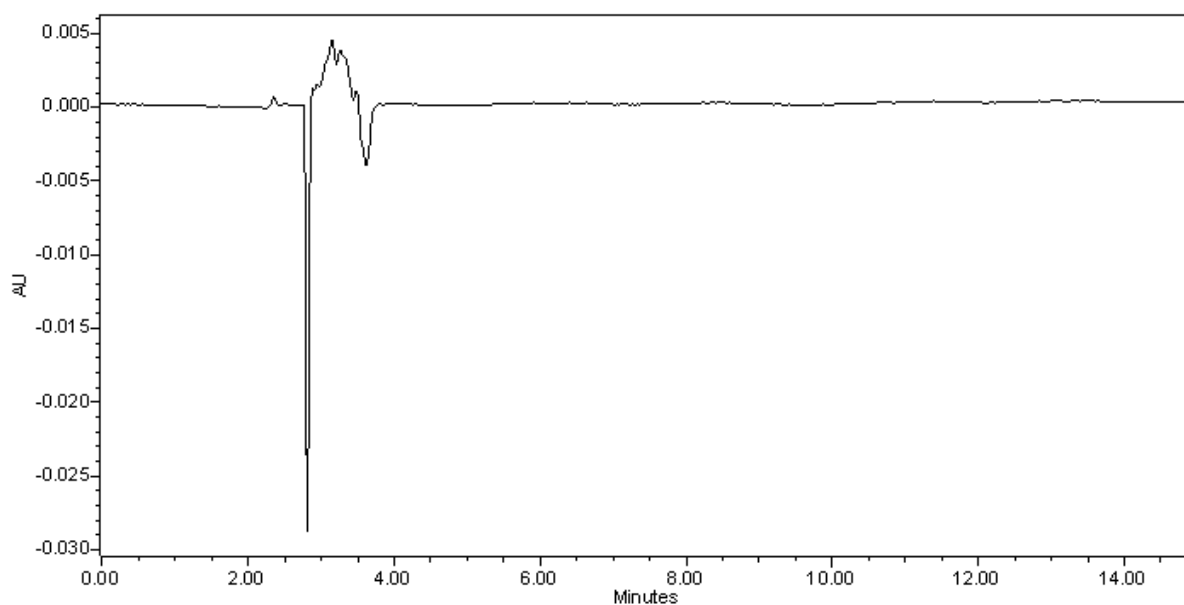
Tabulka 5 Shrnující tabulka z validační zprávy

Parametr	Akceptační kritérium	Výsledky	Vyhovující kritérium (Ano/Ne)
Specifická	Efekt $\leq 0,5$ %	Nebylo zaznamenáno žádné ovlivnění mezi placebem, disolučním médiem a mobilní fází. Metoda je selektivní.	Ano
Robustnost			
Stabilita roztoku standardu	RF $\leq 3,0$ %	Lednice: RD = 0 % po 20-ti dnech	Ano
		Laboratoř: RD = 0 % po 20-ti dnech	Ano
		Autosampler: RD = 1 % po 20-ti dnech	Ano
Stabilita zásobního roztoku standardu	RF $\leq 3,0$ %	Lednice: RD = 0 % po 20-ti dnech	Ano
		Laboratoř: RD = 0 % po 20-ti dnech	Ano
Stabilita roztoku vzorku	RD $\leq 3,0$ % SOTAX AT 70	Lednice: RD = 0 % po 10-ti dnech	Ano
		Laboratoř: RD = 1 % po 10-ti dnech	Ano
		Autosampler: RD = 2 % po 5-ti dnech	Ano
	RD $\leq 3,0$ % SOTAX AT 7	Lednice: RD = 0 % po 10-ti dnech	Ano
		Laboratoř: RD = 2 % po 10-ti dnech	Ano
		Autosampler: RD = 1 % po 10-ti dnech	Ano
Disoluční parametry	RD $\leq 3,0$ % SOTAX AT 7	<i>Teplota</i>	
		36,5 °C - RD = 0 %	Ano
		39°C - RD = 0 %	Ano
		<i>Rychlost pádel</i>	
		114 RPM - RD = 0 %	Ano
		126 RPM - RD = 1 %	Ano
	RD $\leq 3,0$ % SOTAX AT 70	<i>Teplota</i>	
		36,5 °C - RD = 2 %	Ano
		39°C - RD = 1 %	Ano
		<i>Rychlost pádel</i>	
		114 RPM - RD = 2 %	Ano
		126 RPM - RD = 2 %	Ano
Odplynění média nemá vliv na výsledky.			
HPLC parametry	SST musí splňovat požadavky metody.	Metoda je robustní ve všech kritériích: vlnová délka ± 3 nm, složení mobilní fáze ± 10 % organické složky, teplota kolony ± 5 °C, průtok ± 10 %.	Ano
Filtreační studie	RD $\leq 3,0$ % AT 7 / AT 70	<i>1 μm skleněný filtr</i>	
		RD = 0-2 %	Ano
		<i>0,45 μm nylonový filtr</i>	
		RD = 0-1 %	Ano
Není nutné vykřevat filtrát do odpadu.			
Správnost	Výtěžnost mezi 95 – 105 %.	Výtěžnost od 102 % do 105 %.	Ano
Linearita	korelační koeficient $> 0,99$ / Y - průsečík $< 5,0$ %	korelační koeficient $> 1,00$ / Y - průsečík = 1,6 %	Ano
Přesnost			
Opakovatelnost	RSD $\leq 8,0$ %		
	SOTAX AT 7	Průměrný obsah: 103 %, RSD = 0,8 %	Ano
	SOTAX AT 70	Průměrný obsah: 101 %, RSD = 0,7 %	Ano
Systémová přesnost	RSD $\leq 8,0$ %		
	SOTAX AT 7	Průměrný obsah: 107 %, RSD = 1 %	Ano
	SOTAX AT 70	Průměrný obsah: 100 %, RSD = 1 %	Ano
Intermediální přesnost	RSD $\leq 8,0$ %, RD $\leq 8,0$ %		
	SOTAX AT 7	RD = 1 %, RSD = 1 %	Ano
	SOTAX AT 70	RD = 1 %, RSD = 1 %	Ano
Srovnání automatické a manuální disoluce	RSD $\leq 8,0$ %, RD $\leq 8,0$ %	RD = 1 %, RSD = 1 %	Ano

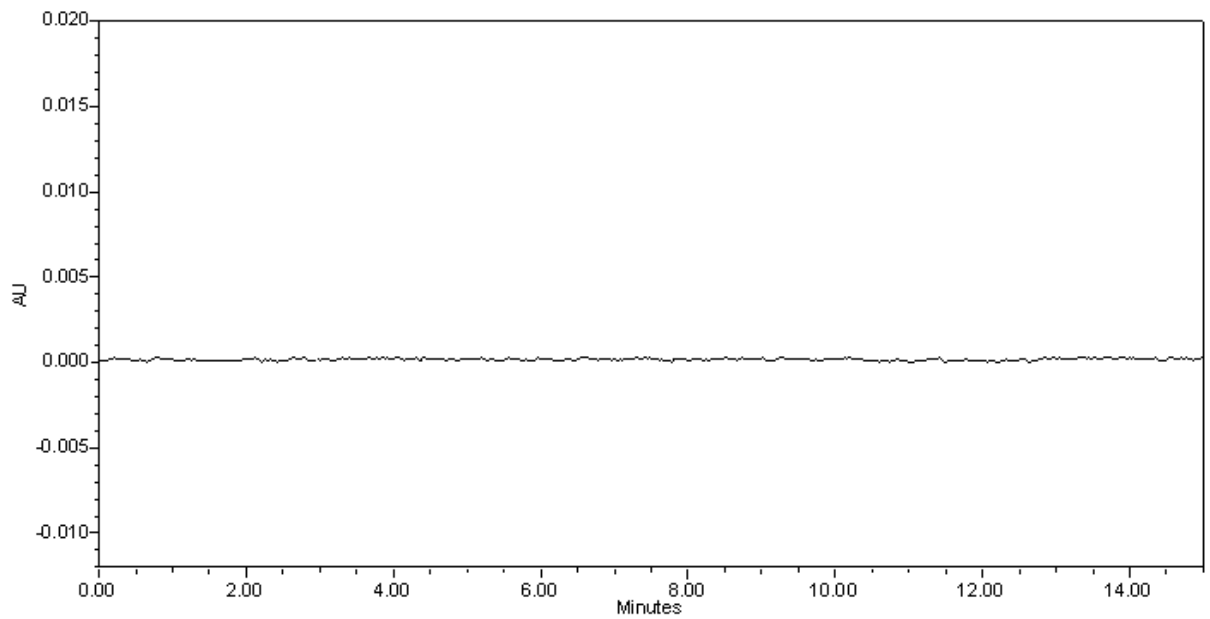
7.3.1 Specificita

Specificita byla prokázána porovnáním zkoušky mobilní fáze, placebo a disolučního média s roztokem standardu – nebyly pozorovány žádné interference (Obr. 18 - 22). Metoda je selektivní.

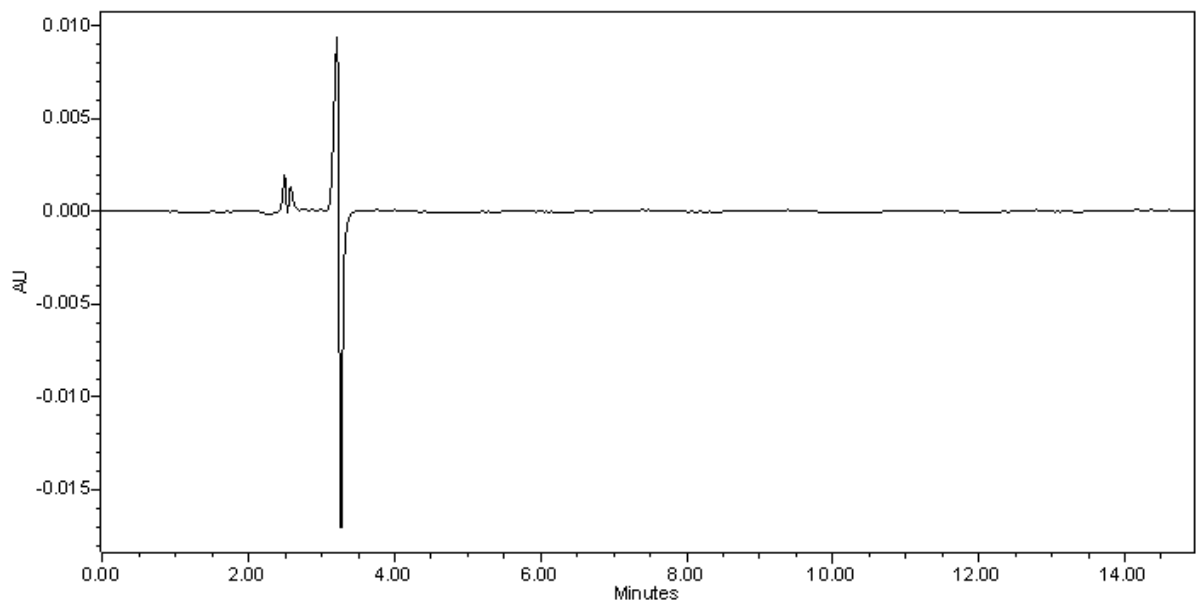
Poznámka: Novo-Passit Extract nebyl součástí placebo, protože obsahuje aktivní látku (API) (Obr. 23). Při porovnání Obr. 21 a Obr. 23 je zřejmé, že se nejedná o stejnou API – guaifenesin.



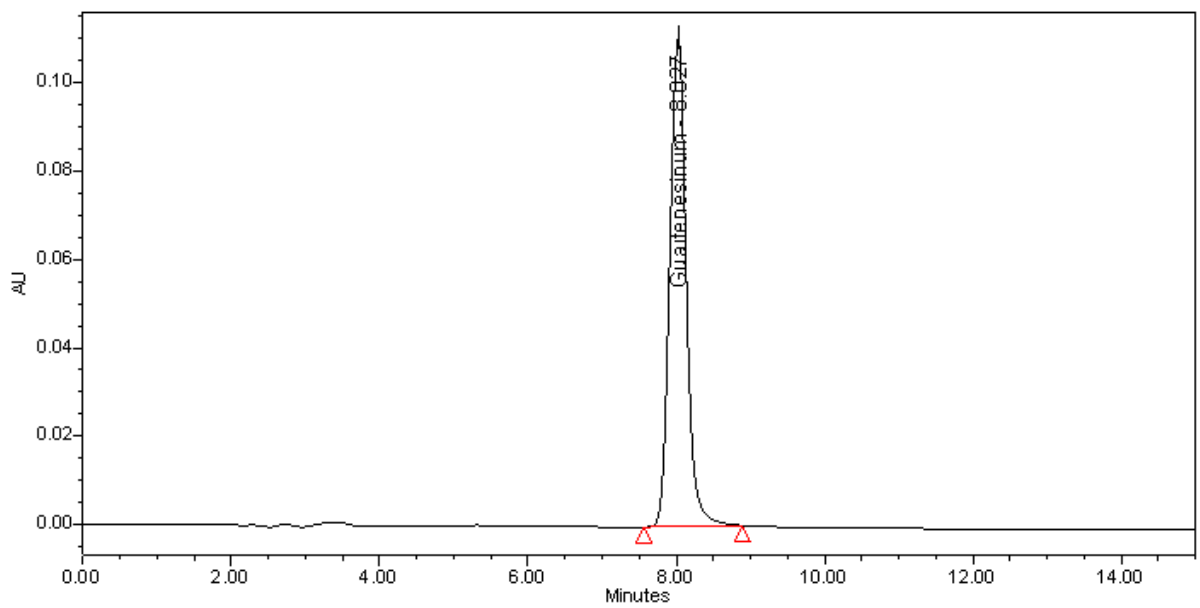
Obr. 18 Chromatogram placebo



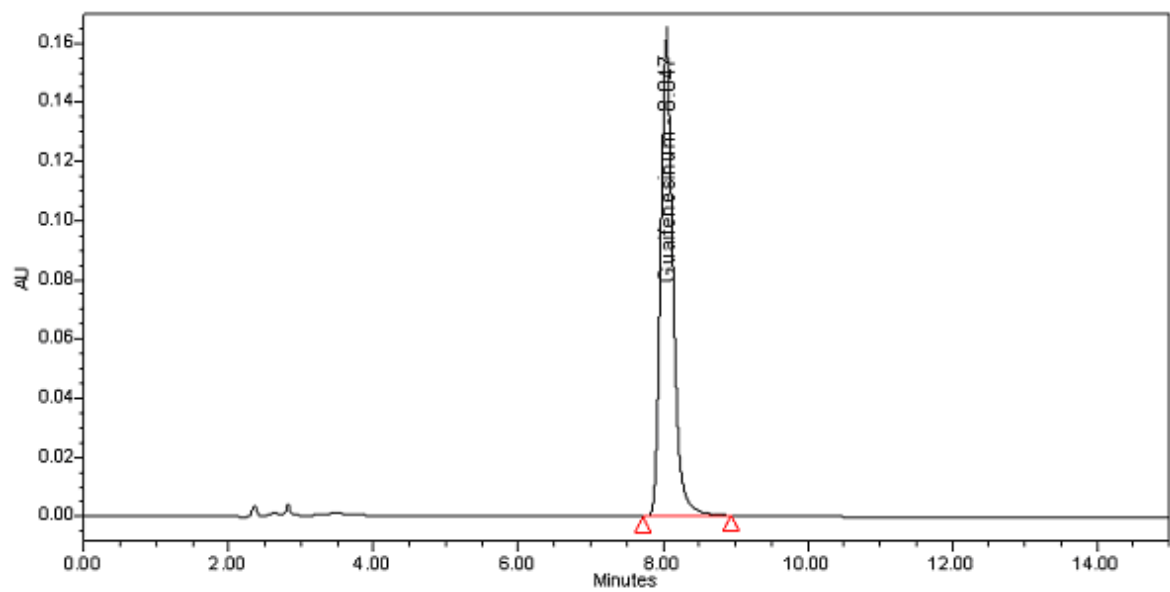
Obr. 19 Chromatogram mobilní fáze



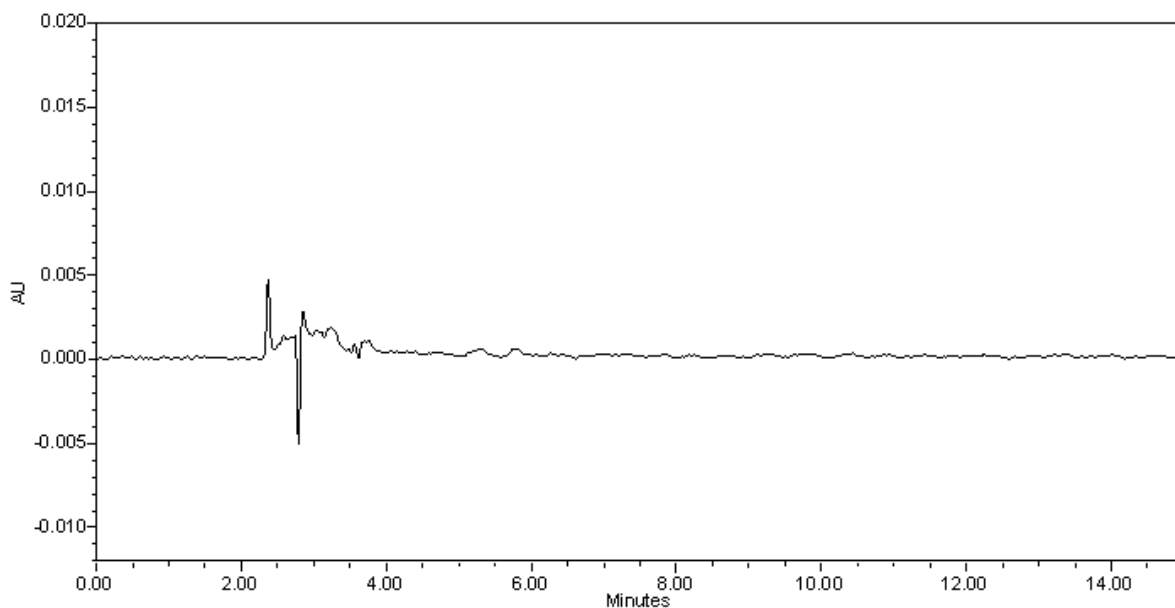
Obr. 20 Chromatogram disolučního média



Obr. 21 Chromatogram roztoku standardu



Obr. 22 Chromatogram roztoku vzorku



Obr. 23 Chromatogram Novo-Passit Extract Dry

7.3.2 Robustnost

7.3.2.1 Stabilita vzorku a standardu

Byla zkoumána stabilita vzorku a standardního roztoku (Tabulka 6 – 9). Pro stabilitní testování byly připraveny nové roztoky standardu a ty byly proměřeny spolu s původními standardy a vzorky skladovanými při laboratorní teplotě (15°C – 25°C), v chladničce (2°C – 8°C) a autosampleru (11±1°C).

Stabilita vzorku byla prokázána porovnáním procentuální hodnoty rozpuštěných látek (obsah) u původního (starého) roztoku a stejného roztoku uloženého v definovaných podmínkách (laboratorní teplota, lednice a autosampler).

Stabilita vzorku byla prokázána pro:

[SOTAX AT 7 SMART]

10 dní pro vzorky uložené při **laboratorní teplotě**

5 dní pro vzorky uložené v **autosampleru**

10 dní pro vzorky uložené v **lednici**

[SOTAX AT 70 SMART]

10 dní pro vzorky uložené při **laboratorní teplotě**

10 dní pro vzorky uložené v **autosampleru**

10 dní pro vzorky uložené v **lednici**

Stabilita standardu byla prokázána porovnáním odezvy faktoru stability testovaného standardu s nově připraveným.

Stabilita standardu byla prokázána pro:

20 dní pro vzorky uložené při **laboratorní teplotě**

20 dní pro vzorky uložené v **autosampleru**

20 dní pro vzorky uložené v **lednici**

Poznámka: Navíc byla provedena také testování zásobního roztoku standard a stabilita byla prokázána porovnáním odezvy faktoru stability testovaného standardu s nově připraveným.

Stabilita zásobního roztoku standardu byla prokázána pro:

20 dní pro vzorky uložené při **laboratorní teplotě**

20 dní pro vzorky uložené v **lednici**

Tabulka 6 Výsledky stabilitní studie tablet Novo-Passit na SOTAX AT 7 SMART

Stabilita 200 mg tablet roztoku vzorku po dobu 10 dnů				
Laboratorní teplota				
Datum	1.2.2013	4.2.2013	6.2.2013	11.2.2013
Obsah [%]	100,0	-	-	-
Obsah Stabilita [%]	-	101,2	101,1	100,5
RD	-	1	1	1
Lednice				
Datum	1.2.2013	4.2.2013	6.2.2013	11.2.2013
Obsah [%]	100,0	-	-	-
Obsah Stabilita [%]	-	100,4	100,0	99,7
RD	-	0	0	0
Autosampler				
Datum	1.2.2013	4.2.2013	6.2.2013	11.2.2013
Obsah [%]	100,0	-	-	-
Obsah Stabilita [%]	-	101,5	102,1	103,8
RD	-	1	2	4

Tabulka 7 Výsledky stabilitní studie tablet Novo-Passit na SOTAX AT 70 SMART

Stabilita 200 mg tablet roztoku vzorku po dobu 10 dnů				
Laboratorní teplota				
Datum	1.2.2013	4.2.2013	6.2.2013	11.2.2013
Obsah [%]	99,0	-	-	-
Obsah Stabilita [%]	-	101,4	101,3	100,8
RD	-	2	2	2
Lednice				
Datum	1.2.2013	4.2.2013	6.2.2013	11.2.2013
Obsah [%]	99,0	-	-	-
Obsah Stabilita [%]	-	99,9	99,8	99,0
RD	-	1	1	0
Autosampler				
Datum	1.2.2013	4.2.2013	6.2.2013	11.2.2013
Obsah [%]	99,0	-	-	-
Obsah Stabilita [%]	-	99,0	98,7	98,1
RD	-	0	0	1

Tabulka 8 Výsledky stabilitní studie pracovního roztoku standardu

Stabilita pracovního roztoku standardu v laboratoři					
Datum	1.2.2013	4.2.2013	11.2.2013	15.2.2013	21.2.2013
SI RF Nový	-	39746	40331	40152	39882
SI RF Stabilita	-	39970	40264	40091	40082
RF	-	0	0	0	0
Stabilita pracovního roztoku standardu v lednici					
Datum	1.2.2013	4.2.2013	11.2.2013	15.2.2013	21.2.2013
SI RF Nový	-	39846	40331	40152	39882
SI RF Stabilita	-	39910	40101	40064	39835
RF	-	0	1	0	0
Stabilita pracovního roztoku standardu v autosampleru					
Datum	1.2.2013	4.2.2013	11.2.2013	15.2.2013	21.2.2013
SI RF Nový	-	39846	40331	40152	39882
SI RF Stabilita	-	39893	39767	39500	39429
RF	-	0	1	2	1

Tabulka 9 Výsledky stabilitní studie zásobního roztoku standardu

Stabilita zásobního roztoku standardu v laboratoři					
Datum	1.2.2013	4.2.2013	11.2.2013	15.2.2013	21.2.2013
SI RF Nový	-	396552	395245	395295	393306
SI RF Stabilita	-	397226	396547	396317	394012
RF	-	0	0	0	0
Stabilita zásobního roztoku standardu v lednici					
Datum	1.2.2013	4.2.2013	11.2.2013	15.2.2013	21.2.2013
SI RF Nový	-	396312	395245	395295	393306
SI RF Stabilita	-	397444	396631	396113	393943
RF	-	0	0	0	0

7.3.2.2 Disoluční parametry

Robustnost disolučních parametrů (Tabulka 10 – 11) byla prokázána srovnáním obsahu (%) za normálních a pozměněných podmínek.

SOTAX AT 7 Smart – metoda je robustní v rozsahu 36,5 – 39±0,5°C a od 114 do 126 RPM.

SOTAX AT 70 Smart – metoda je robustní v rozsahu 36,5 – 39±0,5°C a od 115 do 126 RPM.

Podle získaných údajů nemá odplynění média vliv na analýzu.

Tabulka 10 Výsledky studie disolučních parametrů Novo-Passit 200 mg tablety na SOTAX AT 7 Smart

AT 7	Vzorek	Obsah [%]	Průměrný obsah [%]	RD [%]
37°C/50 RPM	Průměr opakovatelnosti	103,0	103	-
	Vzorek 1	98,9	97	6
35°C	Vzorek 2	95,7		
35,5°C	Vzorek 1	100,5	99	4
	Vzorek 2	96,6		
36°C	Vzorek 1	94,7	96	7
	Vzorek 2	96,7		
36,5°C	Vzorek 1	101,1	103	0
	Vzorek 2	104,0		
39°C	Vzorek 1	103,0	103	0
	Vzorek 2	102,3		
114 RPM	Vzorek 1	103,8	103	0
	Vzorek 2	101,5		
126 RPM	Vzorek 1	104,9	104	1
	Vzorek 2	102,6		

Tabulka 11 Výsledky studie disolučních parametrů Novo-Passit 200 mg tablety na SOTAX AT 70 Smart

AT70	Vzorek	Obsah [%]	Průměrný obsah [%]	RD [%]
37°C/50RPM	průměr opakovatelnosti	101,3	101,0	-
	Vzorek 1	95,5	91,0	11,0
35°C	Vzorek 2	86,4		
35,5°C	Vzorek 1	98,0	97,0	4,0
	Vzorek 2	96,2		
36°C	Vzorek 1	97,7	98,0	4,0
	Vzorek 2	97,4		
36,5°C	Vzorek 1	97,8	99,0	2,0
	Vzorek 2	101,0		
39°C	Vzorek 1	101,0	100,0	1,0
	Vzorek 2	99,5		
114 RPM	Vzorek 1	95,6	97,0	4,0
	Vzorek 2	98,1		
115 RPM	Vzorek 1	98,1	99,0	2,0
	Vzorek 2	100,0		
126 RPM	Vzorek 1	100,2	99,0	2,0
	Vzorek 2	98,5		
Neodplynění média	Vzorek 1	98,6	100,0	2,0
	Vzorek 2	100,5		

7.3.2.3 HPLC parametry

Metoda robustnosti pro HPLC parametry (Tabulka 12) byla prokázána vyhodnocením testu způsobilosti systému ve změněných podmínkách.

Tabulka 12 Výsledky studie HPLC parametrů pro Novo-Passit 200mg tablety

Parametr	Plocha RSD 5xS1 [%]	RF S1 vs S2 [%]	Počet pater	Počet pater na metr
<i>Organická složka + 10 %</i>	0,5	0,2	8410	33640
<i>Organická složka - 10 %</i>	0,3	0,1	9706	38824
<i>Teplota kolony + 5 °C</i>	0,2	0,4	8791	35164
<i>Teplota kolony - 5 °C</i>	0,1	0,1	9512	38048
<i>Průtok + 10 %</i>	0,1	0,1	8897	35588
<i>Průtok - 10 %</i>	0,2	0,4	9503	38012
<i>Vlnová délka + 3 nm</i>	0,1	0,1	8937	35748
<i>Vlnová délka - 3 nm</i>	0,2	0,2	9226	36904
<i>Limit</i>	≤2,0	≤2,0	≥2000	≥8000

7.3.2.4 Filtrační studie

Metoda robustnosti pro různé typy filtrů byla prokázána na základě porovnání obsahu filtrovaného části a odstředěné části vzorku (Tabulka 13). Pro všechny testované filtry byl rozdíl ≤ 3%. Není nutné, aby se část filtrátu vylévala do odpadu.

Tabulka 13 Výsledky filtrační studie tablet Novo-Passit

Vzorek číslo	Obsah [%]	RD [%]
<i>Centrifugovaný vzorek 1</i>	101,9	-
<i>1 μm Glass fibre 0-6 ml 1</i>	100,6	1
<i>1 μm Glass fibre 7-12 ml 1</i>	99,7	2
<i>1 μm Glass fibre 13-18 ml 1</i>	100,8	1
<i>0.45 μm Nylon 0-6 ml 1</i>	102,0	0
<i>0.45 μm Nylon 7-12 ml 1</i>	102,2	0
<i>0.45 μm Nylon 13-18 ml 1</i>	102,3	0
<i>Centrifugovaný vzorek 2</i>	101,4	-
<i>1 μm Glass fibre 0-6 ml 2</i>	102,4	1
<i>1 μm Glass fibre 7-12 ml 2</i>	101,1	0
<i>1 μm Glass fibre 13-18 ml 2</i>	100,8	1
<i>0.45 μm Nylon 0-6 ml 2</i>	102,2	1
<i>0.45 μm Nylon 7-12 ml 2</i>	102,8	1
<i>0.45 μm Nylon 13-18 ml 2</i>	102,4	1

7.3.3 Správnost

Validační charakteristika byla dokázána výpočtem průměrného výtěžku, který se pohyboval v rozmezí 95 – 105 %. Výsledky jsou uvedeny v Tabulce 14.

Tabulka 14 Výsledky správnosti pro tablety Novo-Passit tablet

Koncentrační úroveň	Vzorek	Navážka [mg] přidaná	Výtěžek [%]	Průměrný výtěžek [%]	RSD [%]
50%	C1/1	111,59	101,70	102	1,2
	C2/1	111,57	103,90		
	C3/1	111,62	101,70		
100%	C1/4	223,84	104,00	105	1,3
	C2/4	223,84	106,30		
	C3/4	223,77	104,00		
120%	C1/5	268,68	103,20	104	0,6
	C2/5	268,63	103,90		
	C3/5	268,68	104,50		

7.3.4 Linearita

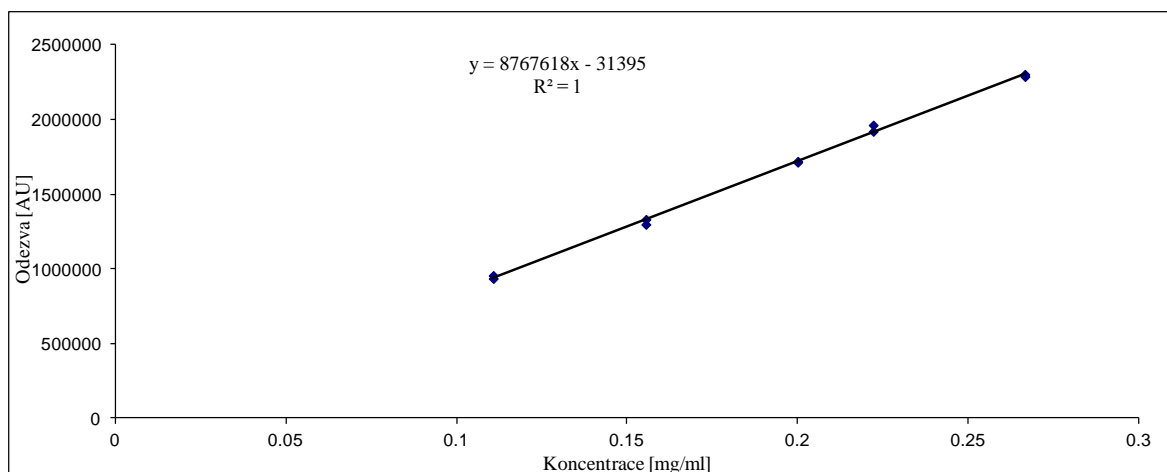
Validační charakteristika byla dokázána výpočtem přímky lineární regrese (Tabulka 15, Graf 1).

Tabulka 15 Výsledky linearity u studie Novo-Passit tablet

Koncentrační úroveň	Vzorek	Navážka [mg] přidaná	c [mg.ml ⁻¹]	Plocha
50%	C1/1	111,59	0,110787	936404
	C2/1	111,57	0,110767	956653
70%	C1/2	156,70	0,155572	1332482
	C2/2	156,67	0,155542	1298868
90%	C1/3	201,52	0,200069	1714924
	C2/3	201,54	0,200089	1721167
100%	C1/4	223,84	0,222228	1921706
	C2/4	223,84	0,222228	1963753
120%	C1/5	268,68	0,266746	2288731
	C2/5	268,63	0,266696	2303853

7.3.5 Rozsah

Rozsah byl prokázán v rozmezí 50 – 120% (z linearity, správnosti a přesnosti) (Graf 1).



Graf 1 Přímka a rovnice lineární regrese

7.3.6 Přesnost

7.3.6.1 Opakovatelnost

Na základě výsledků (Tabulka 16 – 17) byla prokázána opakovatelnost, kdy $RSD \leq 8,0 \%$.

Tabulka 16 Opakovatelnost AT 7 Smart

Vzorek č.	Obsah [%]
1	103
2	103
3	102
4	102
5	104
6	103
Průměr	103
RSD [%]	0,8

Tabulka 17 Opakovatelnost AT 70 Smart

Vzorek č.	Obsah [%]
1	102
2	102
3	102
4	101
5	100
6	101
Průměr	101
RSD [%]	0,7

7.3.6.2 Systémová přesnost

Na základě výsledků (Tabulka 18 – 19) byla prokázána systémová přesnost, kdy RSD \leq 8,0 %.

Tabulka 18 Systémová přesnost AT 7 Smart

Vzorek č.	Obsah [%]
1,1	106
1,2	107
1,3	108
1,4	107
1,5	106
1,6	106
Průměr	107
RSD [%]	1

Tabulka 19 Systémová přesnost AT 70 Smart

Vzorek č.	Obsah [%]
1,1	100
1,2	100
1,3	100
1,4	100
1,5	102
1,6	100
Průměr	100
RSD [%]	1

7.3.6.3 Intermediální přesnost

Na základě výsledků (Tabulka 20 – 21) byla prokázána intermediální přesnost, kdy $RSD \leq 8,0 \%$, $RD \leq 8,0 \%$.

Tabulka 20 Intermediální přesnost AT 7 Smart

<i>Vzorek č.</i>	Původní Obsah [%]	Intermediální Obsah [%]
<i>1</i>	103	101
<i>2</i>	103	102
<i>3</i>	102	103
<i>4</i>	102	101
<i>5</i>	104	101
<i>6</i>	103	102
<i>Průměr</i>	103	102
<i>RSD [%]</i>	0,8	0,9
<i>RSD [%]</i>	1	
<i>RD [%]</i>	1	

Tabulka 21 Intermediální přesnost AT 70 Smart

<i>Vzorek č.</i>	Původní Obsah [%]	Intermediální Obsah [%]
<i>1</i>	102	101
<i>2</i>	102	100
<i>3</i>	102	99
<i>4</i>	101	99
<i>5</i>	100	101
<i>6</i>	101	103
<i>Průměr</i>	101	101
<i>RSD [%]</i>	0,7	1,3
<i>RSD [%]</i>	1	
<i>RD [%]</i>	1	

7.3.6.4 Srovnání automatické a manuální disoluce

Srovnání automatické a manuální disoluce zobrazuje Tabulka 22. $RSD \leq 8,0 \%$ a $RD \leq 8,0 \%$.

Tabulka 22 Srovnání výsledků AT 7 Smart a AT 70 Smart

<i>Vzorek č.</i>	<i>AT 7 Obsah [%]</i>	<i>AT 70 Obsah [%]</i>
<i>1</i>	103	102
<i>2</i>	103	102
<i>3</i>	102	102
<i>4</i>	102	101
<i>5</i>	104	100
<i>6</i>	103	101
<i>Průměr</i>	103	101
<i>RSD [%]</i>	0,8	0,7
<i>RSD [%]</i>	1	
<i>RD [%]</i>	1	

8 VÝVOJ NOVÉ METODY NA STANOVENÍ OBSAHU GUAIFENESINU

Dalším cílem diplomové práce bylo vyvinout metodu na stanovení obsahu guaifenesinu v přípravku Novo-Passit tablety. Obecně existují dva principy detekce – spektrofotometricky a chromatograficky. Oba přístupy byly aplikovány. Zatímco kapitola 8.1 shrnuje výsledky vývoje metody s UV/VIS detekcí, kapitola 8.2 popisuje moderní a daleko efektivnější převod současně zaregistrované metody na UHPLC metodu. Vhodnými změnami v přípravě, použité koloně a podmínek chromatografického měření, bylo dosaženo výrazného zkrácení doby analýzy.

8.1 Stanovení guaifenesinu spektrofotometricky [51]

8.1.1 Materiál a přístroje

8.1.1.1 Vzorek Novo-Passit tablety

K analýze byla použita jedna šarže přípravku Novo-Passit tablety, placebo a standard guaifenesin:

- tablety Novo-Passit 200 mg, šarže: 6A0390410V, expirace: 4/2013
 - placebo (Silicon dioxide expirace: 11/2012 , Microcrystalline Cellulose expirace: 2/2015, Glyceryl Tribehenate expirace: 9/2015 , Magnesium Stearate expirace: 5/2014, Lactose Monohydrate – Fast Flo expirace 9/2013, Opadry AMB 80W311115 expirace: 10/2013)
- standard guaifenesin (číslo standardu: 033-7, šarže: 11GF02113, expirace: 3/2013)
- Novo-Passit Extractum Dry (není považováno za placebo, protože obsahuje účinnou látku), expirace: 3/2013.

8.1.1.2 Seznam chemikálií

- čištěná voda
- ethanol
- kyselina chlorovodíková

8.1.1.3 Pomůcky a přístroje

- disoluční zařízení (SOTAX AT 7 Smart)
- zařízení pro odplynění média
- analytické váhy Mettler Toledo
- vodní lázeň
- ultrazvukové zařízení
- analytické sklo, pipety a mikropipety
- dvoupaprskový UV/VIS spektrofotometr Varian Cary 100

8.1.1.4 Příprava vzorku, placebo a standardu pro UV/VIS měření

8.1.1.4.1 Příprava vzorku

Pro spektrofotometrické proměření postačila disoluce pouze jedné tablety za klasických podmínek (120 RPM, $37\pm 0,5^{\circ}\text{C}$, 45 minut).

Připravilo se 1000 ml disolučního média – do 990,2 ml čištěné vody se odměřilo 9,8 ml 32% HCl. Do disoluční nádoby se odměřilo 900 ml disolučního média a médium se temperovalo na teplotu $37\pm 0,5^{\circ}\text{C}$. Poté se zvažila jedna tableta, byla spuštěna do disoluční nádoby a začal test.

Po 45 minutách byl proveden manuální odběr, vzorek byl přefiltrován přes nylonový filtr. 2 ml filtrátu byl pipetován do 10 ml odměrné baňky, baňka se doplnila 60% ethanolem, vytemperovala se ve vodní lázni a následně byla baňka doplněna 60% ethanolem po rysku. Jelikož byl při spektrofotometrickém měření použit jako slepý vzorek nejen 60% ethanol, ale také 0,1 M HCl, byly filtrované vzorky naředěny také pomocí 0,1 M HCl.

8.1.1.4.2 Příprava placebo

Placebo bylo rozváženo podle produktové specifikace. Pro přípravu placebo se původně nevyužil Novo-Passit Extract Dry, jehož součástí je aktivní látka, která by mohla negativně ovlivňovat průběh měření. Jednotlivě navážené složky placebo se společně smíchaly v příslušném množství disolučního média (60% ethanol). Množství placebo a disolučního média bylo v takovém poměru, který simuloval rozpouštění tablety v 900 ml disolučního

média. Poté se vzorek filtroval přes nylonový filtr a 2 ml filtrátu se pipetovalo do 10 ml odměrné baňky. Do baňky byl přidán 60% ethanol (0,1 M HCl) a po temperaci ve vodní lázni byla baňka doplněna 60% ethanolem (0,1 M HCl) po rysku.

8.1.1.4.3 Příprava standardu

Do 100 ml odměrné baňky navážilo 40 mg standardu guaifenesinu. Standard se rozpustil v 60% ethanolu (0,1 M HCl), vytemperoval se ve vodní lázni a doplnil se 60% ethanolem (0,1 M HCl) po rysku. Poté se pipetovalo 5 ml ze zásobního roztoku do 50 ml odměrné baňky, do baňky byl přidán 60% ethanolem (0,1 M HCl) a po temperaci ve vodní lázni se pracovní roztok doplnil 60% ethanolem (0,1 M HCl) po rysku.

8.1.1.5 *Spektrofotometrické měření*

Po temperaci a doplnění baněk po rysku, byly vzorky, standard a placebo proměřeny. Analýza proběhla na dvoupaprskové spektrofotometru Varian Cary 100.

Musela se provést série několik měření pro dvě různá média. Jelikož se standard dle metody rozpouští v 60% ethanolu, zatímco vzorky v 0,1 M HCl a až poté jsou ředěny 60% ethanolem, musely se provést dvě různá měření, kdy v prvním případě se postupovalo přesně dle metody, a pro vynulování přístroje byl použit 60% ethanol. V druhém případě byly standard a vzorky rozpuštěny a naředěny v 0,1 M HCl a přístroj byl vynulován na 0,1 M HCl. Měření bylo provedeno v 1 cm a v 1 mm kyvetách, aby byl výsledek přehlednější a zobrazovala se celá křivka.

Nejprve byla vytvořena metoda v programu. Nastavilo se rozmezí vlnových délek a snímání hodnot absorbancí po 1 nm. Následně byly proměřeny vzorky, jako médium se použil 60% ethanol a měření proběhlo v 1 cm a v 1 mm kyvetách. Poté jako médium posloužila 0,1 M HCl a opět se měřilo v 1 cm a v 1 mm kyvetách. Všechna měření probíhala v tomto pořadí: slepý vzorek, standard, placebo, neředěné placebo a nakonec vzorek.

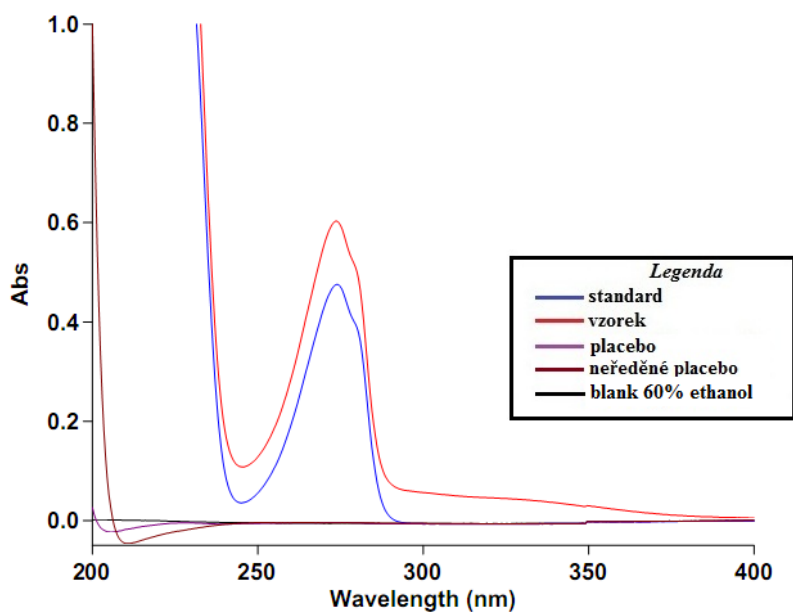
Aby byla všechna měření kompletní, muselo dojít také k proměření Novo-Passit Extract Dry. Jako médium byly použity 60% ethanol a 0,1 M HCl. Pro přehlednější výsledky byly opět kromě 1 cm kyvet užity i 1 mm kyvety a vzorky byly proměřeny v následujícím pořadí: slepý vzorek, standard, Novo-Passit Extract Dry a vzorek.

8.1.1.6 Výsledky a diskuze

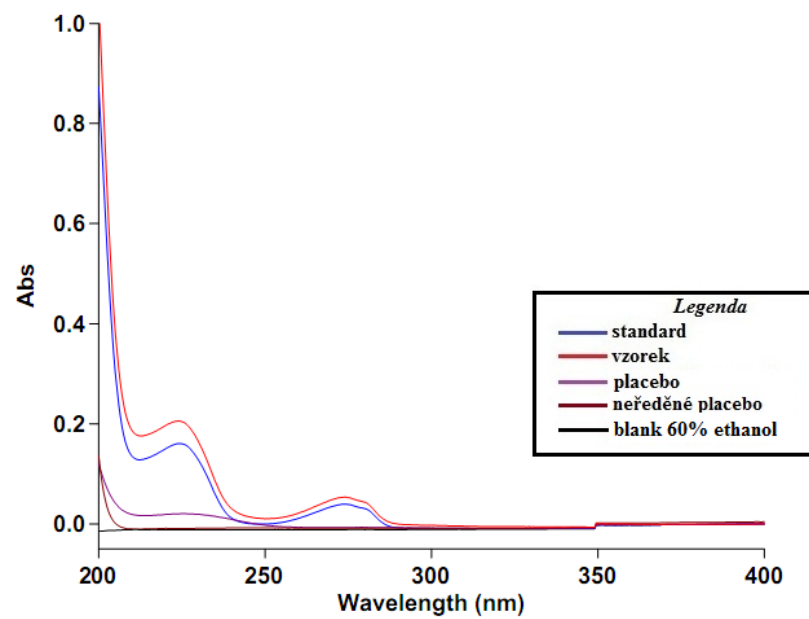
Vyhodnocující křivky, kdy se proměřil blank, standard, placebo, neředěné placebo a vzorek pro 60% ethanol u 1 cm kyvet zobrazuje Obr. 24. Příklad, kdy byly použity 1 mm kyvety, a ředící médium zůstalo stejné, zobrazuje Obr. 25. Výměnu ředícího média za 0,1 M HCl u 1 cm kyvet znázorňuje Obr. 26, pro 1 mm kyvety je to Obr. 27.

V případě, kdy se proměřil blank, standard, Novo-Passit Extract Dry a vzorek, výsledná křivka pro 60% ethanol u 1 cm a 1 mm kyvet je zobrazena v Obr. 28 a Obr. 29. Výsledná křivka pro 0,1 M HCl u 1 cm a 1 mm kyvet je znázorněna v Obr. 30 a Obr. 31.

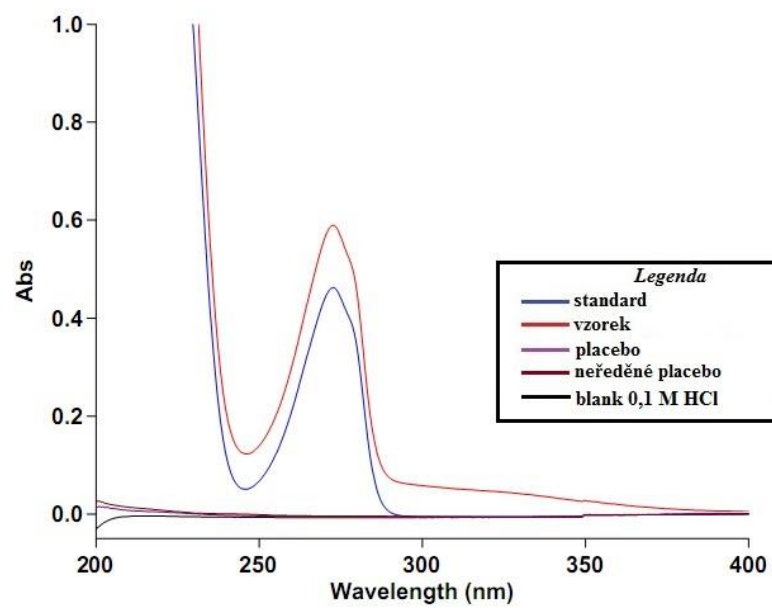
Z vyhodnocujících křivek je patrné, že optimální vlnová délka vzorku a standardu je okolo 275 nm. Hodnoty absorbancí proměřených v 1 mm a 1 cm kyvetách jsou zobrazeny v Tabulce 23 a Tabulce 24. Hodnoty absorpance při proměření standardu, vzorku a Novo-Passit Extract Dry znázorňuje Tabulka 25 a Tabulka 26.



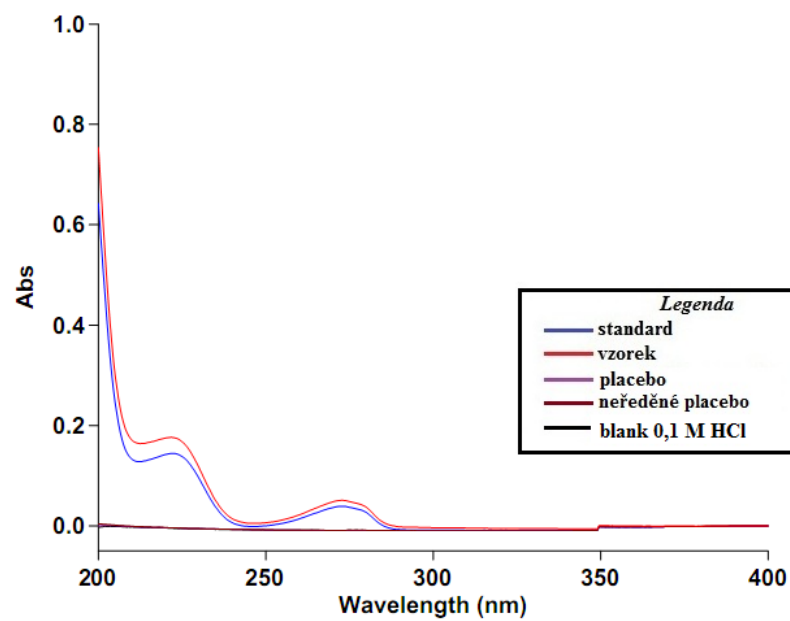
Obr. 24 Vyhodnocovací křivka u 1 cm kyvet – 60% ethanol



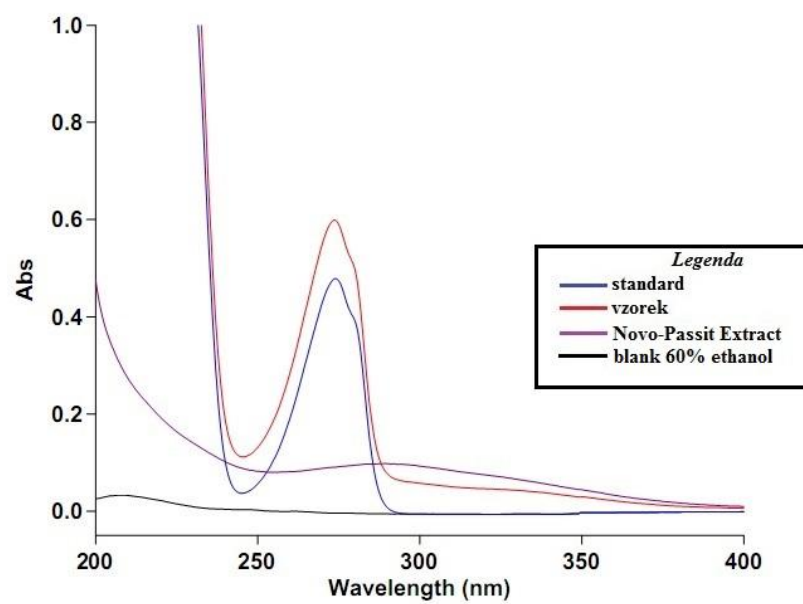
Obr. 25 Vyhodnocovací křivka u 1 mm kyvet – 60% ethanol



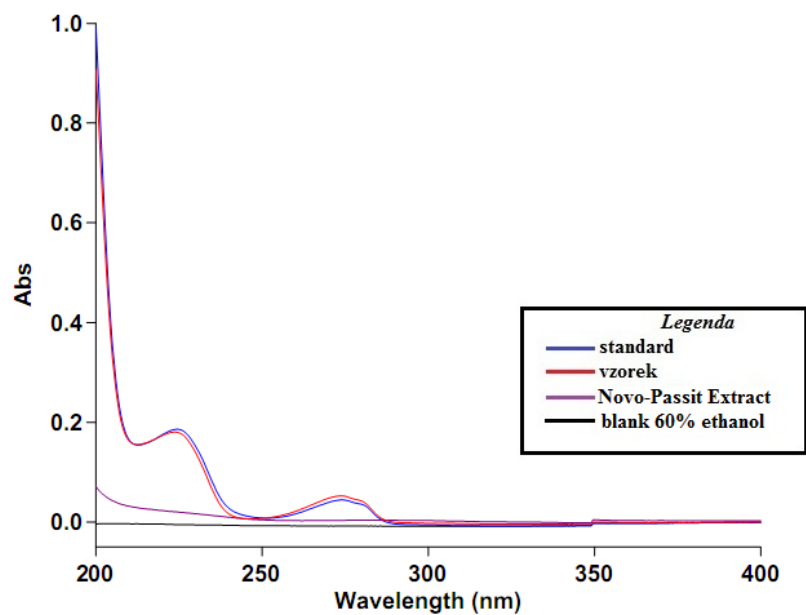
Obr. 26 Vyhodnocovací křivka u 1 cm kyvet – 0,1 M HCl



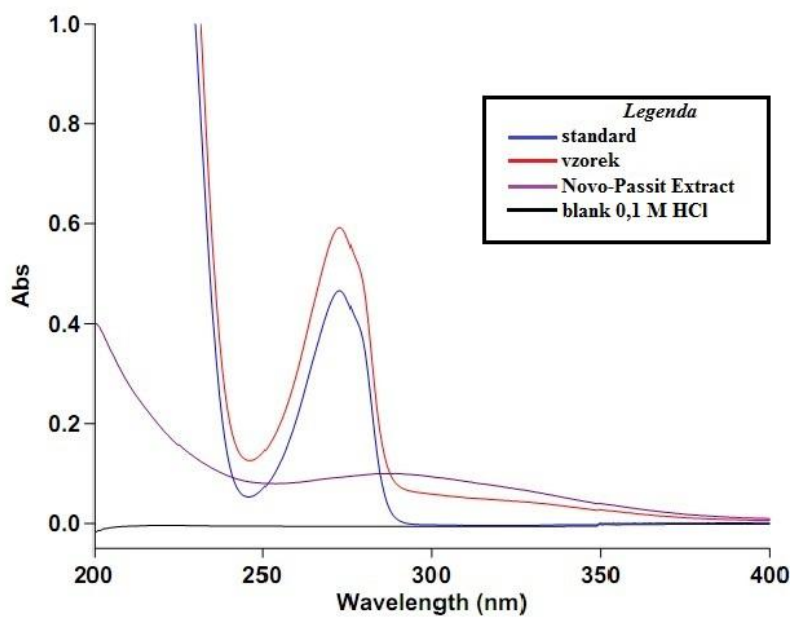
Obr. 27 Vyhodnocovací křivka u 1 mm kyvet – 0,1 M HCl



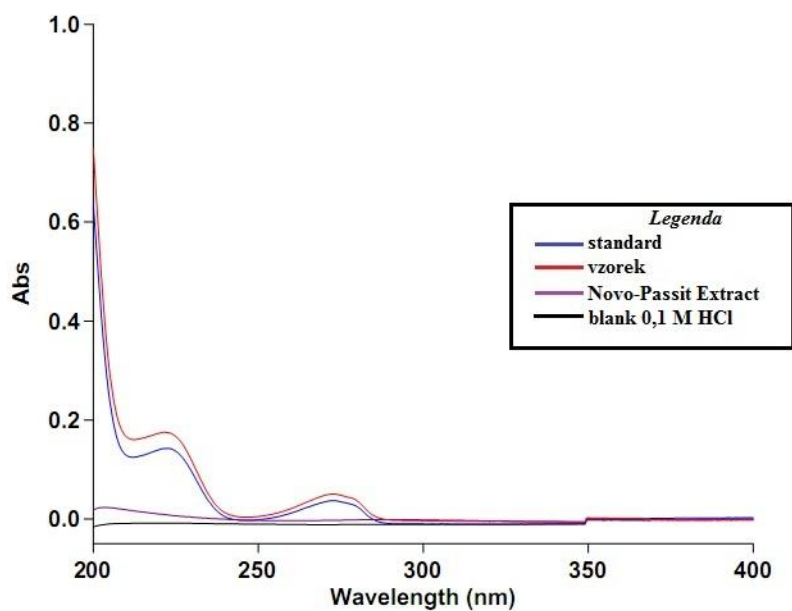
Obr. 28 Vyhodnocovací křivka u 1 cm kyvet – 60% ethanol



Obr. 29 Vyhodnocovací křivka u 1 mm kyvet – 60% ethanol



Obr. 30 Vyhodnocovací křivka u 1 cm kyvet – 0,1 M HCl



Obr. 31 Vyhodnocovací křivka u 1 mm kyvet – 0,1 M HCl

Tabulka 23 Hodnoty absorbancí standardu, vzorku a placeba při vlnové délce 275 nm v 1 cm kyvetě

	Absorbance (60% ethanol)	Absorbance (0.1 M HCl)
Blank	-0,005	-0,007
Standard	0,471	0,441
Novo-Passit vzorek	0,595	0,566
Placebo	-0,004	-0,004

Tabulka 24 Hodnoty absorbancí standardu, vzorku a placeba při vlnové délce 275 nm v 1 mm kyvetě

	Absorbance (60% ethanol)	Absorbance (0.1 M HCl)
Blank	-0,011	-0,009
Standard	0,039	0,037
Novo-Passit vzorek	0,053	0,049
Placebo	-0,007	-0,009

Tabulka 25 Hodnoty absorpance standardu, vzorku a Novo-Passit Extract Dry při vlnové délce 275 nm v 1 cm kyvetě

	Absorbance (60% ethanol)	Absorbance (0.1 M HCl)
Blank	-0,004	-0,006
Standard	0,474	0,445
Novo-Passit vzorek	0,590	0,569
Novo-Passit Extract	0,092	0,095

Tabulka 26 Hodnoty absorpance standardu, vzorku a Novo-Passit Extract Dry při vlnové délce 275 nm v 1 mm kyvetě

	Absorbance (60% ethanol)	Absorbance (0.1 M HCl)
Blank	-0,008	-0,011
Standard	0,044	0,035
Novo-Passit vzorek	0,052	0,048
Novo-Passit Extract	0,004	-0,002

Pokud porovnáme křivky z hlediska použitého ředícího média, nezaznamenáme významného rozdílu mezi 60% ethanolem a 0,1 M HCl.

Hodnoty absorpance a tvar křivky dokazují, že placebo nemá vliv na stanovení obsahu guaifenesinu. Novo-Passit Extract Dry však již stanovení ovlivňuje. Před každou analýzou by bylo nutné provádět korekci na absorpaci placeba, což by bylo časově náročné. Uvedení UV/VIS metody pro využití ve společnosti Teva Czech Industries s.r.o. je z tohoto důvodu nevhodné.

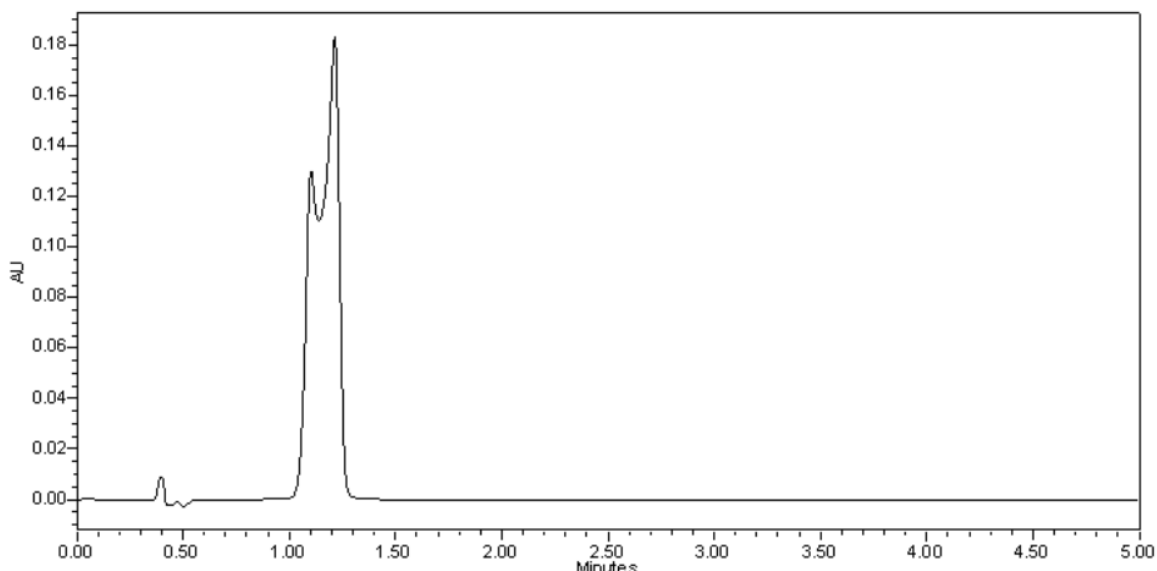
8.2 Převedení metody stanovení guaifenesinu z HPLC na UHPLC [52]

Pro vytvoření nové UHPLC metody bylo nutné změnit některé podmínky ze stávající HPLC metody (vhodná kolona, průtok a objem nástřiku vzorku). Dále bylo třeba upravit přípravu roztoků standardů a vzorků a identifikovat neznámý pík.

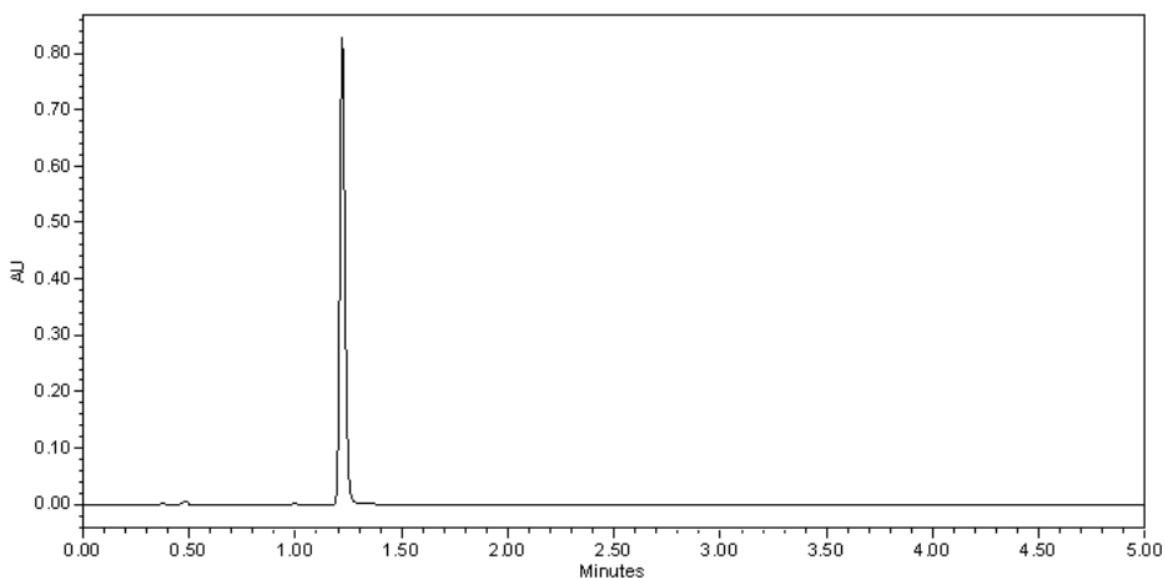
8.2.1 Příprava roztoků standardu a vzorku

Podle používané metody pro HPLC detekci probíhá příprava vzorků a standardu rozdílně, při převodu na UHPLC muselo dojít ke sjednocení médií. Jestliže byly vzorky a standard připraveny v 60% ethanolu, došlo během UHPLC testování k rozštěpení píku guaifenesinu

(Obr. 32 – 33). Proto byla navržnuta změna při přípravě vzorku a standardu, kdy byla místo 60% ethanolu použita 0,1 M HCl.



Obr. 32 Chromatogram znázorňující degradaci píku standardu v 60% ethanolu

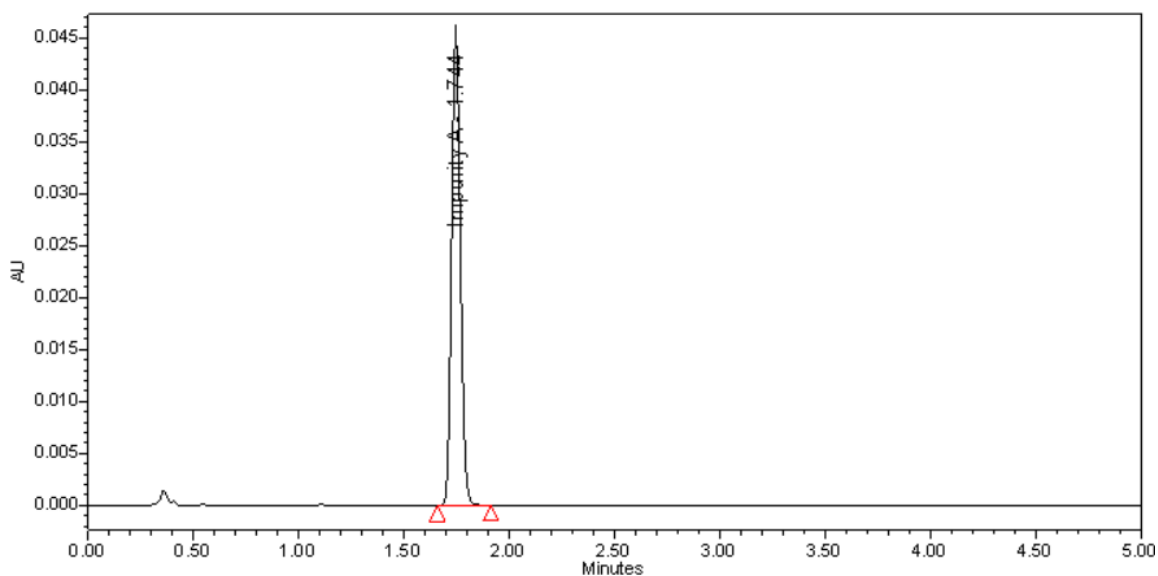


Obr. 33 Chromatogram znázorňující píku standardu v 0,1 M HCl

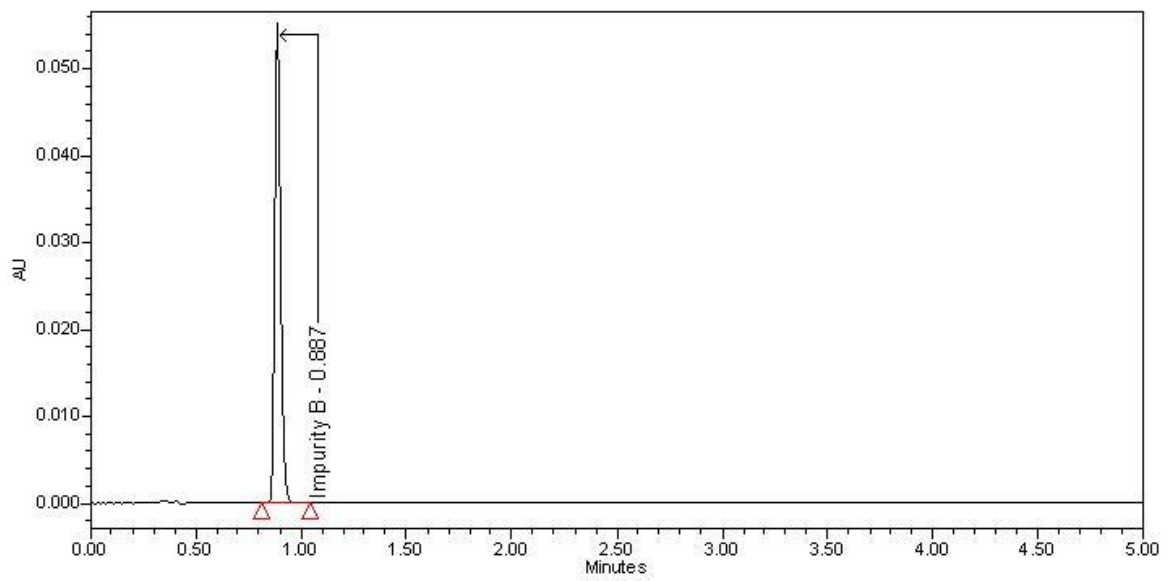
8.2.2 Identifikace neznámého píku

Při analýze standardu byl nalezen neznámý píku. K identifikaci píku byly připraveny jednotlivé vzorky lékopisně definovaných nečistot [nečistota A: Guaiacol $M_m = 124,14 \text{ g.mol}^{-1}$, nečistota B: β – isomer $M_m = 198,22 \text{ g.mol}^{-1}$, nečistota C: Bisether $M_m = 378,43 \text{ g.mol}^{-1}$, nečistota D: 1,3-bis(2-methoxyphenoxy)propan-2-ol $M_m = 304,35 \text{ g.mol}^{-1}$]

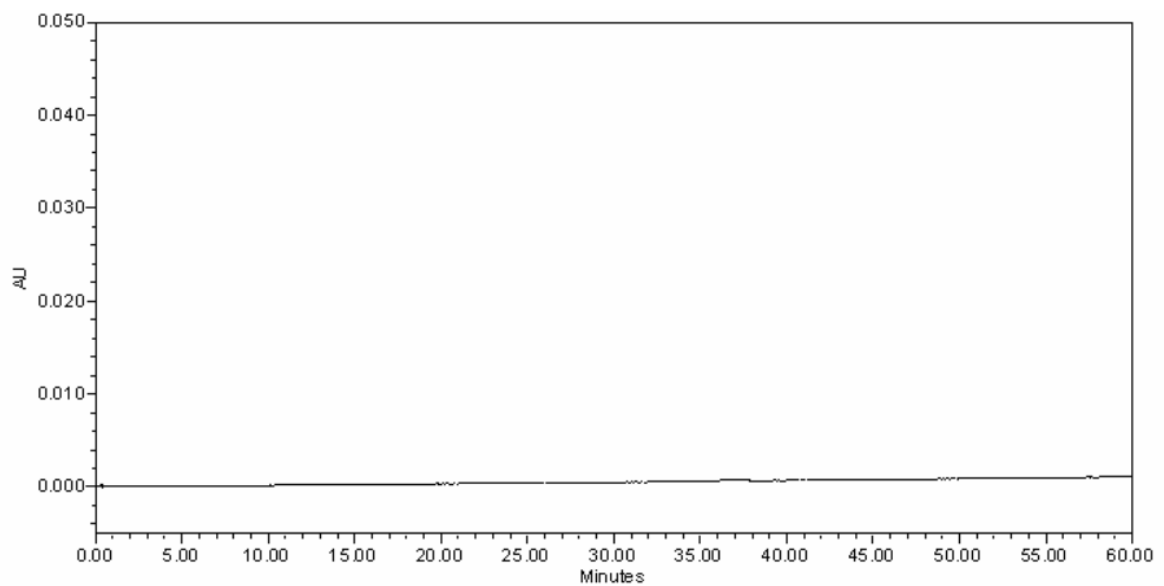
v 10% koncentraci. Jednotlivé chromatogramy nečistot jsou zobrazeny na Obr. 34 – 37. Nečistota C a nečistota D nebyly detekovány z několika možných racionálních důvodů (mohlo dojít k rozkladu nečistoty působením disolučního média, retenční čas byl delší než 60 minut, danou metodou nejsme schopni selektivitu daných nečistot stanovit). I přes výše uvedené důvody bylo ve vývoji pokračováno, neboť metoda je zaměřena výhradně na detekci a kvantitativního stanovení obsahu guaifenesinu a ne jeho známých, či neznámých nečistot. Jako neznámý pík byla identifikována nečistota B (β – isomer) (Obr. 38). Tato nečistota (respektive strukturní isomer) je definována lékopisně a vzhledem k tomu, že nekoreluje s píkem guaifenesinu, je metoda za současných podmínek dostatečně selektivní. Navíc bude selektivita mezi dvěma izomery zajištěna testem vhodnosti systému, při kterém se oba izomery použijí.



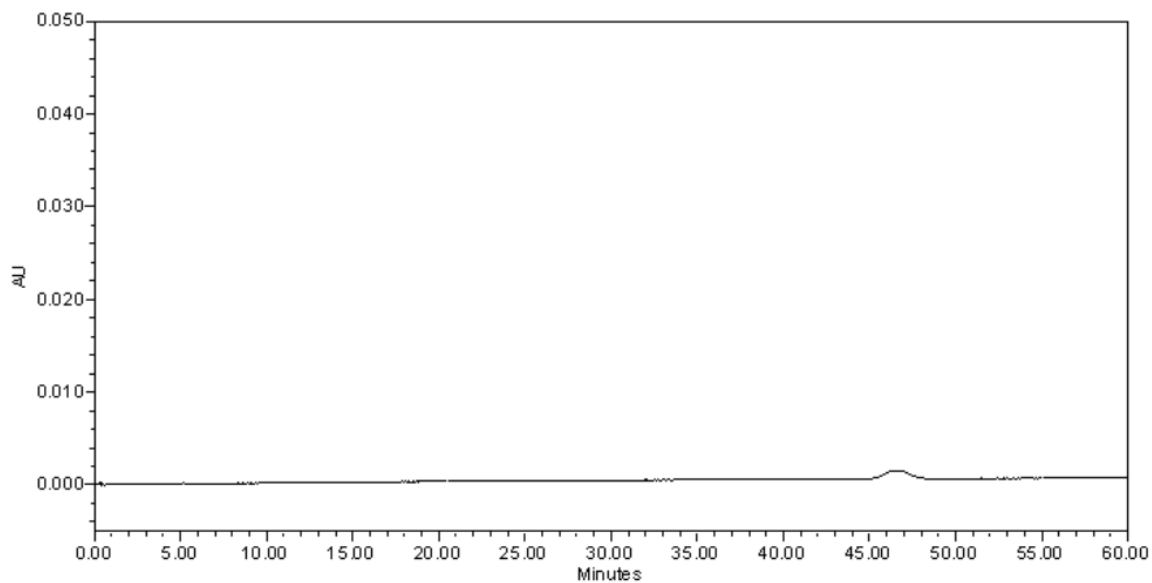
Obr. 34 Nečistota A (Guaiacol) v 10% koncentraci



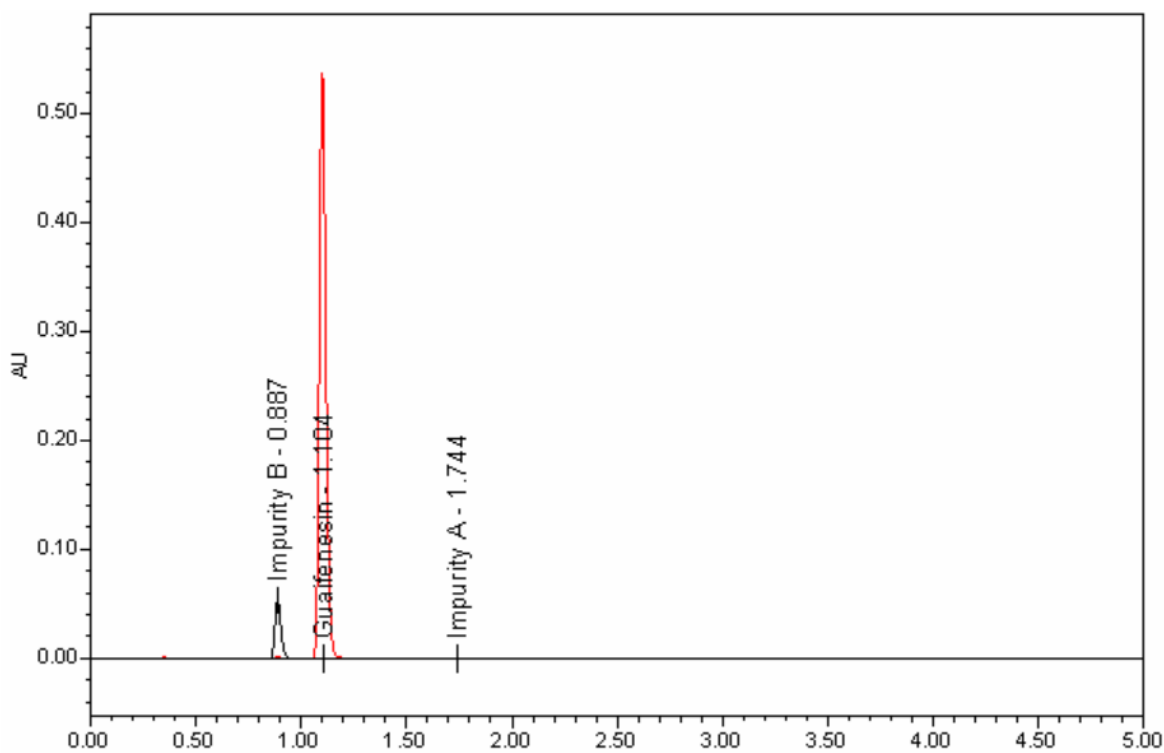
Obr. 35 Nečistota B (β – isomer) v 10% koncentraci



Obr. 36 Nečistota C (Bisether) v 10% koncentraci



Obr. 37 Nečistota D [1,3-bis(2-methoxyphenoxy)propan-2-ol] v 10% koncentraci



Obr. 38 Chromatogram zobrazující pík nečistoty B v 10% koncentraci (zelený pík) a roztoku standardu (červený pík)

8.2.3 Vývoj nové UHPL metody

8.2.3.1 Chemikálie a činidla

- čištěná voda
- kyselina chlorovodíková
- kyselina fosforečná
- ethanol
- acetonitril
- standard guaifenesin
- β - isomer

8.2.3.2 Zařízení

- disoluční zařízení (SOTAX AT70 Smart, SOTAX AT7 Smart nebo ekvivalentní)
- UHPLC systém
- zařízení pro odplynění média
- standardní laboratorní vybavení

8.2.3.3 Příprava mobilní fáze a disolučního média

Disoluční médium: Pro 1000 ml disolučního média se pipetuje 9,8 ml 32% HCl do 990,2 ml čištěné vody.

Mobilní fáze: Mobilní fáze se připraví smícháním acetonitrilu pro HPLC a čištěné vody v přesném poměru (1:4) a hodnota se poté upraví pomocí kyseliny na hodnotu pH = 2.

8.2.3.4 Příprava roztoků vzorku a standardu

8.2.3.4.1 Příprava roztoku vzorku

Do každé disoluční nádoby se odměří 900 ml disolučního média (0,1 M HCl). Je naváženo 6 tableť, které jsou spuštěny do disolučního zařízení skrz horní otvor.

- ✓ Po 45-ti minutách se provede ruční odběr a vzorek se filtruje přes 0,45 μm nylonový filtr přímo do vialek (AT 7 Smart).
- ✓ Po 45-ti minutách se roztok vzorku pumpuje přes 0,45 μm nylonový filtr přímo do vialek (AT 70 Smart).

8.2.3.4.2 Příprava standardu

Do 100 ml odměrné baňky se naváží asi přesně 22,00 mg standardu guaifenesinu a standard se rozpustí v 0,1 M HCl v ultrazvukové lázni. Poté se temperuje ve vodní lázni a baňka se doplní 0,1 M HCl po rysku. Připraví se dva roztoky standardu.

8.2.3.4.3 Příprava roztoku SST

Roztok β – isomeru: Do 100 ml odměrné baňky se kvantitativně převede asi 2,2 mg β – isomeru, který se rozpustí v 0,1 M HCl. Po temperaci ve vodní lázni se baňka doplní po rysku 0,1 M HCl.

Roztok SST: Do 10 ml odměrné baňky se kvantitativně převede asi 2,2 mg standardu guaifenesinu. Standard se rozpustí v 0,1 M HCl. Po temperaci ve vodní lázni se baňka doplní po rysku 0,1 M HCl.

8.2.4 Chromatografické podmínky

Kolona: Acquity UPLC BEH C18, 1.7 μm , 50 x 2.1 mm

Teplota kolony: 25 °C

Objem vzorku: 1 μl

Průtok: 0,4 ml/min.

Detekce (UV): 225 nm

Délka analýzy (min): 1,5x RT guaifenesin píku

Oplach jehly: 50% acetonitril

Teplota vzorku: 20 °C

Poznámka: Po analýze je doporučeno kolonu promývat po dobu 20 minut 50% acetonitrilem.

V případě porovnání chromatografických podmínek u HPLC a UHPLC metody je zřejmé, že původně byla použita jiná kolona (HPLC – Hypersil ODS, 5 μm , 250 x 4,6 mm, UHPLC – Acquity UPLC BEH C18, 1.7 μm , 50 x 2.1 mm). Došlo také ke změně průtoku (HPLC – 1,0 ml/min, UHPLC – 0,4 ml/min) a objemu vzorku (HPLC – 20 μl , UHPLC – 1 μl). Délka analýzy se u HPLC detekce pohybovala okolo 15-ti minut, zatímco u UHPLC metody se délka analýzy zkrátila na čas okolo 2 minut. Ostatní parametry zůstaly u HPLC a UHPLC technik stejné.

8.3 Validace UHPLC metody pro přípravek Novo-Passit tablety

Jelikož byl převod z HPLC na UHPLC metodu velice úspěšný a překonal všechna očekávání, rozhodla se společnost Teva Czech Industries s.r.o. pro validaci UHPLC metody u Novo-Passit tablety. Tato část práce byla provedena nad rámec rozsahu diplomové práce.

8.3.1 Validací protokol UHPLC metody [53]

Chemikálie a činidla, zařízení, příprava standardu, vzorků, roztoku β – isomeru, SST roztoku a chromatografické podmínky zůstaly stejné, jak jsou výše popisovány v kapitole 8.2.

8.3.1.1 *Materiál a přístroje*

8.3.1.1.1 Vzorek Novo-Passit tablety

K analýze bude použita jedna šarže přípravku Novo-Passit tablety, placebo, β – isomer a standard guaifenesin:

tablety Novo-Passit 200 mg, šarže: 6A0390410V, expirace: 4/2013

placebo (Silicon dioxide expirace: 11/2012 , Microcrystalline Cellulose expirace: 2/2015, Glyceryl Tribehenate expirace: 9/2015 , Magnesium Stearate expirace: 5/2014, Lactose Monohydrate – Fast Flo expirace 9/2013, Opadry AMB 80W311115 expirace: 10/2013)

β – isomer, expirace: 1/2014

standard guaifenesin (číslo standardu: 033-7, šarže: 11GF02113, expirace: 3/2013)

Novo-Passit Extractum Dry, expirace: 3/2013

8.3.1.2 Seznam chemikálií a roztoků

- čištěná voda
- kyselina chlorovodíková
- kyselina fosforečná
- ethanol
- acetonitril
- placebo
- standard guaifenesin
- β – isomer

8.3.1.3 Zařízení

- disoluční zařízení (SOTAX AT70 Smart, SOTAX AT7 Smart nebo ekvivalentní)
- HPLC systém
- zařízení pro odplynění média
- standardní laboratorní vybavení

8.3.1.4 Příprava disolučního média

Pro 1000 ml disolučního média se pipetuje 9,8 ml 32% HCl do 990,2 ml čištěné vody.

8.3.1.5 Příprava mobilní fáze

Mobilní fáze se připraví smícháním acetonitrilu pro HPLC a čištěné vody v přesném poměru (1:4) a hodnota se poté upraví pomocí kyseliny na hodnotu pH = 2.

8.3.1.6 Příprava roztoků vzorku a standardu

8.3.1.6.1 Příprava roztoku vzorku

Do každé disoluční nádoby se odměří 900 ml disolučního média (0,1 M HCl). Je naváženo 6 tableť, které se spustí do disolučního zařízení skrz horní otvor.

- ✓ Po 45-ti minutách se provede ruční odběr a vzorek se filtruje přes 0,45 μm nylonový filtr přímo do vialek (AT 7 Smart).
- ✓ Po 45-ti minutách bude roztok vzorku pumpován přes 0,45 μm nylonový filtr přímo do vialek (AT 70 Smart).

8.3.1.6.2 Příprava standardu

Do 100 ml odměrné baňky se naváží asi přesně 22,00 mg standardu guaifenesinu a standard se rozpustí v 0,1 M HCl v ultrazvukové lázni. Poté se temperuje ve vodní lázni a doplní se 0,1 M HCl po rysku. Připraví se dva roztoky standardu.

8.3.1.6.3 Příprava roztoku SST

Roztok β – isomeru: Do 100 ml odměrné baňky se kvantitativně převede asi 2,2 mg β – isomeru, který se rozpustí v 0,1 M HCl. Po temperaci ve vodní lázni se baňka doplní po rysku 0,1 M HCl.

Roztok SST: Do 10 ml odměrné baňky se kvantitativně převede asi 2,2 mg standardu guaifenesinu. Standard se rozpustí v 0,1 M HCl. Po temperaci ve vodní lázni se baňka doplní po rysku 0,1 M HCl.

8.3.2 Chromatografické podmínky

Kolona: Acquity UPLC BEH C18; 1,7 μm , 50 x 2,1 mm

Teplota kolony: 25 °C

Objem vzorku: 1 μl

Průtok: 0,4 ml/min.

Detekce (UV): 225 nm

Délka analýzy (min): 1,5x RT guaifenesin píku

Oplach jehly: 50% acetonitril

Teplota vzorku: 20 °C

Poznámka: Po analýze je doporučeno kolonu promývat po dobu 20 minut 50% acetonitrilem.

8.3.3 Validace jednotlivých charakteristik

Validace analytické metody bude probíhat podle interního dokumentu Teva Czech Industries s.r.o. SOP\PQA\025 verze 5.00 – Validace analytických metod.

8.3.3.1 *Specificita*

Bude analyzováno placebo, disoluční médium mobilní fáze a standard.

Kritéria přijatelnosti:

Pro HPLC detekci v chromatogramu nesmí být přítomny žádné píky interferující s píkem analytu, případně odezva interferujícího píku $\leq 0,5 \%$.

8.3.3.2 *Robustnost*

Provede se disoluce dvou navážených tablet s pozměněnými podmínkami při přípravě vzorku, standardu anebo detekce analytu. Bude se vždy pracovat se dvěma předem naváženými tabletami.

8.3.3.2.1 Stabilita vzorku a standardu

Provede se disoluční test, vzorky budou poté analyzovány a následně uschovány v lednici, autosampleru a při laboratorní teplotě. Další dny se budou vždy analyzovat a porovnávat s nově připravenými vzorky. Stejně se bude postupovat také se standardem.

Kritéria přijatelnosti:

Pro roztoky standardu: Vyhodnotí se opakovatelnost. Pro stabilitní a nové standardy se vypočítá relativní rozdíl (RF). Pro vyhodnocení roztoků standardů jsou použity průměrné hodnoty relativního rozdílu 1. naváženého standardu. Hodnota se vypočítá dle vzorce:

$$RF = \left| 1 - \frac{RF_N}{RF_S} \right| \cdot 100 \text{ [%]} \quad (15)$$

RF_N je hodnota relativního rozdílu nově připraveného roztoku

RF_S je hodnota relativního rozdílu stabilitně sledovaného standardního roztoku

RF $\leq 3 \%$

Pro roztoky vzorku: Obsah se vyhodnotí pro každou navážku a každý čas analýzy zvlášť. Srovná se obsah nové analýzy k obsahu původní analýzy roztoku vzorku. Hodnota relativního rozdílu se vypočítá dle vzorce:

$$RD = \frac{|\text{Průměr}_A - \text{Průměr}_B|}{\text{Průměr}_{AB}} \cdot 100 [\%] \quad (16)$$

Průměr_A je průměrná hodnota původní analýzy připraveného roztoku vzorku

Průměr_B je průměrná hodnota stabilitní analýzy připraveného roztoku vzorku

Průměr_{AB} je průměrná hodnota vypočítaná z obou hodnot (původně připravený vzorek, stabilitní vzorek)

RD ≤ 3 %

8.3.3.2.2 Disoluční parametry

Provede se disoluce dvou navážených tablet s pozměněnými podmínkami:

- ✓ Otáčky pádel ± 5 % (114 RPM, 126 RPM)
- ✓ Teplota ±2°C (35°C, 39°C)
- ✓ odplyněno/neodplyněno – odplyněné disoluční médium

Kritéria přijatelnosti:

Relativní rozdíl mezi průměrnými hodnotami dvou výsledků se spočítá podle vzorce:

$$\text{Průměr}_{A,B,AB} = \bar{x} = \frac{1}{n} \cdot \sum x_i \quad RD = \frac{|\text{Průměr}_A - \text{Průměr}_B|}{\text{Průměr}_{AB}} \cdot 100 [\%] \quad (17)$$

Průměr_A je průměrná hodnota vypočítaná z % rozpuštěné látky z prvního setu (normální podmínky).

Průměr_B je průměrná hodnota vypočítaná z % rozpuštěné látky v druhém setu.

Průměr_{AB} je průměrná hodnota z obou výsledných setů.

Rozdíl mezi soubory je vyhovující, pokud je **RD ≤ 3 %**.

8.3.3.2.3 HPLC parametry

Provede se detekce šarže za pozměněných podmínek:

- ✓ vlnová délka ± 3 nm
- ✓ Složení mobilní fáze ± 10 % organického složení
- ✓ teplota kolony $\pm 5^\circ\text{C}$
- ✓ průtok $\pm 10\%$

Kritéria přijatelnosti:

Test způsobilosti systému **musí vyhovovat požadavkům metody.**

8.3.3.2.4 Filtrační studie

U dvou navážených tablet se provede disoluční test. Nejprve budou odebrány vzorky, které se centrifugují a poté budou odebrány vzorky, jež se filtrují v daném rozmezí (alespoň ve třech frakcích).

Kritéria přijatelnosti:

Hodnota, která se získá z centrifugovaného vzorku, je považována za referenci. Obsah ve filtrovaném vzorku se vyjadřuje jako procento z obsahu nalezeného v centrifugovaných frakcích.

$$\text{Průměr}_{A,B,AB} = \bar{x} = \frac{1}{n} \cdot \sum x_i \quad RD = \frac{|\text{Průměr}_A - \text{Průměr}_B|}{\text{Průměr}_{AB}} \cdot 100 [\%] \quad (18)$$

Průměr_A je průměrná hodnota vypočítaná z centrifugovaného roztoku vzorku

Průměr_B je průměrná hodnota vypočítaná z filtrovaného roztoku vzorku

Průměr_{AB} je průměrná hodnota z obou roztoků vzorku

Rozdíl mezi soubory je vyhovující, pokud je **RD $\leq 3,0$ %**.

8.3.3.3 *Správnost*

Připraví se tři roztoky standardu s množstvím placeba, které bude odpovídat dané jednotce. Standardy se připraví na třech koncentračních úrovních (50%, 100% a 120%) a jsou připraveny vždy 3 navážky.

Kritéria přijatelnosti:

Průměrná hodnota výtěžnosti se musí pohybovat v rozmezí **95 – 105 %**.

8.3.3.4 Linearita

Provedou se dvě přípravy roztoku standardu s přidavkem placebo odpovídajícím jedné jednotce. Standardy se připraví na pěti koncentračních úrovních od 50 % do 120 %. Připraví se vždy 2 navážky.

Kritéria přijatelnosti:

Kritérium přijatelnosti u linearity je $R^2 \geq 0,99$.

Analýzou dat (ANOVA), popřípadě výpočtem uvedeným níže zjišťujeme, zda regresní přímka prochází počátkem. Pokud kritéria přijatelnosti nejsou splněna, je možné použít k analýze vhodnou kalibrační křivku.

$$\frac{\text{úsek na ose y}}{\text{odezva 100 \% koncentrace látky}} \cdot 100 \leq 5.0\% \quad (19)$$

8.3.3.5 Rozsah

Rozsah se prokazuje v rozmezí 50 – 120% (z linearity, správnosti a přesnosti).

8.3.3.6 Přesnost**8.3.3.6.1 Opakovatelnost**

Provede se disoluce běžné šarže přípravku v šesti disolučních nádobách. Tablety se před začátkem analýzy zváží.

Akceptační kritéria:

RSD \leq 8,0 %.

8.3.3.6.2 Přesnost systému

Provede se šest analýz vzorku v jedné disoluční nádobě. Tablety se před začátkem analýzy zváží.

Akceptační kritéria:

RSD ≤ 8,0 %.

8.3.3.6.3 Intermediální přesnost

Provede se disoluce šesti tablet jedné šarže, avšak jiným laborantem, v jiný den a na jiném přístroji. Tablety se před začátkem analýzy zváží.

Akceptační kritéria:

$$RD = \frac{|\text{Průměr}_A - \text{Průměr}_B|}{\text{Průměr}_{AB}} \cdot 100 \text{ [%]} \quad (20)$$

Průměr_A je průměrná hodnota vypočítaná z původních výsledků.

Průměr_B je průměrná hodnota vypočítaná z nových výsledků (jiný laborant, den, přístroj).

Průměr_{AB} je průměrná hodnota z obou analýz.

Jestliže **RD ≤ 8,0 % z 12 – ti výsledků** (2 disoluce), pak lze považovat rozdíl mezi soubory za vyhovující.

8.3.3.6.4 Srovnání manuální a automatické disoluce

Srovnají se výsledné hodnoty šesti vzorků z manuální a automatické disoluční jednotky.

Akceptační kritéria:

$$RD = \frac{|\text{Průměr}_A - \text{Průměr}_B|}{\text{Průměr}_{AB}} \cdot 100 \text{ [%]} \quad (21)$$

Průměr_A je průměrná hodnota vypočítaná z výsledků manuální disoluční jednotky.

Průměr_B je průměrná hodnota vypočítaná z automatické disoluční jednotky.

Průměr_{AB} je průměrná hodnota z obou disolučních jednotek.

Jestliže $RD \leq 8,0 \%$ z 12 – ti výsledků (2 disoluce), pak lze považovat rozdíl mezi soubory za vyhovující.

ZÁVĚR

Cílem diplomové práce bylo provedení validace stávající analytické metody u přípravku Novo-Passit tablety. Dále byl proveden vývoj a převod stanovení obsahu guaifenesinu z HPLC metody na UV/VIS a UHPLC.

Průběh validace a všech vývojových procesů byl dokumentačně zachycen vydáním protokolů (validační protokol pro validaci analytické metody u přípravku Novo-passit tablety a validační protokol UHPLC metody), zpráv (validační zpráva pro validaci analytické metody přípravku Novo-Passit tablety) a reportů (report pro stanovení obsahu guaifenesinu v přípravku Novo-Passit tablety spektrofotometricky a report pro stanovení obsahu guaifenesinu v přípravku Novo-Passit tablety UHPLC metodou).

Během validace byly testovány následující parametry: specificita; robustnost (stabilita roztoku vzorku a standardu; filtrační studie; robustnost HPLC parametrů – složení mobilní fáze, teplota kolony, detekce, průtok; robustnost disolučních parametrů – změna otáček a teplot, odplynění/neodplynění disolučního média); správnost; linearita a rozsah; přesnost (intermediální přesnost; systémová přesnost; srovnání mezi automatickou a manuální disolucí). Na základě výsledků lze konstatovat, že všechny parametry splňují akceptační kritéria společnosti Teva Czech Industries s.r.o a metodu je možné považovat za validní.

Současně registrovaná metoda definuje přípravu roztoků standardu a vzorku v různém druhu média. Tento způsob představuje v současné době nestandardní postup, a proto došlo při převodu z HPLC metody na UV/VIS detekci k použití efektivnějšího způsobu, tedy příprava roztoku vzorku a standardu ve stejném médiu.

Při spektrofotometrickém měření byly použity jak 1 cm kyvety, tak také 1 mm kyvety, aby byla vidět celá křivka. Po proměření vzorků tablet Novo-Passit, standardu guaifenesinu, placebo a Novo-Passit Extract Dry je z výsledků patrné, že vhodná vlnová délka pro detekci je okolo 275 nm. Novo-Passit Extract Dry negativně ovlivnil průběh měření. Mohlo to být způsobeno vysokým obsahem cukrů, které se absorbují v širokém spektru vlnových délek. V tomto důsledku je využití spektrofotometrického stanovení obsahu guaifenesinu v Novo-Passit tabletách pro společnost Teva Czech Industries s.r.o. nevhodné, respektive by bylo nutné u každé analýzy provádět korekci na placebo.

V případě převodu z HPLC na UHPLC metody byla sjednocena příprava vzorků a standardu (0,1 M HCl). Byla použita nová kolona (HPLC – Hypersil ODS, 5 μ m, 250 x

4,6 mm, UHPLC – Acquity UPLC BEH C18, 1.7 μm , 50 x 2.1 mm), průtok (HPLC – 1,0 ml/min, UHPLC – 0,4 ml/min) a objem vzorku (HPLC – 20 μl , UHPLC – 1 μl). Délka analýzy se zkrátila z původních 15-ti minut na 2 minuty.

Cíle diplomové práce byly splněny. Pro velmi příznivé výsledky v oblasti vývoje UHPLC metody bylo vedením QC Pharma Teva Czech Industries s.r.o. rozhodnuto, že bude současná metoda přeregistrována a po nezbytné validaci a provedení srovnávací studie mezi současně registrovanou a nově vyvinutou metodou nahrazena metodou nově vyvinutou. Nad rámec diplomové práce byl navíc vytvořen validační protokol nové UHPLC metody.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] Přípravek Novo-Passit <<http://www.teva.cz/verejnost/produkty/stres-uzkost/vyroby/novo-passit-94-45.htm>> [online]. [2013-02-28].
- [2] STEVEN BRATMAN. *Zbavte se deprese s pomocí třezalky*. Praha: Pragma, 2008, 188 s. ISBN 978-80-7205-105-2.
- [3] HELEN FARMER-KNOWLESOVÁ. *Léčivé rostliny od A do Z*. první vydání. Praha: Metafora spol. s r.o., 2011, 400 s. ISBN 978-80-7459-270-7.
- [4] *Léčivé rostliny*. Překlad Jana Jindrová. Praha: Ottovo nakladatelství, 2010, 496 s. Ottův průvodce přírodou. ISBN 978-80-7360-588-9.
- [5] MANFRED SCHRAMM. *Léčení chmelem*. první vydání. Praha: Nakladatelství PLOT, 2011, 93 s. ISBN 978-80-7428-080-1.
- [6] CHEN, Xiaoyan, Jia HUANG, Zhang KONG a Dafang ZHONG. Sensitive liquid chromatography–tandem mass spectrometry method for the simultaneous determination of paracetamol and guaifenesin in human plasma. *Journal of Chromatography B* [online]. 2005-03-25, vol. 817, issue 2, s. 263-269 [cit. 2013-05-01]. DOI: 10.1016/j.jchromb.2004.12.011.
Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1570023204010074>
- [7] CIKRT, Tomáš. *Příběhy léků: příručka pro zvědavé čtenáře o vzniku, vlastnostech a používání léků*. 1. vyd. Praha: Státní ústav pro kontrolu léčiv, 2012, 169, [23] s. ISBN 978-80-260-1403-4.
- [8] AZARMI, Shirzad, Wilson ROA a Raimar LÖBENBERG. Current perspectives in dissolution testing of conventional and novel dosage forms. *International Journal of Pharmaceutics* [online]. 2007-01-02, roč. 328, č. 1, s. 12-21 [cit. 2013-02-27]. ISSN 03785173. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2006.10.001. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0378517306008313>
- [9] DRESSMAN, J a Johannes KRÄMER. *Pharmaceutical dissolution testing*. Boca Raton: Taylor, 2005, 429 s. ISBN 08-247-5467-0.
- [10] Resorpce látek v trávicím traktu <<http://www.dr-kohoutova.cz/inpage/colon-hydroterapie-vice-informaci/>> [online]. [2013-02-27].

- [11] YANG, Libo, Josep ESTEVE-ROMERO a Samuel CARDA-BROCH. Biorelevant dissolution testing of colon-specific delivery systems activated by colonic microflora. *Journal of Controlled Release* [online]. 2008, roč. 125, č. 2, s. 77-86 [cit. 2013-03-09]. ISSN 01683659. DOI: 10.1016/j.jconrel.2007.10.026. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168365907006219>
- [12] *Český lékopis 2009* – kapitola 2.9.3. 1. vyd. Praha: Grada Publishing, 2009, 1176 s. ISBN 978-802-4729-947.
- [13] Doc. Ing. Petr Zámostný, Ph.D.: Zkouška disoluce pevných lékových forem
- [14] RABIŠKOVÁ, Miloslava a FRIČOVÁ Vítězslava. Perorální formy s řízeným uvolňováním léčiv. [online]. [cit. 2013-03-24]. Dostupné z: <http://www.praktickelekarenstvi.cz/pdfs/lek/2008/04/09.pdf>
- [15] GRUNDY, John S, Keith E ANDERSON, James A ROGERS, Robert T FOSTER a Ph. HUBERT. Studies on dissolution testing of the nifedipine gastrointestinal therapeutic system. I. Description of a two-phase in vitro dissolution test: Acceptance limits and decision methodologies. *Journal of Controlled Release* [online]. 2008, roč. 125, č. 2, s. 77-86 [cit. 2013-03-09]. ISSN 01683659. DOI: 10.1016/S0168-3659(97)00064-3. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168365997000643>
- [16] Interní dokument Teva Czech Industries s.r.o. NO/PCQ/093/V6 – Disoluční zařízení SOTAX AT 7 Smart (Návod na obsluhu)
- [17] Disoluční testování <<http://www.drug-dissolution-testing.com/?p=1852>> [online]. [2013-01-28].
- [18] Disoluční automat SOTAX AT 70 Smart <<http://www.sotax.com/USP-1-2-Fully-automated.103.0.html>> [online]. [2013-01-31].
- [19] Interní dokument Teva Czech Industries s.r.o. SOP/PQC\064\V2 – Provádění disolučních testů (Pracovní instrukce)
- [20] Interní dokument Teva Czech Industries s.r.o. NO/PQC\131\V1 – SOTAX MPS (Návod na obsluhu)
- [21] Interní dokument Teva Czech Industries s.r.o. SOP/PQA/056/V10 - Kvalifikace a údržba laboratorních přístrojů a zařízení (Pracovní instrukce)

- [22] KLOUDA, Pavel. *Moderní analytické metody*. 2., upr. a dopl. vyd. Ostrava: Pavel Klouda, 2003, 132 s. ISBN 80-863-6907-2.
- [23] MILATA, Viktor. *Spektrálne metody v chémii*. 1. vyd. Bratislava: STU, 2004, 327 s. ISBN 80-227-2049-6.
- [24] Spektrofotometrie ve viditelné oblasti spektra <http://www.vscht.cz/anl/lach1/5_Foto.pdf> [online]. [2013-03-03].
- [25] Lambert-Beerův zákon <<http://projektalfa.ic.cz/LB.htm>> [online]. [2013-02-24].
- [26] UV/VIS spektrofotometr <<http://cnx.org/content/m34601/latest/?collection=col110699/latest>> [online]. [2013-03-03].
- [27] Základní části spektrálních přístrojů <<http://ach.upol.cz/user-files/intranet/02-im-instrument-1347905911.pdf>> [online]. [2013-02-08].
- [28] Analytické metody <http://www.lf3.cuni.cz/opencms/export/sites/www.lf3.cuni.cz/cs/pracoviste/chemie/vyuka/studijni-materialy/CPHCH1/pro-kruhy/VZ-S4-Analyticke_metody_a_praktika.pdf> [online]. [2013-02-08].
- [29] Spektrofotometr Varian Cary 100 <http://web.nmsu.edu/~kburke/Instrumentation/Cary100_spec.html> [online]. [2013-03-28].
- [30] GRAFNETTEROVÁ, Jarmila a Josef KLÍMA. *Využití kapalinové a plynové chromatografie v klinické farmakologii*. Praha: Avicenum, 1987, 255 s.
- [31] Vysokoúčinná kapalinová chromatografie, přednáška p. Josef Cvačka <<http://web.natur.cuni.cz/~analchem/bosakova/hplc1.pdf>> [online]. [2013-03-06].
- [32] Iowa State University. protein.iastate.edu. [online] [2013-03-06]. Dostupné z <<http://www.protein.iastate.edu/hplc.html>>
- [33] MOTYKA, Kamil a Jan HLAVÁČ. *Stručný přehled separačních metod*. 1. vyd. Olomouc: Univerzita Palackého v Olomouci, 2009, 45 s. ISBN 978-80-244-2304-3.
- [34] ŠTULÍK, K., a kol. *Analytické Separací metody*. 1. vyd. Praha: Karolinum, 2004. 264s. ISBN 80-246-0852-9.
- [35] Kolektiv autorů. *Kapalinová chromatografie*. Pardubice: ČVTS, 1979. 272 s.

- [36] Kapalinový chromatograf Agilent <<http://www.gelctoronto.com/agilent1100.htm>> [online] [2013-03-28].
- [37] Kapalinový chromatograf Waters <<http://www.analyticaldirect.com/instruments/reconditioned-instruments/22-waters-acquity-uplc-system-with-pda>> [online] [2013-03-28].
- [38] Kolektiv autorů. *Analýza organických látek*. Český Těšín: THETA, 2005. 502 s. ISBN 80-86380-29-7
- [39] Gradientová eluce <<http://www.hplc.cz/Teorie/gradient.html>> [online] [2013-03-08].
- [40] CHURÁČEK, J., a kol. *Analytická separace látek*. 1. vyd. Praha: SNTL, 1990. 384 s.
- [41] KARDOŠ, Emil a Dušan BEREK. *Základy kvapalinové chromatografie*. 1. vyd. Bratislava: Alfa, 1979. 285 s.
- [42] CHURÁČEK, Jaroslav. *Úvod do vysokoúčinné kapalinové kolonové chromatografie*. Praha: Státní nakladatelství technické literatury, 1984, 188 s.
- [43] Pokyny pro správnou výrobní praxi při výrobě léčivých látek [online]. [2013-03-08]. Dostupný z www: <<http://www.sukl.cz/leciva/vyr-26-verze-2>>
- [44] RAMBLA-ALEGRE, Maria, Josep ESTEVE-ROMERO a Samuel CARDA-BROCH. Is it really necessary to validate an analytical method or not? That is the question. *Journal of Chromatography A* [online]. 2012, roč. 1232, s. 101-109 [cit. 2013-03-09]. ISSN 00219673. DOI: 10.1016/j.chroma.2011.10.050. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021967311015743>
- [45] ROZET, E., E. ZIEMONS, R.D. MARINI, B. BOULANGER a Ph. HUBERT. Validation of analytical methods involved in dissolution assays: Acceptance limits and decision methodologies. *Journal of Controlled Release* [online]. 2008, roč. 125, č. 2, s. 77-86 [cit. 2013-03-09]. ISSN 01683659. DOI: 10.1016/j.aca.2012.09.017. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S000326701201344X>
- [46] TAVERNIERS, Isabel, Marc DE LOOSE a Erik VAN BOCKSTAELE. Trends in quality in the analytical laboratory. II. Analytical method validation and quality assurance. [online]. [cit. 2013-03-09]. DOI: 10.1016/j.trac.2004.04.001. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0165993604030031>

- [47] Interní dokument Teva Czech Industries s.r.o. SOP/PQA/025/V6 – Validace analytických metod (Pracovní instrukce)
- [48] Interní dokument Teva Czech Industries s.r.o. PI/PQC/069/V1 – Validace disolučních metod (Pracovní instrukce)
- [49] Interní dokument Teva Czech Industries s.r.o. - Validační protokol pro Novo-Passit 200 mg tablet QDP0050029 (Pracovní instrukce)
- [50] Interní dokument Teva Czech Industries s.r.o. - Validační zpráva pro Novo-Passit 200 mg tablet QDP0055972 (Pracovní instrukce)
- [51] Interní dokument Teva Czech Industries s.r.o. – Research Report stanovení obsahu guaifenesinu v přípravku Novo-Passit tablety spektrofotometricky QDP0057894 (Pracovní instrukce)
- [52] Interní dokument Teva Czech Industries s.r.o. – Research Report stanovení obsahu guaifenesinu v přípravku Novo-Passit tablety UHPLC QDP0057892 (Pracovní instrukce)
- [53] Interní dokument Teva Czech Industries s.r.o. – Validační protokol pro stanovení obsahu guaifenesinu v přípravku Novo-Passit tablety UHPLC QDP0056753 (Pracovní instrukce)

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

EP	European Pharmacopoeia.
ICH	International Conference on Harmonisation.
UV/VIS	Ultraviolet/Visible.
UHPLC	Ultra-High Performance Liquid Chromatography.
API	Active Pharmaceutical Ingredient.
R&D	Research and Development.
QC	Quality Control.
GMP	Good Manufacturing Practice.
RPM	Rotation per Minute.
AIQ	Analytical Instrument Qualification.
UV	Ultraviolet.
VIS	Visible.
IC	Ion Chromatography.
HPLC	High Performance Liquid Chromatography.
AM	Analytical Method.
RD	Relative Difference.
RSD	Relative Standard Deviation.
SST	System Suitability Test.
AM	Analytical Method.
RF	Response Factor.

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obr. 1 Novo-Passit (a – tablety, b – kapky).....	16
Obr. 2 Molekulární struktura guaifenesinu.....	20
Obr. 3 Výroba guaifenesinu.....	21
Obr. 4 Schéma výroby Novo-Passit Extract Dry.....	22
Obr. 5 SOTAX AT 7 Smart – pádelková metoda (a – celkový pohled, b – detailní pohled).....	26
Obr. 6 Rozměry pádla disoluční jednotky.....	27
Obr. 7 SOTAX AT 7 Smart – košíčková metoda (a – celkový pohled, b – detailní pohled).....	28
Obr. 8 Rozměry košíčku disoluční jednotky.....	29
Obr. 9 SOTAX AT 7 Smart (a - ON-LINE, b - OFF-LINE).....	30
Obr. 10 SOTAX AT 70 Smart.....	31
Obr. 11 Schéma AIQ.....	34
Obr. 12 Instrumentace spektrofotometru.....	38
Obr. 13 Spektrofotometr - a) jednopaprskový, b) dvouprskové.....	39
Obr. 14 Varian Cary 100.....	40
Obr. 15 Van Deemterova rovnice graficky.....	42
Obr. 16 Schéma kapalinového chromatografu.....	43
Obr. 17 Kapalinový chromatograf (a – Agilent, b – Waters).....	44
Obr. 18 Chromatogram placebo.....	68
Obr. 19 Chromatogram mobilní fáze.....	69
Obr. 20 Chromatogram disolučního média.....	69
Obr. 21 Chromatogram roztoku standardu.....	70
Obr. 22 Chromatogram roztoku vzorku.....	70
Obr. 23 Chromatogram Novo-Passit Extract Dry.....	71
Obr. 24 Vyhodnocovací křivka u 1 cm kyvet – 60% ethanol.....	85
Obr. 25 Vyhodnocovací křivka u 1 mm kyvet – 60% ethanol.....	86
Obr. 26 Vyhodnocovací křivka u 1 cm kyvet – 0,1 M HCl.....	86
Obr. 27 Vyhodnocovací křivka u 1 mm kyvet – 0,1 M HCl.....	87
Obr. 28 Vyhodnocovací křivka u 1 cm kyvet – 60% ethanol.....	87
Obr. 29 Vyhodnocovací křivka u 1 mm kyvet – 60% ethanol.....	88

Obr. 30 Vyhodnocovací křivka u 1 cm kyvet – 0,1 M HCl	88
Obr. 31 Vyhodnocovací křivka u 1 mm kyvet – 0,1 M HCl.....	89
Obr. 32 Chromatogram znázorňující degradaci píku standardu v 60% ethanolu	91
Obr. 33 Chromatogram znázorňující pík standardu v 0,1 M HCl	91
Obr. 34 Nečistota A (Guaiacol) v 10% koncentraci	92
Obr. 35 Nečistota B (β – isomer) v 10% koncentraci	93
Obr. 36 Nečistota C (Bisether) v 10% koncentraci.....	93
Obr. 37 Nečistota D [1,3-bis(2-methoxyphenoxy)propan-2-ol] v 10% koncentraci	94
Obr. 38 Chromatogram zobrazující pík nečistoty B v 10% koncentraci (zelený pík) a roztoku standardu (červený pík)	94

SEZNAM TABULEK

Tabulka 1 Povolené rozdíly u otáček.....	32
Tabulka 2 Nejčastěji používaná disoluční média.....	32
Tabulka 3 Validační charakteristiky v závislosti na kategorii analytické metody	49
Tabulka 4 Kritéria přijatelnosti u jednotlivých charakteristik	65
Tabulka 5 Shrnující tabulka z validační zprávy.....	67
Tabulka 6 Výsledky stabilitní studie tablet Novo-Passit na SOTAX AT 7 SMART	73
Tabulka 7 Výsledky stabilitní studie tablet Novo-Passit na SOTAX AT 70 SMART	73
Tabulka 8 Výsledky stabilitní studie pracovního roztoku standardu	74
Tabulka 9 Výsledky stabilitní studie zásobního roztoku standardu.....	74
Tabulka 10 Výsledky studie disolučních parametrů Novo-Passit 200 mg tablety na SOTAX AT 7 Smart.....	75
Tabulka 11 Výsledky studie disolučních parametrů Novo-Passit 200 mg tablety na SOTAX AT 70 Smart.....	75
Tabulka 12 Výsledky studie HPLC parametrů pro Novo-Passit 200mg tablety.....	76
Tabulka 13 Výsledky filtrační studie tablet Novo-Passit.....	76
Tabulka 14 Výsledky správnosti pro tablety Novo-Passit tablet	77
Tabulka 15 Výsledky linearity u studie Novo-Passit tablet	77
Tabulka 16 Opakovatelnost AT 7 Smart	78
Tabulka 17 Opakovatelnost AT 70 Smart	79
Tabulka 18 Systémová přesnost AT 7 Smart.....	79
Tabulka 19 Systémová přesnost AT 70 Smart.....	79
Tabulka 20 Intermediální přesnost AT 7 Smart.....	80
Tabulka 21 Intermediální přesnost AT 70 Smart.....	80
Tabulka 22 Srovnání výsledků AT 7 Smart a AT 70 Smart	81
Tabulka 23 Hodnoty absorbancí standardu, vzorku a placebo při vlnové délce 275 nm v 1 cm kyvetě.....	89
Tabulka 24 Hodnoty absorbancí standardu, vzorku a placebo při vlnové délce 275 nm v 1 mm kyvetě	89
Tabulka 25 Hodnoty absorbancí standardu, vzorku a Novo-Passit Extract Dry při vlnové délce 275 nm v 1 cm kyvetě	90

Tabulka 26 Hodnoty absorbanční standardu, vzorku a Novo-Passit Extract Dry při vlnové délce 275 nm v 1 mm kyvetě.....	90
--	----

SEZNAM PŘÍLOH

P I GUAIFENESIN A JEHO VÝROBA	119
P II SLOŽENÍ PRODUKTU NOVO-PASSIT	126

PŘÍLOHY

PI GUAIFENESIN A JEHO VÝROBA

SYNTHOKEM LABS PRIVATE LIMITED

1.1 NOMENCLATURE :

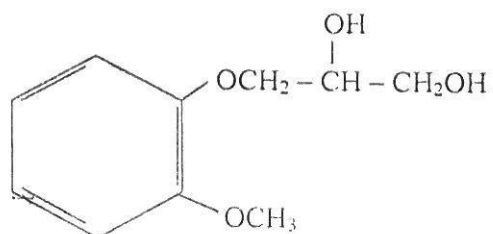
1.1.1 PHYSICAL PROPERTIES AND CHEMICAL CHARACTERISTICS :

1. General Name : Guaifenesin
2. Chemical Name : 3-(2-Methoxy Phenoxy)-1,2-propanediol
3. CAS Number : [93-14-1]
4. Appearance : White or almost white crystalline powder.

SYNTHOKEM LABS PRIVATE LIMITED

1.1.2 GENERAL INFORMATION :

1. MOLECULAR STRUCTURE :



3-(2-methoxyphenoxy)-1,2-Propanediol

2. MOLECULAR FORMULA : C₁₀H₁₄O₄

3. MOLECULAR WEIGHT : 198.22

4. HANDLING PRECAUTIONS :

Wear gloves, goggles and dust mask. In the event of contact with skin, flush with water. For eyes, give prolonged wash with water. For spillage, brush up or vacuum up with vacuum equipment.

5. STORAGE :

Store in tightly sealed polyethylene bags in fiberboard drums or plastic containers, in cool a dry area.

SYNTHOKEM LABS PRIVATE LIMITED

1.1.3 MATERIAL SAFETY DATA :

1. Product Name : GUAIFENESIN

Formula : $C_{10}H_{14}O_4$

2. Ingredient Name : 1,2-Propanediol, 3-(2-methoxyphenoxy)-.

CAS Number : [93-14-1]

3. Hazards Identifications :

a. Emergency Overview : Remove from exposure. Remove contaminated clothing. Persons developing serious hypersensitivity reactions must receive immediate medical attention. Upon eye or skin contact flush affected area with copious quantities of water, obtain medical attention.

b. Potential Health Effects :

1. Inhalation : Possible allergic reaction to dust. May cause irritation of respiratory tract.

2. Eye Contact : May cause irritation.

3. Skin Contact : Possible allergic reaction to dust. May cause irritation.

4. Ingestion : Possible allergic reaction to dust. May cause irritation.

c. Overview : Promptly consult physician.

Adverse effects : Gastrointestinal discomfort and drowsiness have been reported. Very large doses cause nausea and vomiting. May be irritating to mucous membrane and respiratory tract.

4. First Aid Measures :

a. Inhalation : Avoid inhalation, remove to fresh air.

b. Eye Contact : Flush with copious quantities of water.

c. Skin Contact : Flush with copious quantities of water.

d. Ingestion : Consume copious quantities of water.

SYNTHOKEM LABS PRIVATE LIMITED

5. Fire Fighting Measures :

Extinguishing media : Spray water, Carbon dioxide, dry chemical powder. Wear self-containing breathing apparatus and protective clothing to prevent contact with skin and eyes.

6. Accidental Release Measures :

General : Wear respiratory and chemically compatible gloves. Sweep up spillage. Avoid raising dust. Place spillage in appropriate container for waste disposal. Wash contaminated clothing before re-use. Ventilate spill area and wash spill site thoroughly with water after picking of material is complete.

7. Handling and Storage :

Handling : Wear protective clothing.

Storage : Store in tight, light resistant containers.

8. Exposure Controls / Personal Protection :

Wear approved respiratory and chemically compatible gloves, safety goggles, other protective clothing. Wash thoroughly after handling. Wash contaminated clothing before re-use.

9. Physical and Chemical Properties :

Appearance : White or almost white crystalline powder.

Solubility : Sparingly soluble in water. Soluble in alcohol.

Melting Point : 79°C - 83°C.

10. Stability and Reactivity :

Stability : Stable in the normal conditions of storage.

Hazardous combustion or decomposition products : CO_x. Hazardous polymerisation will not occur.

SYNTHOKEM LABS PRIVATE LIMITED

11. Toxicological Information :

RTECS No : TY8400000
LD50 (oral-rat) : 1510 mg/kg.

12. Ecological Information :

Data not available.

13. Disposal Considerations :

Ensure disposal in compliance with all applicable Federal, State and Local Laws.

14. Transport Information :

Transport in close fiberboard drums/ HDPE containers.

INTERNATIONAL REGULATIONS :

Land :

- Rail / Road (RID/ADR) : Not restricted.

Sea (IMO/IMDG) : Not restricted.

Air (ICAO-IATA) : Not restricted.

15. Regulatory Information :

EINECS No : 202-222-5
Xn, R22, S36.

16. Other information :

Bibliographic data : Not applicable
Data sheet released by : Manager -QA

SYNTHOKEM LABS PRIVATE LIMITED

2.1 DESCRIPTION OF THE MANUFACTURING METHOD :

Guaifenesin is manufactured in four stage process.

STAGE - I :

Pyrocatechol reacts with dimethyl sulphate and sodium carbonate in toluene media gives guaiacol. Which on reaction with sodium hydroxide gives sodium guaiacolate.

STAGE - II :

Epichlorohydrin reacts with water in presence of phosphoric acid gives Glycerol Mono chloro hydrin.

STAGE - III :

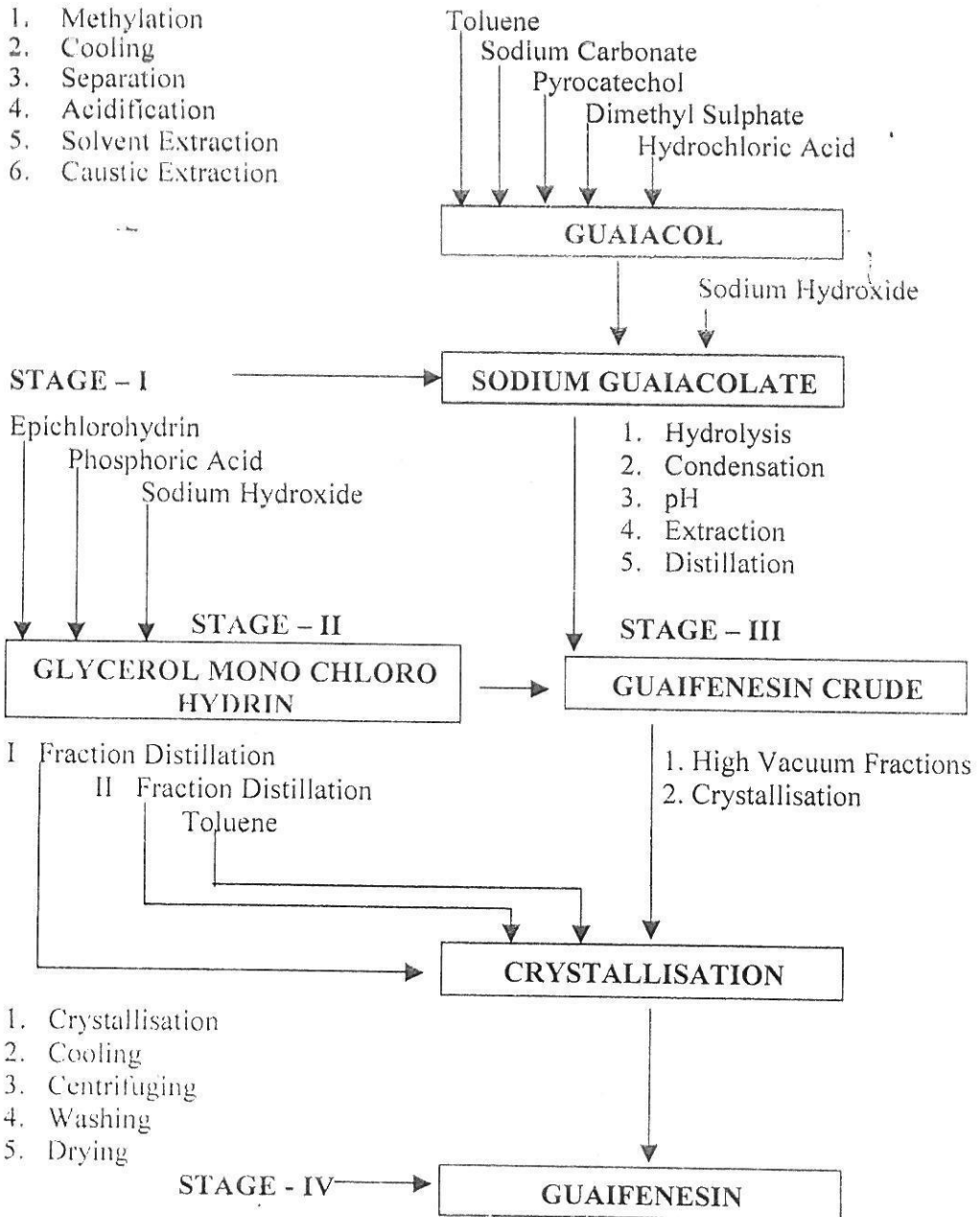
Stage - I and Stage - II reacts at 100°C gives Guaifenesin crude, which is extracted, washed and distilled under vacuum gives Guaifenesin technical.

STAGE - IV :

Guaifenesin technical on crystallization in toluene gives pharma grade Guaifenesin.

SYNTHOKEM LABS PRIVATE LIMITED

2.2 PROCESS FLOW CHART :



P II SLOŽENÍ PRODUKTU NOVO-PASSIT

TEVA Czech Industries s.r.o
Effective Date: 01-Sep-2011

QDP0015978

Version 1.0
Effective

Název dokumentu \ Title: Novo-passit, 200 mg, coated tablets		Ozn. dokum. \ User refer. : PC\PQC
Typ dokumentu \ Type : Description and composition	Název produktu \ Product : Novo-passit, 200 mg, coated tablets	Kap. \ Chap. CTD: 3.2.P.1

Nahrazený dokument \ Supersedes : PC\PQC\010\V1 - A

Zdrojový dokument \ Source document : ZŘ 6342/10

Autor \ Author: Jitka Zicháčková

3.2.P.1 COMPOSITION OF THE DRUG PRODUCT

Novo-passit, 200 mg, coated tablets

Composition of 1 coated tablet:

Latin names	English names	Quantity	Quality
**Novo-Passit Extractum Siccum	-----	157.5 mg	QDS0009727*
Guaifenesinum	Guaifenesin	200.0 mg	Ph. Eur.*
Silica praecipitata	Silicon dioxide	2.0 mg	NF *
Cellulosum Microcristallinum	Microcrystalline Cellulose	96.0 mg	Ph. Eur.*
Glyceroli Tribhenas	Glyceryl Tribhenate	10.0 mg	NF*
Magnesii Stearas	Magnesium Stearate	10.0 mg	Ph. Eur.*
Lactosum Monohydricum (Fast Flo)	Lactose Monohydrate (Fast Flo)	ad 800.0 mg	Ph. Eur.*
Viride Opadry AMB 80W31115	Opadry AMB 80W31115 (Green)	24.0 mg	SS\QC\37601*

**the current versions of pharmacopoeia and internal specifications*

Název dokumentu \ Title: Novo-passit, 200 mg, coated tablets		Ozn. dokum. \ User refer. : PC\PQC
Typ dokumentu \ Type : Description and composition	Název produktu \ Product : Novo-passit, 200 mg, coated tablets	Kap. \ Chap. CTD: 3.2.P.1

****Composition of Novo-passit extract dry:**

Latin names	English names	Quality
Sambusi flos	Elder flower	SS-47012*
Crataegi folium cum flore	Hawthorn leaf and flower	SS-47014*
Hyperici herba	Hypericum herb (St. John's wort)	SS-47019*
Melissae herba	Melissa herb (Lemon balm top)	SS-47020*
Passiflorae herba	Passion flower	SS-47021*
Lupuli flos	Hop strobile	SS-47025*
Valerianae radix	Valerian root	SS-47040*
Ethanolum 96% (V/V)	Ethanol 96 per cent V/V	Ph. Eur.*
Aqua purificata	Purified water	Ph. Eur.*
Silica praecipitata	Silicon dioxide	NF*